

博士論文

婦人科悪性腫瘍担癌患者におけるインターロイキン 17 産生性 T 細胞の変動と抗腫瘍薬が PD-L1 を含む免疫関連因子に与える影響、及び PD-L1 とインターロイキン 17 産生誘導因子との関連性についての検討

青墳愛理

婦人科悪性腫瘍担癌患者におけるインターロイキン 17
産生性 T 細胞の変動と抗腫瘍薬が PD-L1 を含む免疫関連
因子に与える影響、及び PD-L1 とインターロイキン 17 産生
誘導因子との関連性についての検討

生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員：藤井 知行

氏名：青墳 愛理

目次

要旨	4
第1章 背景	5
1) 卵巣癌の疫学	
2) インターロイキン 17 産生性 T 細胞	
3) PD-1/PD-L1 経路	
4) シグナル伝達兼転写活性化因子とナイーブ T 細胞からの分化	
5) 抗癌剤と免疫系細胞の関連性	
第2章 本研究の目的	13
第3章 方法	14
1) 被検者と検体	
2) 血清と末梢血単核細胞の準備	
3) 細胞培養と細胞刺激	
4) フローサイトメトリー	
5) RNA 単離と qRT-PCR	
6) 血清中サイトカインの測定	
7) ウェスタンブロット	
8) 免疫組織染色	

9)	抗中球リンパ球比	
10)	解析方法	
第4章	結果	23
1)	婦人科癌担癌患者における Th17 細胞および $\gamma\delta$ T17 細胞の変動	
2)	卵巣癌における IL-17 関連因子と PD-L1 の関係性について	
3)	卵巣癌における抗癌剤と PD-L1 および IL-17 との関係性	
第5章	考察	47
第6章	結論	54
謝辞		55
参考文献		56

要旨

PD-1/PD-L1 (programmed cell death 1/ programmed death 1 ligand 1) 経路を標的とした治療は癌の免疫治療において画期的な成功を示し始めている。IL-17 は、最近担癌患者でも上昇することが確認されてきた。卵巣癌を主とした婦人科癌担癌患者 52 人と健常者 18 人を対象として IL-17 産生性 T 細胞の変動を調査し、IL-17 の変化と PD-L1 の発現との関連性を検討した。これらの結果は卵巣癌において、IL-17 の上昇が PD-L1 の発現に影響を与え、PD-1/PD-L1 経路阻害剤の有効適応のバイオマーカーや予後不良の予測因子ともなりうることを示唆した。

第一章 背景

1) 婦人科癌の疫学

日本において子宮体癌・子宮頸癌に罹患する女性は年間 1 万人以上おり、2014 年には初めて卵巣癌罹患数も 1 万人を超えたことが報告され、年々罹患数が増加している¹。同年の人口 10 万人に対しての罹患率は子宮体癌で 15.7 人、子宮頸癌で 13.3 人、卵巣癌で 11.2 人であり、死亡率（人口 10 万人対）は子宮体癌・子宮頸癌が 3.5 人・4.5 人に対し、卵巣癌は 7.5 人であった¹。卵巣癌は初期に無症状で経過するため、早期発見が困難となる。このため、治療時の進行期分布をみると 62%が FIGO（International Federation of Gynecology and Obstetrics）分類のⅡ期以上の進行癌症例であり、約 80%の症例で化学療法による治療が必要となってくる²。しかしながら、再発までの無治療期間が半年に満たない白金製剤抵抗性卵巣癌では抗癌剤の奏効率 10%未満であり、再発までの無治療期間が半年から 12 か月の群でも奏効率は 30%ほどである³。がん生存率の推移に関するグローバルサーベイランス（卵巣癌では 61 カ国、865,501 症例）の報告でも、2010 年から 2014 年の間の 5 年生存率は 60 か国で 50%に満たなかった⁴。

2) インターロイキン 17 産生性 T 細胞

インターロイキン（IL）17 は炎症性サイトカインの一つであり、インターフ

ェロン γ (IFN- γ) を産出するヘルパーT 細胞 (Th1) や IL-4 産生性ヘルパーT 細胞 (Th2) とは異なる CD4 陽性ヘルパーT 細胞から産生されることが知られている⁵。IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞 (Th17 細胞) は、ナイーブ T 細胞が IL-6 やトランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor β : TGF- β) に刺激されることで、ナイーブ T 細胞から分化する⁶。

IL-17 は IL-17A から IL-17F までサイトカインファミリーを形成する。炎症性サイトカインとして、リウマチ性関節炎や多発性硬化症、炎症性腸疾患、喘息などの自己免疫系疾患で上昇が認められている⁷一方で、細菌感染に対する宿主防御においても重要な役割を果たしている。具体的には、好中球やマクロファージを活性化し、単球の分化を促進して^{8,9}、病原体に対する宿主防御に寄与している。IL-17A は主に Th17 細胞によって産生され¹⁰、後に述べる $\gamma\delta$ T 細胞からも産生されている^{11,12}。ヒト常在菌である *Bacteroides fragilis* を接種したマウスにおいて、IL-17A・B 依存的に腫瘍形成を促進することも報告されている^{7,10,13}。

Th17 細胞の発現に関与する因子には IL-6 や TGF- β などの誘導因子の他に、IL-23 および IL-27、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体- γ t (ROR- γ t) などの因子が挙げられ、いずれも Th17 細胞を誘導・維持するために重要な因子である。まず、IL-6 と TGF- β がシグナル伝達兼転写活性化因子 3 (signal transducer

and activator of transcription 3 : STAT3) のリン酸化を促し、次にリン酸化 STAT3 (pSTAT3) がナイーブ T 細胞を Th17 細胞へ分化・誘導する転写因子である ROR- γ t を発現させる。そして、ROR- γ t が Th17 細胞の細胞上に、IL-23 受容体を産生させる。IL-23 は Th17 細胞の維持と増殖に重要な役割を担う。また、Th17 細胞からは IL-17 の他に、炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor-alpha : TNF α) も産生されている⁶ (図 1)。

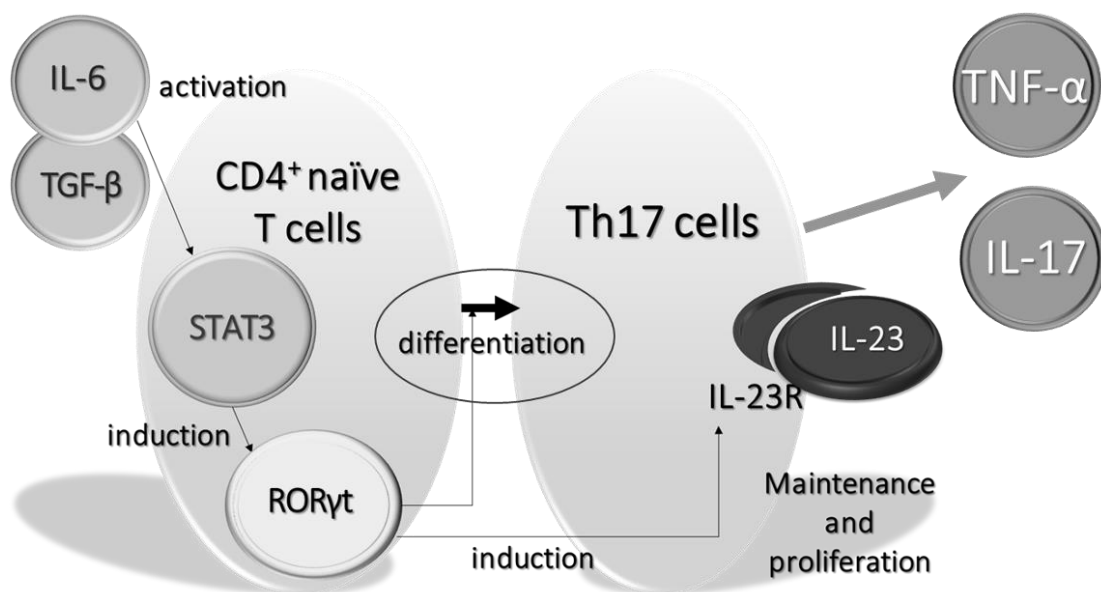


図 1 : ナイーブ T 細胞から Th17 への分化

IL-6 と TGF- β がともになければナイーブ T 細胞は Th17 細胞への分化に至らない。STAT3 のリン酸化を受けた ROR- γ t が IL-23 受容体を発現させる。IL-23 は Th17 細胞の維持に必要である。また、Th17 細胞からは IL-17 が産生される他に、TNF- α も産生される。

Th17 細胞以外に IL-17 を産生する T 細胞として、IL-17 産生 γ δ T 細胞が挙げら

れる ($\gamma\delta$ T17)。 $\gamma\delta$ T 細胞は結核菌による肺感染症で最初に報告され¹⁴、現在では感染に対する宿主防御の役割を果たすことが知られている。 $\gamma\delta$ T 細胞は $\alpha\beta$ T 細胞と同じリンパ球前駆細胞から分化するが、 $\alpha\beta$ 細胞に比べて早期に胸腺で分化する^{15,16}。また、 $\gamma\delta$ T 細胞はヒト白血球抗原 (HLA : Human Leucocyte Antigen) 分子および抗原提示細胞とは無関係に非ペプチド抗原を認識する¹⁷。HLA を介さないことにより、素早い抗原への攻撃が可能となっており、例えば *Candida albicans* の全身感染症マウスモデルでは $\gamma\delta$ T17 細胞によって産生された IL-17 が、好中球を集合させて感染初期防御に働くことが認められている¹⁸。

IL-17 や Th17 の発現は、卵巣癌を含む様々な担癌患者で確認されているが¹⁹⁻²²、その詳細な役割についてはまだ議論が続いている²³。後で述べるように、担癌患者では免疫システムが通常と異なる働きをするが、通常は主要組織適合遺伝子複合体上に発現された抗原を T 細胞受容体が認識することで T 細胞が活性化する。しかし、担癌患者では T 細胞応答がもう一つの経路を示すことがあり、抗原と T 細胞上の共刺激・共阻害分子の結合によって働きを変化させる。例えば、T 細胞に発現している共刺激分子 CD28 が抗原を認識すると T 細胞活性化を引き起こし、共阻害分子の T 細胞補助受容体 CTLA-4 が抗原を認識すると T 細胞活性は抑制される²⁴。このように担癌患者では T 細胞に発現する共分子によって、T

細胞の活性と抑制が制御されている。

3) PD-1/PD-L1 経路

T 細胞の共分子経路の一つである PD-1 (programmed cell death 1) /PD-L1 (programmed cell death 1 ligand 1) 経路は、腫瘍に対する T 細胞活性を阻害する。癌細胞に対する T 細胞活性が阻害されるため、癌組織への宿主からの攻撃がなされないことになる。このことから、PD-1/PD-L1 シグナル伝達を標的とした PD-1/PD-L1 阻害剤は、抗腫瘍薬として注目を集めており、既にメラノーマや非小細胞性肺癌、腎細胞癌において抗腫瘍効果をもたらすことが報告されている²⁵。しかしながら、PD-1/PD-L1 阻害剤が良好な治療効果をもたらすか否かは阻害剤を使用して初めて判明する。すなわち、阻害剤を使用することで良好な結果をもたらすと判断できるバイオマーカーが未だ特定されていない。PD-L1 の発現条件として、IFN- γ 存在下などの炎症環境下で高度に発現することが知られているが²⁶、その他に、主要な炎症誘発性サイトカインである IL-6 によって活性化する STAT3 シグナル伝達を介して発現すること^{27,28}や、結腸癌および乳癌の細胞実験において、炎症性サイトカイン IL-17 とともに PD-L1 発現に関連を持つことが報告されている²⁹。また、PD-L1 の発現は腫瘍細胞でも認められることが近年報告されている³⁰。

4) シグナル伝達兼転写活性化因子とナイーブ T 細胞からの分化

シグナル伝達兼転写活性化因子 (signal transducer and activator of transcription : STAT) は、サイトカインからのシグナルを細胞内に導入するための転写因子であり、チロシンキナーゼによりリン酸化されると、核内に移行して転写を開始させる。STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5、STAT6 の存在が確認されており、その中で STAT1 と STAT3、STAT5 がナイーブ T 細胞から各 T 細胞への分化に関与している。ナイーブ T 細胞から分化する T 細胞の一つに、末梢性の免疫寛容を維持する働きの制御性 T 細胞 (Regulatory T cells : Treg) がある。末梢性の免疫環境において、Treg 細胞の発生と維持に不可欠な細胞核内因子 Foxp3 は、STAT5 依存性に TGF- β および IL-2 によって誘導されることが知られている³¹⁻³³ が、同時に STAT3 依存性のメカニズムも介している。つまり、Foxp3 プロモーターには STAT3 結合領域も含まれており、炎症や腫瘍などの IL-6 存在下では、STAT3 依存性に Foxp3 の発現を減衰させる³¹。

先述の通り、Th17 細胞はナイーブ T 細胞から IL-6 と TGF- β の存在下で分化するが、その分化には STAT3 の働きが必須である。ナイーブ T 細胞が Treg 細胞に分化するか、Th17 細胞に分化するかは STAT3 と STAT5 のバランスにより決定されている³⁴⁻³⁶ (図 2)。つまり、ナイーブ T 細胞は STAT5 の発現が増加し、STAT3 の発現が抑制されている環境では Treg 細胞に分化する傾向がある。重要

な点は、IL-6の存在が、STAT3とSTAT5のバランスを変化させ、ナイーブT細胞のTreg細胞への分化を抑制し、Th17細胞への分化を促進する点である。これまでに、健常者に比べ、卵巣癌患者の末梢血でTreg細胞が高いことが報告されている³⁷。

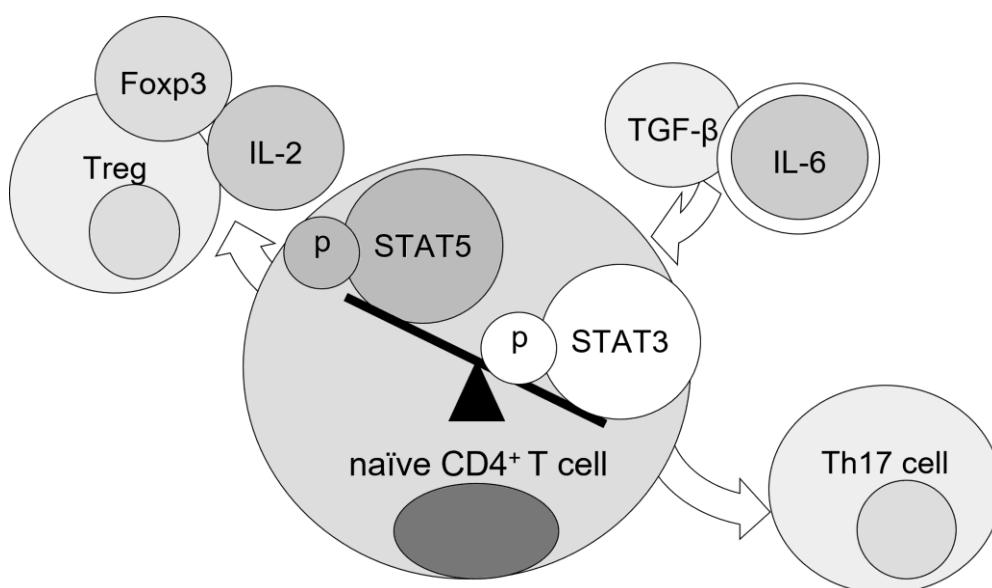


図2：TregとTh17細胞の関連性。ナイーブT細胞が制御性T細胞（Treg）に分化するか、Th17細胞に分化するかはSTAT5とSTAT3のリン酸化のバランスによって決定されている。IL-6の存在下ではナイーブT細胞はTh17細胞に分化する。

