



Title	抗腫瘍免疫の誘導を目指した治療および再発予防研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	梶原, ナビール
Description	配架番号 : 2803
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15643号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90953
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KAJIHARA_Nabeel_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 梶原 ナ ビ ール

学位論文題名

抗腫瘍免疫の誘導を目指した治療および再発予防研究
(Studies on cancer therapy and recurrence prevention aimed at inducing anti-tumor immunity)

【背景と目的】近年大きな注目を集めている免疫療法は、がんを根絶するだけでなく将来の再発リスクを大幅に低減させる。実際、免疫療法の一つである免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は様々ながん種に対して高い治療効果を示し、がん患者の生存率改善および再発率減少をもたらしている。しかしながら、その治療効果や再発抑制効果は不十分でほとんどの腫瘍が最終的に治療抵抗性を獲得するため、より効果的な治療法や再発予防法の開発が期待されている。そこで我々は、1. 腫瘍内に浸潤している免疫細胞の大半を占める免疫抑制性のミエロイド細胞に着目し、これらを減少させる治療法の開発 (第一章)、2. 腫瘍内に浸潤している細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を直接活性化させる治療法の開発 (第二章)、3. がんの再発を予防するための新規がんワクチンの開発 (第三章)、の三つのテーマに取り組んだ。

【方法と結果】

(第一章) ほとんどの腫瘍には免疫抑制性ミエロイド細胞が大量に浸潤しており、それらは、がん細胞に対して攻撃性を持つ CTL などの免疫細胞機能を抑制することで免疫抑制的な腫瘍微小環境 (TME) を構築する。特に、トリプルネガティブ乳がん (TNBC) は免疫抑制性ミエロイド細胞の浸潤が豊富ながん種として報告されている。そこで、ミエロイド細胞の分化を抑制性に傾けるサイトカインである Interleukin-34 (IL-34) の TNBC における病理学的役割について調査した。まず、TCGA (The Cancer Genome Atlas) データセットを用いて TNBC における IL-34 の遺伝子発現を調査したところ、TNBC 患者の腫瘍組織では IL-34 が高発現しており、多変量解析の結果 IL-34 発現そのものが独立した予後不良因子となることが判明した。そのメカニズムを、IL-34 恒常的発現するマウス TNBC 細胞株 4T1 (Ctrl) と IL-34 欠損 4T1 (KO) を用いて探ったところ、KO 腫瘍の方がマウス生体内における成長速度が遅いことがわかった。また、フローサイトメトリーを用いてその腫瘍内を解析してみると、単球系骨髄由来抑制細胞 (M-MDSC) が減少し多形核 MDSC (PMN-MDSC) が増加していた。さらに、試験管内での実験により、これらの結果が IL-34 による直接的なものであることが判明した。M-MDSC は強力な免疫抑制能を持ち、PMN-MDSC は血管新生を促進するため、両腫瘍における制御性 T 細胞 (Treg) と腫瘍内血管量を比較したところ、KO 腫瘍において Treg の減少と血管浸潤の大幅な増加が観察された。腫瘍内血管は薬剤の送達性を制御するため、それぞれの腫瘍を接種したマウスに抗がん剤を投与したところ、Ctrl に対しては全く治療効果を示さなかったのに対し、KO 腫瘍の成長が有意に抑制された。

(第二章) 抗腫瘍免疫サイクルの様々なステップが抑制されることで最終的には CTL の機能が制限され治療抵抗性を呈する。本章では、最終エフェクターである CTL を直接活性化させる手法を探索した。文献の調査により、性ホルモンであるエストロゲンの TME における CTL への関与が予測されたため、マウスエストロゲン非感受性腫瘍を用いてこれを調査した。まず、4T1 とマウス結腸がん細胞株 CT26 がエストロゲン受容体 (ER) 陰性で、エストロゲン感受性を持たないことを確認した。これら細胞株をそれぞれエストロゲン枯渇マウスに移植すると、エストロゲン循環マウスと比較して腫瘍の増大が有意

