HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	TLR3アジュバントによるCTL依存性抗腫瘍免疫応答の解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	武田, 洋平
Description	配架番号：2301
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12560号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65966
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yohei_Takeda_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　武田　洋平

学 位 論 文 題 名

TLR3 アジュバントによる CTL 依存性抗腫瘍免疫応答の解析
(Analysis of CTL-dependent anti-tumor immune response induced by TLR3 adjuvant)

[背景と目的] 抗腫瘍免疫療法においては、細胞傷害性 $CD8^+$ T cell (CTL) が腫瘍退縮に重要な役割を果たすと言われており、如何に効果的に腫瘍特異的 CTL を誘導し、活性化状態を維持出来るかが治療成功の鍵となる。TLR3 アジュバントである Poly(I:C)は、抗原提示細胞である樹状細胞（DC）を成熟化させ、DC を介した CTL の増殖・活性化を促進し、腫瘍退縮を強力に誘導することが知られている。このように TLR3 アジュバントは有用な抗腫瘍免疫賦活剤であるが、未だその DC-CTL 依存的腫瘍退縮誘導の詳細なメカニズムは解明されていない。その詳細なメカニズムが解明されれば、その知見に基づきより効果的かつ副作用の少ない新規アジュバントや新規治療戦略の開発が可能になると考えられる。そのため本研究では、ヒトでもカウンターパートが存在し、$CD8^+$ T cell への抗原提示能（クロスプレゼンテーション能）が高いマウス $CD8\alpha^+$ DC サブセットに特に着目し、DC を起点とした Poly(I:C)依存的腫瘍退縮誘導メカニズムの解明を目指した（第一章)。また、抗腫瘍免疫療法により誘導される抗原特異的 CTL の量や活性化状態を把握することは、治療継続の可否や予後の予測に重要である。本研究において Poly(I:C)投与により担がんマウス体内で CD11c 分子陽性の $CD8^+$ T cell 分画が増加する現象が認められた。このことより、この $CD11c^+CD8^+$ T cell 分画が Poly(I:C)療法時の治療奏功性評価のための有効な指標となり得ると考え、その可能性について解析を行った（第二章)。

[材料と方法] 実験には野生型マウス、および $CD8\alpha^+$ DC の数が減少している *Batf3* 欠損（$Batf3^{-/-}$）マウス、またその他複数の遺伝子欠損マウスを用いた。第一章ではそれらマウスに、OVA 抗原を発現している EG7 腫瘍株および WT1 抗原を発現している WT1-C1498 腫瘍株を移植した後 Poly(I:C)治療を行い、腫瘍径を経時的に測定することで腫瘍退縮誘導能を評価した。また、Poly(I:C)治療後にマウスからリンパ組織や腫瘍組織を採取し、FACS 解析や定量 PCR を用いて、抗原特異的 CTL や $CD8\alpha^+$ DC の活性化といった抗腫瘍性応答の有無を評価した。また、野生型および $Batf3^{-/-}$ マウスから $CD8\alpha^+$ DC を単離し、*in vitro* 実験において Poly(I:C)誘導性のクロスプレゼンテーション能や表現型の違いを評価した。更に、野生型および $Batf3^{-/-}$ マウス由来 $CD8\alpha^+$ DC を担がん-$Batf3^{-/-}$ マウスに移植したのち、Poly(I:C)による腫瘍退縮能を評価した。第二章の $CD11c^+$ $CD8^+$ T cell 分画の解析においては、Poly(I:C)治療後にリンパ組織および腫瘍組織内の $CD11c^+$ 分画の存在割合やその分子発現パターンを FACS により評価した。また、更に表現型を詳細に調べるため、$CD11c^+$ 分画を単離し、遺伝子発現パターンを定量 PCR により、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を 51Cr-release assay により評価した。また、Poly(I:C)による $CD11c^+$ 分画の増加誘導を担うシグナル経路を特定するため、Poly(I:C)刺激時に活性化する各種のシグナル伝達分子を欠損させたマウスを用い、Poly(I:C)治療後の $CD11c^+$ 分画の存在割合を評価した。

[結果] 第一章: Poly(I:C)による腫瘍退縮は $Batf3^{-/-}$ マウスで大きく低下しており、リンパ組織における腫瘍特異的 $CD8^+$ T cell の割合も減少していた。この $Batf3^{-/-}$ マウスにおける Poly(I:C)誘導性腫瘍退縮能の低下は、野生型マウス由来 $CD8\alpha^+$ DC を養子免疫移植することで回復した。そこで $CD8\alpha^+$ DC の表現型を野生型および $Batf3^{-/-}$ マウスで比較したところ、$Batf3^{-/-}$ マウス由来

