HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13472
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74757
Type	doctoral thesis
File Information	Sumito_Yoshida.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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)

2019 年 3 月

北海道大学

吉田 純人

学位論文

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)

2019 年 3 月

北海道大学

吉田　純人

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁
要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁
序章・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁

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

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14 頁
実験材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15 頁
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22 頁
1-1　放射線による in vivo 腫瘍細胞死モデルの作成
1-2　TLR3 シグナルは放射線の治療効果を増強する
1-3　TLR3 リガンド/放射線併用療法の治療効果は DC と CTL に依存する
1-4　TLR3 リガンドと放射線の併用は CTL プライミングを誘導する
1-5　TLR3 リガンドと放射線の併用は CTL の腫瘍内浸潤を増強する
1-6　TLR3 リガンドと放射線は CTL 遊走関連ケモカインを腫瘍内で増加させる
1-7　TLR3 リガンドと放射線の併用は腫瘍内の細胞傷害関連分子の発現を増強する
1-8　TLR3 刺激で産生される TNF-α は腫瘍細胞の放射線感受性を増強する
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33 頁

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
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35 頁

第一節　L-ergothioneine (EGT)のマクロファージ TLR 応答調節作用の解析
実験材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36 頁
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39 頁
2-1-1　EGT はマクロファージの TLR 応答で生じた ROS を消去する
2-1-2　EGT はマクロファージの TLR 応答を調節する
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44 頁

第二節　L-ergothioneine によるがん微小環境改善作用の解析
実験材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46 頁
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51 頁
2-2-1　EGT は TLR2/6 リガンドの CTL 依存性がん治療効果を増強する
2-2-2　EGT は TLR2/6 リガンドがもたらす腫瘍内マクロファージの増殖を抑制する

2-2-3　EGT は TLR2/6 リガンドと共に腫瘍内マクロファージの CTL 抑制性分子の発現を低下させる
2-2-4　EGT は腫瘍内 CTL のエフェクター活性を増強する
2-2-5　EGT は抗酸化活性依存的に TAM の CTL 抑制を解除する
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・60 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・65 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・66 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・66 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Sumito Yoshida, Hiroaki Shime, Kenji Funami, Hiromi Takaki, Misako Matsumoto, Masanori Kasahara, Tsukasa Seya.
The anti-oxidant ergothioneine augments the immunomodulatory function of TLR agonists by direct action on macrophages
PloS one 12, e0169360 (2017)

2. Sumito Yoshida, Hiroaki Shime, Yohei Takeda, Jin-Min Nam, Ken Takashima, Misako Matsumoto, Hiroki Shirato, Masanori Kasahara, Tsukasa Seya.
Toll-like receptor 3 signal augments radiation-induced tumor growth retardation in a murine model
Cancer science 109, 956-965 (2018)

本研究の一部は以下の論文として投稿中である。

Sumito Yoshida, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Masanori Kasahara, Tsukasa Seya.
An anti-oxidative amino acid L-ergothioneine modulates tumor microenvironment to facilitate adjuvant vaccine immunotherapy
Frontiers in Immunology (submitted)

参考論文

1. Junya Ono, Hiroaki Shime, Hiromi Takaki, Ken Takashima, Kenji Funami, Sumito Yoshida, Yohei Takeda, Misako Matsumoto, Masanori Kasahara, Tsukasa Seya.
The TLR3/TICAM-1 signal constitutively controls spontaneous polyposis through suppression of c-Myc in Apc Min/+ mice
Journal of biomedical science 24,79 (2017)

2. Hiroaki Shime, Akira Maruyama, Sumito Yoshida, Yohei Takeda, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya.
Toll-like receptor 2 ligand and interferon-γ suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells
Oncoimmunology 7, e1373231 (2018)

3 . Tsukasa Seya, Yohei Takeda, Ken Takashima, Sumito Yoshida, Masahiro Azuma, Misako Matsumoto

Adjuvant immunotherapy for cancer: both dendritic cell-priming and check-point inhibitor blockade are required for immunotherapy

Proceedings of the Japan Academy, Series B 94, 153-160 (2018)

4. Yohei Takeda, Sumito Yoshida, Ken Takashima, Noriko Ishii-Mugikura, Hiroaki Shime, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto.

Vaccine immunotherapy with ARNAX induces tumor-specific memory T cells and durable anti-tumor immunity in mouse models

Cancer science 109, 2119–2129 (2018)

5. Yohei Takeda, Hiromi Takaki, Aya Fukui-Miyazaki, Sumito Yoshida, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya

Vaccine adjuvant ARNAX promotes mucosal IgA production in influenza HA vaccination

Biochemical and Biophysical Research Communications, 506, 1019-1025 (2018)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 吉田純人、志馬寛明、松本美佐子、冨山隆広、笠原正典、瀬谷司
L-ergothioneine はマクロファージによる炎症促進性サイトカインの産生を増大する
第 27 回日本生体防御学会学術総会、2016 年 7 月、福岡

2. Sumito Yoshida, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Masanori Kasahara, Tsukasa Seya.
TLR3 adjuvant enhances tumor regression in concert with radiation therapy in mouse tumor-implant models.
The 36th Sapporo International Cancer Symposium. June 2017, Sapporo.

3. 吉田純人、志馬寛明、南ジンミン、松本美佐子、笠原正典、白土博樹、瀬谷司
TLR3 リガンドはマウスモデルで放射線のがん治療効果を増強する
第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月，横浜

4. 吉田純人、志馬寛明、松本美佐子、笠原正典、瀬谷司
TLR3 リガンドは放射線の増感性免疫アジュバントとして機能する
第 22 回日本がん免疫学会学術総会、2018 年 8 月、岡山

要旨

【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。

略語表

Ab	Antibody
APC	Antigen presenting cell
BMDM	bone marrow-derived macrophage
CBA	Cytometric bead assay
CCL	CC chemokine ligand
CD	Cluster of differentiation
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
CTL	Cytotoxic T lymphocyte; CTL
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DC	Dendritic cell
DLN	Draining lymph node
EGT	L-ergothioneine
GMP	Good Manufacturing Practice
HER	L-Hercynine
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	Induced nitric oxide synthase
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharide
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene 5
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MHC	Major histocompatibility complex
MHC	Major histocompatibility complex
M-MDSC	Monocytic MDSC
MyD88	myeloid differentiation primary response
MΦ	Macrophage
NAC	N-Acetyl-L-cysteine
OCTN1	Organic cation/carnitine transporter 1
OVA	Ovalbumin
Pam2CSK4	2,3-Bis(palmitoyl) propyl Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys
Pam3CSK4	2,3-Bis(palmitoyl) propyl-N-palmitoyl-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys

PAMPs	Pathogen associated molecular pattern
PMN-MDSC	Polynuclear MDSC
PolyI:C	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	Pattern-Recognition Receptor
ROS	Reactive oxygen species
STING	Stimulator of interferon genes
TAA	Tumor-associated antigen
TAM	Tumor-associated macrophag
TAN	Tumor-associated neutrophil
TICAM-1	TIR domain-containing adapter molecule-1
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
Treg	Regulatory T cell
TUNEL	TdT-mediateddUTPnickendlabeling
WT	Wild-type

序章

自然免疫と獲得免疫

免疫系は自己と非自己を認識し、非自己を体内から排除する様に進化した。ヒトを含む脊椎動物では、免疫系は自然免疫と獲得免疫に大別される。自然免疫は非自己成分のパターン分子を認識して即時的な細胞応答を誘導する。自然免疫細胞にはマクロファージ(Macrophage; MΦ)、樹状細胞（Dendritic cell; DC）、好中球等が該当し、貪食、細胞変調因子をはじめとした抗原非特異的かつ速やかな異物の排除応答を惹起する。さらに MΦ や DC は抗原提示細胞（Antigen presenting cell; APC）に分類され、異物の抗原情報を獲得免疫細胞（リンパ球）に提示し、活性化をもたらす。即ち、自然免疫は獲得免疫とリンクする。

獲得免疫において非自己を規定する分子構造は抗原と呼ばれ、抗原は病原微生物や異種細胞等のあらゆる非自己に含まれる。一方、自己由来の細胞も抗原性を有する場合があり、一例としてがん細胞の遺伝子変異で生じた異常タンパク質が抗原として振る舞うことが知られている(Lee et al., 2018)。獲得免疫系は抗原特異的であり、T 細胞や B 細胞により構成され、強力かつ持続的な免疫応答を引き起こす(Iwasaki and Medzhitov, 2015)。つまり、自然免疫は抗原非特異的な防御を行うのみならず、獲得免疫活性化の起点となって、引き続く免疫応答を司るはたらきを有する。そのため、自然免疫の効率的な活性化が生体防御の達成にとって非常に重要である。

自然免疫活性化シグナル

APC を活性化させるには、パターン認識受容体（Pattern-Recognition Receptor; PRR）の刺激が重要である。PRR には細胞膜上およびエンドソーム内に局在する Toll-like receptor（TLR）や細胞質内に局在する RIG-I like receptor 等が含まれ、これらのリガンドには細菌やウイルスに由来する病原体関連分子パターン（Pathogen associated molecular patterns; PAMPs）や、傷害を受けた自己細胞に由来するダメージ関連分子パターン（Damage associated molecular patterns; DAMPs）が該当する(Blander and Sander, 2012; Kono and Rock, 2008)。

本研究では特に DC に発現する TLR の刺激による自然免疫応答に着目する。TLR は DC や MΦ に高発現する受容体であり、ヒトでは 1-10 の十種類が知られている。TLR3 を除いた TLR1-9 の刺激は、アダプター分子である myeloid differentiation primary response (MyD88)をリクルートする。

TLR3 のシグナル伝達は TIR domain-containing adapter molecule-1 (TICAM-1; 別名 TRIF)に依存し、さらには TLR4 の一部シグナルも TICAM-1 分子を介する。これらのシグナル伝達は最終的に NF-κB や AP-1、IRF ファミリー等の転写因子を活性化する(Pandey et al., 2014; Stack et al., 2014)。その結果サイトカインやI型インターフェロンの産生が生じ、さらに主要組織適合複合体（Major histocompatibility complex ; MHC）分子や副刺激分子（CD80、CD86）など抗原提示に必須の分子群が発現上昇する。TLR 刺激は複合的に獲得免疫の成立を導く(Dalod et al., 2014; Seya et al., 2015)。

腫瘍に対する免疫応答

自然免疫による獲得免疫の成立は、がんの排除に重要な役割を果たす。獲得免疫系細胞のうち、細胞傷害性 T 細胞（Cytotoxic T lymphocyte; CTL）はがん細胞を傷害する最終エフェクター細胞として知られており、腫瘍に反応する CTL は、APC が腫瘍関連抗原（Tumor-associated antigen; TAA）を主要組織適合複合体 (Major histocompatibility complex; MHC)クラスIを介して提示すること（クロスプレゼンテーション）で誘導される。この過程は新たに CTL を活性化する初回刺激であることから、プライミング相と呼ばれる。クロスプレゼンテーション活性は APC の中でも特に DC に強く、マウス $CD8\alpha^{+}$/$CD103^{+}$DC あるいはヒト $CD141^{+}$ DC がその担当サブセットである(Joffre et al., 2012)。活性化して血中に移行した CTL は CXCL9, 10, 11 および CCL3, 4, 5 のようなケモカインシグナルを介して腫瘍内に浸潤し、そこで抗原特異的な抗腫瘍作用を発揮する（エフェクター相）(de Charette et al., 2016) （図 1)。

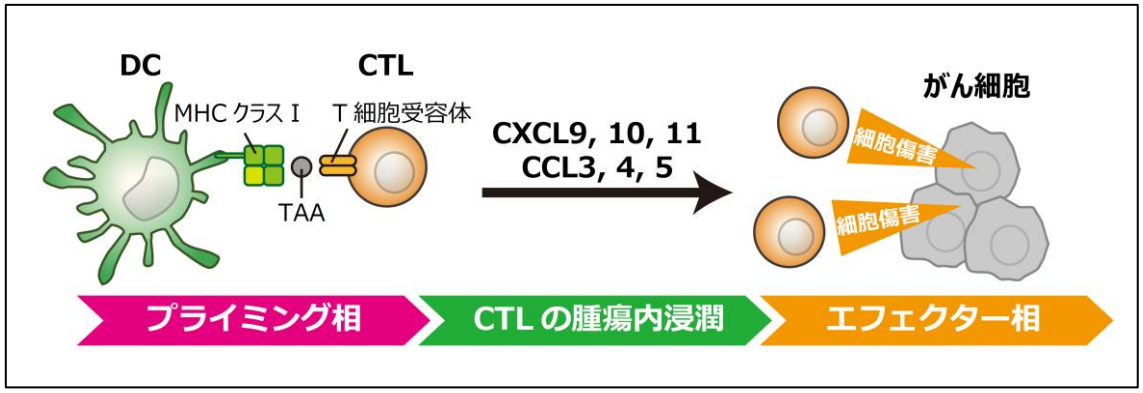

図 1. DC による抗がん CTL 応答の誘導：プライミング相、浸潤、エフェクター相

このように CTL の誘導は腫瘍排除に重要であるが、担がん患者のほとんどで CTL 応答は正常に機能していない。プライミング相と CTL 浸潤の

不足は組織学的にそれぞれ、CTL が腫瘍内に存在しない免疫枯渇型と、腫瘍の中心部まで CTL が達していない排除型につながる。また、CTL が腫瘍内に十分存在している組織型を炎症型と呼ぶが、CTL の疲弊化や、免疫抑制細胞の浸潤が強い場合には抗がん免疫系の働きは弱い(Chen and Mellman, 2017; Galluzzi et al., 2018)（図 2)。そのため、それぞれの免疫抑制状態に基づき適切に応答を改善することが、効果的ながん免疫療法の達成に重要である。例えば、TAA の外的投与はがんワクチンとしてプライミング相を増強して免疫枯渇を解除すると考えられ、抗 PD-1 抗体等の免疫チェックポイント阻害剤は、疲弊化 CTL の機能を改善することで炎症型腫瘍に対して治療効果を発揮する(Chen and Mellman, 2017)。

なお、腫瘍内の免疫抑制細胞としては制御性 T 細胞（Regulatory T cell; Treg）や、腫瘍関連マクロファージ（Tumor-associated macrophage; TAM）および腫瘍関連好中球（Tumor-associated neutrophil; TAN）が挙げられる。さらにミエロイド由来抑制性細胞（Myeloid-derived suppressor cell; MDSC）も腫瘍内に浸潤しており、TAM への分化能を有する単球系 MDSC (Monocytic MDSC; M-MDSC)と TAN に似た多形核細胞系 MDSC (polynuclear MDSC; PMN-MDSC)が観察される(Munn and Bronte, 2016; Ugel et al., 2015; Veglia et al., 2018)。これらの細胞の免疫抑制能を解除することもがんの治療戦略となり得る。

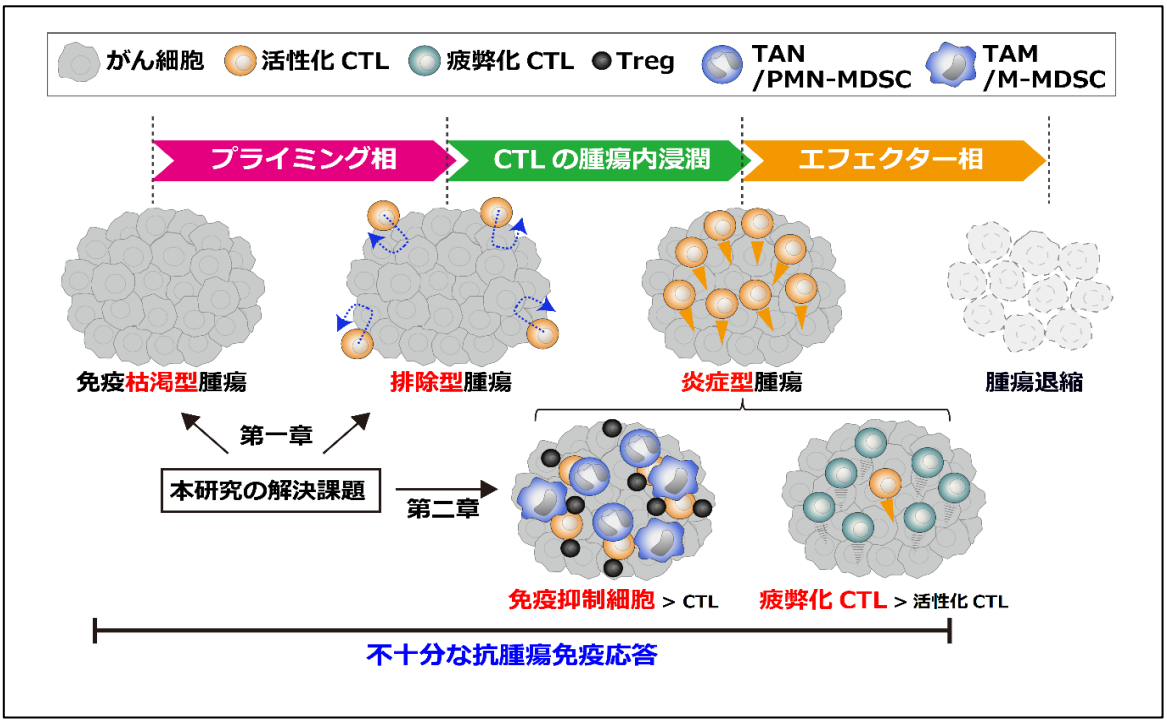

図 2. 腫瘍内の免疫状態と腫瘍排除の成否

自然免疫シグナルの利用・調節による抗がん免疫応答の増強

CTL 活性化や腫瘍内微小環境の構築には、DC や MΦ のような TLR 高発現の細胞が重要な役割を果たす。腫瘍反応性 CTL の誘導には、TAA と DC を成熟化する免疫賦活物質（アジュバント）が必須である(Seya et al., 2015)。CTL を活性化するヒト $CD141^+$ DC に TLR2 ヘテロダイマー(TLR2/1 と TLR2/6)と TLR3 のみが高発現することを考慮すると(Jongbloed et al., 2010)、これらのリガンドがワクチンのアジュバントとしてがん治療に応用され得る。そのため、当研究室を含む国内外のグループにより、物性、有効性、そして安全性に注目して様々な新規 TLR2 および TLR3 リガンドが開発されている(Akazawa et al., 2018; Matsumoto et al., 2015; Wang et al., 2018)。さらに TLR2/TLR3 リガンドは腫瘍内に CTL を浸潤させる作用も有するため(Takeda et al., 2017, 2018a)、これらは免疫枯渇型腫瘍や排除型腫瘍を改善するものと期待される。

一方でワクチンに用いる TAA として、がん細胞の遺伝子異常によって生じる抗原性の変異タンパク質、すなわちネオアンチゲンが有効である(Hu et al., 2018)。そのために全エキソンシーケンスを利用した抗原ペプチド合成が提案されており、これは腫瘍内遺伝子変異と MHC ハプロタイプを解析して、抗原提示されるペプチド構造をアルゴリズムで予測するものである(Aurisicchio et al., 2018)。しかしながら、ネオアンチゲンの同定には精度、所要時間、費用等の問題があり、現状では Good Manufacturing Practice (GMP)の基準を満たすワクチンの合成には、一人の患者につき 3~4 カ月を要すると見積もられる(Hu et al., 2018; Sahin and Türeci, 2018)。さらに近年、イントロン関連のネオアンチゲンが報告されており、エキソン解析だけでは有効な抗原を見落とす可能性が示唆される(Smart et al., 2018)。この背景から、腫瘍細胞に含まれるネオアンチゲンを包括的に、なおかつ簡便に投与する方法が望まれる。

これまでに腫瘍細胞に含まれるネオアンチゲンを包括的に投与する手法として、患者から摘出した腫瘍を放射線等により死細胞処理してワクチン化することが試行されている(Hu et al., 2018)。しかし、本手法ではワクチンの品質を一律にすることが困難であり(Guo et al., 2013)、医薬品として承認されない恐れがある。この問題を解決するためには、画一的な薬剤の投与により抗がん免疫を誘導することが必須である。

そこで、本研究では既存の化学療法や放射線療法によって生じるがん細胞の死がネオアンチゲンの供給源になること(Galluzzi et al., 2016)を利用し、この時に生理活性の定義された免疫アジュバントを投与することでワ

クチンとしての効果が得られる可能性を考えた。その研究として第一章では既存のがん治療法として放射線を用い、アジュバントとしての TLR リガンドの併用が CTL 誘導（プライミングおよび腫瘍内浸潤）を達成するか検討した。本手法は既存の治療法に薬剤を一つ追加するだけで成立するため、第一章の研究成果は CTL の誘導および腫瘍内浸潤をもたらす簡便な手法を与えるものと期待される（図 2)。

