

氏名 (本籍)	野 中 健 一 (愛知県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 772 号
学位授与日付	平成 20 年 9 月 10 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Skewing the Th cell phenotype toward Th1 alters the maturation of tumor-infiltrating mononuclear phagocytes
審 査 委 員	(主査) 教授 近 藤 直 実 (副査) 教授 森 脇 久 隆 教授 伊 藤 善 規

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

骨髄球由来抑制細胞 (MDSC) は、腫瘍細胞や腫瘍組織が宿主の骨髄や脾などのリンパ器官に影響を与え、免疫抑制的な性格へと分化した骨髄球/単球系細胞で、特に単球系分画は腫瘍内で腫瘍内浸潤マクロファージへと分化すると言われている。我々は以前から、動物モデルにおいて腫瘍内浸潤単核食細胞 (MPC) が単球とマクロファージとから構成されていることを報告してきたが、この細胞が腫瘍内浸潤 MDSC として分類されるかどうか十分に証明できておらず、さらに腫瘍内の T 細胞がどのように MPC の成熟に影響を与えているかも検討したことがない。そこで本研究ではこれらの課題を、IL-2 をベースとした免疫治療モデルを用いて検討した。

### 【対象と方法】

- 1) マウス: C57BL/6J マウス, *gld* マウス, TNF 受容体 I 型および II 型のノックアウトマウスを使用した。
- 2) 腫瘍細胞: サイトカイン治療モデルとしてマウス大腸癌株 MCA38 に①IL-2 (IL-2 群), ②可溶性 TNF 受容体 II 型 (sTNFR II 群), ③IL-2 と可溶性 TNF 受容体 II 型の双方 (共導入群), ④ベクターのみ (対照群), の計 4 つの遺伝子導入群を作成した。 *In vitro* での各遺伝子導入腫瘍の増殖には有意差はなかった。
- 3) 腫瘍増殖曲線: マウス皮下にそれぞれの腫瘍細胞を接種し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。
- 4) 腫瘍内浸潤細胞の採取: 腫瘍接種後 12 日目に腫瘍を摘出し細胞を酵素で分散させ、その後抗 CD11b 抗体で標識された磁気ビーズと反応させ、磁場内のカラムを通しカラム内に残った細胞を回収した。
- 5) フローサイトメトリー: いずれの試料も Fc 受容体のブロックをした後、蛍光標識された各種細胞表面抗原に対する抗体で染色し、洗浄後固定して解析した。
- 6) 細胞生存率の解析: 腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞を *in vitro* で培養し、死細胞から培養上清中に逸脱した LDH 量と全 LDH 量 (試料中の全細胞を強制的に界面活性剤で溶解) を比較して細胞生存率を算出した。
- 7) 細胞死の解析: フローサイトメトリーで解析する場合はアネキシンバッファーで洗浄後、アネキシンと Via-Probe で染色した。顕微鏡での解析ではヘキスト 33258 で細胞核を染色した。
- 8) 共培養: 脾の CD8<sup>+</sup>T 細胞を抗 T 細胞受容体抗体で 24 時間前から刺激し CFSE で標識後、腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞あるいは腹腔内滲出細胞 (PEC) と共培養し CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖程度を CFSE 量の変化で検討した。
- 9) NO 解析: IFN- $\gamma$  刺激あるいは未刺激の細胞の培養上清を、Greiss 試薬と混合し吸光度を測定した。
- 10) マルチプル PCR 法とリアルタイム PCR 法: 細胞のトータル RNA を逆転写し cDNA を調整した後、各種サイトカインに対するプライマーと混ぜ、PCR 装置で増幅し解析した。
- 11) NK や T 細胞の除去: それぞれの細胞に特異的な精製抗体 (GK1.5 と NK1.1) をあらかじめマウスの腹腔内に接種して、標的の細胞を除去してからマウスの腫瘍接種の実験に供した。
- 12) Western Blotting: 可溶性蛋白を SDS-PAGE で電気泳動後 PVDF 膜に転写した。膜を抗 NOS2 (iNOS) あるいは抗 Arginase I 抗体と POD 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体の組合せで染色し、化学発光で観察した。
- 13) 免疫染色: 腫瘍の切片を作成後、FITC 標識抗 CD11b 抗体と PE 標識抗 CD4 抗体で染色した。

### 【結果】

- ① 皮下腫瘍径の検討: sTNFR II 群の腫瘍径は対照群と差がなかったが、IL-2 群および共導入群は腫瘍増

殖が抑制され、特に共導入群では全例の腫瘍が退縮した。全ての遺伝子導入群において腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞は CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup>という MDSCs としての表現型を有しており、CD8<sup>+</sup>T 細胞と共培養すると T 細胞の増殖を抑制した。また各群の腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞の成熟割合 (1y6C 陰性が成熟, 1y-6C 陽性が未熟とし、成熟分画の比率を算定) は腫瘍径と正の相関を示しているように思われた。

