

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 丸山 晃

学位論文題名

TLR2 シグナルは MDSC の生存と抑制活性を増強する (TLR2 signal enhances survival and immune-suppressive activity of MDSCs)

【背景と目的】 健常個体には自己に対する免疫応答を制御する為、免疫抑制という機能が備わっている。制御性 T 細胞 (regulatory T cell : Treg) は免疫病を惹起する能力を持った自己反応性 T 細胞を抑制的に制御している細胞である。Treg は粘膜組織の免疫系の制御に深くかかわっている。腸内細菌の一部は Treg を誘導することで腸管内の免疫系を抑制的に制御しており、Treg の機能的異常が腸管における過剰な免疫応答を引き起こすことが報告されている。組織特異的な Treg 誘導機序を解明する事で、その組織における自己免疫寛容の機序の理解へと繋がると考えられる。そこで、本論文の第一章では、自己免疫寛容の機序が不明であった口腔における Treg 誘導機序の解明を目的とした。

一方で、「がん」は免疫抑制を利用している疾患の一種である。健常なヒトの生体には、病原性微生物を認識し排除する免疫監視機構と同じくがん細胞を認識し排除する免疫監視機構が存在する。しかし、がんの進行に伴い免疫監視機構では排除しきれないがん細胞が生じてくる。これらのがん細胞は免疫抑制細胞を誘導することで免疫機能を著しく低下させる。その結果、進行がん患者の生体内の免疫監視機構ではがん細胞を効率的に排除することが出来なくなる。骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell : MDSC) は、がんが誘導する免疫抑制細胞の一種であり、Arginase, iNOS (inducible nitric oxide synthase), 活性酸素種という三つの因子を介して T 細胞を強く抑制することが知られている。

がん細胞が免疫抑制を誘導することで免疫監視機構から逃れているならば、低下した免疫機能を人為的に活性化することで、がんを治療できる可能性がある。当研究室では、移植がんモデルマウスに対し、免疫賦活化剤 (アジュバント) を用いることで抗がん免疫応答を誘導する方法を模索している。TLR2/6 のリガンドである Pam2 リポペプチドの抗がんアジュバントとしての応用を試みている。Pam2 リポペプチドは、樹状細胞を起点として抗がん免疫を誘導できることが分かっている。一方で、MDSC も TLR2 を有しており、がん生体内における免疫抑制能の維持に TLR2 シグナルが重要であるという報告がある。Pam2 リポペプチドが TLR2 シグナルを介して MDSC の免疫抑制能を増強し、抗がん免疫誘導の足枷となる可能性がある。そこで、本論文の第二章では、Pam2 リポペプチドの一種である Pam2CSK4 が MDSC に与えている影響の解明を目的とした。

【材料と方法】 (第一章) マウスより取り出した頸部リンパ節 (cervical lymph node : CLN) 、腋窩部リンパ節 (axillary lymph node : ALN)、鼠径リンパ節 (inguinal lymph node : ILN)、腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node : MLN) における Treg の割合をフローサイトメトリーにより比較した。また、各リンパ組織特異的樹状細胞の遺伝子発現を定量 PCR 法により、割合と Treg 誘導能をフローサイトメトリーにより比較した。

(第二章) EG7 担がんマウスから MACS により単離した MDSC を Pam2CSK4 で刺激し、生存能の増強効果を WST-1 法により観察した。また、単離した MDSC を T 細胞、樹状細胞と共に共培養し、Pam2CSK4 刺激による T 細胞抑制効果の影響をフローサイトメトリーにより検証した。MDSC の Arginase, iNOS, 活性酸素種発現・産生についてはフローサイトメトリーおよび定量 PCR 法により観察した。

【結果】 (第一章) CLN, MLN における Treg の割合は ALN, ILN に比べて高いことが判明した。MLN が腸管の所属リンパ節であるのと同様に CLN は口腔の所属リンパ節であり、CLN から単離した樹状細胞は MLN から単離した樹状細胞と同様の高い Treg 誘導能を有していた。MLN では Treg 誘導能が高いと報告されている CD103⁺樹状細胞が多く存在していたが、CLN での CD103⁺樹状細胞の割合は ALN と有意な差がなかった。一方、CLN では ALN や MLN と比較して高い割合の CD8⁺DC が観察された。

(第二章) EG7 担がんマウスに Pam2CSK4 を投与することで、全身的な MDSC の増加が見られた。単離した MDSC に Pam2CSK4 を作用させることで細胞生存能の増強が観察された。また、MDSC を Pam2CSK4 で刺激する事によって MDSC の有する T 細胞抑制能の増強が観察された。Pam2CSK4 で刺激した MDSC では iNOS ならびに ROS の発現・産生が亢進しており、iNOS 阻害剤ならびに ROS scavenger の存在下では、Pam2CSK4 で増強される T 細胞抑制効果は打ち消された。さらに、Pam2CSK4 で刺激した MDSC の一部はマーカー分子の一つである Gr-1 の発現が低下する一方で、F4/80, CD115 の発現が上昇していた。

【考察】 (第一章) CLN, MLN における Treg の割合が高いことから組織特異的な Treg 誘導機序が存在すると考えられた。腸管での CD103⁺樹状細胞の報告から、口腔の所属リンパ節である CLN においても Treg 誘導能の高い組織特異的な樹状細胞が存在する事が予想された。実際に、CLN から単離した樹状細胞は高い Treg 誘導能を示したが、CLN と MLN では組織特異的な樹状細胞の構成や遺伝子発現は異なっており、CLN における Treg 誘導には MLN と異なる機序が存在する可能性が示唆された。

(第二章) EG7 担がんマウスに Pam2CSK4 を投与することで、全身的な MDSC の増加が見られた。実際に、単離した MDSC に Pam2CSK4 を作用させることで細胞生存が増強した。このことから、Pam2CSK4 には MDSC の生存を増強させる効果があると考えられた。さらに、MDSC の T 細胞抑制活性が増強した。Pam2CSK4 で刺激した MDSC では iNOS 発現ならびに ROS 産生が亢進しており、iNOS 阻害剤ならびに ROS scavenger の存在下では、Pam2CSK4 で増強される T 細胞抑制効果は打ち消された。Pam2CSK4 で刺激することで MDSC の iNOS ならびに ROS を介した T 細胞抑制機構が増強していると考えられた。さらに、Pam2CSK4 で刺激した MDSC の一部の集団は Gr-1 の発現低下に伴い、マクロファージに特徴的なマーカー分子である F4/80, CD115 の発現が上昇していた。MDSC が免疫抑制機能を有するマクロファージへ分化することでさらなる免疫抑制能を獲得するという報告もあり、MDSC の分化は T 細胞抑制活性の増強に影響を与える可能性がある。これらのことから、Pam2CSK4 は、樹状細胞を介した抗がん免疫を増強する一方で、MDSC の免疫抑制能を増強することで抗がん免疫を抑制する可能性が示唆された。

【結論】 口腔では腸管と異なる機序によって Treg 誘導が起こり、局所における免疫応答を制御している可能性がある。一方で、担がん生体においては、自然免疫シグナルが MDSC の生存・免疫抑制能を増強し、抗がん免疫応答を抑制している可能性がある。