さらに TLR リガンドをワクチンに用いて、CTL のプライミングと腫瘍内浸潤を誘導しても、上述したように CTL の疲弊や免疫抑制性細胞の機能を解除しない限りは、治療効果の制限が予想される。特に TLR2 リガンドは腫瘍内微小環境において免疫抑制性の MΦ にはたらき、DC 成熟化の作用とは反対にがんの進展に寄与することが知られている(Kim et al., 2009; Kuang et al., 2007; Maruyama et al., 2015; Shime et al., 2017)。そのため、腫瘍制御に適した応答を増強し、適さない応答を減弱する必要がある。本研究の第二章では抗酸化性アミノ酸 L-ergothioneine (EGT)が MΦ の TLR 応答を調節することを発見したため、EGT が TLR2 がんワクチンと共にはたらく腫瘍内微小環境の改善剤として使用できるか検討を行った。第二章の研究結果は腫瘍内の免疫抑制状態を解除する新たなアプローチをもたらすものと期待される（図 2)。

第一章
新規抗がん免疫誘導法としての
放射線/TLR3 リガンド併用療法の開発

緒言

第一章では既存のがん治療法と TLR リガンドの免疫アジュバントとしての機能を利用して、抗原の同定を必要としない簡便な抗がん免疫誘導法を開発する。がんに対する放射線の使用はがん細胞の死をもたらし、死細胞貪食、または細胞内成分の流出を介して TAA を DC に到達させる(Galluzzi et al., 2016)。腫瘍内で TAA を取り込んだ DC はリンパ節に移行し、Naïve $CD8^+$ T cell に対するクロスプレゼンテーションを行い、CTL のプライミングを行う(Chen and Mellman, 2013)。したがって放射線治療は抗原の同定と投与を必要としない、簡便な抗がん免疫誘導法としてのポテンシャルを有するものである。

放射線で生じるがん死細胞は TAA のみならず、PRR を刺激する DAMPs（特に DNA）を放出し、DC の抗原提示能を増強することが報告されている(Deng et al., 2014)。しかし、実際には死細胞はアジュバント無しには抗がん免疫系を誘導することはできず(Ahn et al., 2018; Azuma et al., 2012; Ju et al., 2016)、自然に生じた DAMPs による DC 抗原提示誘導は限られた条件でのみ達成されるものと予想される。臨床的には放射線療法における免疫学的な治療効果としてアブスコパル効果（放射線照射後に生じる非照射領域での腫瘍抑制効果）が知られているが、その発生頻度はまれであると報告されており、放射線治療のみでは十分に免疫系を誘導できないことが示唆される(Reynders et al., 2015)。

そこで、本研究では DC 成熟化能に優れる TLR リガンドを放射線に併用することで抗がん免疫の誘導が達成できるものと考え、検討を行った。TLR リガンドはがんワクチンのアジュバントとして優れた CTL 誘導能を発揮するため、内因性に生じた TAA に対してもアジュバント効果を発揮すると期待できる。特に当研究室では TLR3 を標的として、全身性のサイトカイン過剰産生を起こさない安全な合成アジュバントの開発を行っているため(Matsumoto et al., 2015; Takeda et al., 2017)、本研究では TLR3 リガンドを放射線に併用する。予想が正しければ、本併用療法は単に放射線の治療効果を改善するのみならず、抗原の同定・投与を必要としないがん免疫誘導法を達成すると期待される。

実験材料と方法

1. マウス

WT の C57BL/6 マウス(以下 WT B6) は日本クレア社より、*Batf3*$^{-/-}$マウスは Jackson Laboratory 社より購入した。*Tnf-α*$^{-/-}$マウスは東京理科大学 岩倉洋一郎教授より、*Tlr3*$^{-/-}$マウスは大阪大学　審良静男教授より供与された。*Ticam1*$^{-/-}$ マウス、*Mavs*$^{-/-}$ マウス、*Tmem173*$^{-/-}$ マウスは当研究室で作成された(Akazawa et al., 2007; Oshiumi et al., 2011; Takashima et al., 2016)。
マウスは SPF 条件下で飼育され、6~14 週齢で使用された。全ての動物実験は、北海道大学動物実験に関する規程に従い、承認を受けて行った。

2. 細胞培養

試薬	メーカー
ウシ胎児血清(Fetal bovine serum; FBS)	GE Healthcare
L-Glutamine	Thermo Fischer Scientific
HEPES	Thermo Fischer Scientific
2-mercaptoethanol (2-ME)	Thermo Fischer Scientific
Penicillin/streptomycin	Thermo Fischer Scientific
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Thermo Fischer Scientific
LIPOFECTAMINE2000	Thermo Fischer Scientific
Puromycin	Sigma-Aldrich

卵白アルブミン発現ルイス肺癌細胞(LLC-OVA)は北海道大学 西村孝司元教授ならびに北村秀光准教授らから供与された。LLC-OVA 細胞は 10%非動化 FBS、2 mM L-glutamine、25 mM HEPES、55 μM2-ME、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin、100 μg/ml G418 を含む IMDM 中で培養した。培養は 37° C、5% CO_2 の条件下で行った。

GFP 発現 LLC-OVA 細胞は当研究室で作成されたものであり、LLC-OVA 細胞（1.25×10^6）に LIPOFECTAMINE2000 を用いて pME-EGFP-IRES-Puro プラスミド（8 μg）をトランスフェクションし、1.5 μg/ml Puromycin でセレクションすることで得られた。培養は LLC-OVA 細胞と同様のメディウムに 1.5 μg/ml Puromycin を加えて行われた。pME-EGFP-

IRES-Puro plasmid は大阪国際がんセンター井上徳光部長から供与された。

3. 腫瘍移植

試薬または機器	メーカー
PolyI:C	GE Healthcare
MBR-1520R-4	Hitachi

マウスの腰背部に LLC-OVA 細胞を皮下移植し (2×10^6 cells/200μl PBS/匹) 、腫瘍の長径と短径をノギスで計測した。腫瘍体積は公式 [腫瘍体積 (cm^3) = 短径 (cm) × 短径 (cm) × 長径 (cm) × 0.4]によって算出した。マウスへの polyI:C 投与は腹腔内投与で行った。腫瘍局所への X 線照射は MBR-1520R-4 を用いて、腫瘍部以外を 3 mm 厚の鉛板で遮蔽し、150 kV、20 mA、1.5 Gy/分の条件下で実施した。抗体による $CD8^+$ T 細胞(CTL)の除去は、ハイブリドーマ移植ヌードマウス由来の抗 CD8β 抗体含有腹水を各種治療開始の 1 日前に腹腔内投与することで達成された。

4. フローサイトメトリー

(A) 組織からの細胞の回収

試薬	メーカー
Collagenase I	Sigma-Aldrich
Collagenase IV	Sigma-Aldrich
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich
DNase I	Takara Bio
Hank's balanced salt solution	Sigma-Aldrich
RPMI1640	Thermo Fischer Scientific

腫瘍をカミソリによって細断した後、0.05 mg/ml Collagenase I、0.05 mg/ml Collagenase IV、0.025 mg/ml Hyaluronidase、0.01 mg/ml DNase I を含む Hank's balanced salt solution に懸濁して、33°C、15 分間の処理を行った。100 μm ストレイナーを通して得た細胞に ACK lysis buffer [組成: 150mM NH_4Cl、10mM $KHCO_3$、0.1 mM Na_2EDTA/H_2O] を 1 分間反応させて赤血球を溶解し、残った細胞をさらに 40 μm ストレイナーに通してから解析に用いた。脾臓なら

びに鼠径リンパ節の細胞は 10% 非働化 FBS 含有の RPMI1640 の中でスライドガラスの磨りガラス部分で組織をしごくことで回収した。

脾臓細胞は ACK lysis buffer による 1 分間の溶血処理の後、さらに 40 μm ストレイナーに通して、細胞懸濁液として使用した。鼠径リンパ節細胞は ACK lysis buffer で処理することなく 40 μm ストレイナーに通して、細胞懸濁液として使用した。

(B) 細胞の染色および測定

抗体または細胞染色試薬	クローン番号	メーカー
FITC-anti-mouse CD3	145-2C11	Biolegend
PE/Cy7-anti-mouse CD3	17A2	Biolegend
AlexaFluor700-anti-mouse CD8	53-6.7	Biolegend
APC-anti-mouse CD8	53-6.7	Biolegend
PE/Cy7-anti-mouse/human CD11b	M1/70	Biolegend
APC-anti-mouse CD11c	N418	Biolegend
PE/Cy7-anti-mouse CD11c	N418	Biolegend
APC-anti-mouse/human CD44	IM7	Biolegend
AlexaFluor700-anti-mouse CD45.2	104	Biolegend
APC/Cy7-anti-mouse CD45.2	30-F11	Biolegend
FITC-anti-mouse CD62L	MEL-14	Biolegend
APC-anti-mouse F4/80	BM8	Biolegend
FITC-anti-mouse F4/80	BM8	Biolegend
APC-anti-mouse Ly6G/Ly6C (Gr-1)	RB6-8C5	Biolegend
Purified anti-mouse CD16/32	93	Biolegend
PE-Rat IgG1, κ	BM2a	eBioscience
T-select H-2Kb OVA Tetramer-SIINFEKL-PE	-	MBL
BD ViaProbe (7-AAD)	-	BD Bioscience

試薬または機器	メーカー
ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA)	Sigma-Aldrich
BD FACS Calibur	BD Biosciences
BD FACS AriaII	BD Biosciences
FlowJo software	Tree Star

細胞を FACS buffer [組成: 0.5% BSA、0.1% NaN_3 / PBS]に再懸濁して、抗 CD16/32 抗体によるブロッキング(希釈倍率 ×200、4℃、5 分)の後に、各種蛍光標識抗体(希釈倍率 ×200、4℃、30 分)による染色を行った。フローサイトメーターとして BD FACS Calibur または BD FACS AriaIIを用い、解析には FlowJo software を用いた。OVA tetramer による染色時には、細胞を先に OVA tetramer と反応 (希釈倍率 ×50、4℃、30 分)させた後、他の蛍光標識抗体で染色した。BD ViaProbe は希釈倍率 ×50 で使用し、各種抗体と同時に添加した。

(C) 細胞内染色

試薬	メーカー
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
BD Cytofix/Cytoperm Kit	BD Biosciences
PE-anti-mouse TNF-α (クローン: MP6-XT22)	Biolegend

PolyI:C 投与後の腫瘍内細胞の TNF-α 細胞内染色を行う場合は、腫瘍を polyI:C 投与から 1 時間後に単離し、得られた腫瘍細胞懸濁液を 10% 非働化 FBS 含有の RPMI1640 の中で 5 時間、10 μg/mL Brefeldin A 存在下で培養した。細胞を回収して各種細胞表面マーカーで染色した後、BD Cytofix/Cytoperm Kit によって固定化・透過性処理を行い、さらに抗 TNF-α 抗体による染色を実施した。

4. 腫瘍内サイトカイン含量の決定

試薬	メーカー
CelLytic MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent	Sigma-Aldrich
Complete Protease Inhibitor Mixture	Roche
CBA mouse TNF Flex Set	BD Biosciences

腫瘍を単離し、カミソリでおよそ 15 mg の小片に細断した後、10 μl/腫瘍重量 mg の CelLytic MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent に腫瘍片を溶解した。このとき、Complete Protease Inhibitor Mixture が加えられた。

溶解液中のサイトカイン(TNF-α)含量は cytometric beads assay (CBA)によって決定された。

5. WST-1 アッセイ

試薬または機器	メーカー
WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)	Doijndo
1-methoxy PMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate)	Doijndo
Recombinant Mouse TNF-alpha Protein	R&D Systems
CellRad X線照射装置	Faxitron Bioptics

96 ウェルプレートに 5 x 10^3 個の LLC-OVA を播種して、TNF-α の添加ならびに X 線の照射を実施した。X 線照射は CellRad を用いて 130kV、5mA、1.5 Gy/min の条件下で実施した。細胞培養は放射線照射から 48 時間継続した。その後 1-Methoxy PMS で 10 倍に希釈した WST-1 を培養上清に 1/10 量添加し 37℃で 2 時間静置した。450 nm の吸光度($A_{450\ nm}$)を測定し、細胞生存率を次の式によって算出した [相対生存率(増殖率) = 各ウェルの $A_{450\ nm}$/無処置群ウェルの $A_{450\ nm}$ の平均値(n =3) × 100 (%)]。

6. 逆転写定量 PCR (RT-qPCR)

試薬	メーカー
TRIzol reagent	Sigma-Aldrich
DNase I	Takara Bio
High capacity cDNA Reverse Transcription kit	BD Biosciences

カミソリで細断した腫瘍片を TRIzol reagent に溶解した。サンプルを-80℃にて数日保存した後、室温にて 1/5 量のクロロホルムを加え、十分に混和した。2 分間静置した後にサンプルを 12,000 g、15 分間の条件で遠心し、水層とクロロホルム層に分離した。水層のみを分取し、等量のイソプロパノールを加え、再び十分に混和し、10 分間静置した。その後さらにサンプルを 12,000 g、10 分間の条件で遠心し、上清を捨て、沈殿を 70%エタノールで洗

浄した。十分に風乾させた後に沈殿物を水で溶解し、RNA 抽出物を得た。精製した RNA は、400-1000 ng の RNA に対し DNase I を 5 U 加えて室温で 15 分間反応させ DNase を不活化した。その後 EDTA を最終濃度が 2.5 mM になるように加え、80°C で 2 分間処理することで DNase I 反応を停止させた。その後 High capacity cDNA Reverse Transcription kit を用い、random primer による逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、Power SYBR Green master mix を用いて PCR を行い、増幅産物を Step One Real-time PCR system (Applied Biosystems 社) により検出した。得られた増幅曲線より Ct 値を算出し、鋳型に含まれる mRNA 量を ΔΔCt 法により算出した。なお、内部標準としては *Gapdh* を使用した。用いたプライマーの配列は次の表の通りである。

遺伝子	Forward primer 配列 (5' – 3')	Reverse primer 配列 (5' – 3')
Ccl3	TTGAAACCAGCAGCCTTTGC	CTTTGGAGTCAGCGCAGATCT
Ccl4	GCCCTCTCTCTCCTCTTGCT	GGAGGGTCAGAGCCCATT
Ccl5	TGCCCACGTCAAGGAGTATTT	TCGAGTGACAAACACGACTGC
Cxcl9	GATAAGGAATGCACGATGCTC	TCTCCGTTCTTCAGTGTAGCAA
Cxcl10	GTGTTGAGATCATTGCCACGA	GCGTGGCTTCACTCCAGTTAA
Cxcl11	GGCTGCGACAAAGTTGAAGTGA	TCCTGGCACAGAGTTCTTATTGGAG
Gapdh	GCCTGGAGAAACCTGCCA	CCCTCAGATGCCTGCTTCA
Gzmb	GCCTGGAGAAACCTGCCA	CCCTCAGATGCCTGCTTCA
Ifng	GATATCTGGAGGAACTGGCAAAAG	AGAGATAATCTGGCTCTGCAGGAT
Prf1	CAAGGTAGCCAATTTTGCAGC	GGCGAAAACTGTACATGCGAC

7. 腫瘍組織切片作製

試薬または機器	メーカー
10%中性緩衝ホルマリン	Sigma-Aldrich
O.C.T. compound	Sakura Finetek
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche
ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific

腫瘍組織塊を 10%中性緩衝ホルマリン液に浸し 4°C で 3 時間固定した。その後 15% スクロース / PBS 溶液に移し、組織塊が底に沈むまで 4°C で

スクロース置換を行った。その後 30% スクロース / PBS 溶液に移し、再び組織塊が底に沈むまで 4° C で置換操作を行った後、組織塊を Tissue-Tek O.C.T. compound に移し、液体窒素に浸し凍結させることで包埋した。凍結ブロックからクライオスタット LEICA CM1850 (LEICA BIOSYSTEMS) を用いて 10 μm の厚さの組織切片を切り出し、剥離防止処理がなされたスライドグラスに張り付けた。スライドグラスを充分に乾燥させ、4% PFA/PBS を用いて室温で 20 分間固定化した後、0.1 % Titon X-100, 0.1 % クエン酸ナトリウム水溶液で透過性処理を行い、TUNEL アッセイキットである In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein を用いて死細胞染色を実施した。さらに ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI を組織上に添加し、カバーグラスをかぶせて封入した後、作製した組織切片を蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE)を用いて観察した。

8. 統計処理

2 群間の有意差検定では、Student's t-検定または Mann-Whitney U 検定を用いて p 値を求めた。多重比較検定では、one-way analysis of variance (ANOVA)の後に Bonferroni 法を実施して p 値を求めた。グラフ中のエラーバーは SD を表す。

実験結果

1-1　放射線による *in vivo* 腫瘍細胞死モデルの作成

マウス皮下にモデル抗原(卵白アルブミン)を発現する肺がん細胞 LLC-OVA を移植し、体積が約 0.4 cm^3 に達した時点で 15 Gy の X 線(X-radiation; Rad)を腫瘍に単回局所照射した。照射から 48 時間後に腫瘍組織内の細胞死を TUNEL アッセイで評価したところ、放射線は腫瘍内の TUNEL 陽性細胞を増加させ、細胞死の誘導をもたらした(Fig. 1-1A)。さらに腫瘍体積を経時的に測定したところ、放射線は LLC-OVA 腫瘍の増殖を抑制した(Fig. 1-1B)。

放射線の治療効果が CTL に依存するか判定するため、抗 CD8β 抗体を投与したマウスで同様に LLC-OVA 腫瘍への放射線照射を実施したところ、腫瘍増殖抑制効果はほとんど影響を受けなかった(Fig. 1-1B)。したがって、本放射線照射モデルは腫瘍細胞を直接的に傷害し、CTL 非依存性の治療効果を示すものである。

なお、放射線は DC の DAMPs (DNA)認識経路である cGAS/STING 経路を活性化する。STING KO (*Tmem173*$^{-/-}$)マウスで CTL プライミング、ならびに放射線治療効果が消失することが報告されているが(Deng et al., 2014)、本 LLC-OVA モデルでは野生型マウスと *Tmem173*$^{-/-}$マウスが同様に放射線の腫瘍増殖抑制効果を受けたため(Fig. 1-1C)、自然に生じる DAMPｓシグナルでは CTL の誘導に至らないことが示唆された。そのため、以下の実験では DC 成熟化をもたらす TLR3 リガンドを放射線に併用し、免疫学的な治療効果を誘導できるか検討した。

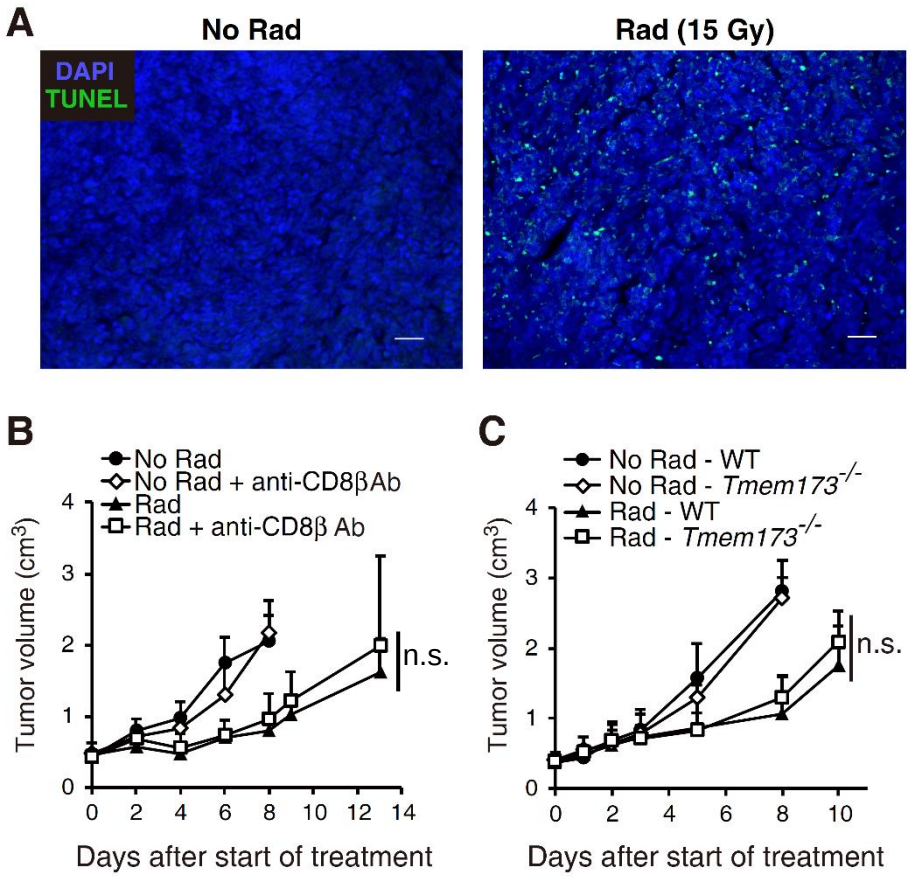

Fig. 1-1 CTL 非依存性のがん放射線治療モデルの作成

LLC-OVA 細胞を WT B6 マウスに移植し、腫瘍体積が約 0.4 cm^3 に達した時点で 15 Gy の X 線(Rad)を腫瘍局所に単回照射した。

(A) 腫瘍組織を放射線照射から 48 時間後に単離し、凍結切片を用いて TUNEL アッセイを実施した。腫瘍は各群 2 匹ずつから単離し、得られた代表的な画像を掲示した。青色は DAPI の、緑色は TUNEL の蛍光を表す。白線の長さは 50 μm に相当する。

