



Title	自然免疫応答を利用した新規抗がん免疫誘導法・がん微小環境制御法の開発〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	吉田, 純人
Description	配架番号 : 2486
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13472号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74756
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sumito_Yoshida_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 吉田 純人

学 位 論 文 題 名

自然免疫応答を利用した新規抗がん免疫誘導法・がん微小環境制御法の開発
(Development of novel methods to induce antitumor immunity and regulate
tumor microenvironment secondary to innate immune response)

【背景と目的】

免疫応答によるがん細胞の傷害には、細胞傷害性 T 細胞(CTL)の「プライミング」「腫瘍内への浸潤」「エフェクター活性の発揮」の 3 点が不可欠である。このうちプライミングは樹状細胞(DC)による腫瘍抗原の抗原提示によって達成される。

当研究室ではこれまでに、トル様受容体(TLR)のリガンドが DC を成熟化させて抗原提示能を増強することに注目し、プライミングを増強するアジュバントとして新規 TLR リガンドの開発を行ってきた。マウスモデルで既知の腫瘍抗原と共にアジュバントを投与すると、腫瘍は劇的に退縮し、さらには既存のがん免疫療法であるチェックポイント阻害剤の抵抗性が解除される。したがって、TLR リガンドは優れたがん治療薬候補になる。しかし、このワクチンの試みは腫瘍抗原の同定と合成を前提としており、ヒトの抗原同定にはテーラーメイド医療として膨大な遺伝子解析を実施する必要がある。そのため現状ではアジュバントのがん治療への応用は容易ではない。

さらに、腫瘍内には種々の免疫抑制細胞が浸潤し、CTL のエフェクター活性を抑制する微小環境を構築する。TLR は代表的な腫瘍内免疫抑制細胞である腫瘍内マクロファージ(TAM)にも高発現し、その刺激は CTL のプライミングとは反対に、腫瘍の増悪に寄与する場合がある。したがって TLR リガンドをがん治療に用いるには、この微小環境を改善して負の免疫応答を取り除く必要がある。

これらの背景から、第一章では簡便な抗がん CTL 誘導法の開発を目的として、死細胞貪食による DC への抗原到達を応用した放射線/TLR リガンド併用療法を開発した。さらに第二章では免疫抑制性微小環境を改善するために、マクロファージ調節機能を有するチオール性アミノ酸誘導体 L-ergothioneine (EGT)を用いたがん免疫療法について検討した。

第一章 TLR リガンドと放射線を用いた新規がん免疫誘導法の開発

【方法・結果】

- (1) 卵白アルブミン発現ルイス肺癌細胞(LLC-OVA)移植をマウスに皮下移植し、担がんマウスモデルを作成した。本モデルでは、放射線単独治療による CTL 依存性の免疫応答は得られなかった。このマウスに放射線照射と TLR3 リガンド投与を併用すると、腫瘍抗原である OVA を投与しなかったにも関わらず、がんの増殖は強力に抑制された。
- (2) DC 機能不全である *Batf3*^{-/-}マウスや、CTL を抗体で除去したマウスで放射線/TLR3 リガンド併用療法を実施したところ、TLR3 リガンドによる放射線の治療効果増強は消失した。
- (3) 放射線/TLR3 リガンド併用療法を実施し、治療開始から 6~10 日後にフローサイトメトリーによる解析を行った。その結果、併用療法はそれぞれの単独治療に比べて顕著にリンパ節の CD44⁺ CD62L⁻ CTL を増加させた。この応答はプライミングの増強を表す。TLR3 リガンドあるいは放射線の単独治療ではこの作用は認められなかった。また、本併用療法は腫瘍内に浸潤する CTL の割合も増加させた。

- (4) 腫瘍内の遺伝子発現を解析したところ、放射線/TLR3 リガンド併用療法は CTL の遊走に関与する CXCL9, 10 と CCL3, 4, 5 の発現や、細胞傷害活性に関連する Perforin, Granzyme B, IFN- γ の発現を高めていた。

【考察】

本研究から、TLR3 リガンドはがん放射線治療のアジュバントとして機能し、その治療効果を大きく増強することがわかった。その作用は樹状細胞と CTL に依存しており、なおかつ強力にリンパ節における CTL のプライミングを誘導するものであった。さらに、本手法は腫瘍抗原の投与を必要としなかったことから、複雑な遺伝子解析を必要としない、簡便な腫瘍反応性 CTL の活性化法として利用可能と考えられる。

第二章 L-ergothioneine による TLR 応答調節は免疫抑制性がん微小環境を改善する

【方法・結果】

- (1) 骨髄由来マクロファージを EGT 存在下で各種 TLR リガンドによって刺激したところ、TLR リガンド単独時に比べて IL-12p40 など免疫系を活性化する因子の発現が上昇し、IL-10 や CD206, Arginase-1 など免疫抑制に関連する分子の発現は減弱した。つまり、EGT は免疫系を活性化するようにマクロファージの TLR 応答を調節した。
- (2) マウスに LLC-OVA 細胞を移植し、TLR2 リガンドと OVA を投与した。さらに EGT を併用したところ、腫瘍増殖は単独治療よりも強力に抑制された。抗体により CTL を除去すると EGT の作用は消失した。
- (3) フローサイトメトリーによって腫瘍内微小環境を解析した。TLR2 リガンドの投与条件下で、EGT は TAM に作用し、割合の減少と CTL 抑制性分子(PD-L1 や Arginase-1 等)の発現減少をもたらした。一方で種々の CTL 活性化マーカーの発現は EGT の併用により増加していた。
- (4) 共培養実験の結果、EGT による TAM 機能調節が直接的に CTL 抑制を解除した。この作用は EGT のチオール基に依存した。しかしながら、同様にチオール基を有する N-acetyl-L-cysteine には CTL 抑制を解除する作用がなく、EGT のチオール基に特有の性質が認められた。

【考察】

本研究から、EGT が TAM の CTL 抑制を解除することで、TLR2 リガンドを用いたワクチン療法の治療効果を増強することがわかった。EGT がどのような細胞内メカニズムで TAM 機能を調節するのかについては不明な点が残るが、腫瘍内微小環境を改善し、CTL の抗腫瘍活性を引き出すための新規手法として EGT の今後の応用が期待される。

【結論】

本研究の第一章では、放射線に TLR リガンドを併用することで、抗腫瘍性 CTL のプライミングと腫瘍内浸潤を極めて簡便に誘導できることを示した。さらに第二章では、TLR リガンドの存在下で、腫瘍内に浸潤した CTL のエフェクター活性が EGT によって劇的に改善されることを明らかにした。TLR リガンド/放射線/EGT の三者併用療法がさらに優れた抗腫瘍効果をもたらすかは今後の検討課題である。全体を通して本研究は自然免疫制御をがん治療に対して利用する価値をさらに高める研究であり、その成果はがんに対する CTL の誘導や、がん微小環境の制御法に反映される。本研究をさらに発展させることで、これまで免疫療法が無効であった患者にも有効な、新規がん免疫療法が達成されると考えられる。