5) 抗癌剤と免疫系細胞の関連性

抗癌剤が癌細胞に及ぼす影響について、免疫関連因子に着目すると、抗癌剤投与後の幾つかの癌細胞で免疫関連因子が増加していることが報告されている。

具体的には、抗癌剤投与後のメラノーマ担癌患者の腫瘍組織でTGF- β やIL-10の増加が免疫染色検査にて認められ³⁸、卵巣癌ではNF- κ B (nuclear factor-kappa B)の発現が同様に免疫染色で報告されている³⁹。抗癌剤の働きは薬剤により異なる

が、DNA や微小管を標的として細胞障害を起こす働きと、特定の分子に作用して癌細胞の増殖を抑制する働きとに大別される。これらの癌細胞における働きが、どのように免疫系因子に作用しているかは明らかになっていない。

第2章 本研究の目的

本研究では婦人科腫瘍担癌患者において IL-17 及び IL-17 産生性 T 細胞関連因子が、炎症による免疫応答の変化を通じて、PD-L1 の発現に何かしらの関与をしていると仮定し、PD-L1 の発現を予測するバイオマーカーを明らかとすることで、PD-1/PD-L1 阻害剤の治療効果を向上させる知見を得ることを目的とした。

実験は、婦人科癌、特に卵巣癌における IL-17 の発現及び IL-17 産生性細胞の変化を、被検者の末梢血を用いて調査し、健常者との比較および各々の IL-17 関連因子と PD-L1 の関連性についての検討、組織型別での比較を行った。また、担癌患者の腫瘍組織で IL-17 と PD-L1 の発現状態を免疫染色検査により観察し、抗癌剤使用の有無での比較を行った。細胞実験では、卵巣癌細胞を用いて IL-17 と PD-L1 発現因子との関連性をウェスタンブロット法や ELISA により観察し、関連性を検討した。さらに担癌患者の好中球/リンパ球比と IL-17 産生性細胞、IL-17 関連因子に相関関係があるかを検討した。

第3章 研究材料及び研究方法

1) 被検者と検体

東京大学医学部附属病院で治療中の、婦人科悪性腫瘍に罹患した 52 人の患者を対象とした。全患者において、当該施設の倫理委員会から承認を得た（承認番号 G0683-17）。患者の内訳として、卵巣癌（N = 30）、子宮体癌（N = 12）、子宮頸癌（N = 10）であった。卵巣癌患者の病理組織学的分類は、漿液性癌（N = 17）、粘液性癌（N = 3）、類内膜性癌（N = 6）、および明細胞癌（N = 4）であり、30 人の卵巣癌患者のうち、21 人（70%）は化学療法を施行しておらず、すべての患者が放射線療法未施行であった。患者は FIGO 分類で I 期（N = 6）、II 期（N = 2）、III 期（N = 5）、および IV 期（N = 17）に分類された。すべての対象者から末梢血および腫瘍検体を得た。また、正常対照群として、24～79 歳（平均年齢 = 50 歳、N = 18）の健常女性が、研究内容を踏まえた上で自発的に末梢血を検体として提供し、被検者全員からインフォームドコンセントを得た。正常対照群は、内膜症性疾患・自己免疫性疾患を以前に指摘されたことがない者を対象とした。被検者と検体の特徴を表 1 に示した。

被検者内訳	分類	(n)
	健常者	18
	卵巣癌患者	30
	子宮体癌患者	12
	子宮頸癌患者	10
卵巣癌患者の内訳 (n=30)	年齢	(中央/幅)
		50 /24-79
	組織型	(n)
	漿液性癌	17
	粘液性癌	3
	類内膜性癌	6
	明細胞癌	4
	抗癌剤使用	(n)
	有 (漿液性 6 人、粘液性・ 類内膜性・明細胞癌 各 1 人)	9
	無	21
	病期	(n)
	I	6
	II	2
III	5	
IV	17	

表 1 婦人科癌患者と健常群の対象人数 (表上) および卵巣癌患者における年齢、病理組織型、化学療法の有無、病期別の内訳 (表下)

2) 血清と末梢血単核細胞の準備

末梢血 (20 mL) を被検者と健常者から採取して二等分し、片方を ELISA によ

るサイトカイン分析に用いるため、遠心分離器で血清を分離したのちに速やかに-80度で保存した。また、PBMCはFicoll Hypaque液（Sigma-Aldrich、米国、ミズーリ州）²³を使用して分離し、RNAの抽出と細胞刺激に備えて同様に-80度で保存した。

3) 細胞培養と細胞刺激

OVSAHO ヒト漿液性卵巣癌細胞株および MCAS 粘液性卵巣癌細胞株は、日本組織培養学会品質管理等普及委員会（日本、大阪）から購入した。また、ヒト子宮頸癌細胞株 SiHa（HPV16 陽性）、HeLa（HPV18 陽性）および CaSki（HPV16 陽性）は、ATCC（米国、バージニア州）から購入した。OVSAHO 細胞は、10%（v/v）ウシ胎児血清（FBS; Thermo Fisher Scientific）および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI-1640（Thermo Fisher Scientific、米国、マサチューセッツ州）の培地で培養した。MCAS 細胞および SiHa 細胞、HeLa 細胞、CaSki 細胞は、10%FBS および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM（Thermo Fisher Scientific）培地で増殖させた。細胞は、37 度、5%CO₂ の存在下で培養した。細胞を 6 ウェルプレート（2×10⁵ 細胞/ウェル）または 10 cm プレート（2.0×10⁶ 細胞/ウェル）に播種し、IL-17A（20 ng / mL; BioLegend、米国、カリフォルニア州、570504）および/または IL-6 抗体（20 ng / mL; Abcam、英国、

ケンブリッジ、ab9324)、NF- κ B 阻害剤 (Bay11-7082; 15 μ M; Santa Cruz Biotechnology、米国、テキサス州)、STAT3 阻害剤 (S31-201; 50、100、および 200 ng / mL; Santa Cruz Biotechnology) を添付し、37 度 CO₂5%の環境下で 4 または 16、24 時間培養し、ELISA、定量的 RT-PCR (qRT-PCR)、またはウェスタンブロットを行った。なお、BAY11-7082 は DMSO (Sigma-Aldrich) 10 mM で溶解した。

4) フローサイトメトリー

PBMC を室温にて解凍・懸濁し、RPMI-1640 液 2mL に Gorgi Stop (2 μ L ; BD バイオサイエンス、米国、ニュージャージー州)、PMA (25 ng / mL; Sigma-Aldrich) およびイオノマイシン (1 μ g/ mL; Sigma-Aldrich) を添加させ、37°C で 4 時間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄し、固定および透過バッファー (Thermo Fisher Scientific)⁸ でインキュベートした後、次の抗体を用いて細胞を標識した。細胞表面標識に FITC 結合 $\gamma\delta$ T 抗体 (アイソタイプ mIgG1; test IO, 米国、カリフォルニア州; IM1571U)、フィコエリスリン結合 CD3 抗体 (アイソタイプ mIgG1; Beckman Coulter, 米国、カリフォルニア州; IM1282) および CD4 抗体 (アイソタイプ mIgG1 κ , PerCP5.5, BD Biosciences; 560650)、細胞内標識に Alexa Fluor 647 結合 IL-17 抗体 (アイソタイプ mIgG1 κ ; BD Biosciences; 560490) を用いた。また、

FACSCalibur™フローサイトメーター (BD Biosciences) を使用して少なくとも 30,000 個の細胞を記録し、分析には Kaluza ソフトウェア (Beckman Coulter) を使用した。

5) RNA 抽出と qRT-PCR

PBMC、OVSAHO および MCAS 細胞、SiHa、HeLa、CaSki 細胞は、それぞれ 3.5μL/ウェルの 98%2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich) および 350μL/ウェルの FARB バッファー (Favorgen、台湾、上海) で溶解し、Blood / Cultured Cell Total RNA Mini キット (Favorgen) を使用して、細胞から total RNA 抽出を行った。プロトコルに従って、5×RT Master Mix (東洋紡、日本、大阪) を使用して cDNA を合成し、qRT-PCR は Light Cycler 480 (Roche、スイス、バーゼル) および SYBR Green I Master Mix (Roche) を使用して 2 連で実行を行った。順方向および逆方向プライマー配列は以下の通りだった。

PD-L1、5'-GGCATTGCTGAACGCAT-3' および 5'-CAATTAGTGCAGCCAGGT-3'

IL-6、5'-ACAAGCCAGAGCTGTGTGCAGATG-3' および

5'-GTGCCCATGCTACATTTGCCGA-3'

TGF-β、5'-GCTGCCTGTGTGACTTTGG-3' および

5'-TCCTGGATTCTAGCACTTCTGG-3'

ROR- γ t、5'-GTGGGGACAAGTCGTCTGG-3' 'および

5'-AGTGCTGGCATCGGTTTCG-3'

IFN- γ 、5'-CGAGGGTTGAATGAGAGCTT-3' 'および

5'-CAGACGGCTGCCTTTATAGC-3'

GAPDH、5'-GAAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' 'および

5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

IL-17、5'-AGAGATATCCCTCTGTGATC-3' 'および

5'-CACCCCAAATTGTCTCAGG-3'

IL-27、5'-GAGCAGCTCCCTGATGTTTC-3' 'および

5'-AGCTGCATCCTCTCCATGTT-3'

TNF- α 、5'-GGCGTGGAGCTGAGAGATAAC-3' 'および

5'-GGTGTGGGTGAGGAGCACAT-3'

IL-23、5'-CAGTTCTGCTTGCAAAGGAT-3' 'および

5'-ATCTGCTGAGTCTCCCAGTG-3'。抗体はすべて Sigma-Aldrich 社より購入し

た。各遺伝子産物は GAPDH との比率を使用して、比較 Ct 法に従って mRNA 発現量を決定した。

6) 血漿中のサイトカイン測定

被検者から採取した血液を用いて、血漿中 IL-17 および IL-23、IL-6 の濃度を ELISA により測定した。IL-17 (Bio-Techne、米国、ミネソタ州)、IL-23 (BioLegend)、IL-6 (Thermo Fisher Scientific) で ELISA キットを購入した。測定方法はそれぞれのプロトコルに従って行った。

7) ウエスタンブロッティング

培養細胞を protease inhibitor cocktail (ナカライ、日本、京都) および PhosSTOP (Roche) を含む溶解液 (Cell Signaling Technology、米国、マサチューセッツ州、#9803) で溶解した後、等量のタンパク質を Any kD Mini-PROTEAN TGX ゲル (Bio-Rad、米国、カリフォルニア州) に分注して電気泳動を行って分離した。転写後に 5% スキムミルクまたは 2.5% BSA にてブロッキングを行い、以下のタンパク質に対する抗体で反応させた。

α -tubulin (クローン TU-02、マウスモノクローナル IgM)、STAT1 (クローン E-23、ウサギポリクローナル IgG) は Santa Cruz Biotechnology 社から購入した。

pSTAT1 (Tyr701、ウサギポリクローナル IgG)、STAT3 (クローン 124H6、マウスモノクローナル IgM)、および pSTAT3 (Tyr705、ウサギポリクローナル IgG) は Cell Signaling Technology から購入した。また、PD-L1 (ウサギモノクローナル IgM、ab205921) は Abcam 社より購入した。タンパク質の発現バンドは ECL

Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences、米国、ニュージャージー州) を使用して検出し、ImageJ ソフトを用いて定量化評価を行った。実験は各 3 回ずつ行った。

8) 免疫組織染色

染色には、PD-L1 抗体 (1 : 250 ; クローン 28-8、Abcam : ab205921) およびポリクローナル IL-17 抗体 (1 : 200、Bioss、米国、マサチューセッツ州 ; bs- 2140R) を使用した。手術で採取された腫瘍検体を用いてスライドを作成し、キシレンによる脱パラフィン化およびエタノールによる水和の後、希釈した universal HIER antigen retrieval reagent 試薬 (pH 6.0、1:10 ; Abcam ; ab208572) を使用して 121°C で 10 分間ベーキングした。内因性ペルオキシダーゼ活性は、室温で 20 分間、0.3% H₂O₂ / メタノールを用いてブロックした。スライドを一次抗体とともに室温で一晩インキュベートし、PD-L1 染色用にウサギ特異的 IHC ポリマー検出キット HRP / DAB (Abcam ; ab209101)、また IL-17 染色用に DAKO EnVisionDako+ system-horseradish peroxidase (HRP)-labelled polymer (Dako、米国、カリフォルニア州、K4003) を二次抗体として、室温で 60 分間結合させた。特異的な抗原抗体反応は、ImmPACT DAB (Vector Laboratories ; SK-4105) で視覚化し、マイヤーヘマトキシリンを対比染色とした。

9) 好中球／リンパ球比 (Neutrophil-to-lymphocyte ratio : NLR)

手術直前の採血結果を用いて、好中球数 (%) をリンパ球数 (%) で除することで好中球／リンパ球比を算出した。

10) 統計方法

検定は、ノンパラメトリック **Mann-Whitney U** 検定を使用して評価した。また、2 群間の相関関係はスピアマンの相関分析を使用した。統計分析は **JMP v.13.2** ソフトウェア (**SAS Institute**、米国、ノースカロライナ州) を使用して実行した。 $P < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

第4章 結果

1) 婦人科癌担癌患者における Th17 細胞および $\gamma\delta$ T17 細胞の変動

婦人科癌担癌患者および健常者から血液検体を収集し、PBMC を分離した後、PMA とイオノマイシンで細胞刺激を行い、Gorgi Stop を加えてから 37°C で 4 時間インキュベートした。まず、フローサイトメトリーで前方散乱光 (Forward Scatter : FS) と側方散乱光 (Side Scatter : SS) でリンパ球を同定し、さらに CD3 陽性となる細胞を T 細胞と同定した (図 3A)。次に、CD3 陽性かつ D4 陽性、IL-17 陽性細胞を Th17 細胞、CD3 陽性かつ $\gamma\delta$ T 陽性、IL-17 陽性であった細胞を $\gamma\delta$ T17 細胞とした (図 3B)。各被験者の PBMC 中の Th17 細胞および $\gamma\delta$ T17 細胞の評価は、それぞれ CD4 陽性細胞中の Th17 細胞占有率と $\gamma\delta$ T 陽性細胞中の $\gamma\delta$ T17 細胞占有率として算出した。

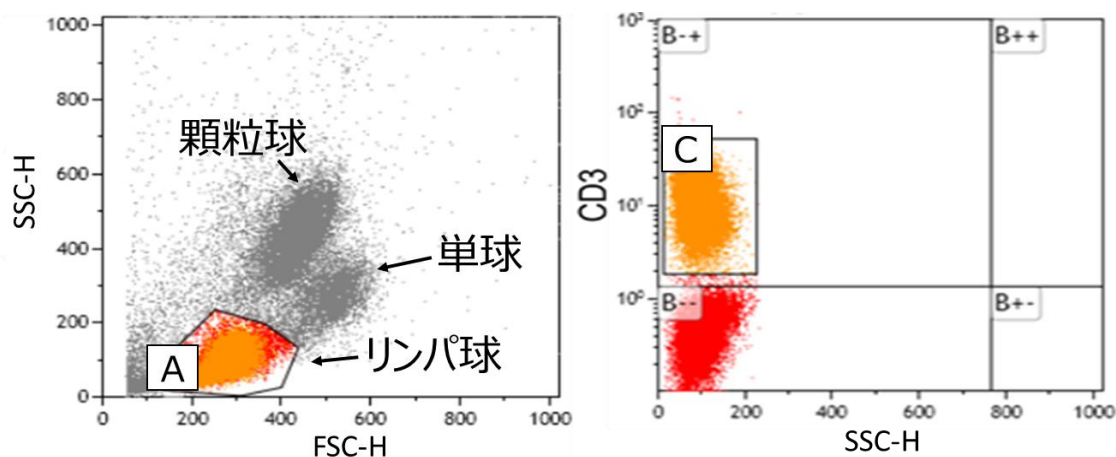


図 3 : フローサイトメトリーの結果

3A:細胞の大きさの目安となる FS と細胞内部の複雑さを反映する SS を用いて、リンパ球分画を示す (A) の部分をゲートし、その中で、CD3 陽性となる細胞 (C) を T 細胞と同定した。