(B) WT B6 ならびに anti-CD8β Ab を投与したマウスで放射線照射後の腫瘍体積を測定した。n = 3 匹/群。独立した二つの実験のうち、代表的なデータを掲載した。

(C) WT B6 ならびに STING KO (*Tmem173*$^{-/-}$)マウスに LLC-OVA 細胞を移植し、放射線照射後の腫瘍体積を測定した。n = 4-5 匹/群。

n.s.; 統計学的有意差無し。

1-2　TLR3 シグナルは放射線の治療効果を増強する

TLR3 のリガンド活性を有する polyI:C を放射線に併用し、LLC-OVA 腫瘍の体積を経時的に測定した。その結果、WT B6 において polyI:C は有意に放射線の治療効果を増強することがわかった(Fig. 1-2A)。PolyI:C は TLR3/TICAM-1 経路のみならず、細胞内 RNA センサーである MDA5/MAVS 経路を活性化することが知られるため(Kato et al., 2006)、次に *Tlr3*$^{-/-}$, *Ticam1*$^{-/-}$, *Mavs*$^{-/-}$マウスを用いて、どのシグナル経路が放射線の治療効果増強に重要か検討した(Fig. 1-2B)。その結果、polyI:C による放射線治療効果増強は *Tlr3*$^{-/-}$および *Ticam1*$^{-/-}$マウスで消失し、*Mavs*$^{-/-}$マウスで残存した。すなわち、担がん宿主細胞の TLR3/TICAM-1 経路が本増強効果に重要であることが示された。

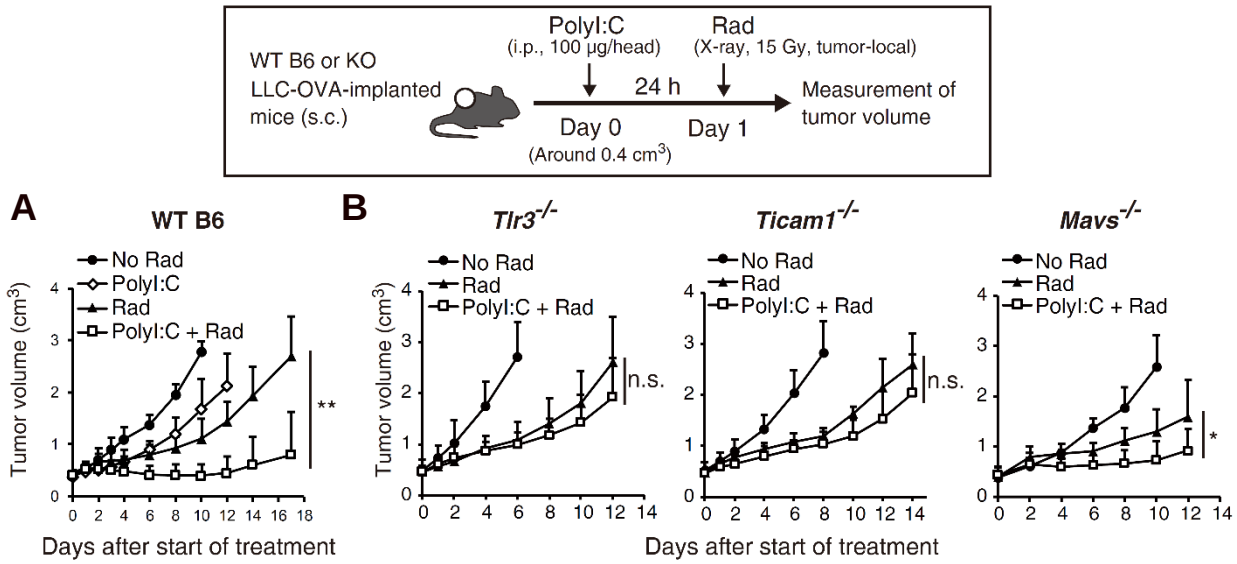

Fig. 1-2 TLR3 リガンドは放射線のがん治療効果を増強する

LLC-OVA 細胞を WT B6 または各種 KO マウスに移植し、腫瘍体積が約 0.4 cm^3 に達した時点で polyI:C (100 μg/匹)を腹腔内投与し、24 時間後に 15 Gy の X 線(Rad)を腫瘍局所に単回照射した。

(A) WT B6 における腫瘍体積測定結果。n = 5-7 匹/群。データは同様の結果となった 2 つの実験をまとめたものである。

(B) 各種 KO マウスにおける腫瘍体積測定結果。n = 3-5 匹/群。

*p < 0.05、**p < 0.01、n.s.; 統計学的有意差無し。

1-3　TLR3 リガンド/放射線併用療法の治療効果は DC と CTL に依存する

次に、TLR3 リガンドによる放射線治療効果の増強が DC 成熟化、ならびに CTL 誘導に依存するか検討するため、$CD8^+/CD103^+$ DC (クロスプレゼンテーションの責任サブセット)が機能不全である *Batf3*$^{-/-}$マウス(Azuma et al., 2016)、ならびに抗体によって CTL を除去したマウスを用いて、Fig. 1-2 と同様に polyI:C 投与と放射線照射を行った。その結果、これらのマウスで polyI:C による放射線治療効果の増強は消失し(Fig. 1-3)、この作用には DC/CTL を介した免疫応答が必須であることがわかった。

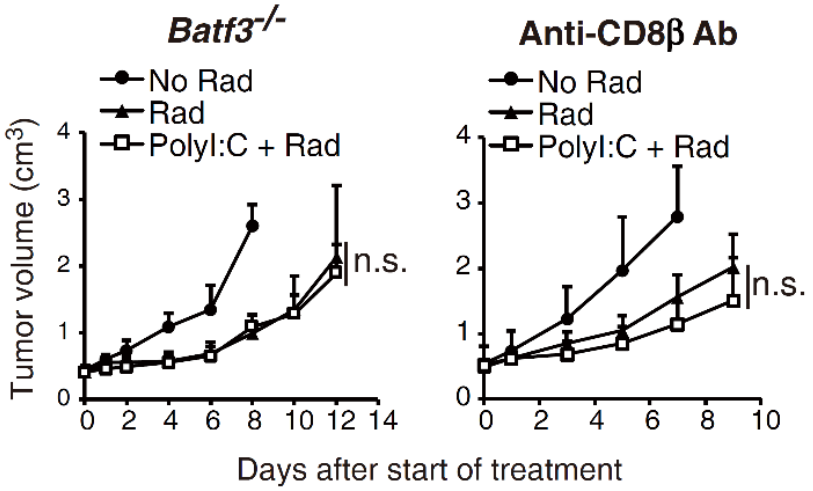

Fig. 1-3 TLR3 リガンドは DC/CTL 依存性に放射線治療効果を増強する

LLC-OVA 細胞をマウスに移植し、腫瘍体積が約 0.4 cm^3 に達した時点で polyI:C (100 μg/匹)を腹腔内投与し、24 時間後に 15 Gy の X 線(Rad)を腫瘍局所に単回照射した。

(A) *Batf3*$^{-/-}$マウスに LLC-OVA 細胞を移植し、各種治療後の腫瘍体積の推移を測定した。

(B) Anti-CD8β Ab 処理によって CTL を除去したマウスで各種治療後の腫瘍体積の推移を測定した。

n.s.; 統計学的有意差無し。

1-4　TLR3 リガンドと放射線の併用は CTL プライミングを誘導する

結果 1-3 より、DC と CTL が本併用療法の治療効果に必須であることがわかった。そのため、次にそれぞれの単独治療ならびに併用治療における、DC の抗原提示および CTL のプライミングを評価した。

DC による CTL のプライミングはリンパ節で生じる。本モデルはリンパ節 DC への死細胞の到達を期待するものであるため、その評価のために GFP 発現 LLC-OVA 細胞を WT B6 マウスに移植し、併用治療から 24 時間後にリンパ節 DC の GFP 陽性率を測定した(Fig. 1-4A)。その結果、リンパ節の $CD103^+$ DC にのみ GFP 陽性画分が認められ、その割合は併用治療で大きく増加した。すなわち、本併用療法はリンパ節に腫瘍死細胞を取り込んだ DC を増加させるものである。

また、DC の抗原提示には抗原提示関連分子の発現上昇、すなわち成熟化が必須である。そこで、$CD103^+$ DC の成熟化を副刺激分子 CD86 の発現強度によって評価したころ、放射線は DC の成熟化を全く誘導せず、併用療法による DC 成熟化は TLR3 刺激に大きく依存することが明らかになった(Fig. 1-4B)。

併用療法による DC の抗原取り込みと成熟化の増強は、クロスプレゼンテーションにつながることが予想された。そこで、腫瘍近傍リンパ節(Draining lymph node; DLN)および脾臓において $CD8^+$ T 細胞のプライミング(活性化)を $CD44^+$ $CD62L^-$エフェクターメモリー細胞の割合で評価したところ(Wherry and Kurachi, 2015)、併用療法を受けたすべての個体でその割合は大幅に上昇していた(Fig. 1-4C)。

さらに活性化した CTL がモデル抗原である OVA に特異性を有するかテトラマーアッセイにより評価したところ、予想外に併用療法では OVA への特異性が高い個体と低い個体に結果がわかれた(Fig. 1-4C)。すべての個体で活性化 CTL が増加することを考慮すると、本併用療法では OVA 以外の TAA も DC に取り込まれ、CTL 活性化に利用されていることが示唆される。実際に併用療法で誘導された OVA テトラマー陰性の $CD44^+$ $CD62L^-$ $CD8^+$ T 細胞が LLC-OVA に内在する抗原に対して反応性を有するかは今後の検討課題であるが、本併用療法は幅広い内在性抗原に対応し、CTL を誘導するものと期待される。

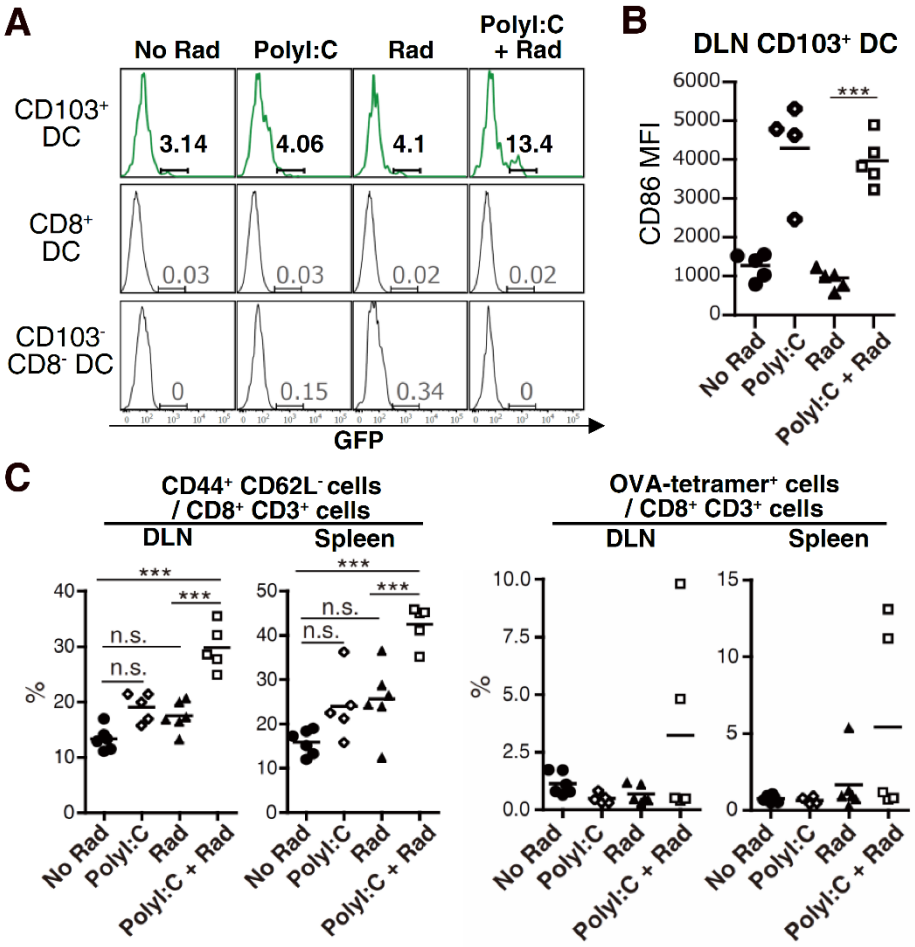

Fig. 1-4 TLR3 リガンドと放射線の併用は、CTL プライミングを誘導する

(A) GFP 発現 LLC-OVA 細胞を WT B6 マウスに移植し、腫瘍体積が約 0.4 cm^3 に達した時点で polyI:C (100 μg/匹)を腹腔内投与し、24 時間後に 15 Gy の X 線を腫瘍局所した。さらに 24 時間後、腫瘍近傍リンパ節 (Draining lymph node; DLN)を採取し、各種 DC サブセットの GFP 陽性率をフローサイトメトリーで測定した。リンパ節は各群 5 匹ずつから採取し、細胞を混合した後に測定した。

(B) LLC-OVA 細胞を WT B6 マウスに移植し、Fig. 1-4A と同様に polyI:C と放射線で処置した。放射線照射から 24 時間後に DLN の $CD103^+$ DC をフローサイトメトリーで解析し、CD86 の MFI を求めた。n = 4-5。

(C) LLC-OVA 細胞を WT B6 マウスマウスに移植し、Fig. 1-4A と同様に polyI:C と放射線で処置した。放射線照射から 5 日後に DLN と脾臓の細胞を単離し、$CD8^+$ $CD3^+$ 細胞における $CD44^+$ $CD62L^-$ 細胞と OVA $tetaramer^+$ 細胞の割合をフローサイトメトリーで評価した。n = 5-6。

***$p < 0.001$、n.s.; 統計学的有意差無し。

1-5　TLR3 リガンドと放射線の併用は CTL の腫瘍内浸潤を増強する

CTL が抗腫瘍作用を発揮するためには、プライミングのみならず、腫瘍内への浸潤が重要な要因となる。そこで、腫瘍内の $CD8^+$ $CD3^+$ 細胞の割合を評価した(Fig. 1-5)。その結果、TLR3 リガンドと放射線は有意ではないものの、それぞれ軽度に CTL 浸潤を増加させ、これらを併用することで強力な腫瘍内 CTL 浸潤が達成された。したがって、TLR3 リガンド/放射線併用療法は単にプライミングを誘導するのみならず、CTL の腫瘍内浸潤も増加させる治療法になることが明らかになった。

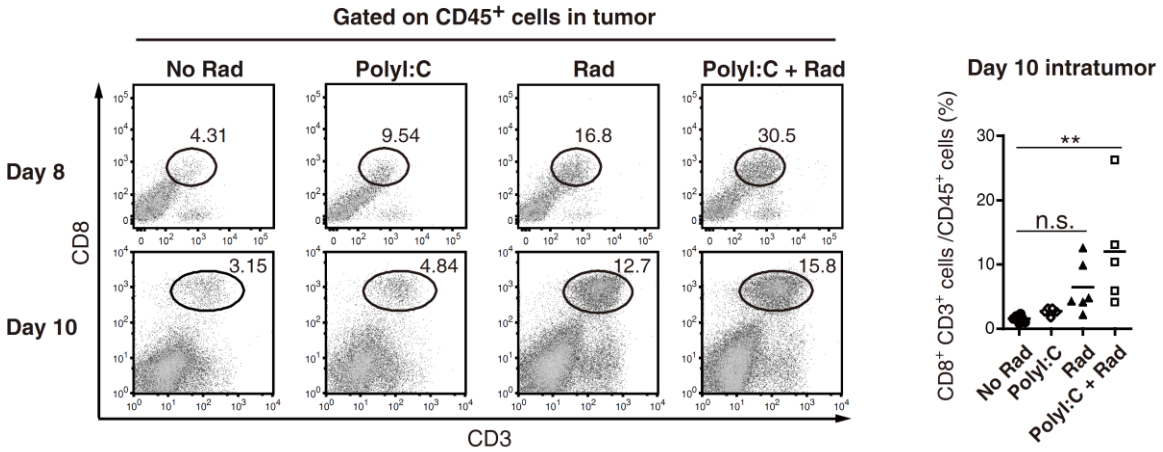

Fig. 1-5 TLR3 リガンドと放射線の併用は、腫瘍内の CTL を増加させる

LLC-OVA 細胞を WT B6 マウスに移植し、Fig. 1-2A と同様に polyI:C と放射線の処置を行った。治療開始から 8 日後(Day 8)または 10 日後(Day 10)に腫瘍を単離し、$CD45^+$ 免疫細胞における $CD8^+$ $CD3^+$ 細胞の割合をフローサイトメトリーで評価した。Day8 については、各群 2 匹ずつから腫瘍を単離して測定を行い、代表的な CD8/CD3 の展開図を図示した。Day10 については各群 5-6 匹ずつから腫瘍を単離し、各群の細胞を混合した際のデータを CD8/CD3 の展開図として、個体ごとのデータを右パネルにドットプロットグラフで表示した。**$p < 0.01$、n.s.; 統計学的有意差無し。

TLR3 リガンドと放射線は CTL 遊走関連ケモカインを腫瘍内で増加させる

CTL の腫瘍内浸潤はケモカインシグナルに大きく依存するため (González-Martín et al., 2011; Vicari and Caux, 2014)、次に活性化 CTL の遊走に関与する CXCR3 ケモカイン(CXCL9, 10, 11)ならびに CCR5 ケモカイン(CCL3, 4, 5)の腫瘍内遺伝子発現について解析を行った(Fig. 1-6)。その結果、有意でないものの、TLR3 リガンドと放射線はそれぞれわずかに CXCL9, 10 の発現を上昇させ、これらの併用は CXCL9, 10 を顕著に発現上昇させた。放射線照射は CCL3,4,5 の発現を単独治療でも増加させ、TLR3 リガンドを併用してもそのその値は同程度だった。

すなわち、放射線は単独でも CCL3, 4, 5 を介して CTL の腫瘍内への遊走をもたらし、その遊走は TLR3 リガンドがもたらす CXCL9,10 の発現上昇によってさらに強まることが示唆される。この結果は Fig. 1-5 で示した腫瘍内 CTL の割合と一致する。

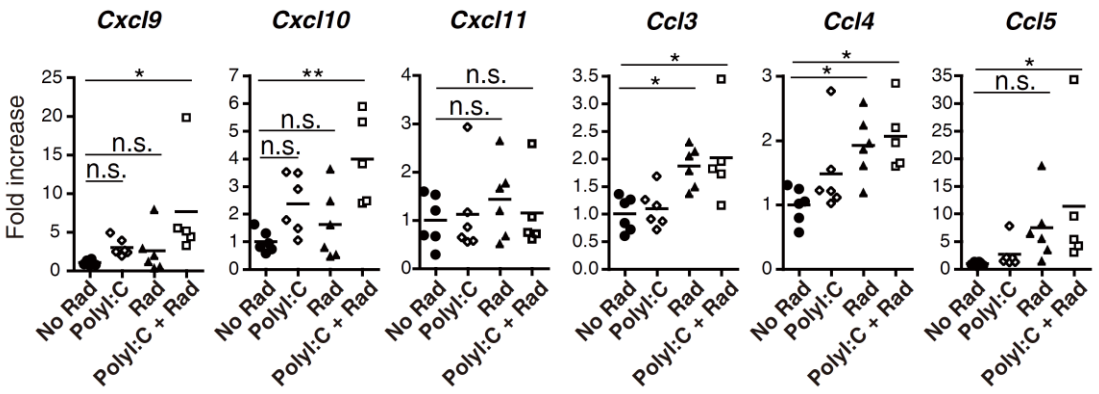

Fig. 1-6 TLR3 リガンドと放射線による CTL 遊走関連ケモカインの誘導

LLC-OVA 細胞を WT B6 マウスに移植し、Fig. 1-2A と同様に polyI:C と放射線の処置を行った。治療開始から 10 日後に腫瘍を回収し、その RNA 発現を逆転写 PCR 法により解析した。n = 5-6。*p < 0.05、**p < 0.01、n.s.; 統計学的有意差無し。

