

## 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 角田 健太郎

### 学位論文題名

#### **Studies on biological properties and immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment**

(がん微小環境におけるミエロイド由来抑制性細胞群の性状とその免疫抑制機能に関する研究)

【背景と目的】担がん生体内における免疫逃避機構には、制御性 T 細胞 (Regulatory T cell; Treg)、腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage; TAM) といった抗腫瘍免疫を抑制する作用を持つ細胞群の分化誘導が関係する。近年、様々な種類のがん患者や動物モデルにおいて、未熟ミエロイド細胞 (Immature myeloid cell; ImC) が血液、リンパ組織、骨髄、あるいは腫瘍局所で異常に増加していることが報告され、この細胞群は T 細胞免疫応答の抑制能を有するミエロイド由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells; MDSCs) として注目されている。従って、がん治療を行うにあたり、がん微小環境における MDSCs を介した免疫抑制状態の解除が非常に重要である。また、より優れた治療効果を得るには免疫抑制状態の解除に加えて、さらに MDSCs の免疫抑制機序を厳密に解明することも必要である。担がん生体内における MDSCs の制御法を開発することは、より効果的ながん免疫療法の確立へと繋がる非常に重要な課題であると言える。そこで、本研究では、がん微小環境における“MDSCs サブセットによる免疫抑制機構の解明”を目的とした。

【方法】BALB/c マウス皮内にメチルコラントレン誘発性 Carcinoma 細胞株を移植する生体がんモデルを作出し、腫瘍増殖に伴い脾臓および腫瘍内に分化・誘導される CD11b+Gr-1+細胞について、フローサイトメトリーによる解析および形態学的検討を行った。また、脾臓 ImC を腫瘍細胞培養上清存在下で培養し、免疫抑性能を T 細胞との共培養系により検証した。次に、本モデルマウスに MDSCs において生存や分化に必要なサイトカインの一つとして報告されている IL-6 のシグナル伝達経路を阻害する為に、抗 IL-6 受容体 (IL-6R) 抗体及び制がん剤であるゲムシタビンを投与し、脾臓および腫瘍内浸潤 CD11b+Gr-1+細胞、エフェクター T 細胞の解析、腫瘍増殖の評価を行った。同意文書の得られた健常人被験者より PBMC を回収し、IL-11 存在下で7日間培養を行い、誘導される各種ミエロイド系細胞群について HLA-DR などの細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーにより解析した。また、誘導されるミエロイド系細胞群について、その免疫抑制能を T 細胞との共培養にて検討を行った。さらに、この免疫抑制因子について遺伝子発現レベルを定量 PCR 法により評価した。最後に、ヒト大腸癌被験者の腫瘍組織における IL-11 およびリン酸化 STAT3 の発現を免疫組織染色法により解析した。

【結果】マウス皮内に腫瘍を移植すると、腫瘍増殖に伴い脾臓において CD11b+Gr-1+細胞の異常集積が認められた。この CD11b+Gr-1+細胞について解析した結果、CD11b+Gr-1<sup>high</sup> は分葉核を有する成熟好中球 (Neut<sub>seg</sub>-ImC)、CD11b+Gr-1<sup>mid</sup> は桿状核球 (Neut<sub>stab</sub>-ImC)、CD11b+Gr-1<sup>low</sup> は単球 (MΦ-ImC) であり、形態学的にも異なる細胞群であった。また、脾

臓 ImCs を腫瘍細胞培養上清存在下で培養した結果、脾臓 CD11b+Gr-1+細胞群の全てが T 細胞の活性化を抑制した。

次に、本マウス担がんモデルに抗 IL-6R 抗体およびゲムシタピンの投与を行った結果、それぞれの単剤投与群で、脾臓 CD11b+Gr-1+細胞が有意に減少した。さらに、脾臓 CD11b+Gr-1+細胞の中でも特に Neut<sub>stab</sub>-ImC と MΦ-ImC が選択的に除去された。また、腫瘍内浸潤 CD11b+Gr-1+細胞において、抗 IL-6R 抗体、ゲムシタピン投与によって、Neut<sub>seg</sub>-ImC、および MΦ-ImC の絶対数が減少した。また、抗 IL-6R 抗体およびゲムシタピンの単剤投与群において、腫瘍増殖が有意に抑制されるとともに、IFN-γ 産生 CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合が有意に増加した。