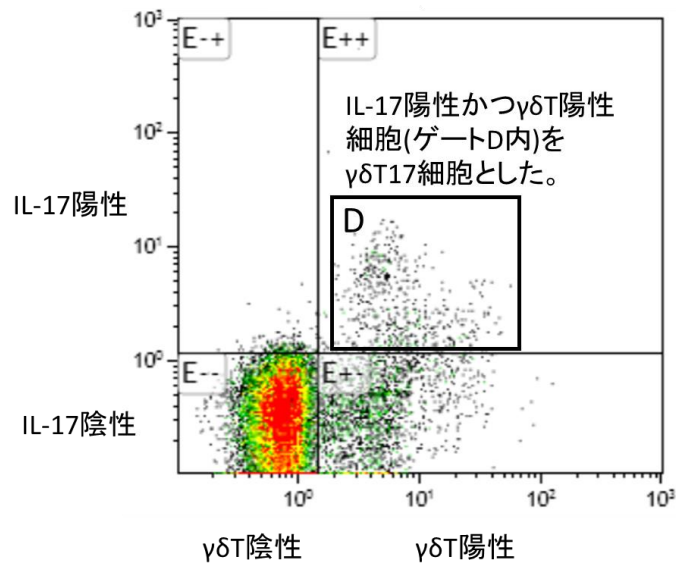
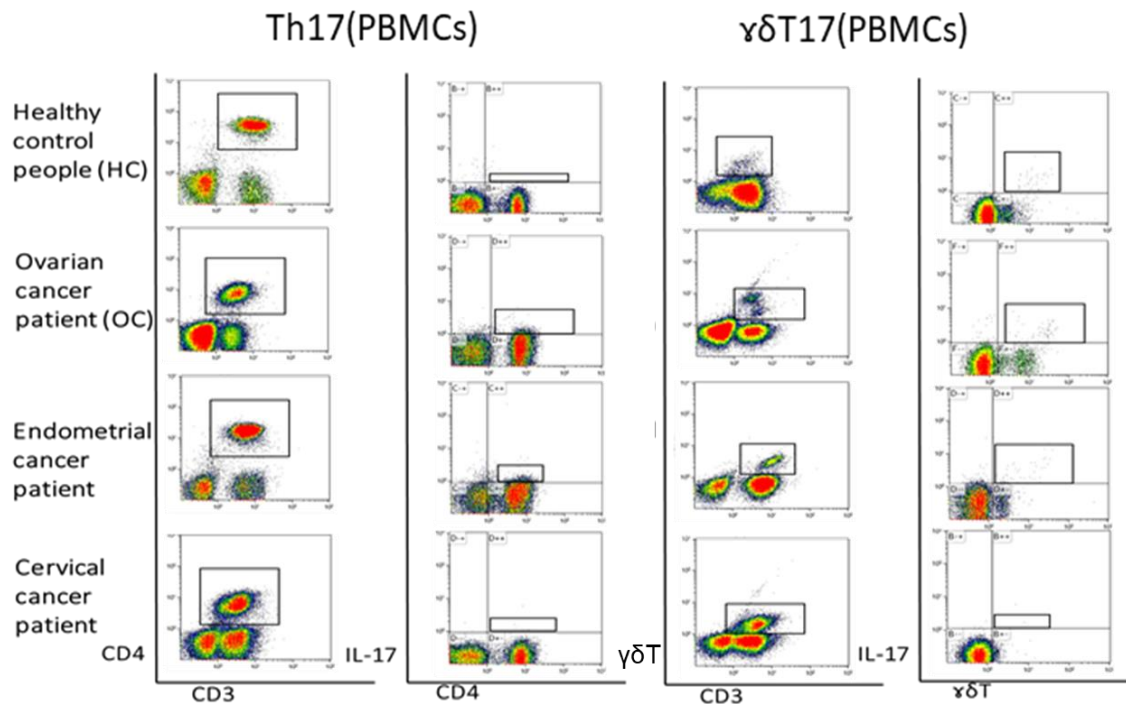


図 3B : CD3 陽性かつ CD4 陽性、さらに IL-17 陽性細胞を Th17 細胞として同定した (上段 : 左 2 列)。また、CD3 陽性かつ $\gamma\delta$ T 陽性細胞の中で、IL-17 陽性であった細胞を $\gamma\delta$ T17 細胞として同定した (上段 : 右 2 列)。下段は卵巣癌患者を一例とした $\gamma\delta$ T17 細胞の同定例。

Th17 細胞および $\gamma\delta$ T17 細胞占有率のどちらも、健常者に比べて卵巣癌患者と

子宮体癌患者で有意に高かった。一方、健常者と子宮頸癌患者の間に有意差は観察されなかった (図 4A)。さらに、卵巣癌患者における Th17 細胞と $\gamma\delta$ T17 細胞占有率に正の相関関係を認めた (図 4B)。

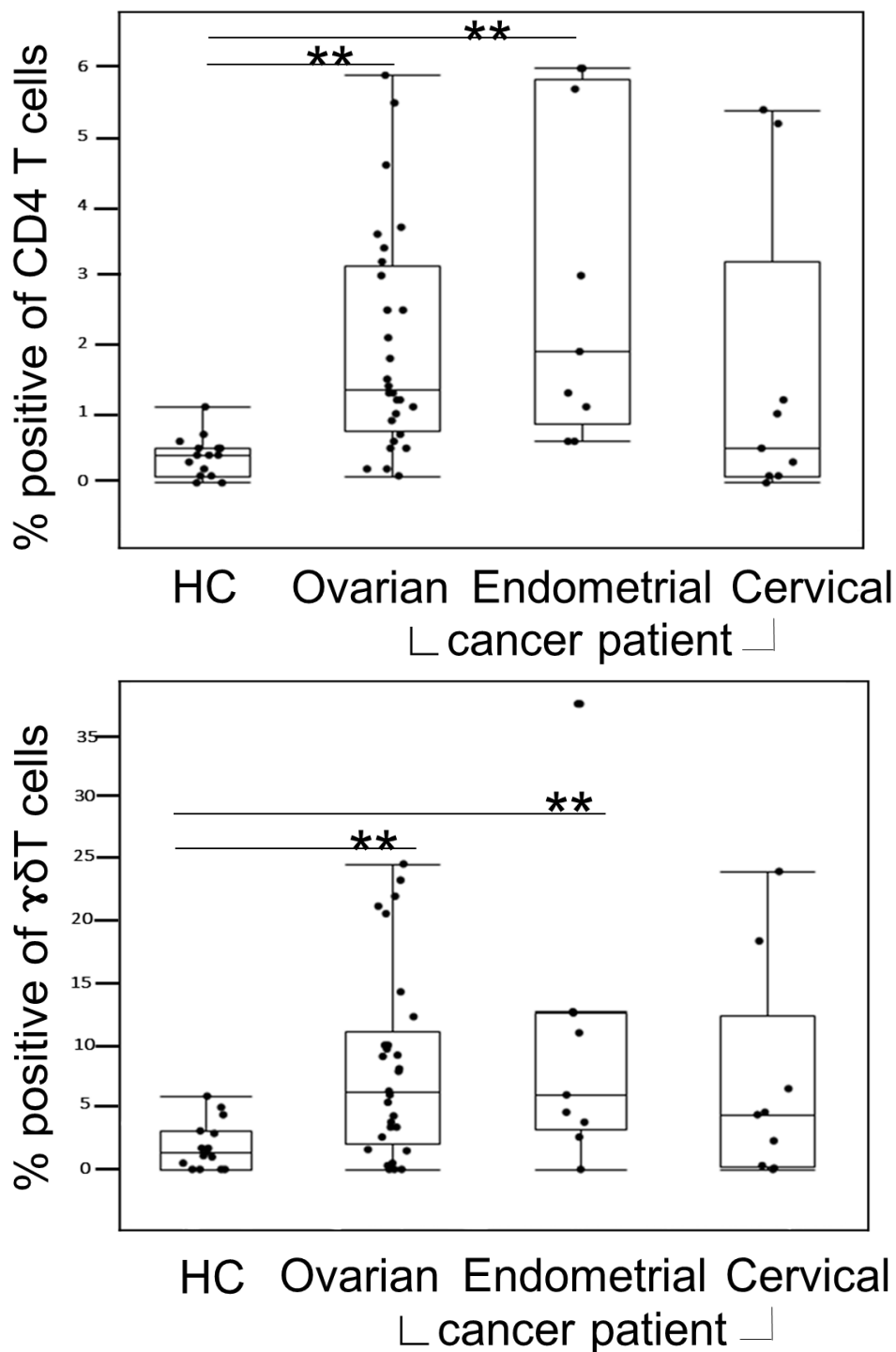


図 4A : PBMC 中における Th17 細胞 (上) と $\gamma\delta$ T17 細胞 (下)。卵巣癌と子宮体癌患者の Th17 細胞と $\gamma\delta$ T17 細胞占有率は、健常群と比較して有意に上昇を認めた。一方、子宮頸癌患者と健常群の間には有意差を認めなかった。各ボックスの中央線は中央値を表し、下限と上限はそれぞれ 5 パーセントイルと 95 パーセントイルを示す。結果は、Mann-Whitney U 検定を使用して分析した。* P < 0.05、** P < 0.01。

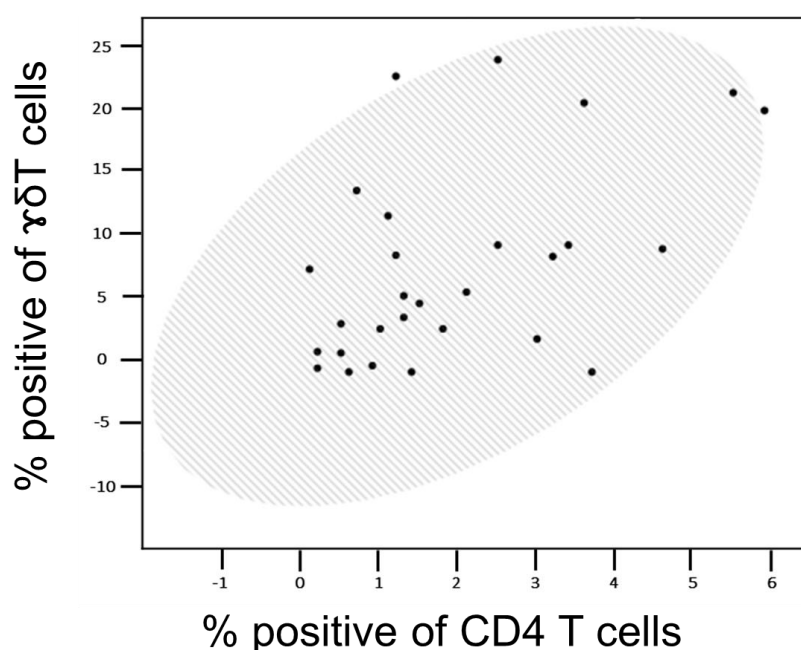


図 4B : 卵巣癌患者の PBMC における Th17 と $\gamma\delta$ T17 占有率の相関関係。データはスピアマン検定を使用して分析し、楕円は 95% の信頼区間を表す ($r = 0.50$ 、 $P = 0.0052$)。

2) 卵巣癌における IL-17 関連因子と PD-L1 の関係性について

2.1) 卵巣癌患者の PBMC 中における Th17 関連性サイトカインの上昇

次に、IL-17 産生性 T 細胞とその関連因子について、卵巣癌に着目した。IL-23、ROR- γ t、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、および IL-17 (ナイーブ T 細胞から Th17 細胞に分化する過程の関連因子) の PBMC 中における mRNA 量を qRT-PCR で分析し

た。これらの関連性を判断するために、PD-L1 転写産物の発現も同様に調べたところ、IL-17 および IL-23 は、健常群と比較して有意に卵巣癌患者で増加を認め (図 5A)、さらに両者には正の相関性を認めた (図 5B)。PD-L1、IL-6、TNF- α および ROR- γ t の mRNA 発現量は、健常群と卵巣癌患者との間で有意差が観察されなかった。

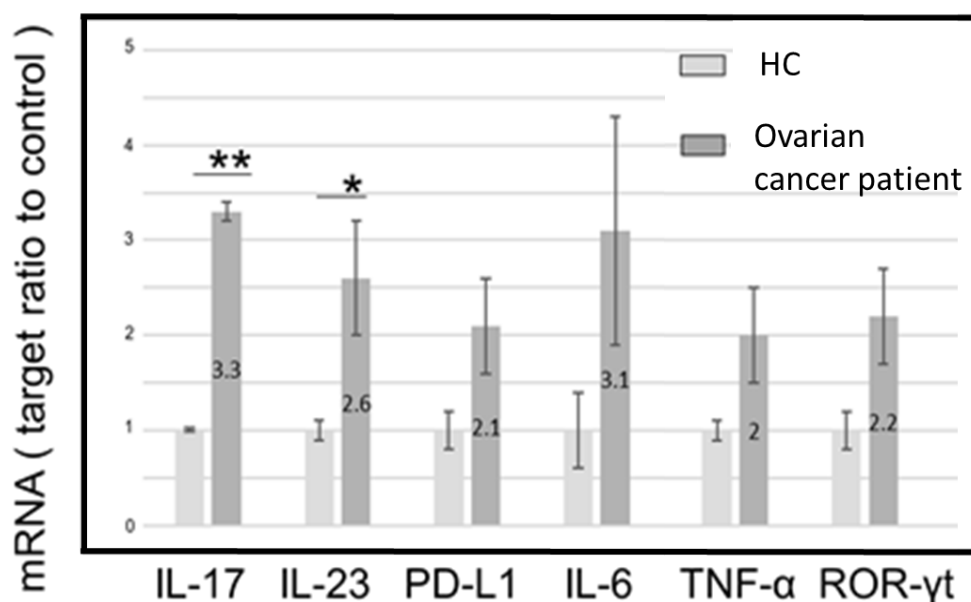


図 5A : PBMC 中の mRNA の発現量。全ての項で左が健常群、右が卵巣癌患者における mRNA の発現量比を表す。* P<0.05、** P<0.01 (マン・ホイットニー検定)。HC (N=18)、Ovarian cancer patient (N=30)