1-7 TLR3 リガンドと放射線の併用は腫瘍内の細胞傷害関連分子の発現を増強する

TLR3 リガンドと放射線の併用による CTL のプライミングと腫瘍内浸潤が機能的に腫瘍に対する CTL 応答を増加させているか検討するため、CTL 活性に関与する分子の腫瘍内発現を解析した。その結果、本併用療法は CTL の細胞傷害活性に必須である Perforin (*Prf1*)と Granzyme B (*Gzmb*) (Martínez-Lostao et al., 2015)ならびに活性化の指標となる IFN-γ (*Ifng*) (Wherry and Kurachi, 2015)の腫瘍内発現を増加させていた(Fig. 1-7)。これらの顕著な増加は放射線単独では認められないため(Fig. 1-7)、TLR3 リガンドの併用は抗腫瘍 CTL 応答を増加させるために有効な手段となることが示された。

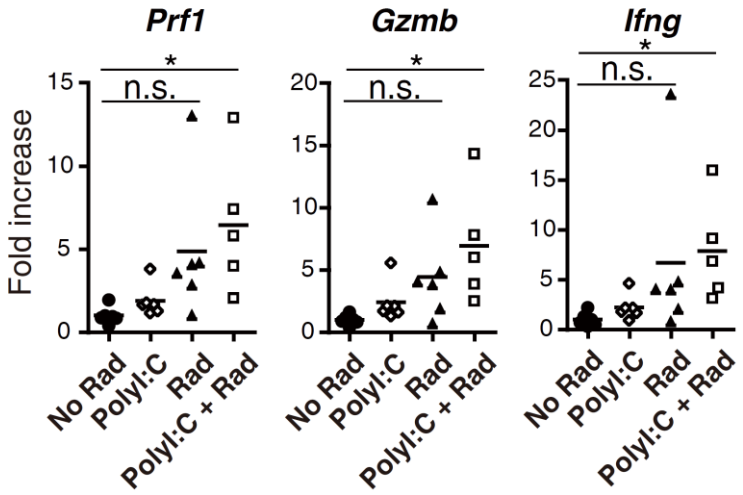

Fig. 1-7 TLR3 リガンドと放射線の併用による CTL 機能性分子の発現上昇
LLC-OVA 細胞を WT B6 マウスに移植し、Fig. 1-2A と同様に polyI:C と放射線の処置を行った。治療開始から 10 日後に腫瘍を回収し、その RNA 発現を逆転写 PCR 法により解析した。n = 5-6。*p < 0.05、n.s.; 統計学的有意差無し。

1-8　TLR3 刺激で産生される TNF-α は腫瘍細胞の放射線感受性を増強する

TLR3 リガンドによる TICAM-1 シグナルの活性化は、腫瘍内 MΦ の TNF-α 産生を誘導する(Shime et al., 2012)。さらに、TNF-α は腫瘍細胞の放射線感受性を亢進することが報告されていたため(Azria et al., 2003)、最後に TNF-α の本併用療法における重要性を検討した。PolyI:C の投与が LLC-OVA 腫瘍内で TNF-α 産生を誘導し (Fig. 1-8A)、さらに *Tnf-α*$^{-/-}$マウスに LLC-OVA 細胞を移植して腫瘍体積の推移を測定したところ、TLR3 リガンドによる放射線治療効果の増強はわずかにしか認められなかった(Fig. 1-8B)。すなわち、本併用療法で TNF-α は重要な役割を果たす。

本研究に用いた LLC-OVA 細胞においても TNF-α が腫瘍細胞の放射線感受性を増加させるか検討するため、*In vitro* の培養系で TNF-α 存在下に放射線を照射し、WST-1 アッセイによる生存率測定を実施した。その結果、TNF-α と放射線は相乗的に LLC-OVA 細胞の生存率を低下させることが明らかになった(Fig. 1-8C)。

さらに TLR3 は DC や MΦ、さらには線維芽細胞や一部上皮細胞に発現することが報告されているため(Tatematsu et al., 2018)、どの細胞が TNF-α の産生に重要か検討した。その結果、腫瘍内で polyI:C に応答して TNF-α を産生するのは主に CD11b^{+} F4/80^{+} MΦ であった(Fig. 1-8D)。CD45^{-} 非免疫細胞や CD11c^{+} DC には TNF-α 陽性集団はほとんど観察されなかった。F4/80^{+} MΦ は全腫瘍細胞の 40%程度と豊富に腫瘍内に集積することからも(Fig. 1-8E)、TLR3 リガンドに誘導される TNF-α はほとんど MΦ に由来し、腫瘍細胞の放射線感受性を増加させることが示唆された。この結果から、TLR3 リガンドが単に DC の抗原提示能を増強するのみならず、放射線と共に腫瘍細胞死を積極的に誘導して、放射線治療効果ならびに DC への死細胞の供給を増強する可能性が示された。

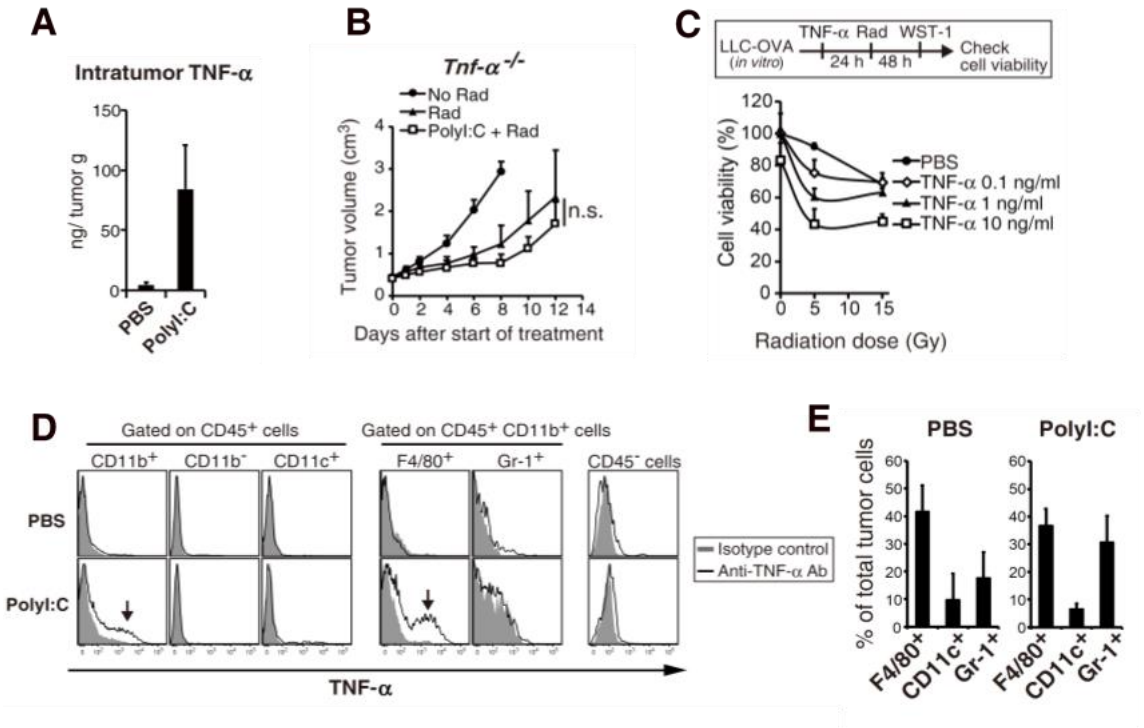

Fig. 1-8 TLR3 刺激は MΦ の TNF-α 産生を誘導し、腫瘍細胞の放射線感受性を増強する

(A) WT B6 マウスに LLC-OVA 細胞を移植し、腫瘍体積が約 0.4 cm^3 に達した時点で PBS または polyI:C (100 μg)の腹腔内投与を行った。投与から 1 時間後に腫瘍を単離し、TNF-α 含量の測定を実施した。n = 3-4。

(B) *Tnf-α*$^{-/-}$マウスに LLC-OVA 細胞を移植し、Fig. 1-2A と同様に、polyI:C 投与と放射線照射を実施した。n = 3-5。

(C) LLC-OVA 細胞を TNF-α 存在下で 24 時間培養し、放射線照射を実施した。さらに 48 時間培養後、生存率を WST-1 アッセイで評価した。

(D) WT B6 マウスに LLC-OVA 細胞を移植し、腫瘍体積が約 0.4 cm^3 に達した時点で PBS または polyI:C (100 μg)の腹腔内投与を行った。投与から 1 時間後に腫瘍を単離し、各種腫瘍内細胞の TNF-α 細胞内染色を実施した。データはフローサイトメトリーによって取得され、図は各群 4 匹の代表例である。

(E) Fig. 1-8D のアッセイ時に、各種免疫細胞の全腫瘍細胞における割合をフローサイトメトリーで算出した。n = 4。

n.s.; 統計学的有意差無し。

考察

第一章では、TLR3 リガンドを放射線に併用することで達成される、新規抗がん免疫誘導法の開発を行った。TLR3 リガンドと放射線を併用する治療法は効率的な CTL の活性化と腫瘍内への浸潤をもたらし、がんの増殖を著しく抑えることがわかった(Fig. 1-2, 1-4, 1-5)。

TLR3 リガンドを放射線に併用した時の治療効果は、CTL を除去したマウスのみならず、$CD8^+/CD103^+$ DC が機能不全である *Batf3*$^{-/-}$マウス(Azuma et al., 2016)で完全に消失した(Fig. 1-3)。そのため、本併用療法の中心的作用は DC のクロスプレゼンテーション、すなわちプライミング相にあることがわかる。

成熟化した DC は腫瘍から CCR7 依存性にリンパ節に遊走し、抗原提示を行う(Roberts et al., 2016)。放射線はリンパ節に成熟化 DC を増加させなかったが、TLR3 リガンドの併用はリンパ節に死細胞成分を含んだ成熟化 $CD103^+$ DC を出現させた。この結果は併用療法がリンパ組織の $CD44^+$ $CD62L^-$ エフェクターメモリーCTL を著増させる理由を説明する(Fig. 1-4)。

なお、活性化された CTL の抗原認識性については今後のさらなる研究が必要である。本研究では OVA 発現腫瘍を用いたため、併用療法で OVA 特異的な CTL が増加することが予想された。しかしながら、エフェクターメモリーCTL の増加とは異なり、OVA 特異的な CTL 増加は、併用療法を実施したマウスの一部の個体のみで認められた。この結果は、LLC-OVA に発現する OVA 以外の抗原に対して CTL が強く反応したことを示唆する。本併用療法が利用する TAA 配列および CTL の T 細胞受容体(T cell receptor; TCR)レパトワは不明であるが、放射線とアジュバントの併用は、ペプチド単独投与よりも抗原多様的に抗がん免疫を誘導する新規手法として、実施の意義はさらに強まる。

TLR3 リガンドの放射線への併用は、プライミング相のみならず、腫瘍内への CTL 浸潤も強めることがわかった(Fig. 1-5)。放射線は単独でも軽度に CTL の腫瘍内浸潤を強めた。この応答は腫瘍における CCR5 ケモカイン(CCL3, 4, 5)の発現上昇によって説明される。一方で TLR3 リガンドは腫瘍内の CXCR3 ケモカイン(CXCL9, 10)を発現上昇させることから、これらの併用は活性化 CTL を誘引するケモカイン種の幅を広げ、CTL の腫瘍内浸潤を増加させることが示唆される(Fig. 1-6)。

なお、放射線が CCR5 ケモカインを産生させるにも関わらず、CTL 依存性の治療効果を発揮できなかった理由として、CTL のプライミングが不十分のため、誘引された CTL が腫瘍応答性でなかった可能性が考えられる。この実証のためには *ex vivo* での腫瘍内 CTL と LLC-OVA 細胞との共培養等、反応性の解析が必要であるものの、予想が正しければ自然免疫シグナルによるプライミング相増強の重要性が一層に強調される。

さらに、TLR3 リガンドが DC への腫瘍死細胞の到達性にも影響を与える可能性を考慮し、TLR3 リガンドの腫瘍細胞放射線感受性への影響も検討した。LLC-OVA 細胞は TLR3 応答を認めないため(Takeda et al., 2018b)、既知の報告と照らし合わせ、腫瘍内 MΦ の TLR3-TICAM-1-TNF-α 経路が腫瘍細胞の放射線感受性を増加すると予想した。解析の結果、TLR3 リガンドは本モデルでも腫瘍内 MΦ の TNF-α 産生をもたらし、また TNF-α が腫瘍細胞の放射線感受性を高めていた。TNF-α ノックアウトマウスで本治療効果が減弱したことから、本効果が in vivo においても重要であることが示唆された(Fig. 1-8)。

一方で DC と CTL を除去すると、TNF-α の残存にも関わらず TLR3 リガンドによる放射線治療効果の増強が認められなくなる(Fig. 1-3)。この結果から、TNF-α による腫瘍死細胞の増加は、直接傷害によって腫瘍増殖を遅延するのではなく、DC への抗原到達を増加させ、CTL 活性化を増強することで抗腫瘍効果に重要となると考えられる。

以上、本研究により TLR3 シグナルを放射線に追加することで、CTL のプライミングおよび腫瘍内浸潤が惹起されることが示された。先行研究から、放射線は細胞死誘導および STING 経路を介した CTL 活性化を予想させたが(Deng et al., 2014)、その効果は必ずしも発揮されず、免疫アジュバントの併用を必要とすることがわかった(Fig. 1-1)。研究結果は TLR3 と MDA5 のリガンドである polyI:C を用いて得られたものであるが、KO マウスの腫瘍体積の測定結果から、TLR3-TICAM-1 経路の重要性が示唆された(Fig. 1-2)。MDA5-MAVS 経路の活性化は細胞種非選択的な I 型 IFN および炎症性サイトカインの産生を誘導し、過剰な炎症性応答による有害事象をもたらす。そのため当研究室ではこれまでに、安全性の高い新規 TLR3 選択的アジュバントを開発してきた(Matsumoto et al., 2017; Takeda et al., 2017)。したがって、本章の研究結果は、TLR3 選択的アジュバントを用いたがん治療戦略を広げる重要な知見となることが期待される。

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

緒言

L-Ergothioneine (EGT)は一部の細菌および真菌により産生される抗酸化性のアミノ酸誘導体である。化学構造は L-histidine に由来し、アミノ基のトリメチル化とイミダゾール環に形成されたチオール基の存在を特徴とする。EGT を細胞内に輸送するトランスポーターOCTN1 の遺伝子変異が種々の免疫疾患の発生と相関するため(Cheah and Halliwell, 2012; Gründemann et al., 2005)、本化合物は免疫系に対する何らかの作用を有すると考えられる。実際に EGT はある種の上皮細胞や骨格筋細胞において、そのサイトカイン産生調節作用が報告されているが(Laurenza et al., 2008; Rahman et al., 2003)、免疫系細胞における本化合物の活性は明らかではなかった。OCTN1 はリンパ球にはほとんど発現しないが、MΦ に高発現するため(Tokuhiro et al., 2003)、EGT は自然免疫応答に作用を発揮するものと期待された。そこで、第二章では EGT の免疫調節能の解明とその医学への応用を目指し、二節にわたる研究を実施した。

第一節では骨髄由来 MΦ (bone marrow-derived macrophage: BMDM)を用いて、EGT の MΦ 調節機能について検討した。特に微生物に対する免疫応答に重要な各種 TLR 応答を対象としてその機能を精査した。

第二節では、第一節の研究結果を応用し、EGT のがん治療への応用性を評価することにした。腫瘍内の MΦ(TAM)は通常、免疫抑制性に機能する。TAM には各種 TLR が発現し、特に TLR2 リガンドは TAM を介して CTL の活性を低下させることが報告されている(Kuang et al., 2007; Maruyama et al., 2015; Shime et al., 2017)。その一方で TLR2 リガンドは DC を成熟化させて CTL 依存性のがん治療効果を発揮するため、第二節では EGT が TAM の免疫抑制機能を低減して、TLR2 リガンドのがん治療効果を高めるか検討した。

第二章 第一節
L-ergothioneine (EGT)の
マクロファージ TLR 応答調節作用の解析

実験材料と方法

(第一章と共通のマウス、試薬および機器の情報は省略する)

1. マウス

C57BL6 マウスを日本クレアから購入し、第一章と同様に実験に用いた。実験に用いたマウスは 7-11 週齢であった。全ての動物実験は、北海道大学動物実験に関する規程に従い、承認を受けて行った。

2. 骨髄由来 MΦ(Bone marrow-derived macrophage; BMDM)の誘導

26G 針を用いて WT B6 マウスの大腿骨を 10%非働化含有 RPMI1640 で洗浄し、骨髄細胞を採取した。さらに 10%非働化 FBS 、100 mU/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycin および 30% L929 培養上清を含む RPMI 1640 をメディウムとして 6 日間培養し、BMDM を誘導した。メディウムは 3 日ごとに交換した。培養は 37°C、5% CO_2 の条件下で行った。

3. 細胞内 ROS 産生の測定

試薬	メーカー
RPMI 1640 Medium, no phenol red	Thermo Fischer Scientific
CM-H_2DCFDA	Thermo Fischer Scientific
Trister LB941	Berthold Technologies
L-Ergothioneine	Cayman Chemical または Tetrahedron
N-Acetyl-L-cysteine	Sigma-Aldrich

BMDM を 1% FBS, 10% L929 培養上清を含む RPMI-1640 (フェノールレッド非含有)に再懸濁し、1×10^5 cells/well の密度で 96 ウェル黒色プレートに播種した。PBS あるいは各種の抗酸化剤を添加し、2 時間あるいは 24 時間培養した後、LPS を 100 ng/ml の濃度で添加し、4 時間培養した。その後 CM-H_2DCFDA を 2.5 μM の濃度で添加し、30 分間培養した後、プレートリーダー Trister LB941 を用いて蛍光を測定した。

4. 培養上清中サイトカインの測定

TLR リガンド	メーカー
Pam2CSK4	Biologica
Pam3CSK4	Boehringer Mannheim
polyI:C	GE healthcare
LPS (Escherichia coli 0111:B4)	Sigma-Aldrich
gardiquimod	Invivogen

CBA 用試薬	メーカー
CBA mouse IL-1β flex kit	BD Biosciences
CBA mouse IL-6 flex kit	BD Biosciences
CBA mouse IL-10 flex kit	BD Biosciences
CBA mouse IL-12p40 flex kit	BD Biosciences

BMDM を 1 x 10^5 cells/well の密度で播種し、L-ergothioneine (EGT)の存在あるいは非存在下で 24 時間培養後、50 nM Pam2CSK4, 100 ng/ml Pam3CSK4, 25 μg/ml polyI:C, 100 ng/ml LPS あるいは 1 μg/ml gardiquimod により刺激した。刺激から 24 時間後に培養上清を回収し、cytometric beads assay (CBA)によって各種サイトカイン濃度を決定した。

5. フローサイトメトリー

BMDM を[3. 培養上清中サイトカインの測定]と同様に処理し、抗 CD16/32 抗体でブロッキングした後、FITC anti-mouse CD206 (MMR) Antibody (クローン: C068C2、BioLegend)によって染色した。染色および測定の方法は[第一章 実験材料および方法の 4.フローサイトメトリー]と同様であった。

6. 定量逆転写 PCR

BMDM を各種 TLR リガンドで刺激し、4 時間後に RNA easy Mini Kit および QIA shredder を用いて細胞ライセートを作成し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて RNA を逆転写して cDNA を作成した。cDNA は Power SYBR Green PCR Master Mix を用いて増幅され、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)による測定に供された。遺伝子発現は *Gapdh* で標準化を行い、ΔΔCt 法により解析を行った。用いたプライマー配列を次に示す。

遺伝子	Forward primer 配列 (5'-3')	Reverse primer 配列 (5'-3')
Arg1	GGAATCTGCATGGGCAACCTGTGT	AGGGTCTACGTCTCGCAAGCCA
Gapdh	GCCTGGAGAAACCTGCCA	CCCTCAGATGCCTGCTTCA
Il1b	TGACGGACCCCAAAAGATGA	TGCTGCTGCGAGATTTGAAG
Il10	GGCGCTGTCATCGATTTCTC-	TGCTCCACTGCCTTGCTCTTA
Il12b	AATGTCTGCGTGCAAGCTCA	ATGCCCACTTGCTGCATGA
Il6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TCCAGTTTGGTAGCATCCATC

