

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 大野 陽介

学位論文題名

Studies on functional regulation of human dendritic cells by IL-6/STAT3 signaling pathway and the effects of anti-tumor immunity in a tumor microenvironment

(IL-6/STAT3 シグナル経路によるヒト樹状細胞の機能制御と抗腫瘍免疫への影響に関する研究)

【背景と目的】 がん微小環境下での免疫抑制状態は、より効果的ながん免疫治療の開発において打破すべき主要な問題とされている。近年、抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体に代表される immune checkpoint therapy の有効性が、悪性黒色腫や腎細胞癌などの固形癌において報告されている。このことは、腫瘍内での T 細胞に対する抑制性シグナルを遮断することで、がん抗原特異的 T 細胞による抗腫瘍効果が認められることを示唆している。一般に、がん抗原特異的 T 細胞の誘導、十分な活性化には樹状細胞からの抗原提示が不可欠であり、従って樹状細胞の適切な機能制御は、よりよいがん免疫治療の開発に寄与すると考えられる。これまで、当研究室において、IL-6/STAT3 シグナル経路がマウス樹状細胞の抗原提示能を減弱させること、担がんマウスモデルにおいて抗 IL-6 受容体抗体を投与することで細胞傷害性 T 細胞の活性化を介し、腫瘍の形成を減弱することを報告してきた。当研究においては、ヒト樹状細胞における IL-6/STAT3 シグナル経路の作用を明らかにするとともに、より効果の高いがん免疫治療への応用の可能性について検討を行った。

【方法】健常人末梢血単核球(PBMC)より CD14 陽性細胞を単離し、IL-4 (50 ng/mL)および GM-CSF (50 ng/mL)存在下にて 7 日間培養することで、Monocyte-derived dendritic cells (MoDC)を誘導した。この際、培養開始 6 日目に IL-6 (50 ng/mL)を加えたものを IL-6 MoDC とした。健常人 PBMC より *in vitro* においてがん抗原特異的ヘルパーT(Th)細胞の誘導を行い、MoDC または IL-6 MoDC との抗原存在下での 24 時間共培養を行い、培養上清中のサイトカインを ELISA 法にて測定することで抗原提示能を比較した。

また健常人 PBMC より CD4 陽性 T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体(clone: OKT3, 2 µg/mL)存在下で MoDC または IL-6 MoDC と 24 時間共培養し、それらの T 細胞活性化能について培養上清中に産生されるサイトカインを ELISA 法にて測定することで評価した。また、ヒト樹状細胞の成熟における IL-6/STAT3 シグナル経路の影響を検討するために、健常人 PBMC 由来の接着性細胞を IL-6 処理した際の HLA クラス I、HLA クラス II、および共刺激分子などの表面分子の発現をフローサイトメトリーにて、遺伝子変化を定量的 PCR にて解析した。

最後に、書面による同意を得た大腸癌手術症例より腫瘍組織の一部と末梢血からそれぞれ CD11b および CD11c 陽性細胞を単離し、その表面分子の発現、遺伝子発現および T 細胞活性化能の比較を行うとともに、27 例において免疫組織学染色において HLA-DR 発現と CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞の浸潤の相関関係を確認した。

【結果】MAGE-A4、Survivin、STEAP の 3 種類のがん抗原特異的 Th 細胞において IL-6 MoDC を

抗原提示細胞として刺激した結果、抗原特異的な IFN- γ 産生の低下が認められた。この IFN- γ 産生誘導は HLA クラス II 依存的な反応であることから、IL-6 MoDC では HLA クラス II を介した Th 細胞への抗原提示能が低下していることが明らかとなった。また CD4 陽性 T 細胞と抗 CD3 抗体存在下での共培養においても IL-6 MoDC では IFN- γ の誘導および IL-12 産生量の低下が認められた。さらに本実験系において IL-12 中和抗体を添加すると IFN- γ の産生は、IL-6 の効果と同様に減弱することが確認された。

健常人 PBMC より得られた接着性細胞に IL-6 を添加し、3 日間培養することで CD11b⁺CD11c⁺細胞の HLA-DR および GD86 の発現が STAT3 依存的に減少した。また、アルギナーゼ 1(ARG1)、シクロオキシゲナーゼ 2(COX-2)、リソソームプロテアーゼの各種阻害剤を用いることで HLA-DR の発現低下が認められないこと、IL-6 を加えた 24 時間後には ARG1、COX-2、リソソームプロテアーゼのひとつである Cathepsin L(CTSL)の遺伝子レベルでの発現上昇が確認された。

大腸癌組織中の CD11b⁺CD11c⁺細胞においても末梢血中の CD11b⁺CD11c⁺細胞と比較して HLA-DR、CD86 の発現低下を認めるとともに ARG1、COX2、CTSL の遺伝子レベルの発現上昇が認められた。また、免疫組織学的染色において大腸癌組織内において腫瘍内に浸潤した免疫細胞および腫瘍関連繊維芽細胞が IL-6 を産生していること、腫瘍内免疫細胞の多くがリン酸化 STAT3 陽性であることを確認した。さらに腫瘍内免疫細胞の HLA-DR 発現は、CD4 および CD8 陽性 T 細胞の浸潤と相関していた。

【考察】これまで、大腸癌患者において血清 IL-6 値と病期および予後との相関、がんワクチン療法における有効性との相関が報告されている。本研究の結果から、IL-6/STAT3 シグナル経路はアルギナーゼ、COX-2、リソソームプロテアーゼの活性化を介して、ヒト樹状細胞の抗原提示能を低下させる作用があると考えられた。また IL-12 は抗腫瘍免疫に重要な Th1 型免疫応答を誘導するサイトカインであり、IL-12p35 欠損マウスにおける造腫瘍能の増悪が報告されている。従って、IL-6 によるヒト樹状細胞の IL-12 産生能低下は、がん患者における Th1 型免疫反応の誘導を抑制し、腫瘍細胞の免疫逃避を促進することが考えられる。また大腸癌において腫瘍内への T 細胞浸潤は予後良好な因子の一つと報告されている。HLA-DR の発現は T 細胞の浸潤と相関しており、腫瘍内への T 細胞浸潤とその活性化には、腫瘍内における抗原提示細胞の存在が重要であると考えられる。本研究の結果から、腫瘍内に浸潤したミエロイド系細胞は IL-6/STAT3 シグナルの影響を受け、抗原提示細胞としての機能的な成熟が抑制されることが示唆される。

近年、臨床試験において IL-6 に対する中和抗体を投与された B 細胞性リンパ腫、去勢抵抗性前立腺癌患者における認容性が認められている。また、抗 IL-6 中和抗体の投与により血清 CRP 値の低下、貧血の改善などの臨床効果が得られている。このことは、IL-6 が担がん生体における慢性炎症の形成に深く関わるのみならず、がん患者における免疫抑制状態の形成と関連していることが示唆される。以上より、標準がん治療に加え、がんワクチン治療を始めとしたがん免疫治療と IL-6 中和抗体、または抗 IL-6 受容体抗体を組み合わせることで、がん患者の免疫抑制状態を改善させることにより、更に効果的ながん治療法の開発が期待できると考える。

【結語】本研究において IL-6/STAT3 シグナル経路は、ヒト樹状細胞の抗原提示能および IL-12 の産生の減弱を介して、Th1 型抗腫瘍免疫反応の低下をひき起こすことが明らかとなった。以上より、IL-6/STAT3 シグナル経路の遮断による免疫抑制の改善は、より効果的ながん免疫治療を開発するための有望な標的の一つと考えられる。