

## 論文の内容の要旨

論文題目 皮膚 T 細胞リンパ腫における OX40, OX40 リガンドの役割

氏名 川名 由起

皮膚 T 細胞リンパ腫 (Cutaneous T-cell lymphoma, CTCL)とは皮膚を原発とした非ホジキンリンパ腫の総称である。CTCL の代表的な疾患に菌状息肉症やセザリイ症候群があり、両者は同一スペクトラム上の疾患と考えられている。菌状息肉症の典型的な経過は、紅斑から始まり、局面を形成し、進行すると腫瘍性病変が出現するというものである。さらに進行するとリンパ節や末梢血中、内臓臓器にも腫瘍細胞が進展することもある。一方、セザリイ症候群は紅皮症、表在リンパ節腫大、末梢血中の異型リンパ球を特徴とする。進行した菌状息肉症とセザリイ症候群は非常に予後が悪く、既存の治療のいずれも予後を大きく改善できていない。それ故、CTCL の病態生理の解明と、それに基づく既存の治療とは異なる機序を標的とした新規治療薬の開発が切に望まれている。

OX40 は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーの一つで、活性化 T 細胞・NK 細胞、制御性 T 細胞 (Treg) に発現している II 型膜貫通タンパク質であり、1987 年にオックスフォード大学の A. William らによって活性化 CD4 陽性 T 細胞の細胞表面タンパク質として報告され、1997 年に悪性黒色腫、頭頸部がんの腫瘍局所に浸潤した T 細胞に OX40 が発現していることが報告された。また、抗 OX40 アゴニスティック抗体によって induced/natural Treg の抑制機能が阻害され、CD8 陽性/CD4 陽性エフェクター T 細胞の増殖、機能が維持されることが健常人末梢血を用いて *in vitro* で示され、ヒトでもエフェクター CD4 陽性 T 細胞に加えて Treg が抗 OX40 のターゲットになることが示唆されている。このように OX40 は免疫応答において様々な役割を担っていることがわかっている。また、マウスモデルを用いた実験では、抗 OX40 アゴニスティック抗体投与により OX40 シグナルを賦活化すると CD4 陽性メモリー T 細胞誘導が上昇することや、抗腫瘍免疫応答を増強することが報告されている。

一方リガンドである OX40 リガンド (OX40L) は、1985 年に成人 T 細胞白血病の原因ウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) に感染している T 細胞に発現しているタンパク質 gp34 として同定され、のちに OX40 と結合することが明らかにされた。OX40L は、活性化 B 細胞、樹状細胞、ランゲルハンス細胞といった抗原提示細胞に発現している。

血液系悪性腫瘍における OX40 と OX40L に関して、HTLV-1 に感染した T 細胞では OX40 と OX40L が共発現しており、Tax というウイルスタンパク質によりそれらの発現が誘導されていることが報告されている。また、OX40 と同じ腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーに属する CD137 とそのリガンドである CD137 リガンド (CD137L) はホジキンリンパ腫や白血病を含めた血液系悪性腫瘍の腫瘍細胞に共発現しており、腫瘍細胞間

の CD137-CD137L 相互作用が腫瘍増殖を促進していることがわかっており、CTCL においても、CD137 と CD137L の相互作用が腫瘍進展に有利に働いていることが報告されている。これら事実から OX40-OX40L 相互作用は血液系悪性腫瘍である CTCL の腫瘍免疫応答や腫瘍の進展にも大きく関与し、それ故、OX40-OX40L 相互作用を阻害することで CTCL の治療に利用することができる可能性があるのではないかと考えた。そこで、今回我々は、CTCL の病態における OX40 と OX40L の役割について検討した。