7. 統計解析

2 群間の有意差検定として、Student's t-検定を用いて p 値を求めた。グラフ中のエラーバーは SD を表す。

実験結果

2-1-1　EGT はマクロファージの TLR 応答で生じた ROS を消去する

EGT は細胞内に取り込まれて抗酸化活性を発揮することが知られている(Cheah and Halliwell, 2012)。そのため、どのような条件で EGT が MΦ に取り込まれて抗酸化機能を発揮するか、はじめに検討を行った。Bone marrow-derived macrophages (BMDM)に対し LPS を処理すると、強力な酸化剤である活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)が産生される(Balzola et al., 2011)。抗酸化剤は ROS を消去するため、MΦ での抗酸化活性が知られている N-acetyl -L-cysteine (NAC)をコントロールとして、EGT の ROS 消去機能を検討した(Ohnishi et al., 2014)。BMDM に対し 1 mM あるいは 10 mM の EGT を 2 時間あるいは 24 時間前処置して LPS による刺激を行うと、細胞内 ROS は 10 mM の EGT を 24 時間前処置した時に顕著に消去された(Fig. 2-1-1)。すなわち、In vitro 実験系で機能解析を行うには、EGT を比較的高濃度で長時間処理する必要があることがわかった。そこで、以降の実験では各種 TLR リガンドの添加前に 10 mM の EGT を 24 時間処置して、各種アッセイを実施することにした。

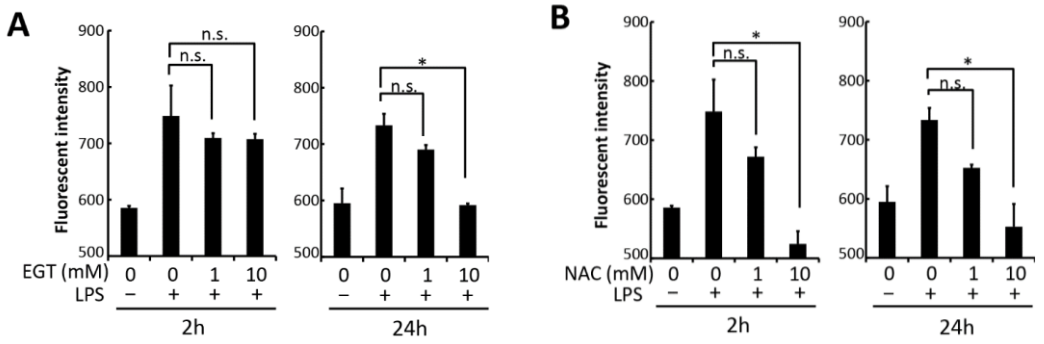

Fig. 2-1-1 EGT は MΦ の LPS 応答で生じた ROS を消去する

BMDM を(A) 1 or 10 mM EGT あるいは(B) 1 or 10 mM NAC によって 2 時間または 24 時間処置した後、100 ng/ml LPS により 4 時間刺激した。その後細胞内の ROS 含量を CM-H_2DCFDA によって測定した。n = 3。*p < 0.05、n.s.; 統計学的有意差無し。

2-1-2　EGT はマクロファージの TLR 応答を調節する

BMDM を EGT 存在下で培養し、MΦ のサイトカイン産生を指標に細胞機能の調節を評価した。CBA によって培養上清中のサイトカイン濃度を測定したところ、EGT は単独ではその産生を全く誘導しなかった(Fig. 2-1-2)。しかし、各種 TLR リガンド、すなわち Pam2CSK4 (TLR2/6)、Pam3CSK4 (TLR2/1)、polyI:C (TLR3、MDA5)、LPS (TLR4)、Gardiquimod (TLR7)を用いて MΦ を刺激したところ、EGT は IL-6、IL-12p40、IL-1β の産生を増大し、反対に IL-10 の産生を減少させた(Fig. 2-1-2)。すなわち、EGT は MΦ の TLR シグナルを調節して、その後の応答を調節する化合物であることが示唆された。なお、TLR3 リガンドである polyI:C では IL-1β および IL-12p40 の応答調節は認められず(Fig. 2-1-2)、TICAM-1 あるいは MAVS 経路と MyD88 経路における EGT のはたらきの違いが示唆される。さらに、これらのサイトカインの RNA 発現レベルを測定したところ、EGT によるサイトカイン産生調節はすべて転写レベルから生じることが明らかになった(Fig. 2-1-3)。

MΦ は周囲の環境に適応し、獲得免疫系の促進及び抑制の両者に寄与する(Lawrence and Natoli, 2011)。炎症性サイトカインである IL-1β、IL-6、IL-12p40 が EGT によって発現上昇し、反対に免疫抑制性である IL-10 の発現は EGT によって負に制御されることから、EGT は MΦ の機能を調節し、免疫応答を亢進するように制御している可能性が考えられた。そこで、さらなるマーカー分子を用いて MΦ の機能性を評価した。免疫抑制性 MΦ は CD206 ならびに Arginase-1 を高発現することが知られるため(Lawrence and Natoli, 2011)、その発現をそれぞれフローサイトメトリーまたは遺伝子発現測定にて解析したところ、EGT は CD206 と Arginase-1 の発現を減少させることが明らかになった(Fig. 2-1-4)。特に Arginase-1 についてはサイトカイン産生の結果と同様に、その調節に TLR シグナルが必須であった。しがたって、EGT は TLR 応答時に MΦ の免疫抑制性をさらに減弱させることが明らかになった。

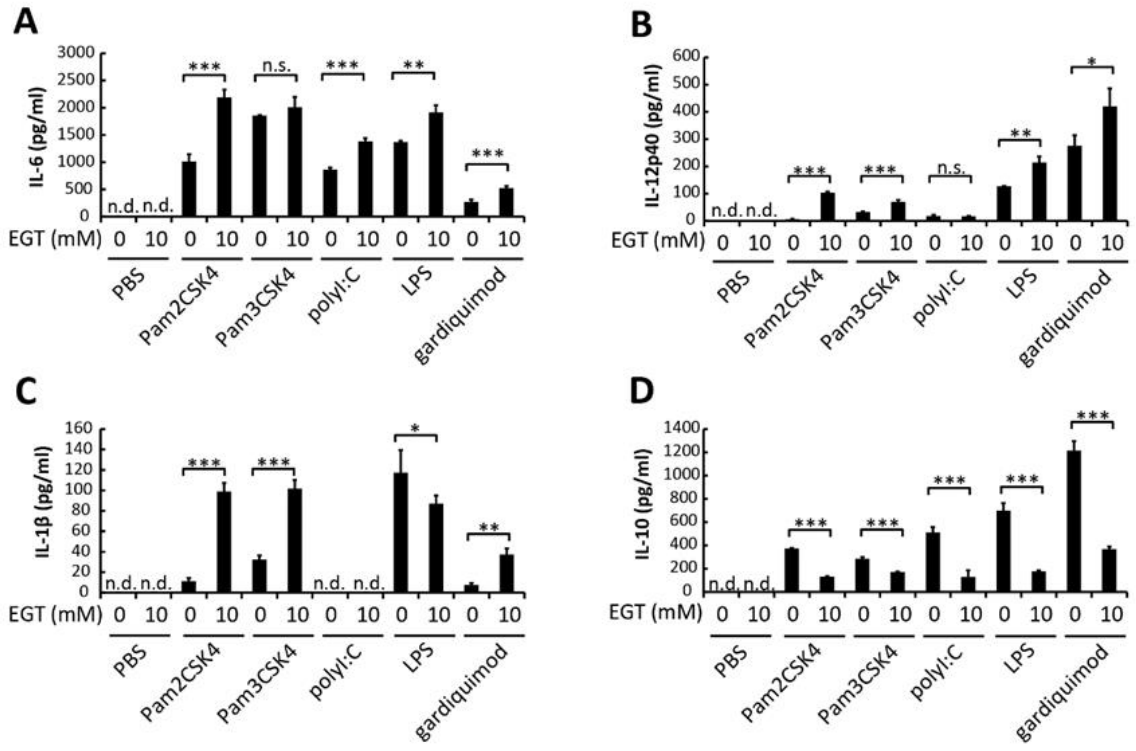

Fig. 2-1-2 EGT は MΦ の TLR 応答を調節する

BMDM を 10 mM の EGT で処置した後、各種 TLR リガンド、すなわち 50 nM Pam2CSK4 (TLR2/6)、100 ng/mL Pam3SCK4 (TLR2/1)、25 μg/mL poly I:C (TLR3)、100 ng/mL LPS (TLR4)または 1 μg/mL gardiquimod (TLR7) によって刺激した。刺激から 24 時間後に培養上清中の(A) IL-6、(B)IL-12p40、（C）IL-1β、(D) IL-10 の含量を CBA によって測定した。n = 3。*p < 0.05、**p < 0.005、***p < 0.0005、n.s.; 統計学的有意差無し。

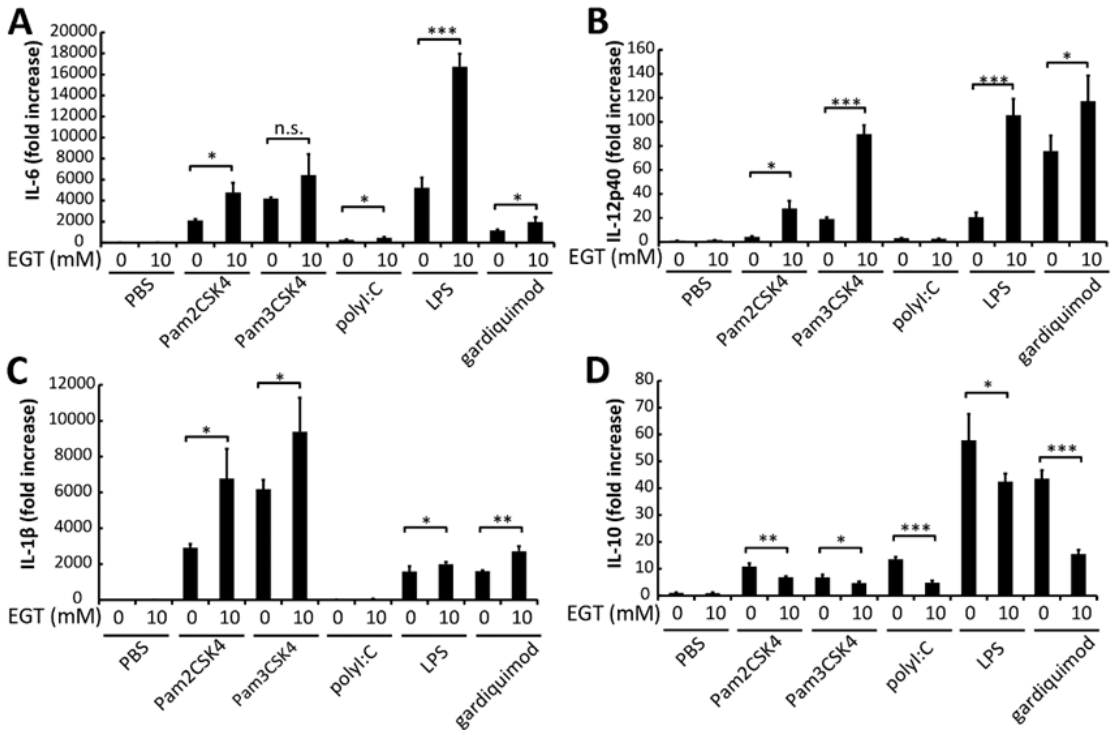

Fig. 2-1-3 EGT の MΦ サイトカイン産生調節は転写レベルから生じる
BMDM を 10 mM の EGT で処置した後、各種 TLR リガンド、すなわち 50 nM Pam2CSK4 (TLR2/6)、100 ng/mL Pam3SCK4 (TLR2/1)、25 μg/mL poly I:C (TLR3)、100 ng/mL LPS (TLR4)または 1 μg/mL gardiquimod (TLR7) によって刺激した。刺激から 4 時間後に RNA を回収し、(A) IL-6、(B)IL-12p40、（C）IL-1β、(D) IL-10 の遺伝子発現量を RT-qPCR 法によって決定した。n = 3。*p < 0.05、**p < 0.005、***p < 0.0005、n.s.; 統計学的有意差無し。

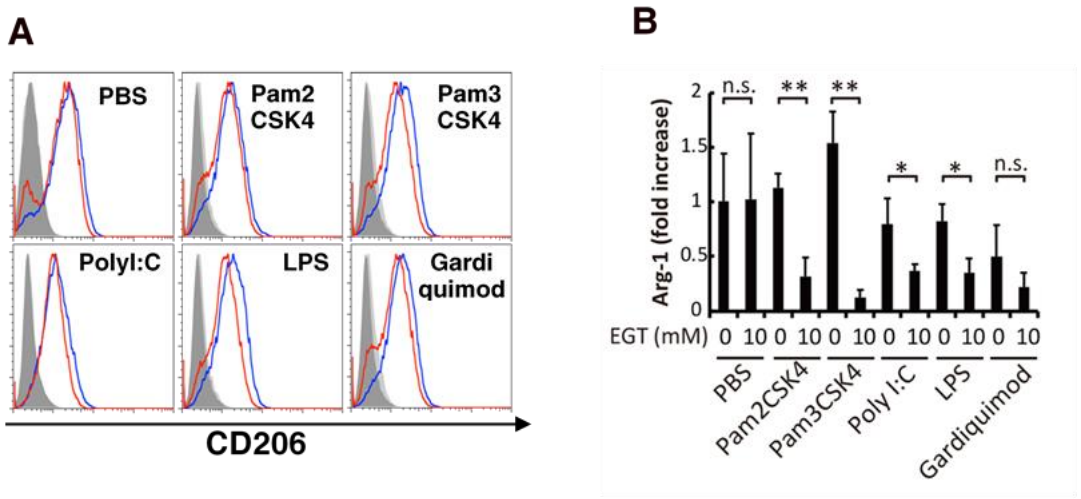

Fig. 2-1-4 EGT は MΦ の免疫抑制関連分子の発現を抑制する

BMDM を(A) 1 or 10 mM EGT あるいは(B) 1 or 10 mM NAC によって 2 時間または 24 時間処置した後、100 ng/ml LPS により 4 時間刺激した。その後細胞内の ROS 含量を CM-H_2DCFDA によって測定した。n = 3。*p < 0.05、**p < 0.005、n.s.; 統計学的有意差無し。

考察

本研究から、EGT が MΦ 機能の調節性化合物としてはたらき、特に TLR 応答を調節することが明らかになった。

MΦ は周囲の環境に応じて、炎症応答に関わる M1-like MΦ と、免疫抑制に関わる M2-like MΦ に分極することが、概念的に提唱されている (Lawrence and Natoli, 2011)。M1-like MΦ は IL-1、IL-6、IL-12 などの炎症性サイトカインを分泌し、免疫応答を全体的に病原微生物の排除に向かわせると言われる。一方で M2-like MΦ は IL-10 等の免疫抑制性サイトカインの分泌や CD206(マンノースレセプター)等を介した老廃物の除去を担い、炎症応答の終結に寄与することが知られる。

MΦ が M1-like に分極するか、M2-like に分極するには種々の刺激が必要とされ、TLR 刺激は M1-like MΦ への分極を促す代表的なシグナルである。本研究から、EGT は TLR 刺激時に IL-1β、IL-6、IL-12p40 のような M1-like MΦ の遺伝子発現特性を増強し、IL-10、CD206、Arginase-1 のような M2-like MΦ の特性を減弱させることがわかった(Fig. 2-1-2、Fig.2-1-3、Fig. 2-1-4)。EGT は単独ではこれらの分子発現にほとんど影響しなかったため、EGT は TLR 応答時に M1-like MΦ への分極をさらに強めるものと考えられる。

M1/M2-like MΦ の分極は可逆的であり、エピジェネティックな制御によりその極性が決定される(Biswas and Mantovani, 2010)。EGT はトランスポーターOCTN1 により細胞内に輸送されることは知られているが (Gründemann et al., 2005)、その後に細胞内でどのようなシグナル応答を調節するのかは未知である。EGT は抗酸化性化合物であると同時にアミノ酸誘導体であるため、酸化還元反応を介するレドックス応答や、アミノ酸センサーである mTOR を介したシグナル(Ishimoto et al., 2019; Katholnig et al., 2013)に作用して最終的に TLR シグナルと共に MΦ の分極に関与することが予想される。

EGT について今後の研究を展開するうえで、EGT の細胞内機能を解析する研究と、MΦ 応答を利用して医学への応用性を検討する研究の 2 つが考えられた。本研究の第二節ではこのうち、医学への応用性を検討することにした。

第一章にて TLR リガンドと放射線を用いた CTL のプライミング・腫瘍内浸潤誘導法を報告したが、腫瘍内に浸潤した CTL はがん微小環境中の細胞によって応答抑制を受けるため、その環境を改善することが免疫療法

のさらなる発展に重要である。特に腫瘍内 MΦ (TAM)は代表的な CTL 抑制細胞であり、その機能制御はがん治療効果に密接に関連する(Cassetta and Kitamura, 2018)。TAM は TLR を発現し、中でも TLR2 シグナルは TAM に免疫抑制応答を付与する(Shime et al., 2017)。つまり TLR2 リガンドをアジュバントとして抗腫瘍 CTL 応答を誘導した場合、同時に TAM による CTL 抑制も惹起されてしまう。そこで、TLR2 リガンドに EGT を併用することで免疫抑制応答が解除され、CTL 依存性の抗腫瘍応答を惹起できるか第二節で検討することにした。

第二章 第二節
L-ergothioneine の TLR 応答調節は 免疫抑制性がん微小環境を改善する

実験材料と方法

(第一章と共通のマウス、試薬および機器の情報は省略する)

1. マウス

C57BL6 マウスを日本クレアから購入し、第一章と同様に実験に用いた。実験に用いたマウスは 7-11 週齢であった。全ての動物実験は、北海道大学動物実験に関する規程に従い、承認を受けて行った。

2. 細胞培養

LLC-OVA 細胞の培養は第一章と同様に実施した。

3. 組織からの細胞の単離と培養

試薬	メーカー
Biotin anti-mouse F4/80 Antibody	BioLegend
Streptavidin microbeads	Miltenyi Biotec
CD8 microbeads	Miltenyi Biotec

MΦ を腫瘍内から単離する際は、はじめにフローサイトメトリーと同様に腫瘍細胞の懸濁液を調整した。その後 MACS buffer [組成: 0.5% BSA、2 mM EDTA / PBS]に再懸濁して、抗 CD16/32 抗体(希釈倍率 ×200)でブロッキング(4℃、5 分)してからビオチン標識抗 F4/80 抗体 (希釈濃度 ×200)で 4℃、30 分間の反応を実施し、さらに MACS バッファーによる洗浄後に Streptavidin microbeads による磁気標識を行い、最後に MACS カラムを用いて標識細胞を分離した。

$CD8^+$ T 細胞は脾臓から単離され、脾臓細胞を CD8 microbeads で磁気標識した後、MACS カラムを用いて標識細胞を分離することで得たものである。腫瘍内 MΦ と $CD8^+$ T 細胞は得られた後に再度 MACS カラムに通して精製し、その後の実験に用いた。

単離された細胞はすべて 10%非働化 FBS、10 mM HEPES、55 μM 2-mercaptoethanol (2-ME)、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin を含む RPMI1640 中で培養した。培養は 37° C、5% CO_2 の条件下で行った。

4. 腫瘍移植

試薬	メーカー
Endotoxin-free PBS	Merck
L-Ergothioneine (EGT)	Tetrahedron
N-Acetyl-L-cysteine (NAC)	Sigma-Aldrich
Pam2CSK4	Biologica
OVA protein (Endotoxin-free or -low)	Hyglos または Wako

第一章と同様にマウス皮下に LLC-OVA 細胞を移植し、腫瘍体積を測定した。腫瘍移植から 9 日後に EGT (500 μg/匹、すなわち 2.18μmol/匹)または NAC (350 μg/匹、すなわち 2.14μmol/匹) を腹腔内投与し、24 時間後に Pam2CSK4 (15 nmol/匹)と OVA protein (100μg/匹)を腫瘍近傍の皮下に投与した。EGT および NAC はその後連日投与し、Pam2CSK4 と OVA protein は 4 日ごとに投与した。各試薬の非投与群には等量の Endotoxin-free PBS を投与した。抗 CD8β 抗体の投与方法は第一章と同様であり、Pam2CSK4 と OVA proteine を投与する 24 時間前に腹腔内投与した。

5. 腫瘍内サイトカイン含量の決定

試薬	メーカー
CBA mouse IFN-γ flex kit	BD Biosciences
CBA mouse TNF-α flex kit	BD Biosciences