健常人 PBMC を、IL-11 存在下で 7 日間培養を行った結果、コントロール群に対して IL-11 を添加した群で優位に CD11b+CD14<sup>+</sup>ヒト単球系 MDSCs が増加した。また、この IL-11 にて誘導された単球系 MDSCs の HLA-DR の発現を精査したところ、HLA-DR の発現低下が認められた。この CD11b+CD14<sup>+</sup>ヒト単球系 MDSCs の免疫抑制能について T 細胞との共培養にて検討を行った結果、IL-11 を加えた群で強い免疫抑制能が認められた。また、その遺伝子発現を解析したところ、ARG1、iNOS、IL-10 などと言った免疫抑制因子の発現上昇が見られた。次に IL-11 で誘導される単球系 MDSCs の分子メカニズムを解析した結果、IL-11-STAT3 経路が MDSCs で活性化しており、STAT3 を阻害する事で MDSCs の誘導効率の減少が認められた。また大腸癌患者の腫瘍組織において、IL-11 およびリン酸化 STAT3 の発現が確認された。

【考察】本研究により、腫瘍内浸潤 MDSCs である MΦ-ImC、Neut<sub>seg</sub>-ImCs 細胞では免疫抑制性能が認められたものの、脾臓 ImC では MΦ-ImC 細胞のみが免疫抑制能を有し、Neut<sub>stab</sub>-ImC と Neut<sub>seg</sub>-ImC 細胞では免疫抑制を示さないことを見出した。また、脾臓 ImC を腫瘍細胞培養上清存在下で培養した結果、脾臓 ImC の全てが免疫抑制性能を獲得したことから、ImC には免疫抑制細胞とその前駆細胞が存在し、腫瘍内環境に曝されることによってより強い免疫抑制性能を獲得することが考えられた。さらに、抗 IL-6R 抗体及びゲムシタピン投与によって、担がん生体内の MDSCs を選択的に除去できることを見出し、CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化を介した抗腫瘍効果が誘導できることが示された。従って、これまで抗がん剤による抗腫瘍効果はがん細胞のみが標的と考えられ、免疫担当細胞の機能不全などの副作用は見逃されてきたが、抗 IL-6R 抗体、ゲムシタピンは脾臓 CD11b+Gr-1+細胞、腫瘍内浸潤 CD11b+Gr-1+細胞両方の生存あるいは増殖阻害に有効であると考えられた。近年、抗がん剤投与が TLR4 や inflammasome を介して免疫応答を賦活化するとの報告もあり、抗 IL-6R 抗体とゲムシタピンの併用治療による治療効果の増強には MDSCs 除去やがん細胞の殺傷の他に、本研究で見出した T 細胞免疫の賦活が関与している可能性も考えられる。また、CD11b+CD14<sup>+</sup>ヒト単球系 MDSCs において、IL-11-STAT3 経路は分化誘導に重要であり、これを制御する事でより効果的な免疫治療が可能であると考えられる。これらの結果は、抗がん剤等の化学療法と免疫療法の併用による、より効果的ながん治療の可能性を示唆するものであり、今後、より効果的な治療法の開発応用へと繋がると考えている。

【結語】本研究において、CD11b+Gr-1+細胞には免疫抑制細胞とその前駆細胞が存在し、腫瘍内環境に曝されることによってより強い免疫抑制性能を獲得することが明らかとなった。抗 IL-6R 抗体やゲムシタピンとがん免疫療法、さらには IL-11-STAT3 経路を阻害することによる MDSCs の制御により、がん治療における抗腫瘍効果の増強が期待される。