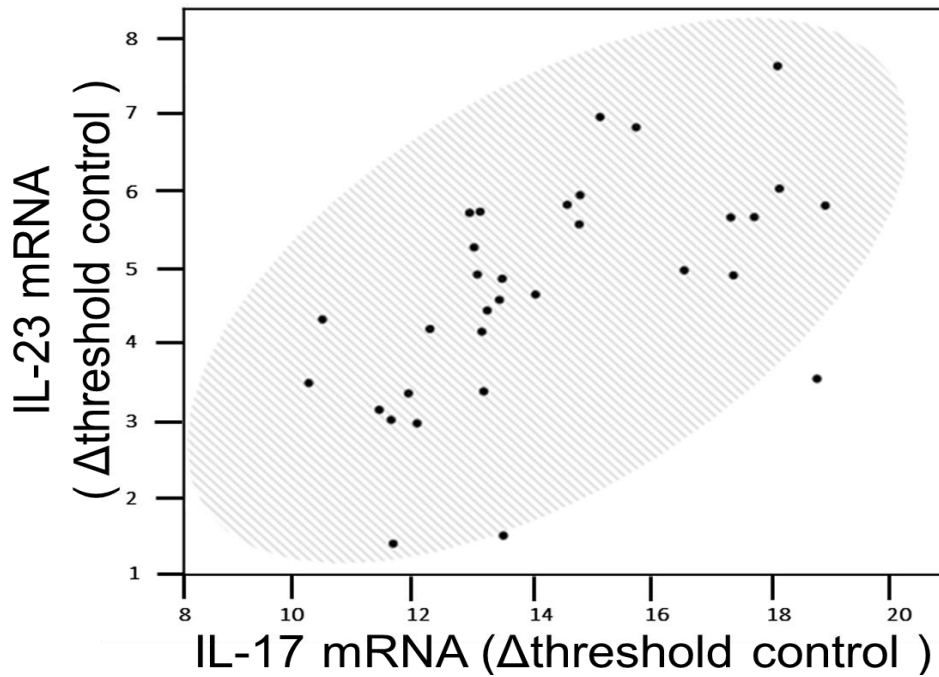


図 5B：卵巣癌患者の PBMC における IL-17 および IL-23 mRNA の発現量間の相関関係。スピアマン検定で $r = 0.64$ 、 $P < 0.0001$ と有意な正の相関関係を示した。影付きの楕円は、95%の信頼区間を表す。

また、IL-17 の mRNA 発現は、IL-17 産生の上流因子にあたる ROR- γ t の mRNA 発現と正の相関を示し、IL-23 の mRNA 発現も、Th17 細胞によって産生される TNF- α の発現と正の相関を示した (図 6)。

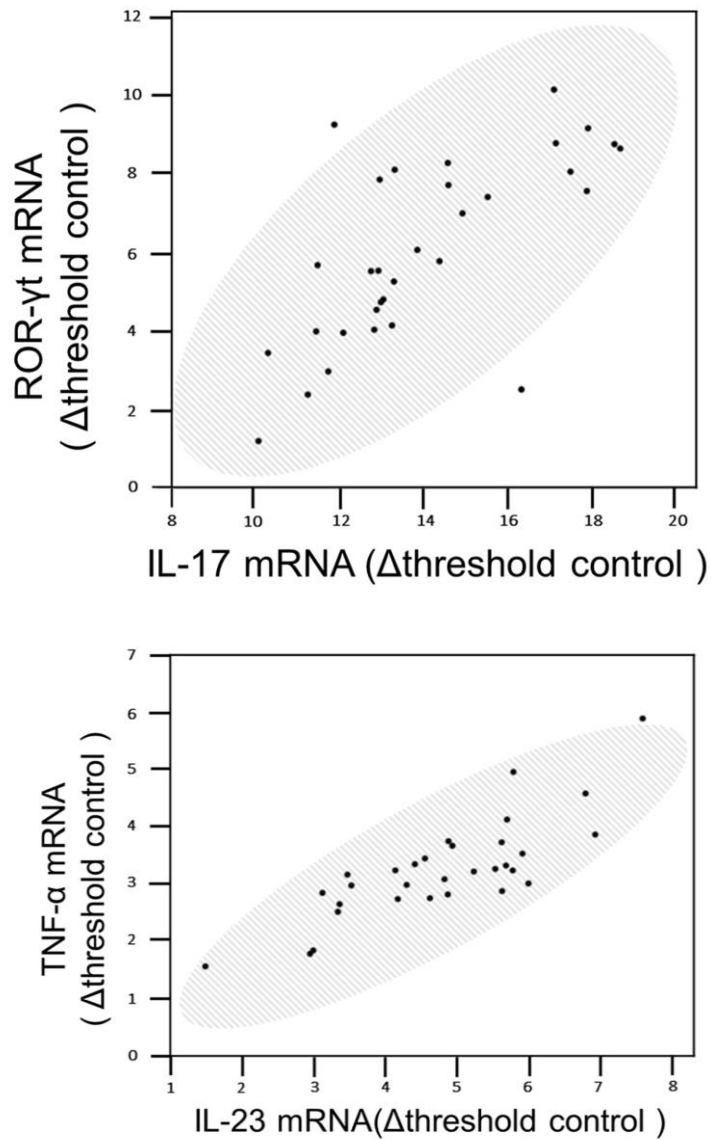


図 6: 卵巣癌患者の PBMC における各因子の相関図。IL-17 と ROR- γ t mRNA、および IL-23 と TNF- α mRNA はそれぞれ有意に正の相関関係を示した (スピアマン検定、左 : $r=0.69$ 、 $P<0.0001$; および右 : $r=0.84$ 、 $P<0.0001$)。

一方、血漿中の IL-17 および IL-23、IL-6 の濃度を ELISA で測定したところ、これらの血漿中濃度は健常群と卵巣癌患者の間に有意差を認めなかった (図 7)。

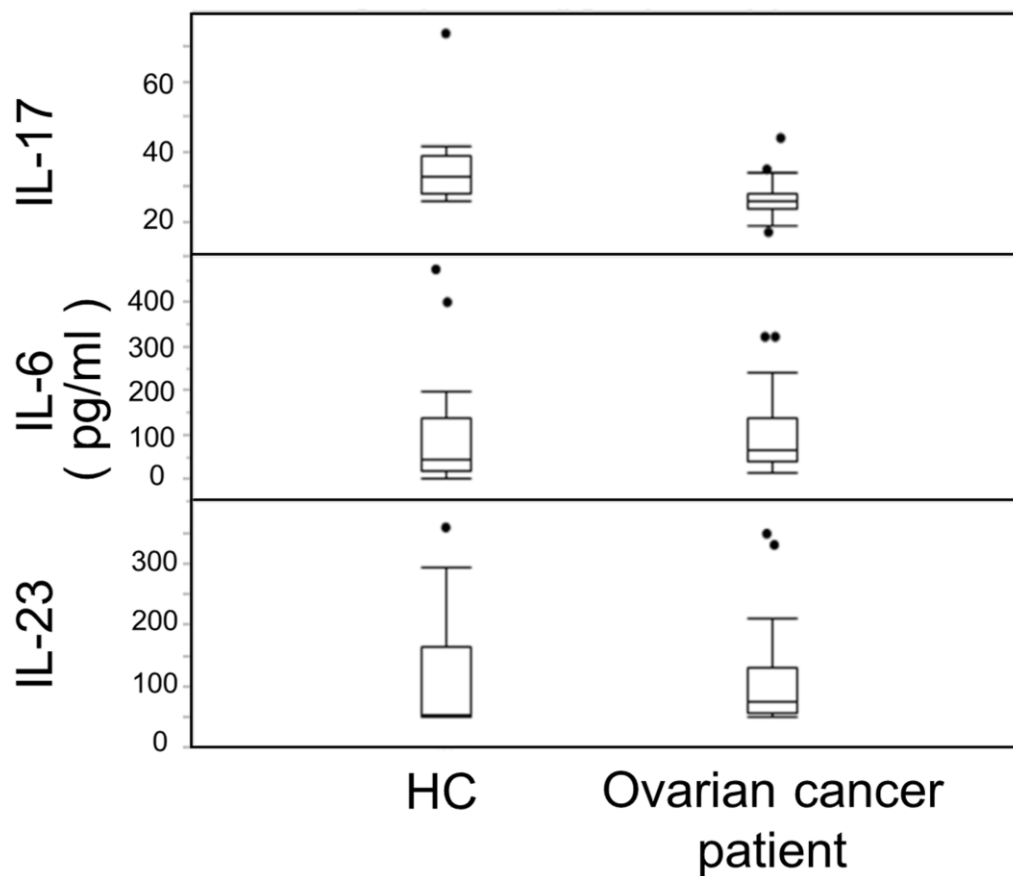


図7：ELISAで測定された健常群（HC）および卵巣癌患者の血漿中IL-17、IL-23およびIL-6のタンパク質量。両者の間に有意な差は認められなかった。黒丸は外れ値を示す。HC（N=18）、Ovarian cancer patient（N=30）

2.2) 粘液性卵巣癌患者のTh17細胞および $\gamma\delta$ T17細胞数の増加

我々は、次に卵巣癌の組織型別（漿液性癌・粘液性癌・類内膜性癌・明細胞癌）にPBMC中のTh17細胞および $\gamma\delta$ T17細胞の変動を調べ、全ての組織型におけるTh17細胞占有率が健常群に比べて有意に増加していることを確認した（図8A）。 $\gamma\delta$ T17細胞占有率は、漿液性および粘液性癌において健常群よりも有意に高く、類内膜性癌および明細胞癌では健常群との間に有意差を認めなかつ

た。さらに、粘液性癌患者の $\gamma\delta$ T17 細胞の占有率は、漿液性癌患者の $\gamma\delta$ T17 細胞の占有率よりも有意に高いことが確認された (図 8B)。

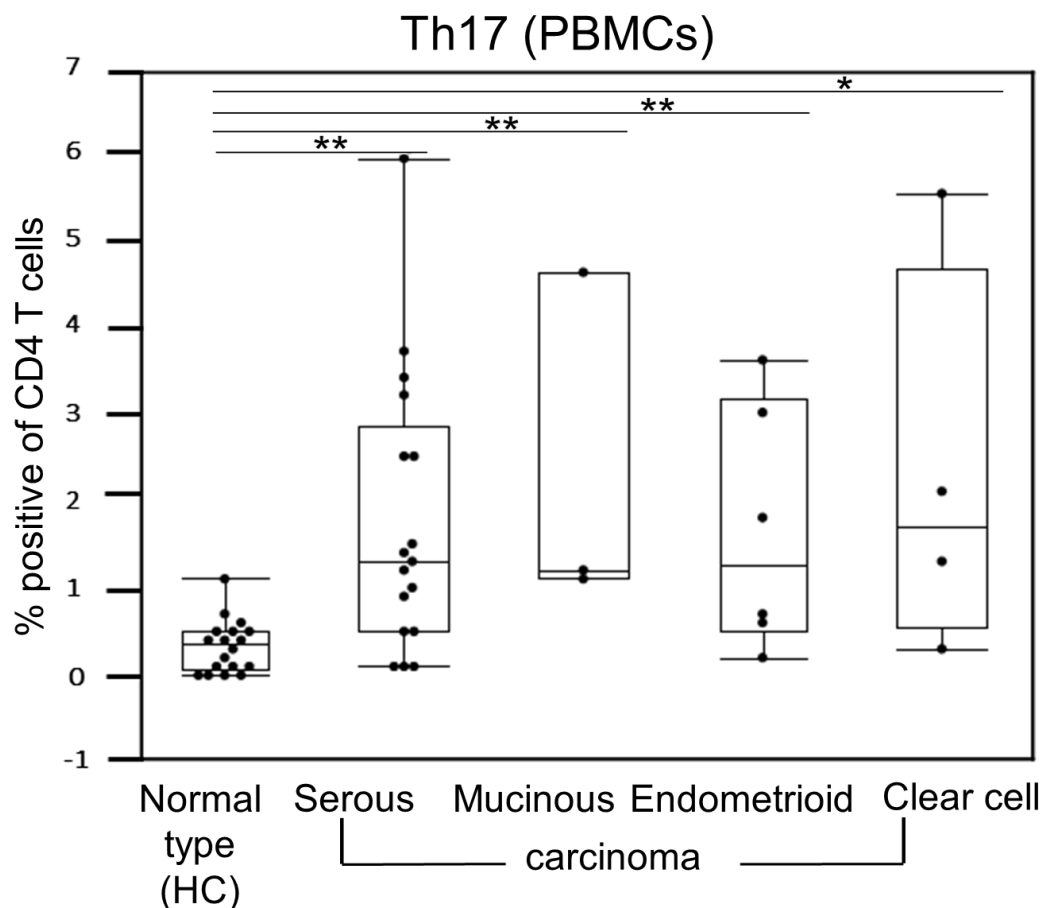


図 8A : 卵巣癌患者の病理組織タイプ別で比較した PBMC における Th17 細胞の占有率。いずれの組織型も健常群に比較して有意に上昇している。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (マン・ホイットニー検定)。Normal type (N=18) , Serous (N=17) ,Mucinous (N=3) , Endometrioid (N=6) , Clear cell (N=4)

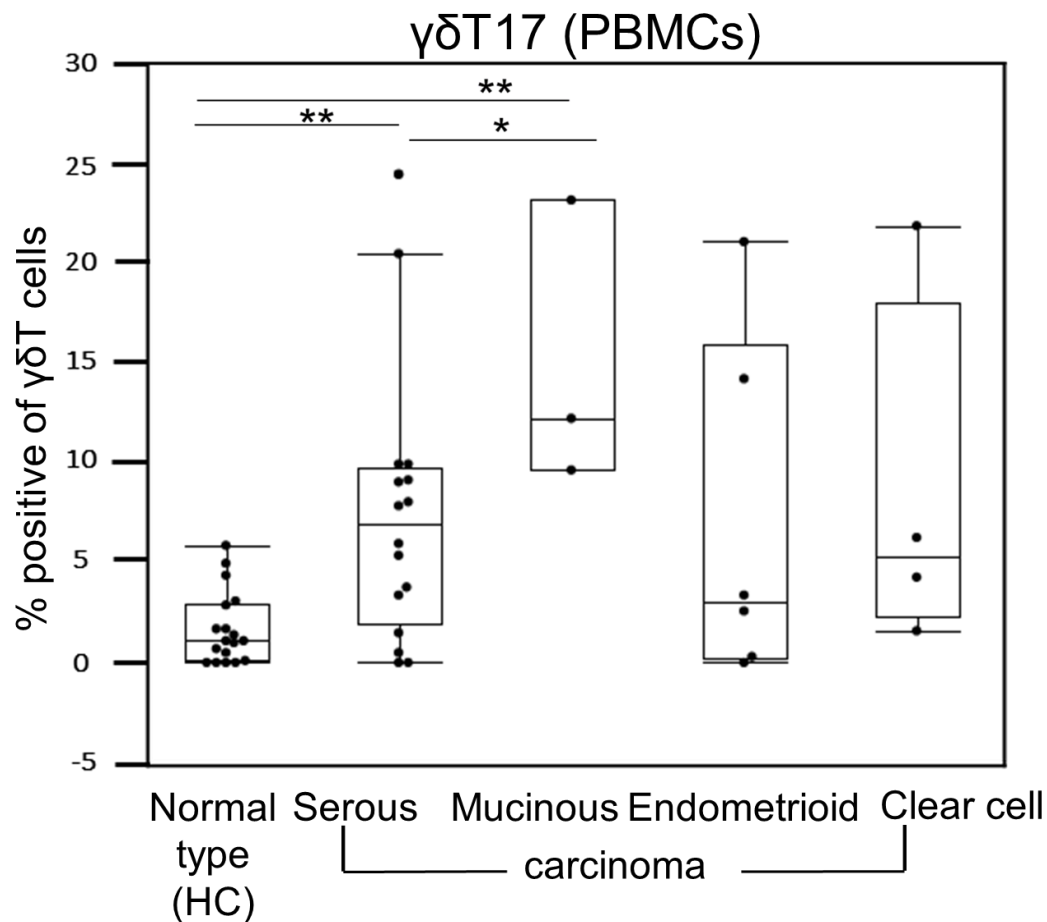


図 8B : 卵巣癌患者の病理組織タイプ別で比較した PBMC における $\gamma\delta$ T17 細胞の占有率。漿液性癌と粘液性癌は健常群に比して有意に上昇を認める。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (マン・ホイットニー検定)。Normal type (N=18), Serous (N=17), Mucinous (N=3), Endometrioid (N=6), Clear cell (N=4)