サンプルは第一章と同様に採取された。腫瘍内の TNF-α と IFN-γ の量は CBA によって決定された。

6. フローサイトメトリー

抗体および細胞染色試薬	クローン	メーカー
Alexa Fluor 700 anti-mouse CD3 Antibody	17A2	BioLegend
PE/Cy7 anti-mouse CD3 Antibody	17A2	BioLegend
APC anti-mouse CD3ε Antibody	145-2C11	BioLegend
Alexa Fluor 700 anti-mouse CD8a Antibody	53-6.7	BioLegend
PE anti-mouse CD8a Antibody	53-6.7	BioLegend
PE/Vy7 anti-mouse/human CD11b Antibody	M1/70	BioLegend
APC anti-mouse CD11c Antibody	N418	BioLegend
APC anti-mouse/human CD44 Antibody	IM7	BioLegend
APC/Cy7 anti-mouse CD45 Antibody	30-F11	BioLegend
Anti-Mouse CD62L Antibody PE	MEL-14	eBioscience (Thermo Ficher Sciences)
Purified anti-mouse CD107a Antibody (combined with donkey anti-Rat IgG)	1D4B	BioLegend
Anti-Mouse CD115(c-fms) Antibody PE	AFS98	eBioscience (Thermo Ficher Sciences)
FITC anti-mouse CD206 (MMR) Antibody	C068C2	BioLegend
Anti-Mouse CD274 (B7-H1) Antibody PE	MIH5	eBioscience (Thermo Ficher Sciences)
FITC anti-mouse F4/80 Antibody	BM8	BioLegend
PE anti-mouse F4/80 Antibody	BM8	BioLegend
FITC anti-mouse IFN-γ Antibody	XMG1.2	BioLegend
APC anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody	RB6-8C5	BioLegend
Anti-Mouse NOS2 Antibody PE	CXNFT	eBioscience (Thermo Ficher Sciences)
Donkey anti-Rat IgG (H+L) Secondary Antibody, PE	polyclonal	eBioscience (Thermo Ficher Sciences)
T-select H-2Kb OVA Tetramer-SIINFEKL-PE	-	MBL
BD ViaProbe (7-AAD)	-	BD Bioscinences

サンプルの調製法ならびに測定法は第一章と同様である。ただし、腫瘍内 T 細胞のサイトカイン陽性率を測定する際は、腫瘍 20 mg の細胞懸濁液

を 96 ウェル U 底プレートに播種し、100 nM の SL8 ペプチドによって 6 時間刺激した細胞を用いた。サイトカインの分泌は刺激開始から 1 時間後に 10 μg/ml Breferdin A 添加することで停止され、Cytofix/Cytoperm Kit による固定化・透過性処理後に抗 TNF-α 抗体ならびに抗 IFN-γ 抗体による検出が実施された。また、腫瘍内 MΦ の iNOS 染色の際も、Cytofix/Cytoperm Kit による固定化・透過性処理後の細胞に抗体反応を実施した。なお、細胞内染色は透過性処理後に 2% ラット血清による 4°C、15 分間のブロッキング後に行った。バッファー中の抗体希釈濃度はすべて×200 で、OVA tetramer ならびに BD Viaprobe は×50 の希釈濃度で使用された。

7. WST-1 アッセイ

LLC-OVA 細胞を 5×10^3 cells/well で 96 ウェルプレートに播種し、EGT を 24 時間処理した後、さらに Pam2CSK4 を添加し、48 時間後に WST-1 アッセイを実施した。腫瘍内 MΦ の場合は 1×10^4 cells/well で 96 ウェルプレートに播種し、EGT で 24 時間処理した後に Pam2CSK4 を添加し、さらに 72 時間培養してから WST-1 アッセイを実施した。抗酸化反応による影響を除去するため、細胞のない各種 EGT 濃度のウェルを作成し、バックグランド値として測定値から減算した。サンプル調整後の手順については第一章と同様であった。

8. 逆転写定量 PCR (RT-qPCR)

腫瘍内 RNA からの cDNA の作成手順は第一章と同様である。腫瘍内 MΦ の RNA 発現量を測定するために、磁気精製した腫瘍内 $F4/80^+$ 細胞を 5×10^5 cell/well で 24 ウェルプレートに播種して EGT 存在下で 24 時間培養した後、さらに Pam2CSK4 で 4 時間刺激してから TRIZOL を用いた RNA 精製を行った。その後の手順は第一章と同様であった。

9. 腫瘍内 MΦ と $CD8^+$ T 細胞の共培養

試薬	メーカー
L-Hercynine	Tetrahedron
LEAF purified anti-mouse CD3ε Antibody (クローン: 145-2C11)	BioLegend
LEAF purified anti-mouse CD28 Antibody (クローン: 37.51)	BioLegend

磁気分離によって得た腫瘍内 $F4/80^+$ 細胞を 5×10^4 cells/well で 96 ウェル U 底プレートに播種し、 EGT、L-hercynine (HER)、NAC の存在下で 24 時間培養した。そこに $CD8^+$ T 細胞を 1:1 で混和し、Pam2CSK4 (50 nM)の添加ならびに抗 CD3 抗体 (0.1 μg/ml)と抗 CD28 抗体 (0.25 μg/ml)による T 細胞刺激を実施した。抗体刺激から 60 時間後に浮遊細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて $CD8^+$ $CD3^+$ 細胞中における $CD44^+$ $CD62L^-$ 細胞の割合を評価した。

10. 統計処理

2 群間の有意差検定では、Student's t-検定を用いて p 値を求めた。多重比較検定では one-way analysis of variance (ANOVA)の後に Bonferroni 法を実施して p 値を求めた。グラフ中のエラーバーは SEM を表す。

実験結果

2-2-1　EGT は TLR2/6 リガンドの CTL 依存性がん治療効果を増強する

EGT の TLR 応答調節ががん治療に有用か判定するため、マウスに LLC-OVA 腫瘍を形成し、TAA として OVA を、アジュバントとして TLR2/6 ヘテロダイマーのリガンドである Pam2CSK4 を投与し、腫瘍体積の推移を測定した。その結果、EGT の Pam2CSK4+OVA への併用は有意に腫瘍増殖を抑制することがわかった (Fig. 2-2-1A, B)。

抗 CD8β 抗体を用いて CTL を除去すると、EGT + Pam2CSK4 + OVA の治療効果はほとんど完全に消去された(Fig. 2-2-1C)。さらに、EGT の単独投与は腫瘍体積に影響を与えず(Fig. 2-2-1D)、In vitro において Pam2CSK4 と共に LLC-OVA に作用させても生存には全く影響しなかった(Fig. 2-2-1E)。したがって、EGT は腫瘍細胞を直接的に障害するのではなく、CTL による免疫応答を強めることで TLR2/6 リガンドと共にがん治療効果を発揮することがわかった。

次に腫瘍内細胞を単離し、プライミング相の達成を示す OVA tetramer$^+$ CTL の割合や、腫瘍内浸潤を示す CD3$^+$ CD8$^+$細胞の比率を検討した。その結果、腫瘍体積の結果とは異なり、Pam2CSK4 + OVA はこれらの比率を有意に増加させた(Fig. 2-2-1F, G)。一方で、EGT はこれらの比率に全く影響を与えなかった(Fig. 2-2-1F, G)。この結果は、Pam2CSK4 + OVA はワクチンとして機能するが、何らかの要因で抗がん CTL 応答が不全であり、その要因は EGT によって除去されることを示唆する。EGT がプライミングや腫瘍内浸潤を増強しないことから、EGT はエフェクター相にて CTL 機能を改善することが予想された。

腫瘍内には種々の免疫抑制細胞が集積し、そのため CTL のエフェクター活性は抑制される。第一節に示した通り、EGT は TLR リガンドと共に骨髄由来 MΦ の性質を調節することから、EGT は腫瘍関連 MΦ (TAM)においてもその性質を変化させ、CTL の抑制を解除する可能性が考えられた。そこで、以下の研究では EGT と TLR2/6 リガンドの腫瘍内 MΦ や CTL 機能への影響を解明し、これらが TAM を対象とした腫瘍内微小環境改善剤として利用可能か検討することにした。

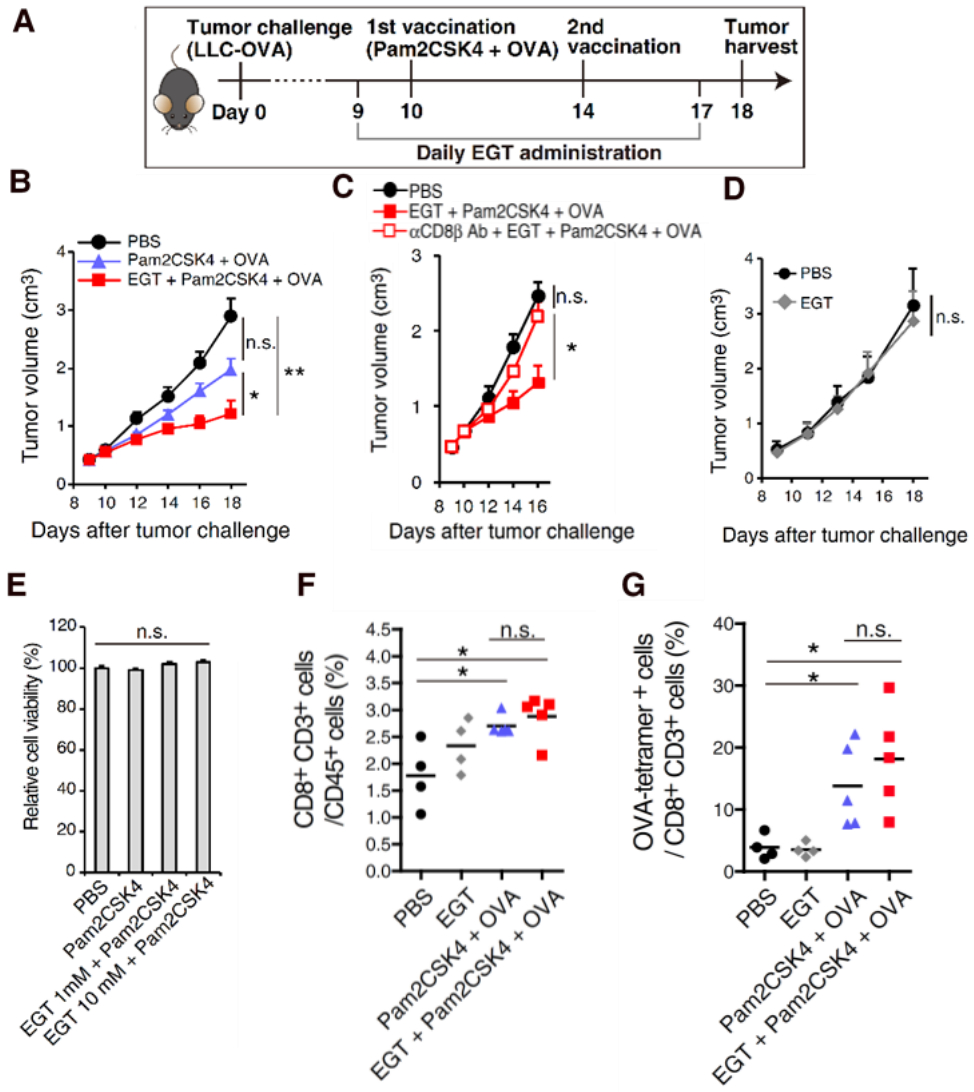

Fig. 2-2-1 EGT は TLR2/6 リガンドの CTL 依存性がん治療効果を増強する

(A) 本研究における EGT および Pam2CSK4 + OVA の投与スケジュール。

(B) Fig. 2-2-1A のスケジュール通りに処置したときの腫瘍体積の推移。n = 8-10。データは同様の結果となった 2 つの実験をまとめた。

(C) 抗 CD8β 抗体を投与したマウスにおける腫瘍体積の推移。n = 4-5。

(D) EGT 単独投与時の腫瘍体積推移。n = 4。

(E) LLC-OVA 細胞を EGT および Pam2CSK4 (50 nM)の存在下で 48 時間培養し、WST-1 アッセイで生存率/増殖率を評価した。n = 4。

(F) LLC-OVA 腫瘍移植マウスを Fig. 2-2-1A に示した通りに処置し、Day18 の腫瘍内 CTL の割合をフローサイトメトリーで評価した。n = 4-5。

(G) (F)と同様に腫瘍内 CTL の OVA tetramer 陽性率を測定した。n = 4-5。

*p < 0.05、**p < 0.01、n.s.; 統計学的有意差無し。

2-2-2 EGT は TLR2/6 リガンドがもたらす腫瘍内マクロファージの増殖を抑制する

TLR2/6 リガンドと EGT が TAM に与える影響を解析するにあたり、はじめに TAM の腫瘍内における割合をフローサイトメトリーで測定した。その結果、Pam2CSK4 を投与した群では腫瘍内免疫細胞における $CD11b^{+}$ $Gr\text{-}1^{-/low}$ $F4/80^{+}$ TAM の割合が増加し、その増加は EGT 併用群で認められなかった(Fig. 2-2-2A)。

EGT の TAM 比率への影響が直接的なものか検討するため、TAM を MACS によって腫瘍内から単離し、Pam2CSK4 および EGT 存在下での TAM の生存・増殖を WST-1 試験で評価した。その結果、TAM の生存・増殖は Pam2CSK4 により増加し、さらにその増加は EGT によって減弱した(Fig. 2-2-2B)。したがって、EGT は直接的に Pam2CSK4 誘導性の TAM 増加をキャンセルすることがわかった。

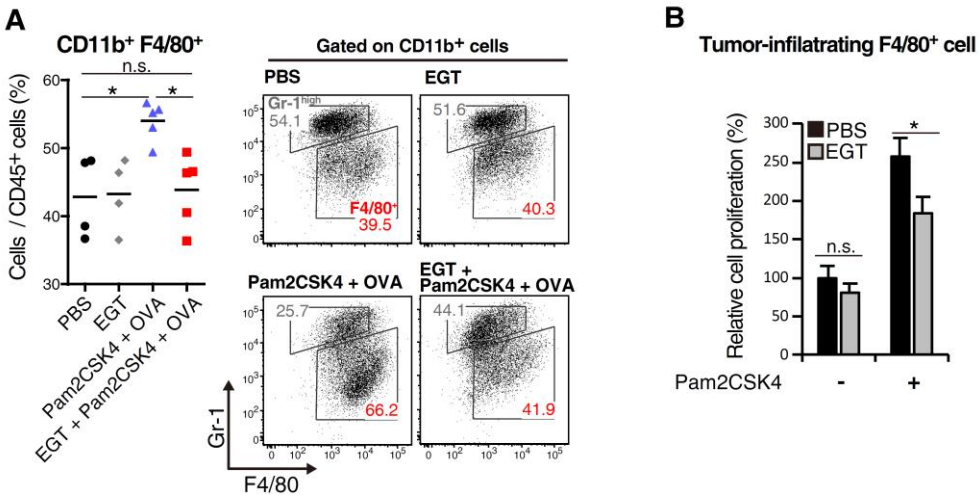

Fig. 2-2-2 EGT は TLR2/6 リガンドによる TAM の増殖を抑制する

(A) マウスに LLC-OVA 細胞を移植し、Fig. 2-2-1A に示した通り処置した。Day 18 に腫瘍内の $CD11b^{+}$ $Gr\text{-}1^{-/low}$ $F4/80^{+}$ 細胞の割合をフローサイトメトリーで評価した。n = 4-5。

(B) マウスに移植した LLC-OVA 腫瘍から $F4/80^{+}$ 細胞を単離し、EGT によって 24 時間前処置した後、Pam2CSK4 を添加し、さらに 72 時間培養した。その後 WST-1 アッセイで生存率/増殖率を評価した。n = 3。

*$p < 0.05$、n.s.; 統計学的有意差無し。

2-2-3 EGT は TLR2/6 リガンドと共に腫瘍内マクロファージの CTL 抑制性分子の発現を低下させる

TAM の免疫抑制活性にはその数のみならず性質、特に免疫抑制性分子の発現が重要である。そこで免疫抑制に重要な種々の分子についてその発現を解析した。

その結果、代表的な免疫抑制性 MΦ のマーカーである CD206、CTL 抑制の代表的な分子である PD-L1、TAM の免疫抑制シグナルを増強する CD115(Cassetta and Kitamura, 2018)は Pam2CSK4 と EGT の併用群で著明な発現減少が認められた。一方で、M1-like MΦ のマーカーとして知られる iNOS の発現は増加しており(Lawrence and Natoli, 2011)、骨髄由来 MΦ と同様に、EGT は TLR リガンドと共に TAM の免疫抑制性を解除することが示唆された(Fig. 2-2-3A,B)。

さらに、TAM を腫瘍内から単離し、種々の遺伝子発現を解析した。その結果、TAM による CTL アポトーシスに関与する Fas ligand (*Fasl*)や TRAIL (*Tnfsf10*)、さらには CTL から L-arginine を除去することで機能抑制を導く arginase-1(*Arg1*)の遺伝子発現が Pam2CSK4 と EGT の併用によって減少することがわかった(Noy and Pollard, 2014; Ugel et al., 2015) (Fig. 2-2-3C)。

Pam2CSK4 のみでは上記の分子の発現はほとんど変化していなかった (Fig. 2-2-3)。結果 2-2-2 と併せると、Pam2CSK4 は TAM を免疫抑制性が保持された状態で増加させ、CTL 機能を阻害するようにはたらくことが示唆される。一方で、EGT を Pam2CSK4 に併用することで、TAM の増加はキャンセルされ、なおかつその機能をより CTL 応答に有利な方向に変化させると考えられた。

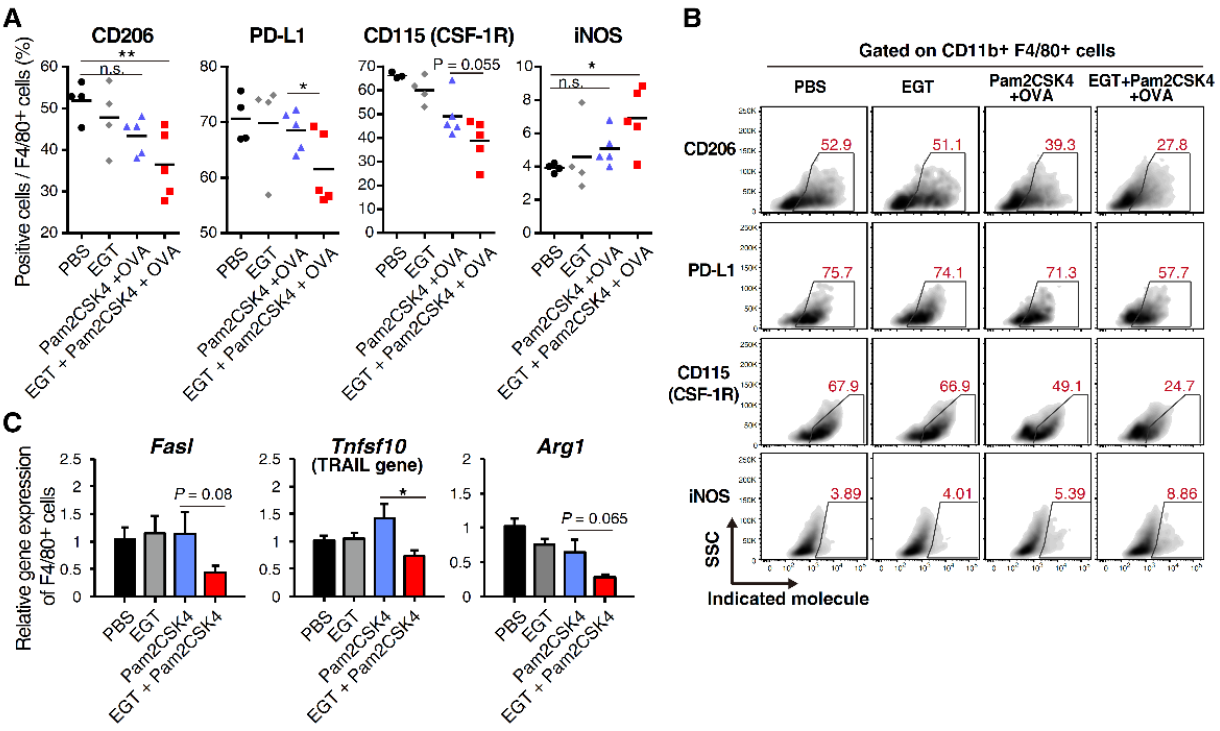

Fig. 2-2-3 EGT は TLR2/6 リガンドと共に TAM の CTL 抑制分子の発現を低下させる

(A) マウスに LLC-OVA 細胞を移植し、Fig. 2-2-1A に示した通り処置した。Day 18 に腫瘍内の $CD11b^{+}$ $Gr\text{-}1^{-/low}$ $F4/80^{+}$ 細胞における種々の分子発現をフローサイトメトリーで解析した。n = 4-5。

