

氏名 (本籍)	大 橋 敏 充 (岐阜県)		
学位の種類	博 士 (医学)		
学位授与番号	甲第 918 号		
学位授与日付	平成 25 年 3 月 25 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	Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases anti-tumor immunoreactivity		
審査委員	(主査) 教授 長 岡 仁		
	(副査) 教授 前 川 洋 一	教授 伊 藤 善 規	

論文内容の要旨

免疫療法は、第 4 のがん治療法と期待されているが、現在のところ確立された治療法とは成り得ていない。その原因の一つが、がん細胞の免疫回避機構である。担がん状態では、腫瘍関連マクロファージ (TAM) や骨髄由来制御性細胞 (MDSC)、制御性 T 細胞 (Treg) などにより、抗腫瘍免疫は抑制される。また、本来、がん細胞の発生や増殖を抑制するはずの免疫が、しばしばがんの進展に促進的に作用することが知られている。マクロファージのような自然免疫細胞は、腫瘍に浸潤し IL-17/IL-23 経路などを亢進させることで炎症を惹起し、血管新生や組織再構築を誘導する。以前我々は、がん細胞から大量に分泌される乳酸が、抗原存在下でマクロファージを活性化し、IL-23 依存的または非依存的な経路で CD4⁺ T 細胞からの IL-17 産生を促進することを見出した。

がん細胞は、通常酸素状態においても、解糖系が亢進しており、大量の乳酸を産生することが知られている (Warburg 効果)。頭頸部癌などのいくつかの癌腫では、腫瘍内の乳酸濃度が高いほど、転移しやすく予後も悪いことが報告されている。ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 欠損症などの高乳酸血症に対し臨床で用いられている Dichloroacetate (DCA) は、PDH キナーゼ (PK) 阻害剤であり、TCA 回路を促進させることで乳酸産生を抑制させる。そこで我々は、担がん動物に DCA を投与することで、免疫状態を改変させ、抗腫瘍免疫療法が効果的に行えるのではないかと仮定し実験をおこなった。

【対象と方法】

MHC class II に提示された OVA ペプチドを特異的に認識する TCR を発現するマウス (OT-II マウス) の脾細胞を乳酸、DCA 存在下で培養したときの、上澄中 IL-17 を ELISA にて測定した。また骨髄由来マクロファージ (BMDM) および BMDM と OT-II マウス脾細胞由来 CD4⁺ T 細胞を、乳酸、DCA 存在下で培養したときの遺伝子の発現を real-time RT-PCR にて測定した。次に、乳酸、DCA 存在下で培養した BMDM と、MHC class I に提示された OVA ペプチドを特異的に認識する TCR を発現するマウス (OT-I マウス) の脾細胞を用いて、乳酸、DCA 存在下で培養した BMDM の CD8⁺ T 細胞に対する増殖抑制能を評価した。また、BMDM を塩酸存在下で培養したときの遺伝子の発現を評価した。

EG7 (胸腺腫細胞株) もしくは B16 (悪性黒色腫細胞株) を C57BL/6 に移植 (Day0) し、Day6 より飲料水に混ぜた DCA (0.3g/l) を投与した。そのときの、腫瘍内乳酸濃度、および腫瘍浸潤免疫細胞における遺伝子の発現を評価した。また摘出した脾細胞を、不活化した腫瘍細胞と共培養したときの IFN- γ を評価した。さらに、DCA の投与に加え、Day8, 11, 14 に、Toll 様受容体 (TLR) 3 リガンドの Poly(I:C) 25 μ g を腹腔内投与したときの、腫瘍増殖を評価した。

【結果】

乳酸により増強された OT-II マウス由来脾細胞からの IL-17 産生は、DCA を加えることにより抑制された。BMDM と OT-II マウス脾細胞由来 CD4⁺ T 細胞を共培養したときの mRNA を測定したところ、乳酸により IL-17 および IL-23p19 の発現が増加し、DCA によってそれらは抑制された。また Arginase I (ARG1) も同様に、乳酸によって発現が増加し、DCA によってそれは抑制された。さらに、BMDM のみを刺激したところ、IL-23p19, ARG1 の発現が同様に乳酸によって増加し、それらは DCA によって抑制された。そのときの上澄中の乳酸濃度を測定したところ、乳酸を加えた群では、DCA の有無にかかわらず乳酸濃度は一定であった。ARG1 は TAM や MDSC に高発現し、T 細胞の活性化や増殖を抑制する役割