2.3) 粘液性癌細胞における IL-17A の PD-L1 および IL-6・pSTAT3 の誘導

次に、我々は Th17 細胞、 $\gamma\delta$ T17 細胞の両方で健常群より高発現を認めた漿液性癌と粘液性癌の腫瘍組織で、IL-17A と PD-L1 の発現を観察するために、卵巣癌担癌患者から手術時に採取した腫瘍検体を用い、IL-17A と PD-L1 の免疫組織染色を行った。漿液性癌および粘液性の腫瘍検体ではいずれも IL-17A および

PD-L1 の免疫染色で陽性を認めた (図 9)。

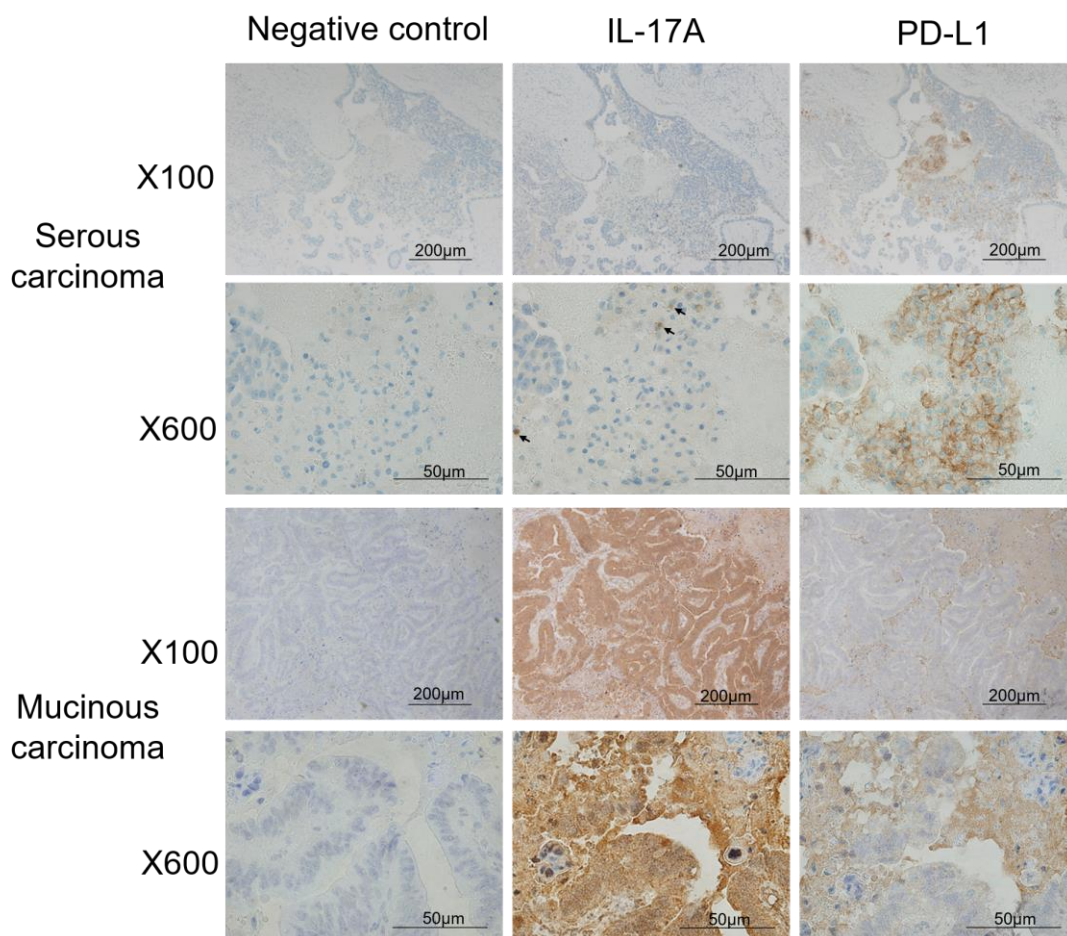


図9: 卵巣癌患者の手術腫瘍標本における IL-17A および PD-L1 の免疫組織染色。漿液性癌 (上 2 段) と粘液性癌 (下 2 段) でそれぞれ弱拡大、強拡大を示した。

これらの結果から、次に IL-17 と PD-L1 の関連性を調査目的とし、細胞実験を行った。漿液性癌の卵巣癌株である OVSAHO と、粘液性癌の卵巣株 MCAS を IL-17A で刺激し、PD-L1 の発現の有無について、刺激から 4 時間後、16 時間後、24 時間後の別に、ウェスタンブロットで観察した。OVSAHO 細胞では、IL-17A は PD-L1 発現を誘導しなかったが、MCAS 細胞では、16 時間および 24 時間後

の細胞で PD-L1 の高発現が検出された (図 10A・B)。

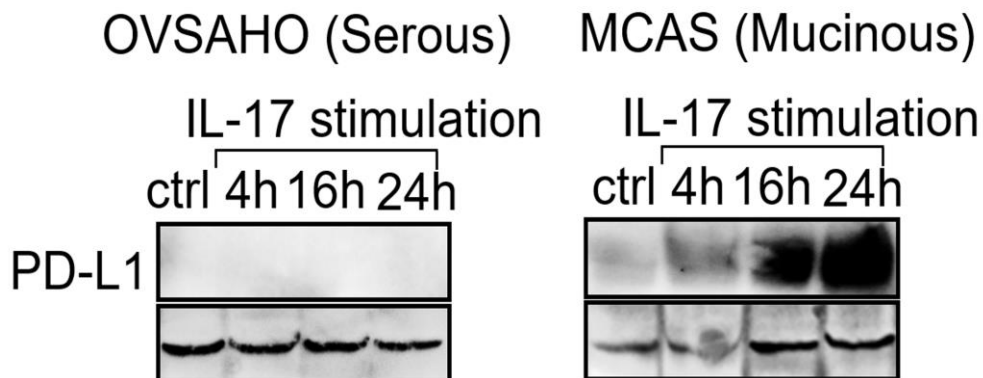


図 10A : OVSAHO 細胞 (左) および MCAS 細胞 (右) でのウェスタンブロッティングにより検出された PD-L1 発現に対する IL-17 の影響。MCAS 細胞で PD-L1 の発現を認める。

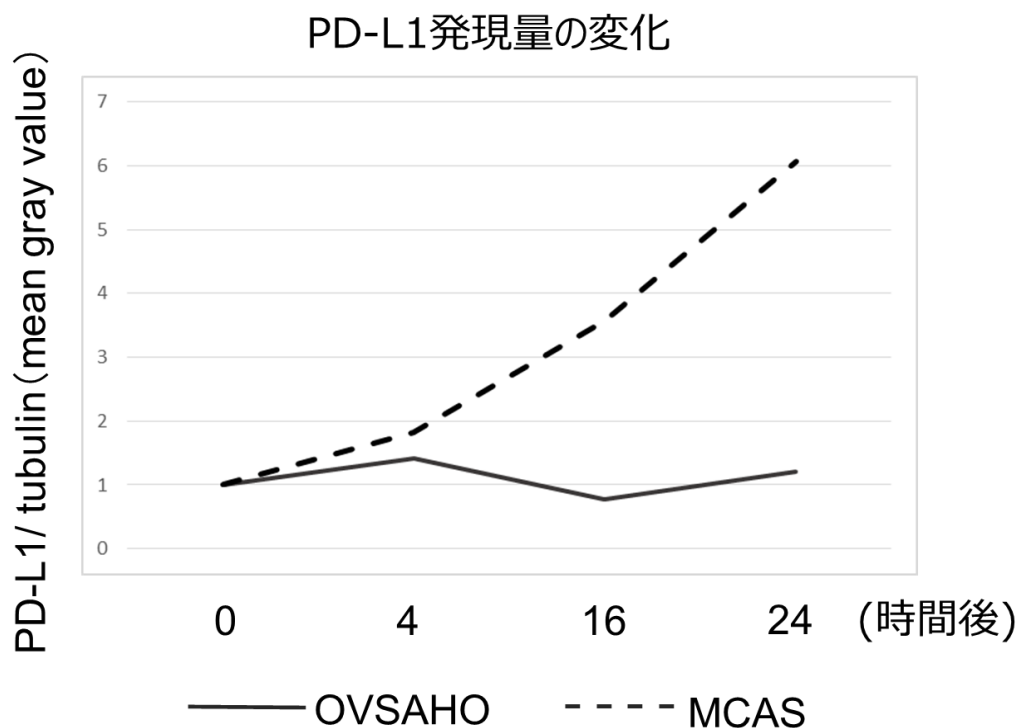


図 10B : OVSAHO 細胞と MCAS 細胞での PD-L1 発現量の変化。MCAS 細胞で経時的に PD-L1 の発現量が増加している。ウェスタンブロットの結果は ImageJ を用いて mean gray value を計測し、PD-L1/tubulin の値で評価した。同様の実験を 3 回行った。

前述のように、IL-17 の発現には IL-6 の活性化と STAT3 のリン酸化を要するが、同時に PD-L1 の発現にもこれらの因子が関連している。IL-17 および IL-6、STAT3、PD-L1 間の相互作用を調べるために、IL-17 刺激で PD-L1 発現を認めた MCAS 細胞を用い、再度 IL-17A で刺激を行って、細胞血漿中における IL-6 の濃度変化を ELISA で測定し、また STAT3 のリン酸化に与える影響をウェスタンブロットで観察した。IL-6 の発現 (図 11) および STAT3 のリン酸化 (図 12A・B) は、IL-17A の刺激から 24 時間後に増加を認めた。

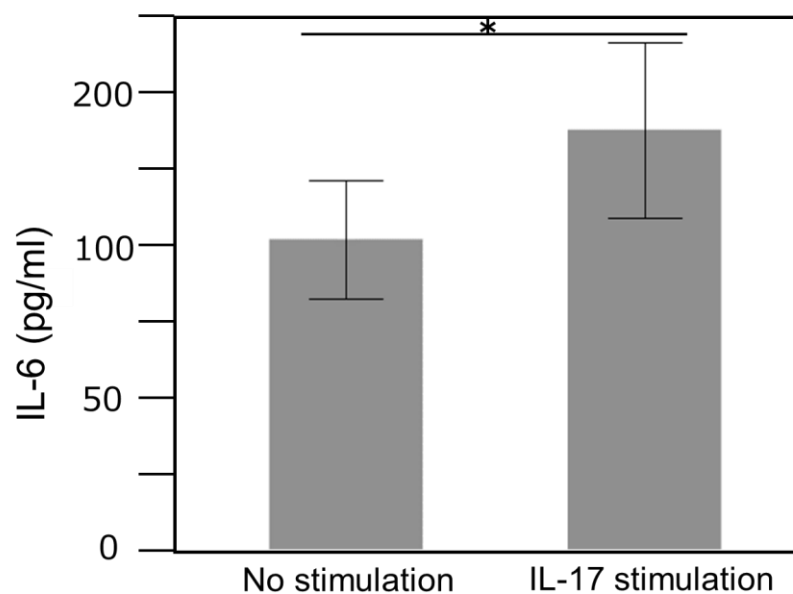


図 11 : IL-17 刺激の有無別による MCAS 細胞での IL-6 発現量。ELISA で評価した。同様の実験を 3 回行った。* $P < 0.05$ (マン・ホイットニー検定)。

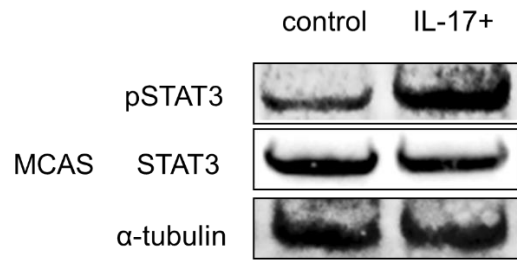


図 12A : MCAS 細胞における IL-17 刺激後の STAT3 と pSTAT3 の変化。IL-17 刺激から 24 時間後の細胞と、刺激無しの細胞を対象に、STAT3 と pSTAT3 の発現をウェスタンブロットで観察した。

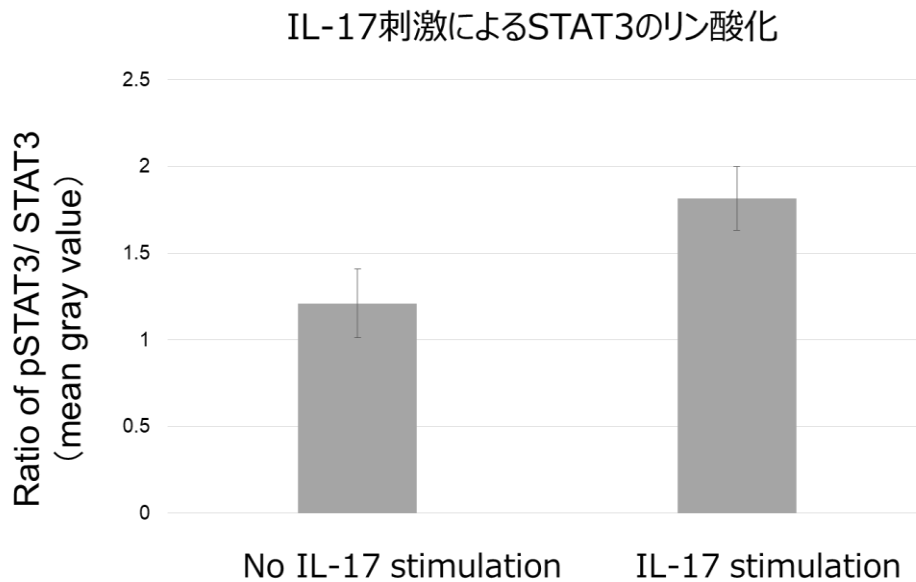


図 12B : 図 12A のウェスタンブロットの結果を ImageJ で評価した。Mean gray value を STAT3、pSTAT3、tubulin について計測し、STAT3/tubulin と pSTAT3/tubulin の比率で評価を行った。同様の実験を 3 回行った。

2.4) IL-6 および pSTAT3/NF-κB 阻害による IL-17A 誘発性 PD-L1 発現の抑制

先の細胞実験で、IL-17 の刺激により IL-6 の活性化と STAT3 のリン酸化が認められたことから、次に IL-17A 誘導性の IL-6 活性および STAT3 のリン酸化が、PD-L1 の発現とどのように関連しているかを調べるために、IL-6 抗体および

STAT3 リン酸化の阻害剤を用い、IL-17A 刺激による PD-L1 発現の変化を評価した。はじめに IL-6 抗体阻害剤を使用した結果、IL-17A 刺激においても MCAS 細胞で PD-L1 は発現しなくなった。また、IL-6 抗体阻害剤自身が細胞に何かしらの影響を与えているかをみるために、IL-17A 刺激をしない MCAS 細胞にも IL-6 抗体阻害剤を添加したが、PD-L1 の発現に変化をもたらさなかった (図 13A・B)。

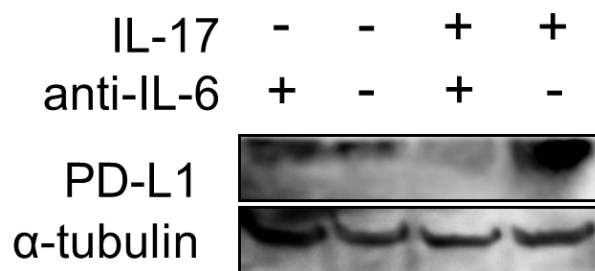


図 13A : IL-6 阻害剤添加後の PD-L1 発現の変化。IL-17 刺激を加え、IL-6 阻害剤を添加して 24 時間後の PD-L1 発現を観察した。