最初に CTCL 患者の病変部皮膚組織を用いて定量リアルタイム PCR を行い、病変部における OX40 および OX40L の発現を解析した。CTCL 病変部では健常人皮膚と比較し OX40 と OX40L の mRNA 発現量が有意に上昇していた。菌状息肉症において病期別に OX40 と OX40L mRNA の発現を比較したところ、病期が進行するにつれて発現量が上昇していた。さらに CTCL 病変部皮膚組織における OX40 と OX40L mRNA 発現量は正相関しており、OX40 及び OX40L の mRNA 発現量と CTCL の病勢マーカーである可溶性 IL-2 受容体 (sIL-2R) も、ともに正の相関を示した。Kaplan-Meier 生存分析にて OX40 mRNA 発現量が高値である群では疾患関連生存率が有意に低かった。一方、OX40L mRNA 発現量が高値である群では OX40 同様に疾患関連生存率は低い傾向にあったものの、有意な差とはならなかった。ELISA kit を用いて CTCL 患者血清中の可溶性 OX40 (sOX40) と可溶性 OX40L (sOX40L) 濃度を測定したところ、sOX40 濃度は検出範囲内ではあったものの、CTCL 患者と健常人の発現は同程度で有意差は認めなかった。一方、血清中の sOX40L 値は CTCL 患者と健常人のほとんどで検出レベル以下であった。CTCL 患者の病変部皮膚組織を用いて免疫組織染色を行い OX40 および OX40L の発現を検討したところ、浸潤している腫瘍細胞が OX40 と OX40L を発現しており、病期が進むにつれて、陽性細胞数が増えていることが明らかになった。セザリ-症候群患者と健常人の末梢血単核細胞を回収しフローサイトメトリーにて細胞表面における OX40 と OX40L の発現を解析した。セザリ-症候群患者末梢血において、腫瘍細胞と考えられる CD4+CD7-T 細胞は OX40 とともに OX40L を異所性に発現していた。一方で、健常人末梢血中の CD4+T 細胞は OX40L を発現していなかった。in vitro の実験としてヒト CTCL 細胞株である HH 細胞、Hut78 細胞、MyLa 細胞を用いて OX40 と OX40L の発現を調べたところ、3 種類の細胞とも OX40 と OX40L を発現していた。以上の結果から、CTCL 腫瘍細胞では OX40 と OX40L を共発現しており、病変部 OX40 mRNA 発現量が高値である群では疾患関連生存率が有意に低く、腫瘍細胞における OX40 の過剰発現が CTCL の進展に関与している可能性が示唆された。

次に CTCL 細胞における OX40-OX40L 相互作用の機能を評価するために、HH、Hut78、MyLa の細胞株を用いて OX40 や OX40L を阻害し細胞増殖に対する影響を検討した。抗 OX40 中和抗体や抗 OX40L 中和抗体は CTCL 細胞株の細胞増殖を有意に阻害し、抗 OX40L 中和抗体より抗 OX40 中和抗体の方がより細胞増殖が抑制される傾向を示した。Hut78 および HH を用いて生存能を調べたところ、抗 OX40 中和抗体を投与するこ

とで CTCL 細胞株のアポトーシスが誘導されていることが確認された。OX40-OX40L の細胞内シグナル伝達経路を検討するにあたり、OX40-OX40L の下流が PI3-キナーゼ/AKT シグナル伝達経路、NF- $\kappa$ B および ERK 活性化であることが報告されていることから、Hut78 細胞株に抗 OX40L 抗体を投与しシグナル伝達物質のリン酸化の変化をウェスタンブロットで評価した。抗 OX40L 中和抗体を投与することで、Hut78 細胞におけるリン酸化 AKT、リン酸化 ERK1/2、リン酸化 p38 MAPK、リン酸化 JNK の発現が低下した。

最後に免疫不全マウスを用いた腫瘍播種モデルにおける抗 OX40 中和抗体及び抗 OX40L 中和抗体の *in vivo* での腫瘍形成への影響を検討した。Control IgG を投与した群と比較して、抗 OX40 中和抗体及び抗 OX40L 中和抗体を投与した群では免疫不全マウスにおいて Hut78 細胞の腫瘍形成が有意に抑制された。

以上の結果より、腫瘍細胞同士の OX40-OX40L 相互作用を阻害することにより腫瘍形成や細胞増殖が抑制されアポトーシスが誘導されることが明らかになった。

要約すると、CTCL 腫瘍細胞では OX40 に加え、OX40L が異所性に過剰発現していた。腫瘍細胞同士の OX40-OX40L 相互作用を阻害することにより細胞増殖能や生存能、*in vivo* での腫瘍形成能が低下した。また OX40L を中和し阻害することで、AKT、ERK1/2、p38 MAPK、JNK のリン酸化が阻害された。これらの結果より、CTCL 腫瘍細胞では OX40 と OX40L が過剰発現し、腫瘍細胞間での OX40-OX40L 相互作用によりリン酸化シグナルを介して腫瘍細胞が増殖することで、CTCL の腫瘍環境形成に有利な環境を構築しており、それ故、OX40-OX40L 相互作用を阻害することは CTCL に対する有望な治療ターゲットとなることが示唆された。