

氏名 (本籍)	安藤達也 (長野県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 1014 号
学位授与日付	平成 28 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	Co-stimulation of GalCer and TLR agonist induces tumor antigen-specific immune response and inhibits the tumor growth 1) Toll-like Receptor agonists and alpha-galactosylceramide synergistically enhance the production of interferon-gamma in murine splenocytes 2) Combination therapy with α -galactosylceramide and a Toll-like receptor agonist exerts an augmented suppressive effect on lung tumor metastasis in a mouse model
審査委員	(主査) 教授 前川 洋 一 (副査) 教授 長岡 仁 教授 大沢 匡毅

論文内容の要旨

α -galactosylceramide (GalCer) は natural killer T (NKT) 細胞を特異的に活性化する作用を持つことが知られている。GalCer によって活性化された NKT 細胞は Interferon (IFN)- γ や Interleukin (IL)-4 等のサイトカインを大量に産生することで免疫応答を刺激する働きを持つ。一方, Toll 様受容体 (TLR) は主に抗原提示細胞に発現しており, 病原体の菌体成分や DNA, RNA を特異的に認識することで宿主免疫反応を活性化させる役割を持っている。近年, 癌治療に対する免疫チェックポイント阻害剤の有効性が確認され, 癌治療に対する免疫療法の重要性が再認識されるようになった。従来より, GalCer による NKT 細胞の活性化または TLR 刺激による免疫応答の活性化作用を癌免疫療法に応用するための検討が行われており, それぞれ一定の効果が得られている。しかし, NKT 細胞と TLR を同時に活性化させた報告は少なく, 両者を刺激した際の免疫動態の解明には至っていない。そこで本研究では, GalCer を用いた NKT 細胞の活性化刺激と TLR アゴニストを用いた TLR 刺激を併用することによって生じる免疫応答について詳細な解析を行い, GalCer と TLR アゴニスト共刺激による抗腫瘍免疫療法への応用の可能性について検証を行った。

【対象と方法】

実験 1: C57BL/6 マウスから脾細胞を採取し, 培養を行った。培養液中に GalCer (100 ng/ml) を添加し, 細胞刺激を行った。その後 TLR アゴニストである Lipopolysaccharide (LPS, 0.01 or 1 μ g/ml), Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C), 1 μ g/ml), Imiquimod (IMQ, 0.3 μ g/ml), または CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODN, 0.3 μ g/ml) を培養液中に添加した。培養開始後から経時的に培養上清と培養細胞を回収し, 培養上清中の IFN- γ を ELISA 法により測定するとともに, 培養細胞から mRNA を抽出しリアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) 法によって各種サイトカインの mRNA 発現量の変化を検定した。また, フローサイトメトリーにより細胞内サイトカインや細胞表面マーカーの発現の変化を解析した。

実験 2: 8-12 週齢の雄の BALB/c マウスに C26 細胞 (マウス大腸癌細胞株) 1×10^5 個を経静脈的に接種することによって肺転移モデルを作製した。本モデルマウスを用いて, GalCer と TLR アゴニスト刺激による抗腫瘍免疫療法の有効性について検討を行った。腫瘍細胞接種から 5 日後に GalCer (1 μ g/マウス) を腹腔内投与し, その翌日に LPS (1 μ g/マウス) を経静脈内注射によって投与した。抗腫瘍効果の評価は, 肺転移結節数を肉眼的観察によって算定することによって行った。同時に, 所属

リンパ節（縦隔リンパ節）に存在する腫瘍抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の数を ELISPOT 法によって算出した。また、GalCer と TLR アゴニスト投与による免疫刺激効果を調べるために、肺組織および縦隔リンパ節に存在する T 細胞サブタイプの変化をフローサイトメトリーによって解析し、縦隔リンパ節中の細胞によって産生される各種サイトカインの mRNA 発現量の変化を qRT-PCR 法にて検定した。

【結果】

GalCer と各種 TLR アゴニストによる共刺激により IFN- γ の産生増強が確認された。IFN- γ の産生は特に CD8 陽性細胞で増加しており、この IFN- γ 産生は抗体により IL-12 を中和することで減弱した。また、GalCer と TLR アゴニストの共刺激により NF- κ B 経路の活性化の増強が確認された。

GalCer と TLR アゴニストを用いた免疫応答増強効果を抗腫瘍免疫療法へ利用すべく、マウス肺転移モデルを用いて検討したところ、肉眼的肺転移結節数が GalCer と LPS の併用療法により有意に減少した。また、所属リンパ節での腫瘍抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の検出を行ったところ、GalCer と LPS の併用療法により腫瘍抗原濃度依存的に IFN- γ 産生細胞数の増加が確認され、腫瘍抗原特異的な免疫応答の増強が確認できた。所属リンパ節細胞を用いたフローサイトメトリー解析や mRNA 解析より、GalCer と LPS の併用療法に伴う CD8 陽性細胞の増加が認められた。CD8 陽性細胞の増加には、ケモカインとその受容体の関与が示唆された。

【考察】

生化学的な解析により、GalCer と TLR アゴニストによる共刺激によって認められる IFN- γ 産生の相乗的な上昇には NF- κ B 経路の活性化の増強が関与していることが示唆された。IFN- γ は細菌・ウイルスなどの病原体や腫瘍細胞の排除に関与するため、GalCer と TLR アゴニストの共刺激は腫瘍に対しより強い抑制効果を示す可能性が想定された。

実際に、GalCer と TLR アゴニストである LPS を用いた抗腫瘍効果を検討したところ、著明な腫瘍結節数の減少が認められた。GalCer と TLR アゴニスト（LPS）共刺激による抗腫瘍効果の誘導は、IFN- γ 産生増加による腫瘍抗原特異的免疫応答の増強とケモカインによる所属リンパ節での CD8 陽性細胞の蓄積が要因であると考えられた。IFN- γ は腫瘍に対する化学療法や放射線療法においても治療効果の向上に関与するとの報告があるため、GalCer と TLR アゴニスト共刺激による癌免疫療法を併用することで、腫瘍に対しより効果的な治療が行えると予想される。また、共刺激による IFN- γ の増加は抗腫瘍免疫療法のみならず、感染症の予防や治療への応用も期待できる。

【結論】

GalCer と TLR アゴニストの共刺激は IFN- γ 産生の相乗的増加による抗腫瘍免疫応答の亢進作用を有するため、本法の応用により更に効果的な免疫療法の確立が期待できる。

論文審査の結果の要旨

申請者 安藤 達也は、natural killer T 細胞活性化と Toll 様受容体刺激を同時に作用させることで各々単独刺激に比べ IFN- γ 産生が増加し抗腫瘍効果が増強することを明らかにした。本研究の成果は免疫系の精緻な制御機構の一端を解明するとともに抗腫瘍免疫効果の向上に新たな知見をもたらすものであり、免疫学および腫瘍治療学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

1. Tatsuya Ando, Hiroyasu Ito, Hirofumi Ohtaki, Mitsuru Seishima: Toll-like Receptor agonists and alpha-galactosylceramide synergistically enhance the production of interferon-gamma in murine splenocytes
Scientific Reports 3, 2559 (2013). doi: 10.1038/srep02559
2. Tatsuya Ando, Hiroyasu Ito, Yuko Arioka, Hideyuki Ogiso, Mitsuru Seishima: Combination therapy with α -galactosylceramide and a Toll-like receptor agonist exerts an augmented suppressive effect on lung tumor metastasis in a mouse model
Oncology Reports 33, 826-832 (2015). doi: 10.3892/or.2014.3634