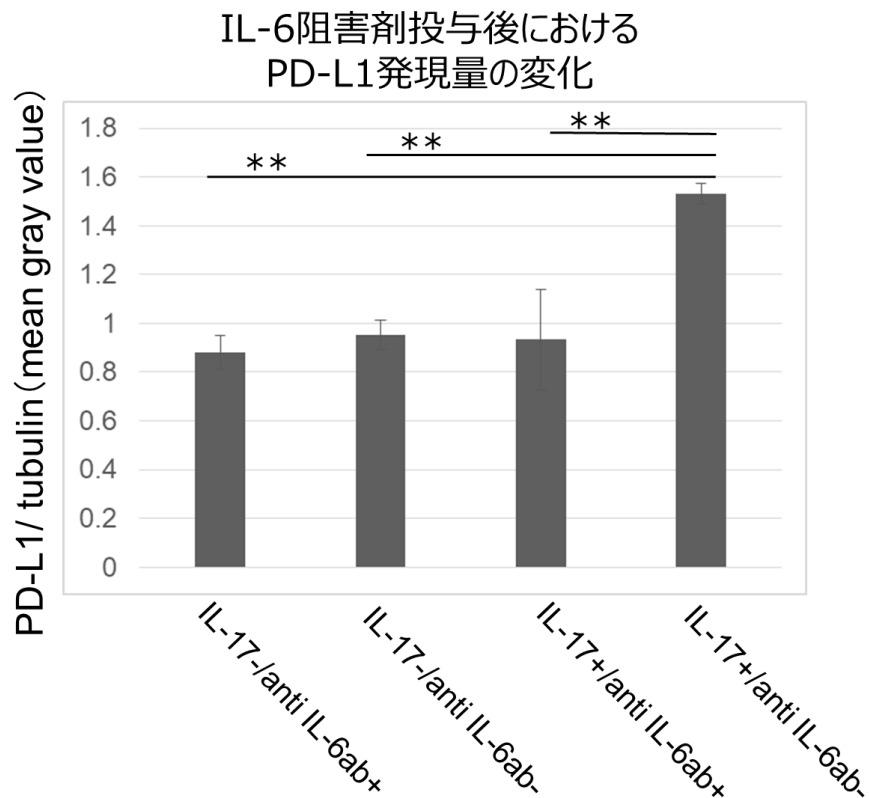


図 13B : IL-6 阻害剤添加後の PD-L1 発現量の変化。図 13A のウェスタンブロットの結果を ImageJ で評価した。Mean gray value を各々求め、tubulin に対する比で評価した。*** $P < 0.01$ (マン・ホイットニー検定)。同様の実験を 3 回行った。

次に、IL-6 の間接的な阻害剤として、BAY11-7082 を用いた。BAY11-7082 は NF- κ B の DNA 結合を無効にすることで、IL-6 発現をブロックする。予め BAY11-7082 で処理した MCAS 細胞を IL-17A で刺激し、PD-L1 の 24 時間後の発現を観察したところ、PD-L1 発現は低下を示した。一方、BAY11-7082 を溶解した DMSO 自体が細胞への影響を示すことを否定するために、DMSO のみを MCAS 細胞に添加し、同様に PD-L1 の発現変化を観察したところ、PD-L1 の発現は低下しなかった (図 14A・B)。

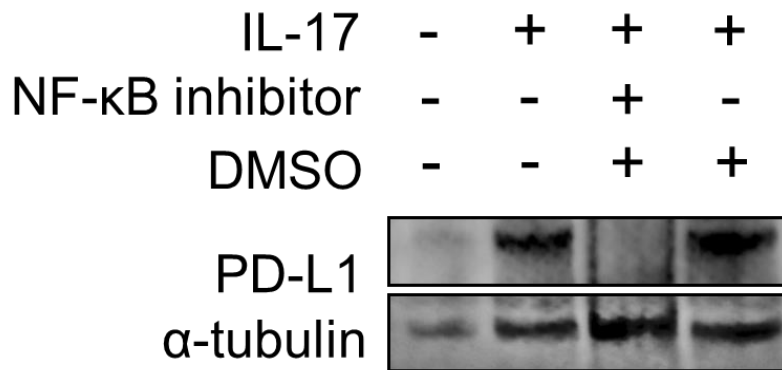


図 14A : NF-κB 阻害剤添加後の PD-L1 発現の変化。MCAS 細胞に IL-17 刺激を加え、NF-κB 阻害剤を添加して 24 時間後の PD-L1 発現を観察した。

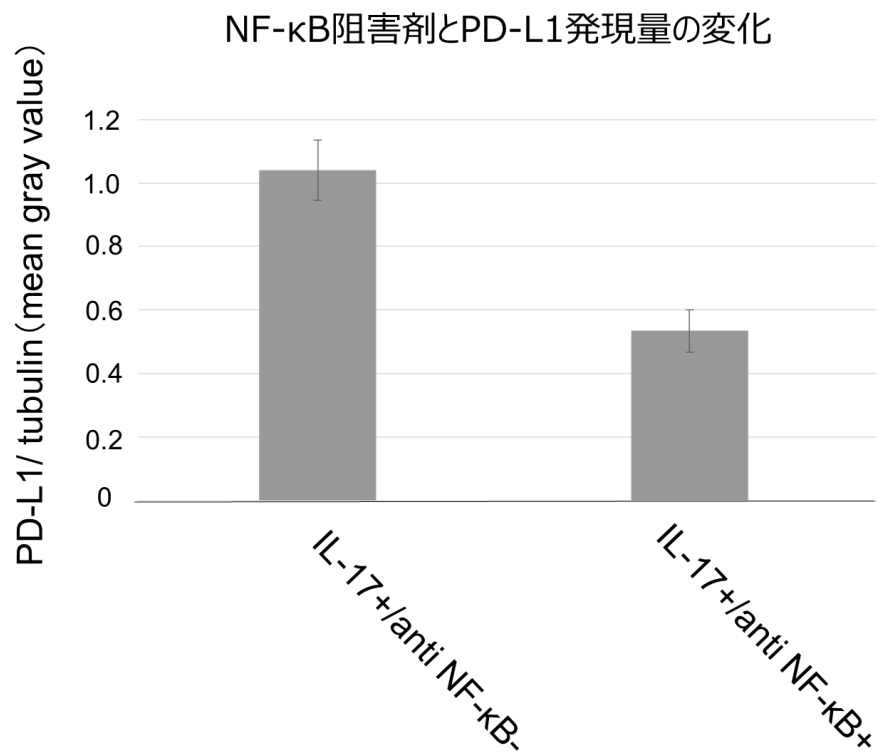


図 14B : NF-κB 阻害剤添加後の PD-L1 発現量の変化。図 14A における IL-17 刺激ありの細胞を対象とし、NF-κB 阻害剤添加の有無別に mean gray value を用いた PD-L1/tubulin の値を比較した。

同様に STAT3 阻害剤 (S31-201) を適用すると、IL-17A で刺激を行った MCAS

細胞の STAT3 リン酸化が濃度依存的に減少し、また、PD-L1 発現量も減少を認めた (図 15A・B)。

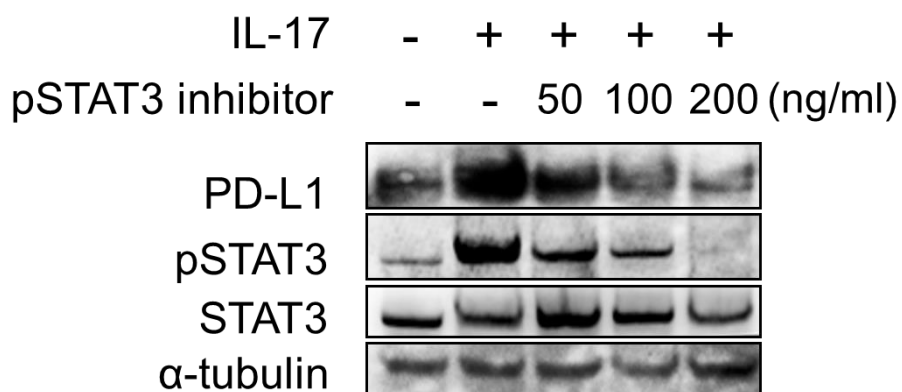


図 15A : STAT3 阻害剤添加後の変化。MCAS 細胞に IL-17 刺激を加え、STAT3 阻害剤を 3 段階の異なる濃度 (S31-201 : 0、50、100、および 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$) で添加して、24 時間後の PD-L1 発現および STAT3 のリン酸化を観察した。

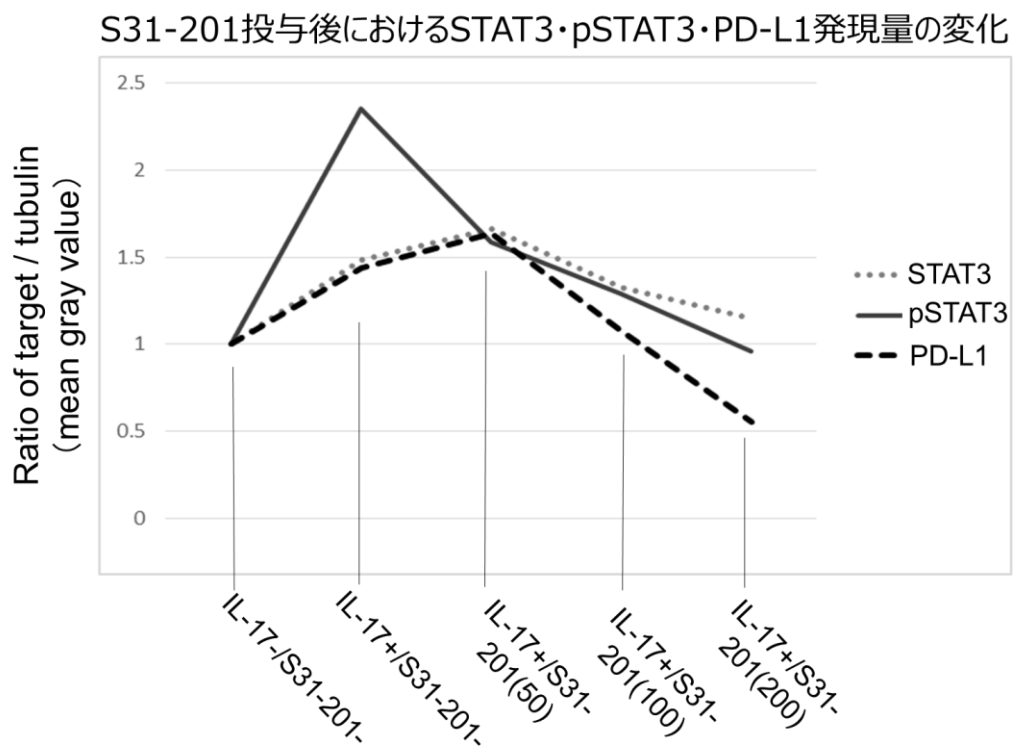


図 15B : STAT3 阻害剤添加後の STAT3・pSTAT3・PD-L1 発現量の変化。図 15A の

ウェスタンブロットの結果において、各因子の発現量を ImageJ で評価した。各因子と tubulin の mean gray value 比を用いた。

細胞実験の結果より、卵巣癌患者の PBMC における IL-6 および PD-L1 の mRNA 発現に焦点をあてると、qRT-PCR 分析で、IL-6 と PD-L1 が正の相関を示すことがわかった (図 16A)。さらに、卵巣癌患者の血漿中における IL-6 の濃度が、PBMC における Th17 占有率と正の相関を持つことも判明した (図 16B)。

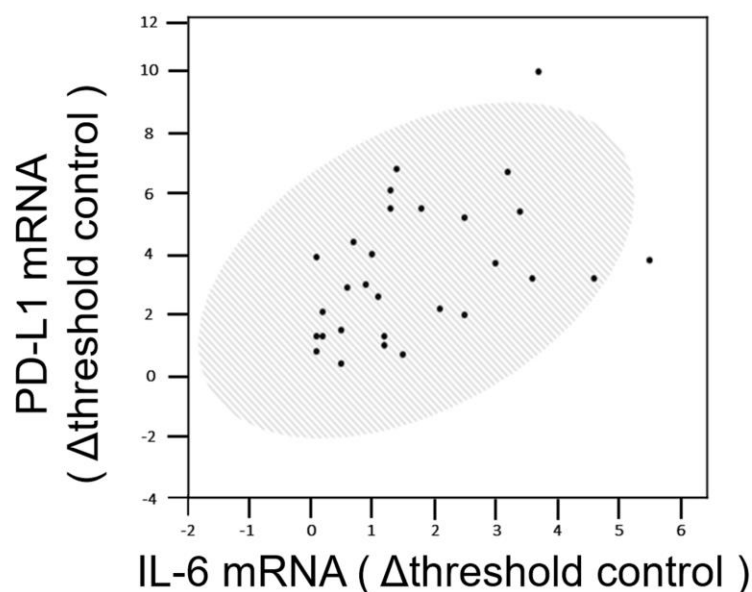


図 16A : 卵巣癌患者の PBMC における PD-L1 および IL-6 の mRNA 発現の相関関係。スピアマンの検定を使用して分析し、影付き楕円は 95%信頼区間を表す ($\rho=0.52$ 、 $P=0.0023$)。N=30

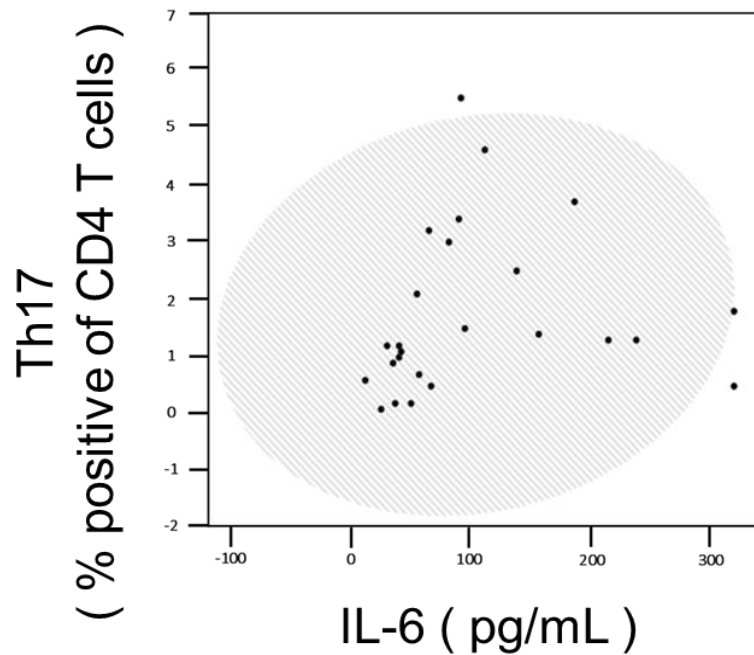
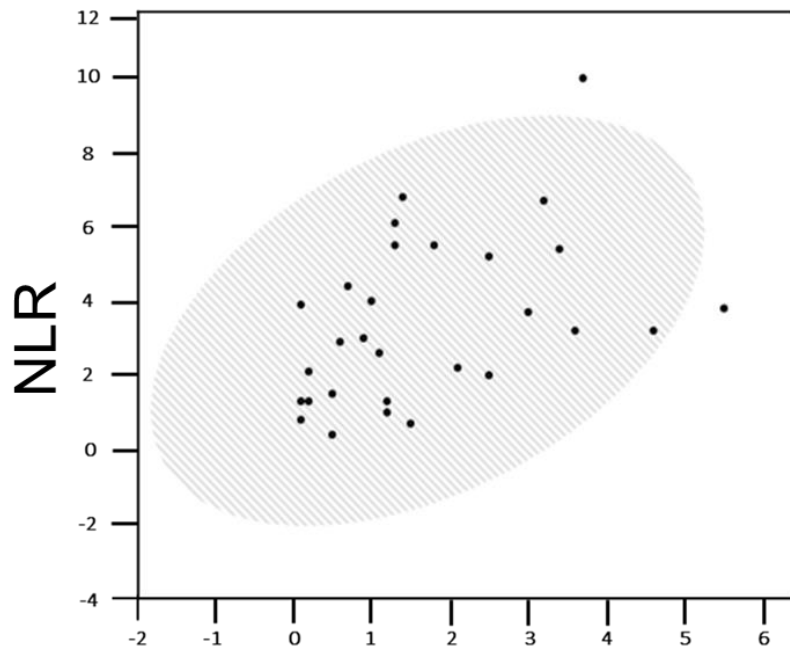