- ② NO 産生量と細胞死について：腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞を IFN- $\gamma$ 存在下で 24 あるいは 48 時間間培養すると、細胞の成熟割合が高いほど NO 産生が強く誘導された。他方、未熟な細胞が多いほど培養後に細胞が死ぬ率が高く、特に共導入群由来 CD11b<sup>+</sup>細胞は、培養 5 時間目で既にアポトーシスする細胞があることが分かった。
- ③ 共培養群由来 CD11b<sup>+</sup>細胞の解析：*gld*マウスに共導入群腫瘍を接種し、腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞の細胞死の割合を検討すると、通常マウスの場合より有意に細胞死が抑制され、IFN- $\gamma$ 刺激後の NO 産生量も増えたが、完全には細胞死は抑えられなかった。
- ④ 他の細胞死寄与因子の検討：各群由来の腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞を食細胞の生存や増殖にかかわる GM-CSF, M-CSF 及びそれらの受容体について解析した結果、共導入群由来の細胞は M-CSF 受容体の発現量が低く、逆に M-CSF の発現量が多いことがわかった。また TNF 受容体をノックアウトしたマウスに IL-2 群の腫瘍を接種すると、腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞の M-CSF 受容体は消失した。すなわち共導入群での CD11b<sup>+</sup>細胞の細胞死には M-CSF 受容体の発現抑制が関わっている可能性が示唆された。
- ⑤ 腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞の成熟における T 細胞関与の検討：腫瘍内浸潤 CD4<sup>+</sup>T 細胞 (CD4<sup>+</sup>TILs) を各腫瘍群から回収し、サイトカインの発現パターンを解析すると、共導入群由来の CD4<sup>+</sup>TILs は IFN- $\gamma$ の発現量が多く、逆に IL-13 発現量は少なく、Th1 型を示した。また、抗 CD4 抗体を用いてマウス CD4<sup>+</sup>T 細胞を除去したマウスでは、共導入群の腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞の成熟がさらに抑制された。また、*gld*マウス由来共導入群腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞は、IL-4, IL-13, あるいは GM-CSF 存在下で培養すると成熟した。

#### 【考察】

腫瘍内に浸潤した CD11b<sup>+</sup>細胞は MDSCs としての細胞表面の表現型や機能を備えていたが、腫瘍内の CD11b<sup>+</sup>細胞の大半は歴史的に今まで腫瘍随伴マクロファージ (TAM) と呼ばれてきたため、腫瘍内浸潤 CD11b<sup>+</sup>細胞を MDSC と言い換えることは MDSC の定義の過大解釈の可能性もある。他方我々の解析で共導入群由来の CD11b<sup>+</sup>細胞は他群由来の細胞と大きく性格が異なるため、マクロファージというより、活性化単球の状態にあると言った方が妥当な細胞が多く含まれると思われた。従って、現時点では MPC と表現するのが妥当と思われた。

今回の研究で共導入群 MPC の成熟が抑制されていたのは、IL-2 と可溶性 TNFII 型受容体の共導入により腫瘍環境が改変され、多数腫瘍内に CD4<sup>+</sup>TIL の浸潤が誘導されたと同時にその Th バランスが Th1 優位に偏向したためと思われる。つまり通常、腫瘍内浸潤未熟 MPC は CD4<sup>+</sup>TILs からの GM-CSF, IL-13, IL-4 の供給を受けることで成熟していくが、Th1 に偏向した状態になると CD4<sup>+</sup>TILs からの IL-13 および IL-4 の供給が減少し親腫瘍活性の高い MPC の成熟が抑制され、抗腫瘍活性優位になったのではないかと考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者 野中 健一は、マウス大腸癌肝転移モデルを用いて、免疫治療で宿主の免疫系のバランスを「抗腫瘍活性」の高い Th1 型に傾けると、腫瘍内浸潤単核食細胞の成熟・分化が妨げられることを示した。すなわち、通常腫瘍内浸潤単核食細胞は腫瘍の増殖を助ける「親腫瘍活性」が高いため、その成熟分化の抑制は相対的に宿主の免疫系のバランスを更に「抗腫瘍活性」優位に傾けたことを意味し、本研究により腫瘍内微小環境における免疫系の相互作用が詳細に明らかとなった。以上により本研究は、腫瘍外科学ならびに、癌免疫治療学の発展に少なからず寄与すると考えられた。

---

#### [主論文公表誌]

Nonaka, K., Saio, M., Suwa, T., Frey, A.B., Umemura, N., Imai, H., Ouyang, G.F., Osada, S., Balazs, M., Adany, R., Kawaguchi, Y., Yoshida, K., Takami, T. (2008) Skewing the Th cell phenotype toward Th1 alters the maturation of tumor-infiltrating mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol.* 84, 679-688 (2008).