に抑制された。一方で、エストロゲン枯渇マウスに腫瘍を接種したのちエストロゲンを投与すると腫瘍増殖が促進された。さらには、ER 陰性がんを接種したマウスに抗エストロゲン薬を投与すると腫瘍増殖が抑制され、その腫瘍浸潤免疫細胞を解析してみると活性化 CTL が増加していた。また、ヒト末梢血中およびマウス脾臓中 CTL を用いた実験により、エストロゲンが CTL を直接抑制し、抗エストロゲン薬の添加によりこの抑制を解除できることが判明した。このメカニズムとして、エストロゲンが CTL 内の JAK-STAT 経路を抑制することで自身からの Interleukin-2 (IL-2) 産生量を減少させ、それにより自己分泌活性化経路が抑制されていることが、次世代シーケンシング解析の結果から示唆された。腫瘍内 CTL の浸潤レベルや機能は ICI の治療効果に関与するため、最後に、ER 陰性腫瘍を接種したマウスに対して抗エストロゲン薬と ICI の併用治療を行ったところ、これらの併用治療が劇的な抗腫瘍効果をもたらすことが確認された。

(第三章) 様々な治療法を駆使してがんが一度寛解に至ったとしても、後に再発するケースが多く存在するため、この克服も重要課題の一つである。本章では、腫瘍細胞に発現する多様な腫瘍関連抗原 (TAA) を宿主免疫の標的にできる全腫瘍細胞ワクチン (WTCV) のワクチンに注目し、より効果的な WTCV の開発を目指した。まず、4T1A (本章では一般的な 4T1 のことをそのように呼ぶ)・4T1S (当研究室で 2015 年に樹立された 4T1 の亜株)・CT26・マウスメラノーマ細胞株 B16・マウスルイス肺がん細胞株 3LL・マウス線維肉腫細胞株 MCA205 に放射線を照射することで不活性化したのち、WTCV としてマウスに接種し、その二週間後に放射線照射していないワクチン時と同種のがん細胞を接種することで、それぞれの細胞株を用いた WTCV におけるワクチン効果の違いを比較した。そして、4T1A・B16・3LL は WTCV 無効細胞株、4T1S・CT26・MCA205 は WTCV 有効細胞株として同定された。その後、各細胞株を次世代シーケンシング解析し、WTCV 有効細胞株では Irf7、Ifi44、Usp18、Oas3 の四遺伝子が高発現していることが判明した。さらに、遺伝子導入細胞株を用いたワクチン実験により Oas3 以外の三遺伝子 (Irf7、Ifi44、Usp18) がワクチン効果に重要であることがわかった。その機序を解明するべく、WTCV 無効細胞株と有効細胞株をワクチン接種したマウスの所属リンパ節中免疫細胞を単一細胞解析→差別的発現遺伝子解析→遺伝子オントロロジー解析→フローサイトメトリーにより評価したところ、Interferon- γ (IFN γ) 産生 B 細胞がワクチン効果に重要であることが示唆された。また、B 細胞除去抗体を用いたワクチン実験により、IFN γ^+ B 細胞のワクチン効果における重要性が示された。

【考察と結論】

(第一章) IL-34 の発現は NF- κ B と関連している。TNBC においては NF- κ B 経路の亢進が報告されているため、IL-34 の高発現に繋がっていると考えられる。本章で得られた結果は、TNBC の TME における IL-34-MDSC 軸を介した免疫抑制と化学療法抵抗性の存在を示唆している。故に、IL-34 阻害治療により腫瘍内の免疫抑制と化学療法抵抗性を解除できる可能性がある。

(第二章) IL-2 は CTL からも産生され、自己分泌経路により CTL 自身の増殖を促進することが報告されている。本章で得られた結果は、エストロゲンが TME において、CTL における IL-2 自己分泌経路を直接抑制することによってがん細胞の ER 非依存的にがんの進行を促進することを示唆している。故に、がん患者におけるエストロゲンシグナルの遮断が TME 内の CTL を活性化および増加させ、結果として ICI の有効性の向上をもたらす可能性がある。

(第三章) Irf7・Ifi44・Usp18 は免疫細胞内の自然免疫応答において密接に関わっていることがわかっていいる。本章で得られた結果は、Irf7・Ifi44・Usp18 ががん細胞内においても協力的に機能でき、これらのがん細胞に導入することで、WTCV による再発を想定した腫瘍の抑制効果が高まることを示唆している。また、上記三因子がワクチン効果を高めるメカニズムとして IFN γ^+ B 細胞の重要性を提示した。故に、がん細胞内の自然免疫経路を活性化させたがんワクチンは将来の再発を予防する可能性があり、最終的に臨床現場での予防的治療として適用され得る。