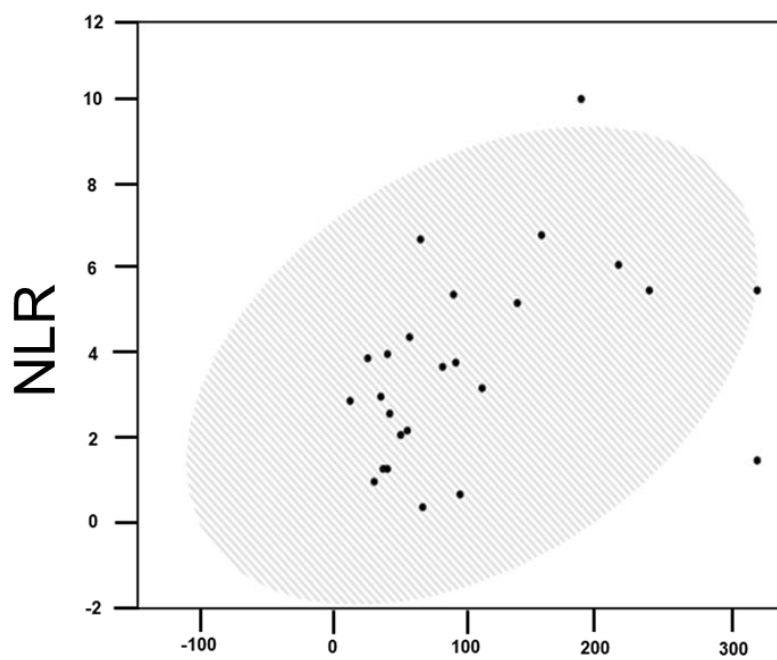
図 16B : 卵巣癌患者の血漿中における IL-6 の濃度 (pg/mL) と PBMC 中の Th17 細胞占有率との関連図。スピアマンの検定を使用して分析し、影付き楕円は 95% 信頼区間を表す ($\rho=0.51$ 、 $P=0.0098$)。N=30

2.5) 卵巣癌患者の PBMC 中 Th17 占有率および血漿中 IL-6 と正の相関関係を示す好中球／リンパ球比

卵巣癌患者の手術直前に採取した血液を用いて、好中球とリンパ球の比率を算出したところ (好中球／リンパ球比)、PBMC 中 Th17 の占有率 (図 17A) および血漿中 IL-6 の濃度とともに有意な正の相関関係を占めることがわかった (図 17B)。



Th17(% positive of CD4 T cells)



IL-6 (pg/mL)

図 17 : 卵巣癌患者の PBMC における Th17 の占有率 (A : 上図) および血漿中 IL-6 濃度 (B : 下図) と好中球 / リンパ球比 (NLR) の相関関係図。スピアマン

の検定を使用して分析し、影付き楕円は 95%信頼区間を表す (A : $\rho=0.49$ 、 $P=0.0068$ 、B : $\rho=0.48$ 、 $P=0.0184$)。

3) 卵巣癌における抗癌剤と PD-L1 および IL-17 との関連性

また、卵巣癌患者の化学療法を施行していない群 (N=21) と施行した群 (N=9) を対象とし、PBMC 中の Th17 細胞占有率および $\gamma\delta$ T17 細胞占有率を比較したところ、両者に有意差は認めなかった (図 18)。一方、PBMC 中における IL-17、IL-23、および ROR- γ t の mRNA 発現量を比較したところ、化学療法を受けなかった患者と比較して、化学療法を受けた患者で全ての因子が有意な上昇を認めた (図 19)。抗癌剤は、化学療法施行の全患者でパクリタキセルとカルボプラチンが用いられた。

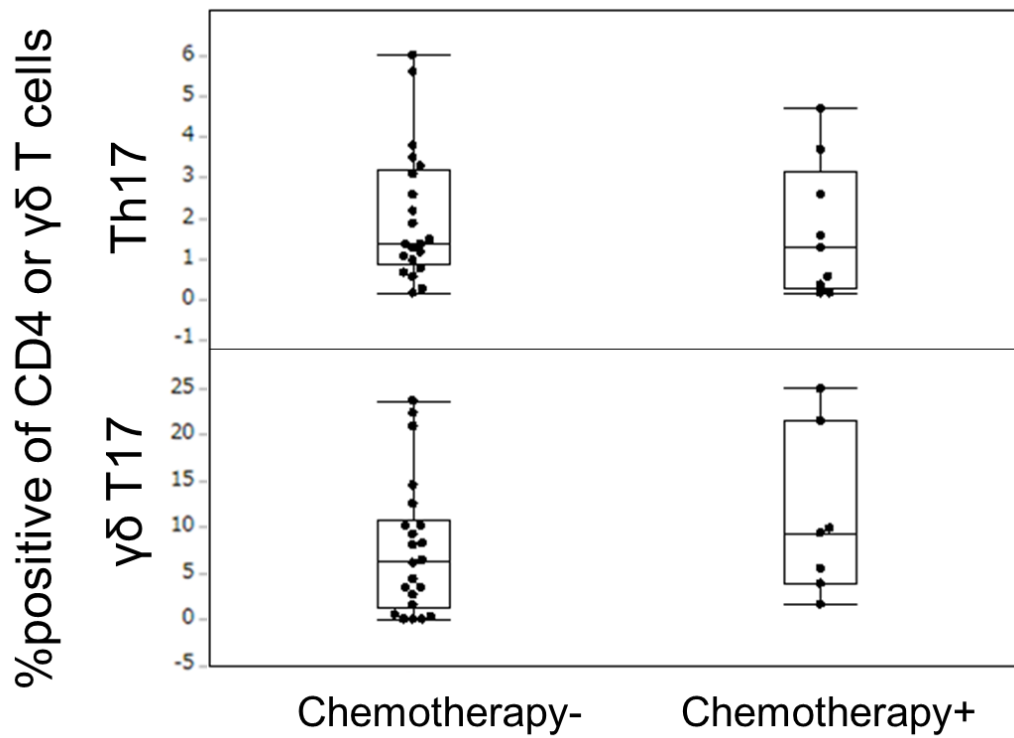


図 18 : 化学療法施行別の Th17 細胞占有率と $\gamma\delta$ T17 細胞占有率。卵巣癌患者を対象に、抗癌剤治療を施行していない群と施行した群の PBMC 中における Th17 細胞占有率と $\gamma\delta$ T17 細胞占有率を比較した。(マン・ホイットニー検定)。No chemotherapy (N=21)、chemotherapy (N=9)

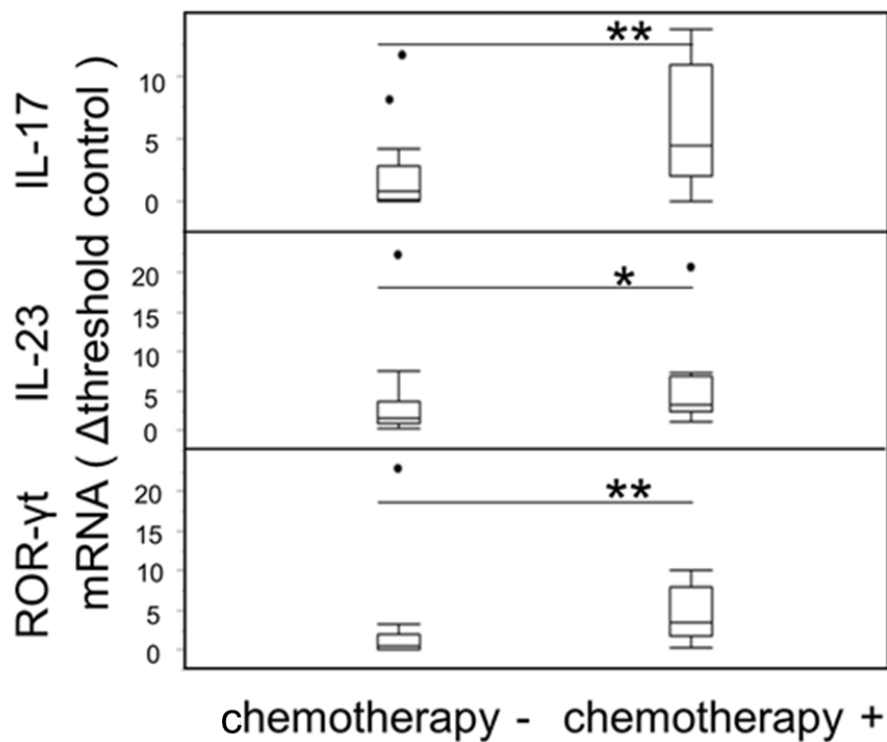


図 19：卵巣癌患者で化学療法を行わなかった群（左）と施行された群（右）の PBMC における IL-17、IL-23、および ROR- γ t mRNA 発現量の比較分析。いずれの項目も化学療法施行群で有意に上昇している。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ （マン・ホイットニー検定）。黒丸は外れ値を示す。No chemotherapy (N=21)、chemotherapy (N=9)

第5章 考察

これまでの研究で、Th17 細胞が有意に健常群に比べて上昇することが、急性骨髄性白血病⁴⁰、肝細胞癌⁴¹、乳癌²¹などの癌腫で報告されており、また胆嚢癌⁴²においては Th17 および $\gamma\delta$ T17 の増加が報告されている。そしてこれらの IL-17 産生性 T 細胞が増加することで、生存率が低下することも報告されている。このことから、IL-17 産生細胞は、癌患者における免疫系因子に、病原となりうる重要な変化をもたらしている可能性がある。今回の研究で、婦人科悪性腫瘍患者、特に卵巣癌患者の PBMC で Th17 と $\gamma\delta$ T17 の占有率が増加することが実証された。さらに、卵巣癌患者の好中球／リンパ球比は Th17 占有率と正の相関があった。4,910 人の卵巣癌患者を対象としたメタ解析で、好中球／リンパ球比の上昇は、卵巣癌の全生存期間および無増悪生存期間の短縮と相関していることが報告されている⁴³。このことから、卵巣癌において Th17 や $\gamma\delta$ T17 は予後に相関している可能性が示唆される。残念ながら、今回の研究では観察期間が十分とは言えず、より長期の観察が望まれるが、胆嚢癌⁴²や肝細胞癌⁴¹などの他種の癌と同様に、卵巣癌でも Th17 や $\gamma\delta$ T17 が全生存期間および無増悪生存期間と相関関係を持つパラメーターである可能性は十分にある。

また、生存期間への寄与という観点から PD-L1 の発現を捉えると、既報として、卵巣癌患者における PD-L1 発現と予後予測価値を評価するため、Lin W.

が、1630人の卵巣癌患者を対象とした12の論文報告をもとにデータベースを作成している。メタ分析により、PD-L1タンパク質の発現は全生存率および無増悪生存率とは関連していなかったが、PD-L1 mRNAの発現は卵巣がん患者1228人の無増悪生存率の悪化と有意に関連していた ($p < 0.001$)⁴⁴。さらに、上皮性卵巣癌を対象とした Mesnage S.らは、化学療法後に半数以上が免疫染色でPD-L1発現の上昇を示したと報告したが、PD-L1陽性と全生存との関連性は認められなかった⁴⁵、と報告している。我々の実験結果では、卵巣癌患者において腫瘍検体では免疫染色でPD-L1の発現を認めていた。一方、PBMC中のPD-L1 mRNA量の増加は認めなかった。PD-L1と生存率との関連性はまだ一定の見解を得られていない。

IL-17のmRNA発現量は、健常群と比較して卵巣癌患者で増加を認め、さらに、Th17の維持と増加に必要なIL-23のmRNA発現量も増加し、IL-17のmRNA発現量と正の相関関係を認めている。一方、血漿中のIL-17濃度は有意な変化を認めなかった。この乖離は、タンパク質の生産が主に翻訳の段階で制御されており、mRNA転写産物の量に依存していないことから説明される⁴⁶。実際に、腫瘍検体を用いた免疫組織染色では明らかに卵巣癌組織におけるIL-17の発現増加を示していた。今研究の目的の一つは、PD-L1の発現がIFN- γ ⁴⁷やIL-6⁴⁸

などの炎症性サイトカインによって増強されることが知られているため、IL-17 という炎症誘導因子によって、PD-L1 の発現がどのように変化するかを調べることにあった。腫瘍検体では IL-17 と PD-L1 の両方で免疫染色の結果が陽性であったものの、卵巣癌患者の PBMC における IL-17 や Th17 占有率と PD-L1 は相関関係を認めなかった。しかし、細胞実験においては（卵巣癌の粘液性癌細胞株のみではあるが）、IL-17 の刺激によって PD-L1 の発現を認めており、IL-17 と PD-L1 が関連している可能性は十分にある。興味深いことに、IL-17 の産生に IL-6 および TGF- β の誘導が必要な一方、今回の実験で、IL-17 が IL-6 の mRNA 発現量および IL-6 のタンパク質の増加に寄与していることが明らかとなった。

近年、IL-6 に誘導される STAT3 のリン酸化と、IL-6 自身、さらに IL-17 との間に正のフィードバックループがあることが報告されている⁴⁹⁻⁵¹。IL-6 と STAT3 は先述のように IL-17 の産生を促進する働きがあるが、IL-17 もまた、IL-6 と STAT3 を活性化する。さらに、PD-L1 も IL-6 の活性化と STAT3 のリン酸化によって生成される。今回の研究結果は、腫瘍細胞において IL-17 が IL-6 および STAT3 の活性化を誘導し、それらがさらに PD-L1 の発現を誘導することを示唆している。このことは IL-6 抗体および STAT3 の阻害剤により、IL-17 の刺激による PD-L1 の発現が無効にされたという実験結果によって裏付けられている

(図 13、15)。

IL-17 の働きの 1 つに NF- κ B の活性化がある。STAT3 の IL-6 との結合部位および NF- κ B の IL-6 との結合部位は、数千の遺伝子からなるプロモーター部分に認められており、重複遺伝子を有する。STAT3 と NF- κ B は腫瘍形成に関わる部分、特にケモカインをコードする遺伝子を制御することで、腫瘍微小環境における免疫応答を調節している⁵²。また、免疫応答に関与する様々なサイトカインを調整するが、興味深いことに、これらのいくつかは造血細胞だけでなく腫瘍細胞においても産生される⁵³。腫瘍細胞における STAT3 および NF- κ B は IL-6 を活性化する一方で、IL-6 も STAT3 を活性化し、正のフィードバックループを形成している⁵¹。