があることが知られている。つまり乳酸は、T細胞による抗腫瘍免疫を抑制するマクロファージの機能を高める効果があり、それはDCAによって抑制されると考えられた。それを確かめるため、乳酸で刺激されたBMDMがOT-Iマウス脾細胞CD8⁺T細胞の増殖を抑制するか調べた。乳酸で前処置されたBMDMはCD8⁺T細胞の増殖を抑制し、乳酸とともにDCAを加えて前処置されたBMDMはCD8⁺T細胞の増殖抑制をキャンセルした。ここで、酸性化がこれら免疫細胞に影響を与えているのではないかと考え、塩酸を用いて同様の実験を行った。塩酸は、BMDMのIL-23p19には影響を与えなかったが、ARG1の発現を増加させた。またDCAは、塩酸によって増加したARG1も抑制した。

DCA治療は、EG7移植マウスの腫瘍内乳酸濃度は低下させたが、B16移植マウスでは低下しなかった。しかし、それぞれの移植マウスにおいて、腫瘍浸潤免疫細胞のARG1の発現は、DCA治療によって低下していた。さらに、DCA治療は、脾細胞由来のCD8⁺T細胞、NK細胞のIFN- γ 産生能を上昇させ、Poly(I:C)によるIFN- γ 産生を増加させた。最後に、それぞれの移植マウスに対し、DCA治療および低容量Poly(I:C)による免疫治療を行ったときの、腫瘍の増殖を評価した。DCA治療単独では腫瘍の成長を抑制しなかったが、Poly(I:C)と併用することで、Poly(I:C)の成長抑制効果を増強させた。

【考察】

乳酸は、IL-23/IL-17経路を促進して炎症を誘導するだけでなく、マクロファージのARG1を誘導することで、腫瘍の進展を促進させていることが示唆された。さらに、DCAは、乳酸によって誘導されたIL-23/IL-17経路、ARG1の亢進を抑制することが明らかになった。興味深いことに、一時的に乳酸刺激を受けたマクロファージは、乳酸を取り除いた状態でもT細胞の増殖を抑制していた。これは、乳酸によって、マクロファージが、T細胞免疫を抑制する細胞へ変化することを示唆している。In vivoでもDCAはARG1の発現を抑制した。DCAによってARG1などの抗腫瘍免疫反応を抑制する作用が抑制されたために、Poly(I:C)による抗腫瘍免疫応答が効率よく誘導されたと考えられた。

DCAは二つの異なる経路で、乳酸によるこれらの現象を抑制していると考えられる。一つ目は、癌細胞に作用して癌周囲環境における乳酸濃度を下げることであり、二つ目は免疫細胞に直接作用することでARG1などの抑制性の遺伝子の発現を抑制することである。In vitroでは、DCAを加えたとき、上澄中の乳酸濃度が変化しないにも関わらずARG1などの発現が抑制されたこと、in vivoでは、DCAで乳酸濃度が低下しなかったB16でも腫瘍浸潤免疫細胞のARG1発現が低下したことから、DCAの作用は免疫細胞への直接作用がより重要な経路と考えられた。

塩酸の結果から、酸性化がARG1の発現を亢進させる因子であると考えられた。乳酸が癌周囲環境を酸性化している主な原因と考えられているので、やはり担癌状態におけるARG1の発現には、乳酸が重要な因子となっていることが示唆された。

【結論】

腫瘍から大量に分泌される乳酸は、IL-23/IL-17経路を促進することにより炎症を誘導するだけでなく、ARG1を促進することで抗腫瘍免疫を抑制する作用があることが明らかになった。DCAは、免疫細胞に直接作用することでこれらを抑制し、抗腫瘍免疫応答が起りやすい免疫状態に変化させていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 大橋敏充は、乳酸がArginase Iの発現を促進することで抗腫瘍免疫を抑制することを明らかにした。またDichloroacetateが、IL-23/IL-17経路を抑制、Arginase Iを抑制することで、抗腫瘍免疫応答を高めていることを明らかにした。この研究成果は、耳鼻咽喉科学ならび腫瘍免疫学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Toshimitsu Ohashi, Takashi Akazawa, Mitsuhiro Aoki, Bunya Kuze, Keisuke Mizuta, Yatsuji Ito and Norimitsu Inoue: Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity

International Journal of Cancer 133, 1107-18 (2013)