

(別紙様式2号)

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

相田 紘一郎

専攻分野：腎泌尿器外科学

コース：

指導教授：力石 辰也

主論文の題目：

Suppression of Tregs by Anti-Glucocorticoid Induced TNF Receptor Antibody Enhances the Antitumor Immunity of Interferon- α Gene Therapy for Pancreatic Cancer

(抗グルココルチコイド誘導性腫瘍壊死因子受容体抗体による制御性T細胞の抑制は膵癌に対するIFN- α 遺伝子治療による抗腫瘍免疫を増強する)

共著者：

Reina Miyakawa, Koji Suzuki, Kenta Narumi, Takeshi Udagawa, Yuki Yamamoto, Tatsuya Chikaraishi, Teruhiko Yoshida, Kazunori Aoki

緒言

膵癌は化学療法による治療効果が乏しく、新規治療法の開発が望まれている。インターフェロン- α (IFN- α) は細胞死の誘導や免疫反応の増強などにより抗腫瘍効果を誘導することが、膵癌細胞を用いた様々な実験により報告されている。しかし、腫瘍が獲得している免疫寛容環境のために、免疫療法の効果は減弱されてしまうことが多い。そこで今回、制御性T細胞 (Treg) を抑制することで、腫瘍へのIFN- α 遺伝子導入による抗腫瘍効果を増強することができるかを検討した。

方法・対象

C57BL/6J マウス由来の腭癌細胞 (Pan02) を同系統マウスの両側下腿皮下に移植し担癌マウスモデルを作製した。単独治療群では、担癌マウスの右腫瘍へアデノウイルスベクターを用いて IFN- α 遺伝子を導入した。併用療法群では、担癌マウスに、Treg を抑制するとされる抗グルココルチコイド誘導性腫瘍壊死因子受容体抗体 (抗 GITR 抗体) を腹腔内投与し、さらに右腫瘍へ IFN- α 遺伝子を導入した。併用療法と、未治療、IFN- α 単独治療、抗 GITR 抗体単独投与の 4 群間で、経時的に腫瘍径を測定し抗腫瘍効果を比較した。

抗腫瘍免疫の評価として、Enzyme-Linked Immunospot アッセイにより各群マウスの脾細胞に含まれる IFN- γ 産生細胞数を測定した。続いて、担癌マウス作製後 24 日目に各治療群の腫瘍組織の免疫染色を行い、組織に浸潤する CD4、CD8、Foxp3 (Treg の核内転写因子) 陽性細胞数より免疫応答を評価した。次に、フローサイトメトリー (FCM) を用いて、担癌マウスの腫瘍と脾臓に浸潤する Treg 上の CCR5 (C-C ケモカインレセプター 5) の発現率を比較した。さらに、各群の脾細胞を採取し、Treg 上の CCR5 陽性率を同様に測定した。また *in vitro* において、培養脾細胞に抗 GITR 抗体を添加し、Treg (CD4⁺Foxp3⁺細胞) と non Treg (CD4⁺Foxp3⁻細胞) の CCR5 陽性率を FCM にて比較した。

統計学的解析には Student's t-test を用いた。本研究は、独立行政法人国立がん研究センター動物実験倫理委員会 (実験承認番号 A11M1-12 号) の承認を得たものであり、同動物実験指針に基づいて行われた。

結果

担癌マウスの腫瘍に IFN- α 遺伝子を導入することで、対象群に比較し、用量依存性に抗腫瘍効果を認めた ($p < 0.05$)。併用療法を行った群で

は、IFN- α および抗 GITR 抗体単独治療群に比較し、IFN- α 遺伝子を導入した右腫瘍のみならず($p=0.0026$, $p=0.00016$)、導入していない左腫瘍においても抗腫瘍効果が増強した($p=0.0044$, $p=0.00016$)。

併用療法群のマウス脾細胞中には単独治療群に比較して腫瘍反応性の IFN- γ 産生細胞が有意に増加していた($p<0.001$)。腫瘍組織の免疫染色から、併用療法群は IFN- α および抗 GITR 抗体単独治療群に比較して腫瘍への Treg の浸潤が抑制され、一方で CD4 および CD8 陽性細胞が増加していた。

腫瘍に浸潤する Treg は脾臓内に比較し CCR5 を高率に発現していた($p=0.0057$)。抗 GITR 抗体を投与したマウス脾臓内では CCR5 を発現している Treg は非投与群に比べ減少していた($P<0.05$)。培養脾細胞に抗 GITR 抗体を投与したところ、Treg では non-Treg に比較して有意に CCR5 発現率が減少していた($p=0.00023$)。

考察

抗 GITR 抗体投与と IFN- α 遺伝子導入を組み合わせる治療法が、腫瘍内の免疫寛容環境に与える影響を検討するため、Treg、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞に焦点をあて、治療による変化を解析した。併用療法群では、腫瘍内に浸潤する CD4⁺細胞や CD8⁺細胞が有意に増加していた一方、Treg は減少していた。これは腫瘍内の免疫状態のバランスが併用療法により抗腫瘍方向に傾いたことを示すと考えられた。本研究では、IFN- α を直接導入した腫瘍だけでなく、導入していない対側の腫瘍においても抗腫瘍効果の増強を認めたことから、併用療法の遠隔巣に対する治療効果も期待できる。抗 GITR 抗体が Treg を抑制するメカニズムとしては、CD4⁺CD25⁺ T 細胞が Treg に変換するのを抑止するという報告や、CD8⁺CD25^{high} T 細胞が腫瘍内に多く浸潤することで、Treg に必要な IL-2 をより多く消費するという報告がある。今回の研究から、抗 GITR 抗体が Treg の CCR5 の発現を低下させることが、腫瘍内に浸潤

する **Treg** の減少につながるという新規メカニズムを推察することができた。

結論

抗 **GITR** 抗体により **Treg** を抑制し、腫瘍内の免疫寛容環境を打破することで、**IFN- α** 遺伝子導入により誘導される抗腫瘍免疫を増強することができた。このような併用療法は、今後、膀胱癌を含めた多くの癌に対する有望な治療戦略として期待できる。