(B) Fig. 2-2-3A に示した結果の代表的な解析図。

(C) マウスに移植した LLC-OVA 腫瘍から $F4/80^{+}$ 細胞を単離し、EGT を 24 時間前処置した後、Pam2CSK4 を添加し、4 時間後に RNA を回収して遺伝子発現量の解析を行った。n = 3。

*p < 0.05、**p < 0.01、n.s.; 統計学的有意差無し。

2-2-4 EGT は腫瘍内 CTL のエフェクター活性を増強する

腫瘍内における MΦ の免疫抑制性フェノタイプの減少は、CTL 抑制の解除を示唆する。CTL の機能はサイトカインの産生や表面分子の発現によって解析できる。

IFN-γ や TNF-α は活性化した CTL によって産生される代表的なサイトカインである(Wherry and Kurachi, 2015)。これらのサイトカインの腫瘍内含量を CBA によって調べたところ、EGT を Pam2CSK4 + OVA に併用することによって、IFN-γ および TNF-α の含量が増加することがわかった(Fig. 2-2-4A)。さらに腫瘍内の CTL がこれらのサイトカインを産生しているのか調べるため、腫瘍内 CTL を SL8 ペプチドで再刺激した後、IFN-γ と TNF-α の細胞内染色を実施した。その結果、CBA の結果と同様に $CD8^+$ $CD3^+$ CTL における IFN-γ^+ および IFN-γ^+ TNF-α^+ 細胞の割合は増加しており(Fig. 2-2-4B)、EGT は TLR2/6 リガンドとの併用により、CTL の機能的活性化をもたらすことがわかった。

さらに、$CD8^+$ $CD3^+$ CTL のうち、$CD44^+$ $CD62L^-$ エフェクターメモリー細胞(Wherry and Kurachi, 2015)や、細胞傷害性分子の脱顆粒マーカーである $CD107a^+$ 細胞(Betts and Koup, 2004)、高度な細胞傷害性活性の指標となる $CD11c^+$ 細胞(Takeda et al., 2016)の割合は増加しており(Fig. 2-2-4C)、細胞表面分子の発現パターンからも、EGT を TLR2/6 リガンドに併用することで、腫瘍内 CTL が強力なエフェクター活性を獲得することが明らかになった。

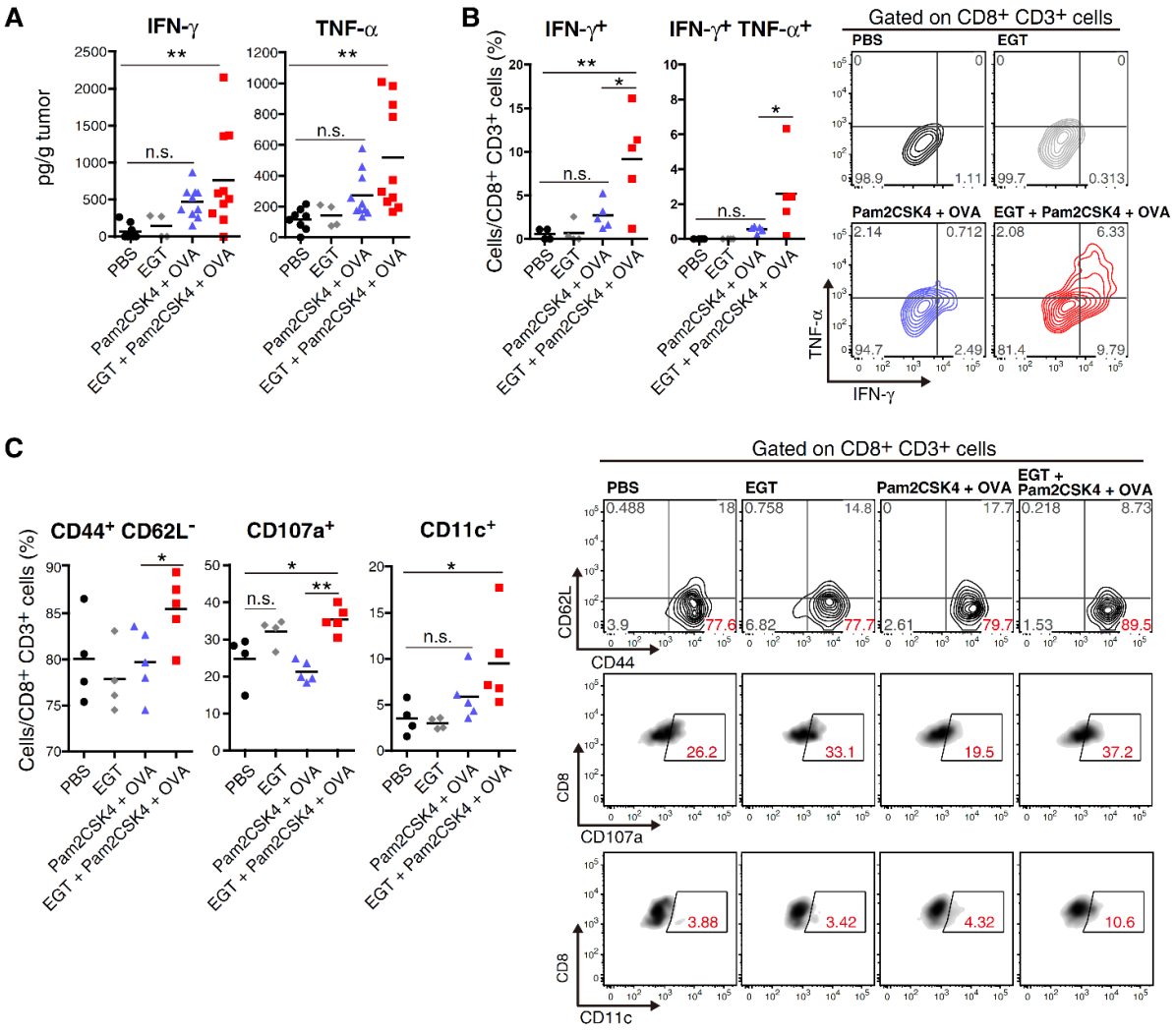

Fig. 2-2-4 EGT は腫瘍内 CTL のエフェクター活性を増強する

マウスに LLC-OVA 細胞を移植して Fig. 2-2-1A に示した通り処置し、Day 18 に次の解析を実施した。

(A) 腫瘍内の IFN-γ と TNF-α の含量を測定した。n = 4-10、データは同様の結果となった 2 つの実験をまとめた。

(B) マウスから腫瘍細胞を単離し、SL8 ペプチド(50 nM)で 6 時間刺激し、$CD8^+$ $CD3^+$ 細胞における IFN-γ と TNF-α の細胞内発現をフローサイトメトリーで解析した。n = 4-5。

(C) 腫瘍内 $CD8^+$ $CD3^+$ 細胞の表面分子発現量をフローサイトメトリーで解析した。n = 4-5。

*p < 0.05、**p < 0.01、n.s.; 統計学的有意差無し。

2-2-5 EGT は抗酸化活性依存的に TAM の CTL 抑制を解除する

最後に、EGT を Pam2CSK4 + OVA に併用することによる TAM の免疫抑制性の減少が実際に CTL の活性化につながるか検討するため、これらの細胞の共培養系を構築した。EGT および Pam2CSK4 で処理した TAM を抗 CD3/CD28 抗体によって活性化させた CTL と共に培養し、CTL のエフェクターメモリー活性が受ける影響を観察した。なお、この際に抗酸化活性の重要性を評価するために抗酸化性のチオールを持たない EGT、すなわち L-Hercynine (HER)、そして代表的な抗酸化剤として知られる N-acetyl-L-cysteine (NAC)を用いて、同様のアッセイを行った(構造式：Fig. 2-2-5A)。

その結果、*in vivo* の結果を反映して、TAM との共培養時に CTL のエフェクターメモリー画分は減少し、Pam2CSK4 のみではその改善は生じなかった(Fig. 2-2-5B)。しかしながら、EGT を併用することによってエフェクターメモリーサブセットは顕著に増加し、腫瘍内微小環境において EGT は MΦ 機能を改善して CTL の活性を上昇させることが示唆された(Fig. 2-2-5B)。

その一方で、抗酸化活性のない HER を Pam2CSK4 刺激に併用することで、EGT と異なり、TAM による CTL 抑制はさらに強まった(Fig. 2-2-5C)。さらに、抗酸剤として知られる NAC も EGT とは反対に TAM による CTL 抑制をさらに強めた(Fig. 2-2-5C)。NAC は *in vivo* モデルでも同様に、Pam2CSK4 + OVA の治療効果を増強しなかった(Fig. 2-2-5D)。すなわち、EGT によるがん微小環境の改善作用には、他の抗酸化剤にはない EGT 特有の抗酸化活性が重要になることが示唆された。

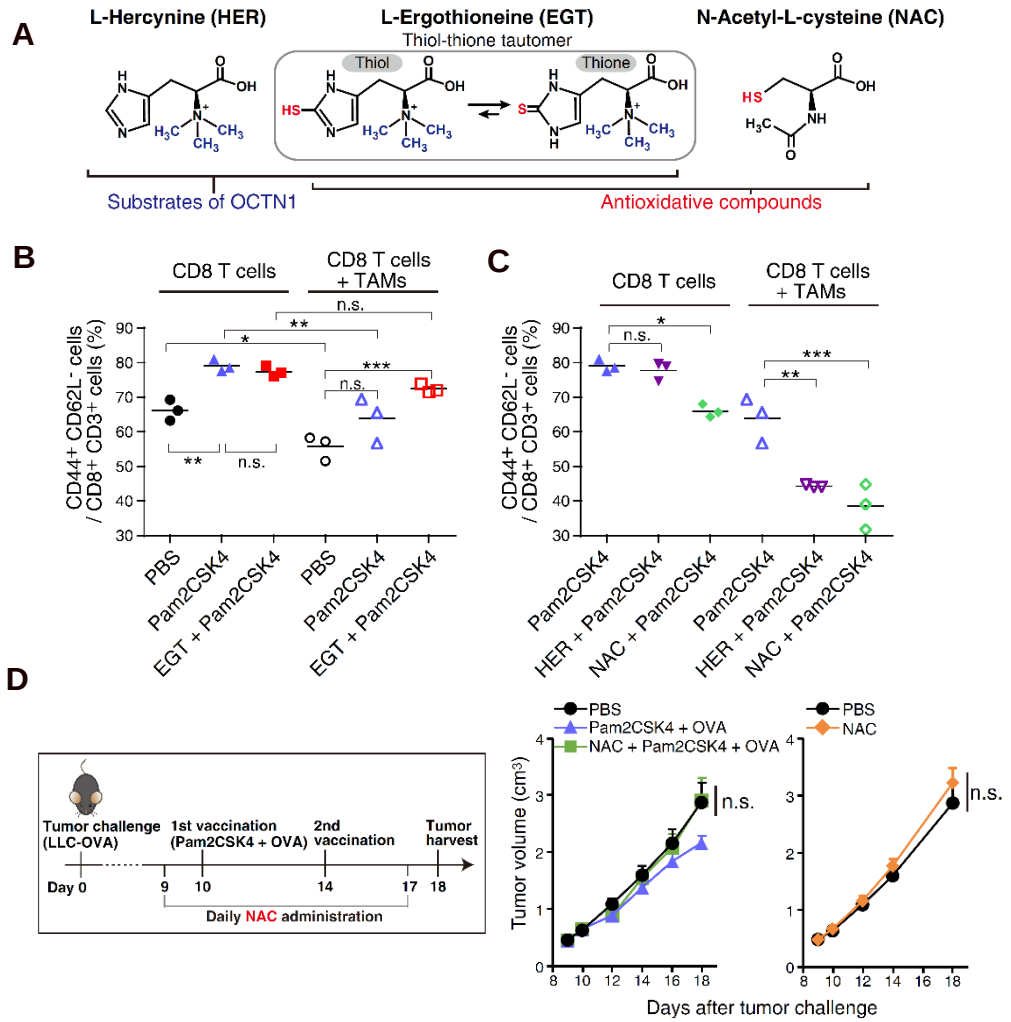

Fig. 2-2-5 EGT は抗酸化活性依存的に TAM の CTL 抑制を解除する

(A) L-Ergothioneine (EGT)、L-hercynine (HER)、N-acetyl-L-cysteineine (NAC) の構造式。

(B) TAM をマウス LLC-OVA 腫瘍からの F4/80$^+$細胞単離によって得た後、EGT (10 mM)によって 24 時間処理した。その後マウス脾臓から単離した CD8$^+$細胞を TAM と 1:1 の割合で混合し、Pam2CSK4 (50 nM)および抗 CD3 抗体 (0.1 μg/ml)/ CD28 抗体 (0.25 μg/ml)を添加してさらに 60 時間培養した。その後 CD44$^+$ CD62L$^-$ 細胞の割合を評価した。n = 3。

(C) EGT の代わりに HER または NAC を処理し、Fig. 2-2-5B と同様の実験を行った。実験は Fig. 2-2-5B と同時に実施した。n = 3。

(D) EGT (500 μg/匹、2.18 μmol/匹)の代わりに NAC (350 μg/匹、2.14 μmol/匹)を用いて Fig. 2-2-1B と同様の実験を実施した。n = 4-5。

*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、n.s.; 統計学的有意差無し。

考察

本研究の第二節では、EGT が腫瘍内微小環境の TAM を標的として、TLR2/6 リガンドを用いたがんワクチンの治療効果を改善することを明らかにした(Fig. 2-2-1)。EGT は TLR2/6 リガンドと共に TAM にはたらき、TAM の増殖を抑制し(Fig. 2-2-2)、さらには分子発現を CTL 抑制能の除去に向かうように調節した(Fig. 2-2-3)。その結果を反映して、腫瘍内の CTL は EGT と TLR2/6 リガンドを併用したときに顕著に活性化していた(Fig. 2-2-4)。TAM の機能調節が CTL 活性化につながることは、これらの細胞の共培養系によって証明された(Fig. 2-2-5)。

TLR2/6 リガンドの存在下で、HER は TAM の CTL 抑制能を除去せず、さらに CTL 機能を低下させるようにはたらいた。すなわち、EGT の抗がん免疫改善作用にはその抗酸化性チオール基が必須である。一方で興味深いことに、同様にチオール性抗酸化剤として機能する NAC は CTL 機能を抑制するようにはたらいた(Fig. 2-2-5)。NAC は CTL にも取り込まれるため(Pilipow et al., 2018)、EGT のトランスポーターOCTN1 が免疫細胞の中ではミエロイド系に局在することが重要である可能性もあるが(Tokuhiro et al., 2003)、すべての抗酸化剤ががん微小環境を改善するのではなく、EGT が特有の抗酸化活性を通じてその環境を改善することが示唆された。

実際に、EGT と NAC のチオール基は抗酸化活性に大きな違いがある。チオール性抗酸化剤の反応強度はチオール/ジスルフィドの酸化還元電位によって示される。酸化還元電位がより負の値に大きければ、その抗酸化活性はより強力である。一般に、チオールを有する化合物は-230 mV から-320 mV の酸化還元電位を取ることが知られ、NAC の細胞内活性本体である還元型 L-glutathione の酸化還元電位は-250 mV と報告されている(Jones, 2004)。しかしながら、EGT の酸化還元電位はわずか-60 mV 程度(Cheah and Halliwell, 2012)であり、NAC に比べてその反応性が低いことを特徴とする。すなわち、EGT と NAC は除去できる酸化剤の種類に違いがあり、がん微小環境の改善に強い酸化剤の除去のみが有効である場合、本研究で得られた結果が説明される。

本研究では種々の TAM 機能関連分子の発現が EGT および TLR2/6 リガンドによって影響されることを報告したが、その分子発現を司る細胞内メカニズムについては明らかにすることができなかった。近年になって、Thioredoxin や Keap1/Nrf2 等の酸化還元シグナル関連分子が免疫シグナルに影響を与えることがわかってきたが(Hadri et al., 2012; Kobayashi et al., 2016)、EGT がこれらの分子を含め、どのような細胞内センサーに認識さ

れるのかは未知の部分が大きい。したがって、今後は TAM の TLR シグナル経路と酸化還元シグナル分子の相互作用を解明し、さらにその相互作用がどのような強さの抗酸化剤によって影響を受けるのか解明することで、EGT 特有の作用メカニズムが説明されるものと考えられる。

TLR2 リガンドはがんワクチンのアジュバントとして開発が進められており、DC に作用することで CTL のプライミングおよび腫瘍内浸潤を増加させることが知られている(Takeda et al., 2018a; Wang et al., 2018)。しかしながら、内因性 TLR2 リガンドによる TAM の刺激は腫瘍の増悪に寄与することが知られており(Chalmin et al., 2010; Kim et al., 2009; Kuang et al., 2007)、腫瘍内環境の CTL 機能に相反する作用を持つことがわかっていた(Shime et al., 2017)。

本研究によって、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改善する可能性が示唆された。EGT は食物に多く存在することから、食品領域の観点からヒトでの安全性が確立されている(Marone et al., 2016; Schauss et al., 2010; Turck et al., 2017)。そのため EGT は安全ながん微小環境制御剤として、TLR リガンドと共にがん治療への応用が期待されるものである。

総括および結論

第一章

・TLR3 リガンドを放射線に併用することで、抗原を投与せずとも、CTL に依存した抗がん免疫応答を誘導できる。すなわち本併用療法は簡便な抗がん免疫誘導法として機能する。TLR3 リガンドは放射線のみでは達成できない DC 成熟化を付与するため、死細胞を介した CTL 誘導を惹起できたものと考えられる。

・TLR3 リガンドと放射線の併用はリンパ節において顕著に CTL のプライミングをもたらしたが、どのような抗原によってその活性化が生じたのかは未解決である。遺伝子変異によって生じた多様な内因性抗原に対して CTL が反応したことが示せれば、本併用療法は包括的ながん抗原投与と同様の意味をもつことになり、その実施の意義はさらに高まる。

・TLR3 リガンドと放射線の併用は、CTL のプライミングのみならず、腫瘍内への浸潤も大きく増強する治療法であり、ケモカインシグナルの増加がその機序として説明される。

・TLR3 リガンドによる腫瘍内 TNF-α の増加はがん細胞の放射線感受性増強をもたらし、死細胞を起点とする免疫応答をさらに増強する可能性がある。

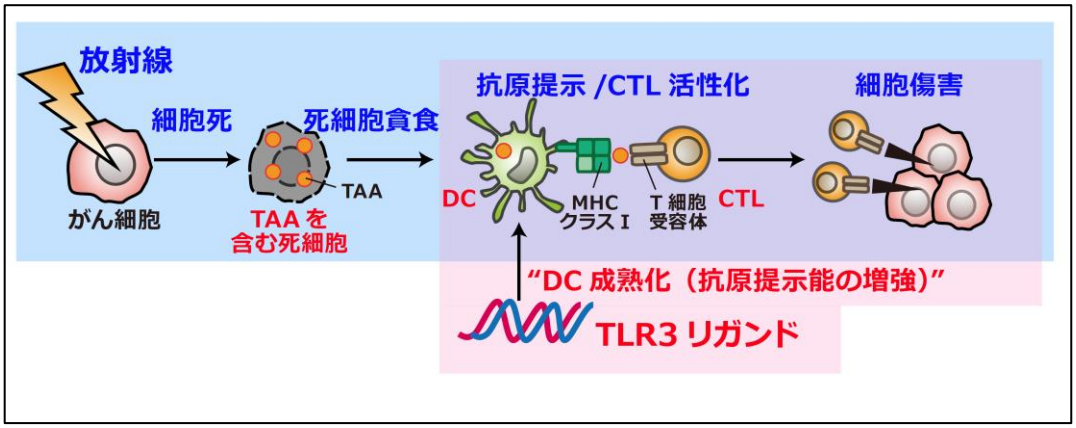

図 3. TLR3 リガンドと放射線の併用によるがん免疫誘導の機序

第二章

・EGT は MΦ にはたらき、TLR シグナルとともに免疫抑制関連分子の発現を抑制する。

・EGT による MΦ 機能調節は抗がん免疫に応用可能である。TLR2/6 シグナルは DC による CTL 活性化を誘導する(図 4A)のみならず、免疫抑制性である TAM を増殖させる(図 4B)。しかしながら、この時に EGT を併用することで(図 4C)、TAM の免疫抑制関連分子の発現は減弱し、CTL 抑制能は除去される(図 4D)。すなわち、EGT は MΦ を中心とした腫瘍内微小環境の改善剤として機能する。