腫瘍細胞において NF- κ B により制御されるもう 1 つのサイトカインに TNF- α がある²⁹。TNF- α も炎症性サイトカインの一つであり、正のフィードバックループを介して NF- κ B を活性化することがわかっている⁵³。今回の実験で、NF- κ B の阻害剤を用いると、IL-17 に誘発されていた PD-L1 の発現が消失することから、腫瘍細胞で IL-17 が NF- κ B を活性化することで、PD-L1 の発現を引き起こしていると考えられ、その過程には NF- κ B による IL-6 の産生誘導と、STAT3 のリン酸化誘導がある。

次に、化学療法の有無に着目して IL-17 および関連因子の mRNA 発現量を観察すると、化学療法の施行後で、卵巣癌患者の血漿中における各因子（IL-17、IL-23、ROR- γ t）が増加していることが判明した。パクリタキセルは、卵巣癌で NF- κ B の活性化を介して PD-L1 の過剰発現を誘発することが報告されている⁵⁴。我々の実験結果でも、IL-17 はパクリタキセルと同じように、NF- κ B の活性化を介して PD-L1 の発現を誘発していることを示しており、このことはパクリタキセルを含む化学療法を受けた卵巣癌患者の PBMC における IL-17 関連因子の増加に矛盾しないと考えられる。つまり、NF- κ B の活性化を介する PD-L1 の発現経路が、フィードバックループを形成していることから、パクリタキセルの刺激によって、IL-17 の産生をさらに刺激する可能性がある（図 20）。図 18 で、化学療法を施行しなかった卵巣癌患者と、施行した卵巣癌患者の PBMC 中 Th17 細胞占有率に有意差がないことを示した。矛盾した結果ではあるが、抗癌剤投与から少なくとも 24 時間以上は経過したあとの腫瘍検体であり、先のパクリタキセルと卵巣癌細胞の実験報告⁵³でも、パクリタキセル投与から 2 日目以降には、PD-L1 の発現が低下してきている。

背景の項で述べたように、卵巣癌患者の末梢血では、健常者よりも有意に Treg の上昇が認められている。一方で、今回の実験で卵巣癌患者の PBMC 中

における Th17 は、健常者よりも多く認められた (図 4)。このことは、Treg が STAT3 の抑制を必要とする一方で、Th17 の発現には STAT3 の活性化が求められている矛盾から、卵巣癌患者の末梢血では常には STAT3 が活性化していないことを示唆している。

対照的に STAT3 のリン酸化は正常卵巣よりも、卵巣癌組織でより強く発現することが報告されている。同時に、STAT3 のリン酸化発現レベルは、免疫染色により早期癌よりも進行癌で増加することも観察されている⁵⁴⁻⁵⁶。また、細胞実験ではあるが、抗癌剤抵抗性の卵巣癌細胞で STAT3 のリン酸化発現が有意に高いことがわかった⁵⁷。これらの事実から末梢血中ではなく、腫瘍細胞における STAT3 のリン酸化活性が、卵巣癌患者における Th17 の高発現に寄与していることが示唆される (図 20)。

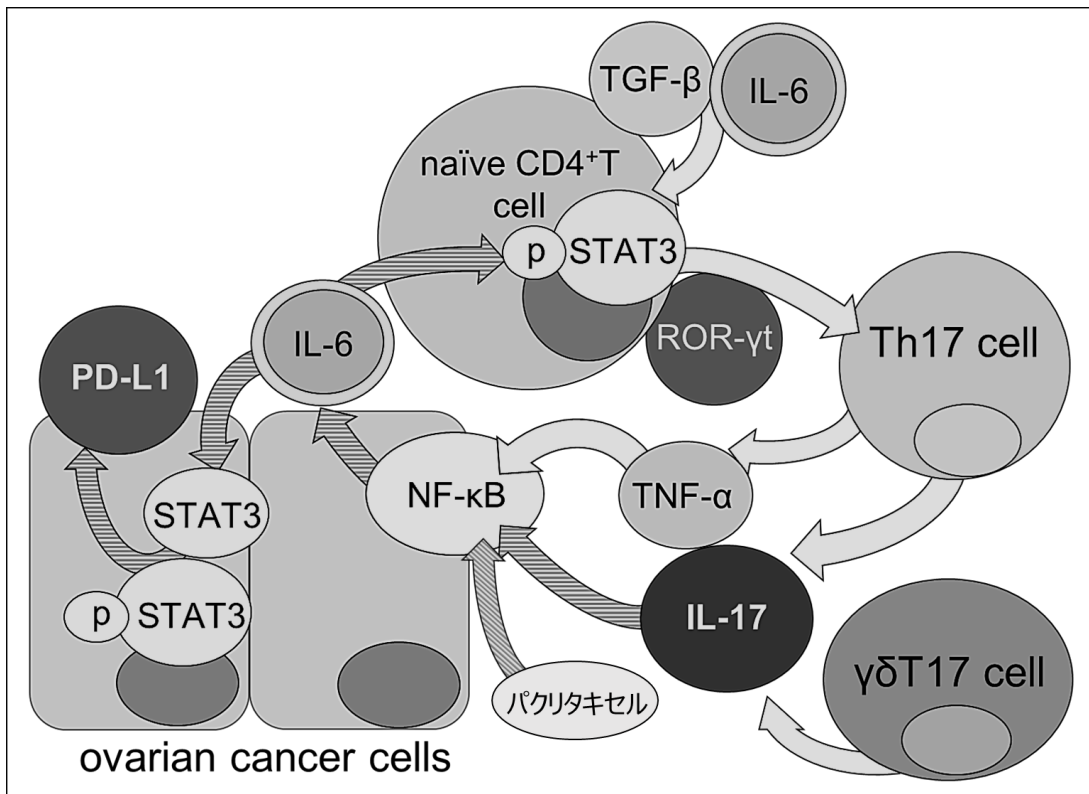


図 20: IL-17 産生細胞と IL-6 および PD-L1 発現経路の関係図。IL-6 および TGF-β は、ナイーブ T 細胞で STAT3 のリン酸化を促進し、Th17 細胞への分化を誘導する。STAT3 のリン酸化が誘導されることで、ROR-γt 活性が起こり、ナイーブ T 細胞から Th17 細胞へと分化が進み、Th17 細胞からは IL-17 と TNF-α が産生される。IL-17 または TNF-α 刺激によって活性化された NF-κB は IL-6 の発現を誘導し、IL-6 は癌細胞の STAT3 をリン酸化させる。これらのステップにより、卵巣癌細胞に PD-L1 が発現し、正のフィードバックループを介して IL-6 および STAT3 が再活性化される。パクリタキセルは NF-κB 活性を介して、卵巣癌細胞での PD-L1 発現を上昇させることから、パクリタキセルによる IL-6 活性と STAT3 のリン酸化がフィードバックループを成している可能性が考えられる。図内の矢印（斜線有り）は今回の実験により考察される内容であり、矢印（斜線無し）は既報での内容を示している。

第6章 結論

本研究の結果に基づき、卵巣癌患者では次のような変化が生じていることが示唆された。IL-6 と TGF- β はナイーブ T 細胞において STAT3 をリン酸化し、ROR- γ t を活性化してナイーブ T 細胞から Th17 細胞への分化を誘導する。そして、IL-17 と TNF- α を産生し、炎症反応を誘発する。すると、IL-17 または TNF- α の刺激によって NF- κ B が活性化され、IL-6 の活性化を促進しながら、STAT3 をリン酸化する。これらの変化は正のフィードバックによって IL-6 と STAT3 を再活性化しながら、卵巣癌細胞で PD-L1 の発現を誘導していると考えられる。

結論として、卵巣癌患者において Th17 や IL-17 の増加は、好中球／リンパ球比と相関したり、PD-L1 の発現を増加させたりすることから、予後や PD-L1 の発現を予測するバイオマーカーになりうると考えられる。今回の実験では PD-L1 や STAT3 の発現は主に腫瘍検体での観察であり、局所的であったことに対し、IL-17 や Th17 の評価は末梢血を対象としていた。これらが互いにどのように反映しているかも今後課題になると考えられる。また、本実験では主に卵巣癌患者を対象とした研究を行ったが、今後子宮体癌や子宮頸癌でも同様の傾向がみられないか検討の余地は十分にある。

謝辞

本研究を行うにあたって、細部にわたり大変多くのご指導をいただきました東京都立墨東病院の松本陽子医長に深く感謝いたします。また、本研究をすすめるにあたり、ご指導を賜りました東京大学医学部産科婦人科学教室 藤井知行教授、大須賀穰教授、織田克利准教授、日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野 川名敬教授、国家公務員共済組合連合会 虎の門病院の有本貴英部長、東京大学医学部産科婦人科学教室の田口歩先生、荻島樹里先生、河田啓先生、富田香織様に心より厚く御礼申し上げます。また、同研究室の皆様には、多くのご指導、助言、温かいご協力をいただきました。深く感謝申し上げます。本研究は、文部科学省科学研究費補助金（no25861471 to TA、no17K11269 to YM と no26293357 to KK）、および AMED（助成金番号 JP17lk0201019 to KK）の御支援のもと遂行されました。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Cancer Registry and Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan. 2015
2. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* . 95 Suppl 1: S161-92. 2006
3. Komiyama S, Katabuchi H, Mikami M, Nagase S, Okamoto A, Ito K, Morishige K, Suzuki N, Kaneuchi M, Yaegashi N, Udagawa Y, Yoshikawa H. Japan Society of Gynecologic Oncology guidelines 2015 for the treatment of ovarian cancer including primary peritoneal cancer and fallopian tube cancer. *Int J Clin Oncol* .21: 435-46. 2016
4. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*.391(10125):1023-1075:2018
5. Dong C. IL-23/IL-17 biology and therapeutic considerations. *J immunotoxicol*.5(1):43-46:2008
6. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 40(7):1830-1835:2010
7. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 34(2):149-162:2011
8. Ma J, Wang J, Wan J, et al. Morphine disrupts interleukin-23 (IL-23)/IL-17-mediated pulmonary mucosal host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 78(2):830-837:2010
9. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: Critical cells driving immune suppression in the tumor microenvironment. *Adv Cancer Res*.128:95-139:2015
10. Bie Q, Jin C, Zhang B, et al. IL-17B: A new area of study in the IL-17 family. *Mol Immunol*.90:50–56:2017
11. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*.10:479–489:2010
12. Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. The interleukin-17 cytokine family: Critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology*.134:8–16:2011
13. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*. 15(9):1016-1022:2009
14. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by $\gamma\delta$ T cells rather than CD4

- T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 177(7):4662-4669:206
15. Hayday, A.C. $\gamma\delta$ T cells; A right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol.* 18:975-1026:2000
 16. Marc, Bonneville, Rebecca, L., O'Brien & Willi, K. Born.: $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 10:467-478:2010
 17. Korn T, Petermann F. Development and function of interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Ann NY Acad Sci.* 1247:34-45:2012
 18. Dejima, T., Shibata, K., Yamada, H., et al. A proactive role of naturally occurring IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells in the lung at the early stage of systemic candidiasis in mice. *Infect. Immun.* 79:4503-4510:2011
 19. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, et al. Generation and regulation of human CD4⁺ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(40): 15505-15510:2008
 20. Zhang B, Rong G, Wei H, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 374(3):533-537:2008
 21. Yang L, Qi Y, Hu J, et al. Expression of Th17 cells in breast cancer tissue and its association with clinical parameters. *Cell Biochem Biophys.* 62(1):153-159:2012
 22. He S, Fei M, Wu Y, et al. Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. *Int J Mol Sci.* 12(11):7424-7437:2011
 23. Wilke CM, Kryczek I, Wei S, et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis.* 32(5):643-649:2011
 24. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer Immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 12(4):252-264:2012
 25. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, et al. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol.* 21(3):462-473:2016
 26. Roberto Bellucci. Interferon-g-induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Onco Immunology.* e1008824:2015
 27. Xu L, Chen X, Shen M, et al. Inhibition of IL-6-JAK/Stat3 signaling in castration-resistant prostate cancer cells enhance the NK cell-mediated cytotoxicity via alteration of PD-L1/NKG2D ligand levels. *Mol Oncol.* 12(3):269-286:2018
 28. Zhang N, Zeng Y, Du W, et al. The EGFR pathway is involved in the regulation of PD-L1 expression via the IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 49(4):1360-1368:2016
 29. Wang X, Yang L, Huang F, et al. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- α up-regulate PD-L1

- expression in human prostate and colon cancer cells. *Immunol Lett.* 184:7-14:2017
30. Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol.* 561(8):1-15:2017
 31. Egwuagu CE. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine.*47:149-156:2009
 32. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.*7: 41-51:2007
 33. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood.* 108:1571-1579:2006
 34. Pallandre JR, Brillard E, Crehange G, et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol.* 179: 7593-7604:2007
 35. Zheng Y, Wang Z, Deng L, et al. Modulation of STAT3 and STAT5 activity rectifies the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol.* 157: 65-77:2015
 36. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 26: 371-381:2007
 37. Cannioto RA, Sucheston-Campbell LE, Hampras S, et al. The Association of Peripheral Blood Regulatory T-Cell Concentrations with Epithelial Ovarian Cancer: A Brief Report. *Int J Gynecol Cancer.* 27:11-6:2017
 38. Yang YuYu. INF α -2b inhibitory effects on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in the tumor microenvironment of C57BL/6 J mice with melanoma xenografts. *BMC Cancer.* 16:397:2016
 39. Jin Peng. Chemotherapy induces programmed cell death-ligand 1 overexpression via the nuclear factor-kb to foster an immunosuppressive tumor microenvironment in ovarian cancer. *American Association for Cancer Research.* 2015
 40. Han Y, Ye A, Bi L, et al. Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Sci.* 105(8):933-942:2014
 41. Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol.* 50(5):980-989:2009
 42. Patil RS, Shah SU, Shrikhande SV, et al. IL17 producing $\gamma\delta$ T cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients. *Int J Cancer.* 139(4):869-881:2016
 43. Zhou Q, Hong L, Zuo MZ, He Z. Prognostic significance of neutrophil to lymphocyte ratio in

- ovarian cancer: evidence from 4,910 patients. *Oncotarget*. 8(40):68938-68949:2017
44. Lin W. Prognostic effect of programmed death ligand 1 (PD-L1) in ovarian cancer: a systematic review, meta-analysis and bioinformatics study. *Journal of ovarian research*. 12(1):1-10:2019
 45. Mesnage SJL, Auguste A, Genestie C et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC). *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 28: 651-657:2017
 46. Schanhusser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 473(7347):337-342:2011
 47. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, et al. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*. 112(9):1501-1509:2015
 48. Qu QX, Xie F, Huang Q, et al. Membranous and cytoplasmic expression of PD-L1 in ovarian cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 43(5):1893-1906:2017
 49. Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity*. 29(4):628-636:2008
 50. Wang L, Yi T, Kortylewski M, et al. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med*. 206(7):1457-1464:2009
 51. Camporeale A, Poli V. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? *Front Biosci (Landmark Ed)*. 17:2306-2326:2012
 52. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 21(1):11-19:2010
 53. Peng J, Hamanishi J, Matsumura N, et al. Chemotherapy induces programmed cell death-ligand 1 overexpression via the nuclear factor- κ B to foster an immunosuppressive tumor microenvironment in ovarian cancer. *Cancer Res*. 75(23):5034-5045:2015
 54. Chen H, Ye D, Xie X, et al. VEGFRs expressions and activated STATs in ovarian epithelial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 94:630-635:2004
 55. Min H, Wei-hong Z. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 in epithelial ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 35: 918-925:2009
 56. McCann GA, Naidu S, Rath KS, et al. targeting constitutively activated STAT3 in hypoxic ovarian cancer, using a novel STAT3 inhibitor. *Oncoscience*. 1: 216-228:2014
 57. Duan Z, Foster R, Bell DA, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 12: 5055-5063:2006