CD8α$^+$ DC では Poly(I:C)誘導性クロスプレゼンテーション能が低下していた。またその他の違いとして、BATF3 の欠損により、CD8α$^+$ DC 中の特定サブセット（選択的に TLR3 を高発現しており、Poly(I:C)誘導性 IL-12 産生を担うサブセット）が消失することが明らかとなった。この BATF3 陽性 CD8α$^+$ DC サブセットから Poly(I:C)刺激に応答して産生される IL-12 は、CD4$^+$ T cell を活性化することで間接的に CD8$^+$ T cell 活性化を増強している可能性が示された。また *Batf3*$^{-/-}$ マウスでは Poly(I:C)刺激時の腫瘍内浸潤 CD8α$^+$ DC の割合も低下しており、腫瘍組織における *Il12* や *Cxcl9, 10, 11* といったケモカイン遺伝子の Poly(I:C)誘導性発現上昇もキャンセルされていた。それに関連し、*Batf3*$^{-/-}$ マウスでは Poly(I:C)による CD8$^+$ T cell の腫瘍組織内への浸潤も著しく低下していた。

第二章: マウスに Poly(I:C)投与を行うと、リンパ組織および腫瘍組織において CD11c$^+$ CD8$^+$ T cell が増加することが確認された。誘導された CD11c$^+$ 分画中には、高い割合で腫瘍抗原特異的 CD8$^+$ T cell が含まれていた。その CD11c$^+$ 分画の増加レベルは、腫瘍退縮程度と良く相関していた。CD11c$^+$ 分画の表現型を評価したところ、高い IFN-γ産生能、高い細胞傷害活性を有しており、遺伝子発現パターンは活性型 CTL と一致していた。この Poly(I:C)刺激時の CD11c$^+$ 分画の増加は、Poly(I:C)の下流の TLR3 経路および MAVS 経路のどちらかの経路に特異的に依存しているのではなく、刺激経路に関わらず CD8$^+$ T cell が受容した抗原特異的分裂シグナルの強度に比例し誘導されることが示された。

[考察] 第一章の結果より、BATF3 陽性 CD8α$^+$ DC サブセットが、Poly(I:C)による CTL 依存性腫瘍退縮において中心的役割を果たす責任細胞であることが明らかとなった。Poly(I:C)刺激を受けた BATF3 陽性 CD8α$^+$ DC は、リンパ組織においてクロスプレゼンテーションの促進および IL-12 を産生することで抗原特異的 CTL 活性化を誘導するのみならず、腫瘍組織からのケモカイン産生にも関与し、腫瘍内への CTL 浸潤を正に制御していることが示された。Poly(I:C)の下流では TLR3 経路以外に MAVS 経路も活性化するが、BATF3 陽性 CD8α$^+$ DC サブセットによる Poly(I:C)誘導性抗腫瘍免疫応答は TLR3 経路が担っていることが示された。Poly(I:C)療法の際に認められる有害事象は、MAVS 経路により誘導される全身的な I 型 IFN や炎症性サイトカイン産生に起因するといわれているため、TLR3 経路を特異的に刺激するアジュバントを用いれば、副作用を生じずに効果的に抗腫瘍 CTL を誘導出来る可能性がある。また第二章の結果より、Poly(I:C)療法の際に増加する CD11c$^+$ CD8$^+$ T cell は腫瘍抗原特異的活性化 CTL であることが示された。この CD11c$^+$ 分画の増加レベルは腫瘍退縮程度と良く相関すること、またその現象は特定の腫瘍種や Poly(I:C)療法のみに限定されないことが示されたことより、CD11c$^+$ 分化の増加レベルの測定は、様々な抗腫瘍免疫療法における治療奏功性を評価するための簡便な指標として広く利用出来る可能性がある。

[結論] 本研究により、TLR3 アジュバント療法において抗腫瘍免疫応答の中心的役割を担う樹状細胞サブセットの同定、およびその腫瘍退縮制御メカニズムの一端を明らかにした。また、上記メカニズムにより誘導された腫瘍抗原特異的 CTL に特徴的に認められる、CD11c 分子の発現増加という新たな表現型を見出し、この表現型が有用性の高い治療奏功性評価の指標となり得る可能性を示した。これら知見は、より有効かつ安全性の高い新規 TLR3 アジュバントや新規治療戦略の開発・臨床応用への一助となると考える。