・EGT の活性は抗酸化部位に依存したが、その細胞内シグナルはほとんど不明である。この細胞内メカニズムを解明することで、EGT のがん微小環境改善剤としての利用性はさらに高まるものと期待される。

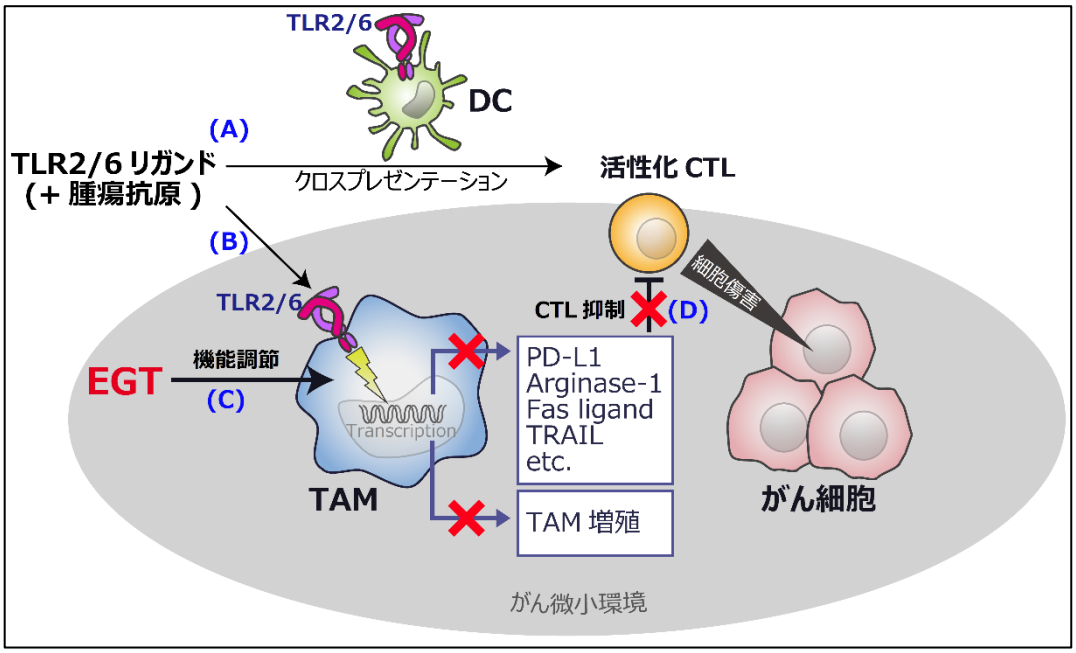

図 4. EGT による TAM の TLR 応答調節および CTL 抑制の解除機構

本研究の第一章では、放射線に自然免疫シグナルを併用することで、極めて簡便に、抗腫瘍性 CTL のプライミング・腫瘍内浸潤を誘導できることを示した。さらに第二章では、CTL が腫瘍内に浸潤した後のエフェクター活性を EGT が劇的に改善す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 CTL のプライミング相・腫瘍内浸潤・エフェクター相のすべての増強をもたらし、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。

TLR リガンドは抗がん免疫の賦活剤として注目されている。TLR3 リガンドである polyI:C は 1960 年代にはその抗腫瘍作用が注目され、数多くの臨床治験が行われた。PolyI:C は優れたがん抑制作用が得られる一方で、炎症応答に起因する強い副作用を伴うため、その臨床応用は困難とされる。しかし、その後 polyI:C が TLR3/TICAM-1 および MDA5/MAVS の二つのシグナル伝達経路を活性化することが発見され、全身性の炎症応答はほとんど MDA5/MAVS 経路に依存することがわかった(Seya et al., 2015)。さらに当研究室で開発した TLR3 選択的リガンドは炎症応答を惹起せず抗腫瘍作用が得られるため(Matsumoto et al., 2015; Takeda et al., 2017)、本研究で見出した放射線との併用療法は、簡便かつ安全に抗がん免疫を誘導するための有効な手法になることが期待される。

TLR3 リガンドと同様に、TLR2 リガンドも他グループから盛んにアジュバントとしての合成が報告されている(Akao et al., 2009; Cheng et al., 2015; Wang et al., 2018)。しかしながら、その臨床応用のためには TLR2 シグナルによる負の抗がん免疫応答を解除することが解決課題であった。本研究では安全性が確立された化合物である EGT が TLR2 リガンドでがん治療を行う際のがん微小環境改善剤となり、その CTL のエフェクター活性を大きく強めることを明らかにした。そのため今後 TLR2 リガンドのがん治療への利用可能性は更に高まるものと予想される。

まとめると、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る。その成果は抗がん免疫の誘導、ならびにがん微小環境の制御法として応用され得る。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ものと期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり多大なるご支援を賜りました北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室 笠原正典教授ならびに外丸詩野准教授に深く感謝致します。

本研究において終始適切なご指導、ご討論を賜り、本論文作成にあたって惜しみないご助力をいただきました北海道大学大学院医学研究院 瀬谷司客員教授ならびに松本美佐子客員教授に深く感謝致します。

放射線研究について丁寧にご指導いただき、本研究に多大なご協力を賜りました北海道大学大学院医学研究院 放射線医学教室 白土博樹教授ならびに北海道大学 GI-CORE GSQ 南璡旼講師に深く感謝致します。

実験の基礎的手技から丁寧にかつ熱心にご指導頂き、また研究の素晴らしさを教えて下さいました名古屋市立大学大学院医学研究科免疫学分野 志馬寛明講師に心より感謝致します。

研究の遂行におきまして多大なご助言をいただきました元北海道大学大学院医学研究院 舟見健児特任助教、札幌医科大学医学部フロンティア医学研究所免疫制御医学部門　高木宏美助教、帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター 武田洋平特任助教ならびにBoston Children's Hospital 高島謙 post-doctoral fellowに感謝致します。

本論文を審査して頂きました、北海道大学大学院医学研究院 免疫学教室 小林弘一教授、北海道大学遺伝子病制御研究所 がん制御学分野 園下将大教授、北海道大学大学院医学研究院 腫瘍病理学教室 田中伸哉教授、北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室Ⅰ 神山俊哉准教授に深く感謝いたします。

研究生活のあらゆる面でお世話になりました、北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室の皆様、ならびに瀬谷研究室の皆様に感謝致します。

最後に、長い学生生活を見守り、精神的、経済的に支えて下さいました両親に深く感謝致します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Ahn, J., Xia, T., Rabasa Capote, A., Betancourt, D., and Barber, G.N. (2018). Extrinsic Phagocyte-Dependent STING Signaling Dictates the Immunogenicity of Dying Cells. Cancer Cell *33*, 862–873.e5.

Akao, Y., Ebihara, T., Masuda, H., Saeki, Y., Akazawa, T., Hazeki, K., Hazeki, O., Matsumoto, M., and Seya, T. (2009). Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. Cancer Sci. *100*, 1494–1501.

Akazawa, T., Ebihara, T., Okuno, M., Okuda, Y., Shingai, M., Tsujimura, K., Takahashi, T., Ikawa, M., Okabe, M., Inoue, N., et al. (2007). Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 252–257.

Akazawa, T., Ohashi, T., Wijewardana, V., Sugiura, K., and Inoue, N. (2018). Development of a vaccine based on bacteria-mimicking tumor cells coated with novel engineered toll-like receptor 2 ligands. Cancer Sci. *109*, 1319–1329.

Aurisicchio, L., Pallocca, M., Ciliberto, G., and Palombo, F. (2018). The perfect personalized cancer therapy: Cancer vaccines against neoantigens. J. Exp. Clin. Cancer Res. *37*, 1–10.

Azria, D., Larbouret, C., Garambois, V., Kramar, A., Martineau, P., Robert, B., Aillères, N., Ychou, M., Dubois, J.B., and Pèlegrin, A. (2003). Potentiation of ionising radiation by targeting tumour necrosis factor alpha using a bispecific antibody in human pancreatic cancer. Br. J. Cancer *89*, 1987–1994.

Azuma, M., Ebihara, T., Oshiumi, H., Matsumoto, M., and Seya, T. (2012). Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c + /CD8α + dendritic cells. Oncoimmunology *1*, 581–592.

Azuma, M., Takeda, Y., Nakajima, H., Sugiyama, H., Ebihara, T., and Oshiumi, H. (2016). Biphasic function of TLR3 adjuvant on tumor and spleen dendritic cells promotes tumor T cell in fi ltration and regression in a vaccine therapy. Oncoimmunology *5*, 1–16.

Balzola, F., Bernstein, C., Ho, G.T., and Russell, R.K. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS: Commentary. Inflamm. Bowel Dis. Monit. *12*, 73.

Betts, M.R., and Koup, R.A. (2004). Detection of T-Cell Degranulation: CD107a and b. Methods Cell Biol. *75*, 497–512.

Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. Nat. Immunol. *11*, 889–896.

Blander, J.M., and Sander, L.E. (2012). Beyond pattern recognition: Five immune checkpoints for scaling the microbial threat. Nat. Rev. Immunol. *12*, 215–225.

Cassetta, L., and Kitamura, T. (2018). Targeting Tumor-Associated Macrophages as a Potential Strategy to Enhance the Response to Immune Checkpoint Inhibitors. Front. Cell Dev. Biol. *6*, 1–6.

Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., et al. (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. J. Clin. Invest. *120*, 457–471.

de Charette, M., Marabelle, A., and Houot, R. (2016). Turning tumour cells into antigen presenting cells: The next step to improve cancer immunotherapy? Eur. J. Cancer *68*, 134–147.

Cheah, I.K., and Halliwell, B. (2012). Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis

Dis. *1822*, 784–793.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. Immunity *39*, 1–10.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature *541*, 321–330.

Cheng, K., Gao, M., Godfroy, J.I., Brown, P.N., Kastelowitz, N., and Yin, H. (2015). Specific activation of the TLR1-TLR2 heterodimer by small-molecule agonists. Sci. Adv. *1*.

Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., and Lawrence, T. (2014). Dendritic cell maturation: Functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. EMBO J. *33*, 1104–1116.

Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, X.D., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., et al. (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors. Immunity *41*, 543–852.

Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2016). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. Nat. Rev. Immunol. *17*, 2–5.

Galluzzi, L., Chan, T.A., Kroemer, G., Wolchok, J.D., and Lopez-Soto, A. (2018). The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. Sci. Transl. Med. *10*, eaat7807.

González-Martín, A., Gómez, L., Lustgarten, J., Mira, E., and Mañes, S. (2011). Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4+ and CD8+ T cells. Cancer Res. *71*, 5455–5466.

Gründemann, D., Harlfinger, S., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Berkels, R., Jung, N., Rubbert, A., and Schömig, E. (2005). Discovery of the ergothioneine

transporter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 5256–5261.

Guo, C., Manjili, M.H., Subjeck, J.R., Sarkar, D., Fisher, P.B., and Wang, X.Y. (2013). Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future. Advances in Cancer Research. 119, 421-475.

Hadri, K. El, Dler Faieeq Darweesh, M., Couchie, D., Jguirim-Souissi, I., Genze, F., Diderot, V., Syrovets, T., Lunov, O., Simmet, T., and Rouis, M. (2012). Thioredoxin-1 promotes anti-inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 1445–1452.

Hu, Z., Ott, P.A., and Wu, C.J. (2018). Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. Nat. Rev. Immunol. *18*, 168–182.

Ishimoto, T., Masuo, Y., Kato, Y., and Nakamichi, N. (2019). Ergothioneine-induced neuronal di ff erentiation is mediated through activation of S6K1 and neurotrophin 4 / 5-TrkB signaling in murine neural stem cells. Cell. Signal. *53*, 269–280.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat. Immunogy *16*, 343–353.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. Nat. Rev. Immunol. *12*, 557–569.

Jones, D.P. (2004). Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. FASEB J. *1*, 1–16.

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141 + (BDCA-3) + dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. J. Exp. Med. *207*, 1247–1260.

Ju, H., Xing, W., Yang, J., Zheng, Y., Jia, X., Zhang, B., and Ren, H. (2016). An effective cytokine adjuvant vaccine induces autologous T-cell response against

colon cancer in an animal model. BMC Immunol. *17*, 1–10.

Katholnig, K., Linke, M., Pham, H., Hengstschläger, M., and Weichhart, T. (2013). Immune responses of macrophages and dendritic cells regulated by mTOR signalling. Biochem. Soc. Trans. *41*, 927–933.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Nature *441*, 101–105.

Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.-W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.-L., and Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. Nature *457*, 102–106.

Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., et al. (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. Nat. Commun. *7*, 11624.

Kono, H., and Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. Nat. Rev. Immunol. *8*, 279–289.

Kuang, D.M., Wu, Y., Chen, N., Cheng, J., Zhuang, S.M., and Zheng, L. (2007). Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. Blood *110*, 587–595.

Laurenza, I., Colognato, R., Migliore, L., Del Prato, S., and Benzi, L. (2008). Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: Evidence of an anti-inflammatory action. BioFactors *33*, 237–247.

Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. Nat. Rev. Immunol. *11*, 750–761.
Lee, C.H., Yelensky, R., Jooss, K., and Chan, T.A. (2018). Update on Tumor Neoantigens and Their Utility: Why It Is Good to Be Different. Trends Immunol.

39, 536–548.

Marone, P.A., Trampota, J., and Weisman, S. (2016). A Safety Evaluation of a Nature-Identical l -Ergothioneine in Sprague Dawley Rats. Int. J. Toxicol. *35*, 568–583.

Martínez-Lostao, L., Anel, A., and Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? Clin. Cancer Res. *21*, 5047–5056.

Maruyama, A., Shime, H., Takeda, Y., Azuma, M., Matsumoto, M., and Seya, T. (2015). Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. *457*, 445–450.

Matsumoto, M., Tatematsu, M., Nishikawa, F., Azuma, M., Ishii, N., Morii-Sakai, A., Shime, H., and Seya, T. (2015). Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo. Nat. Commun. *6*, 6280.

Matsumoto, M., Takeda, Y., Tatematsu, M., and Seya, T. (2017). Toll-like receptor 3 signal in dendritic cells benefits cancer immunotherapy. Front. Immunol. *8*, 1–7.

Munn, D.H., and Bronte, V. (2016). Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. Curr. Opin. Immunol. *39*, 1–6.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. Immunity *41*, 49–61.

Ohnishi, T., Bandow, K., Kakimoto, K., Kusuyama, J., and Matsuguchi, T. (2014). Long-time treatment by low-dose N-acetyl-L-cysteine enhances proinflammatory cytokine expressions in LPS-stimulated macrophages. PLoS One *9*.

Oshiumi, H., Okamoto, M., Fujii, K., Kawanishi, T., Matsumoto, M., Koike, S., and Seya, T. (2011). The TLR3/TICAM-1 Pathway Is Mandatory for Innate Immune Responses to Poliovirus Infection. J. Immunol. *187*, 5320–5327.

Pandey, S., Kawai, T., and Akira, S. (2014). Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. Cold Spring Harb Perspect Biol *7*, a016246.

Pilipow, K., Scamardella, E., Puccio, S., Gautam, S., De Paoli, F., Mazza, E.M.C., De Simone, G., Polletti, S., Buccilli, M., Zanon, V., et al. (2018). Antioxidant metabolism regulates CD8+ T memory stem cell formation and antitumor immunity. JCI Insight *3*. e122299

Rahman, I., Gilmour, P.S., Jimenez, L.A., Biswas, S.K., Antonicelli, F., and Aruoma, O.I. (2003). Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-α-induced NF-κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *302*, 860–864.

Reynders, K., Illidge, T., Siva, S., Chang, J.Y., and De Ruysscher, D. (2015). The abscopal effect of local radiotherapy: Using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. Cancer Treat. Rev. *41*, 503–510.

Roberts, E.W., Broz, M.L., Binnewies, M., Headley, M.B., Nelson, A.E., Wolf, D.M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., and Krummel, M.F. (2016). Critical Role for CD103+/CD141+ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. Cancer Cell *30*, 324–336.

Sahin, U., and Türeci, Ö. (2018). Personalized vaccines for cancer immunotherapy. Science. *359*, 1355–1360.

Schauss, A.G., Vértesi, A., Endres, J.R., Hirka, G., Clewell, A., Qureshi, I., and Pasics, I. (2010). Evaluation of the safety of the dietary antioxidant ergothioneine using the bacterial reverse mutation assay. Toxicology *278*, 39–45.

Seya, T., Shime, H., Takeda, Y., Tatematsu, M., Takashima, K., and Matsumoto, M. (2015). Adjuvant for vaccine immunotherapy of cancer - focusing on Toll-like receptor 2 and 3 agonists for safely enhancing antitumor immunity. Cancer Sci.

106.

Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y., Tahara, H., Inoue, N., and Seya, T. (2012). Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 2066–2071.

Shime, H., Maruyama, A., Yoshida, S., Takeda, Y., Matsumoto, M., and Seya, T. (2017). Toll-like receptor 2 ligand and interferon-γ suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells. Oncoimmunology *7*, e1373231.

Smart, A.C., Margolis, C.A., Pimentel, H., He, M.X., Miao, D., Adeegbe, D., Fugmann, T., Wong, K.-K., and Van Allen, E.M. (2018). Intron retention is a source of neoepitopes in cancer. Nat. Biotechnol. *36*, 1056–1058.

Stack, J., Doyle, S.L., Connolly, D.J., Reinert, L.S., O'Keeffe, K.M., McLoughlin, R.M., Paludan, S.R., and Bowie, A.G. (2014). TRAM Is Required for TLR2 Endosomal Signaling to Type I IFN Induction. J. Immunol. *193*, 6090–6102.

Takashima, K., Takeda, Y., Oshiumi, H., Shime, H., Okabe, M., Ikawa, M., Matsumoto, M., and Seya, T. (2016). STING in tumor and host cells cooperatively work for NK cell-mediated tumor growth retardation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *478*, 1764–1771.

Takeda, Y., Azuma, M., Matsumoto, M., and Seya, T. (2016). Tumoricidal efficacy coincides with CD11c up-regulation in antigen-specific CD8(+) T cells during vaccine immunotherapy. J. Exp. Clin. Cancer Res. *35*, 143.

Takeda, Y., Kataoka, K., Yamagishi, J., Ogawa, S., Seya, T., and Matsumoto, M. (2017). A TLR3-Specific Adjuvant Relieves Innate Resistance to PD-L1 Blockade without Cytokine Toxicity in Tumor Vaccine Immunotherapy. Cell Rep. *19*, 1874–1887.

Takeda, Y., Azuma, M., Funami, K., Shime, H., Matsumoto, M., and Seya, T.

(2018a). Type I interferon-independent dendritic cell priming and antitumor T cell activation induced by a Mycoplasma fermentans lipopeptide. Front. Immunol. *9*, 1–11.

Takeda, Y., Yoshida, S., Takashima, K., Shime, H., Seya, T., and Matsumoto, M. (2018b). Vaccine immunotherapy with ARNAX induces tumor-specific memory T cells and durable anti-tumor immunity in mouse models. 2119–2129.

Tatematsu, M., Funami, K., Seya, T., and Matsumoto, M. (2018). Extracellular RNA Sensing by Pattern Recognition Receptors. J. Innate Immun. *10*, 1–9.

Tokuhiro, S., Yamada, R., Chang, X., Suzuki, A., Kochi, Y., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Ohtsuki, M., Ono, M., et al. (2003). An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. Nat. Genet. *35*, 341–348.

Turck, D., Bresson, J., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K.I., Mangelsdorf, I., McArdle, H.J., Naska, A., et al. (2017). Statement on the safety of synthetic l-ergothioneine as a novel food – supplementary dietary exposure and safety assessment for infants and young children, pregnant and breastfeeding women. EFSA J. *15*.

Ugel, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Ugel, S., Sanctis, F. De, Mandruzzato, S., and Bronte, V. (2015). Tumor-induced myeloid deviation : when myeloid-derived suppressor cells meet tumor- associated macrophages Find the latest version : Tumor-induced myeloid deviation : when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. J Clin Invest *125*, 3365–3376.

Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. Nat. Immunol. *19*, 108–119.

Vicari, A.P., and Caux, C. (2014). Chemokines in cancer. Cancer Immunol. Res. *13*, 143–154.

Wang, Y., Su, L., Morin, M.D., Jones, B.T., Mifune, Y., Shi, H., Wang, K.-W.,

Zhan, X., Liu, A., Wang, J., et al. (2018). Adjuvant effect of the novel TLR1/TLR2 agonist Diprovocim synergizes with anti-PD-L1 to eliminate melanoma in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 201809232.

Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat. Rev. Immunol. *15*, 486–499.