

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700894

研究課題名（和文）腫瘍内微小環境における骨髄由来免疫抑制細胞の制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment

研究代表者

脇田 大功（WAKITA DAIKO）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：30555404

研究成果の概要（和文）：効果的ながん免疫治療の開発のため、担癌生体内における免疫抑制性細胞である骨髄由来免疫抑制細胞（MDSCs）の制御機構に関する研究を実施した。MDSCsは腫瘍組織内微小環境に曝されることにより免疫抑制能を獲得することを見いだした。特に、IL-6がMDSCsの生存、増殖、機能に寄与しており、抗IL-6受容体抗体の投与によって、MDSCsが排除され、抗腫瘍T細胞免疫応答を介して腫瘍増殖が抑制できることを示した。

研究成果の概要（英文）：To develop effective cancer immunotherapy, we investigated the regulation mechanisms of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), a immunosuppressive cells in tumor-bearing host. We found that MDSCs obtained suppressive activity by exposing to tumor microenvironment. Blocking of IL-6 signaling by anti-IL-6 receptor monoclonal antibody eliminated MDSCs and inhibited tumor growth via anti-tumor T-cell responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：免疫抑制・MDSCs・IL-6・腫瘍内微小環境・マクロファージ・好中球

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍に対する免疫応答については多くの研究がなされ、生体にはがんの特異的に発現する抗原（がん抗原）を異物として認識し排除する「がんの免疫監視機構」が存在することが証明された。一方で、がんは免疫システムによる排除から逃れる「がん免疫逃避機構」によって異常な増殖を可能にしている。現行のがん抗原ペプチドを用いたがんワクチン療法の臨床研究では、当初期待されていた効

果はほとんど認められず、担がん生体内の免疫抑制機構の強さが浮き彫りとなった。したがって、真に有効ながん免疫療法の確立には、がんによるがんの生存、増殖に有益な免疫制御機構をより詳細に解明し、治療法開発へと応用することが不可欠であると言える。担がん生体内における免疫抑制機構において「制御性T細胞（Treg）」が注目を集めている。しかしながら、申請者らは、担がん動物モデルにてTregの除去のみでは腫瘍の完全治癒

は認められない結果を得ており、第2の免疫抑制細胞の存在を想定し、腫瘍組織、脾臓、末梢血や骨髄等の各臓器に異常に増殖するCD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞に着目した。CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞については、「骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell: MDSCs)」と呼ばれ、担がん生体内の免疫抑制機構に寄与していることが近年、報告されている。申請者らは、担がん生体の脾臓内 CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞において、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> F4/80<sup>+</sup> マクロファージのみが免疫抑制能を示し、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> 細胞は免疫抑制を示さないことを見出し、(Narita Y. and Wakita W. et al. 2009, 30:7-15.)、世界的に CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞は MDSC と総称されているが、機能的観点から検討した場合、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞が全て免疫抑制機能を持つ「MDSC」ではなく、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞内のサブポピュレーションにより、機能的差異が存在することを提唱した。

## 2. 研究の目的

がんの治療法開発にあたり、生体内に備わっている免疫システムを利用したがん免疫療法の臨床研究が進められているが、画期的な効果は得られていない。その最大の原因は、がん患者生体内の免疫抑制環境にあると考え、担がん生体において異常増殖する MDSCs に着目した。最近、申請者らは MDSCs と総称される細胞は形態学的に異なる多様な細胞群によって構成され、免疫抑制機能も異なることを見いだした。そこで、本研究では、腫瘍内微小環境による MDSCs への分化制御機構、および MDSCs の免疫抑制機構の全貌解明を目的に研究を展開し、最終的により効果的ながん免疫療法への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

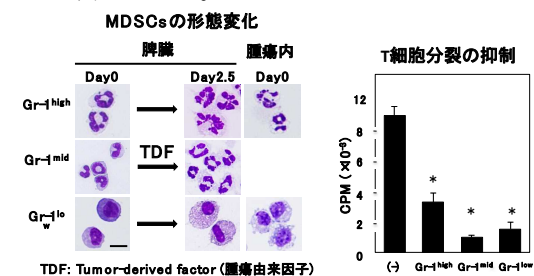
これまでの予備的研究成果により担がん生体の脾臓内 CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞は、形態学的に異なる3種類の細胞群に分類が可能であり、免疫抑制機能が異なる結果を得ている。一方で、腫瘍内 CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞は強い免疫抑制を示す。そこで、本研究課題では、CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 骨髄由来細胞の免疫抑制細胞 (MDSCs) への分化における腫瘍内微小環境の重要性に焦点を当て、in vitro の免疫抑制能の解析、細胞の形態変化を指標に、微小環境内の MDSC への分化制御因子、免疫抑制活性の機能分子の探索、同定を行い、in vivo による標的分子の評価系によって生理的機能を解明する。さらに、申請者らが確立しているがん治療マウスモデルによって、MDSCs の機能制御を介した新規がん免疫療法の効果を検証する。

## 4. 研究成果

(1) CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 細胞の MDSCs への分化機構に

関する研究

担癌マウス脾臓内で増殖する CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>low</sup>、Gr-1<sup>mid</sup>、Gr-1<sup>high</sup> 細胞はそれぞれ単球、桿状核球、分葉核球の形態学的特徴を示し、桿状核好中球 (Gr-1<sup>mid</sup>)、分葉核好中球 (Gr-1<sup>high</sup>) は免疫抑制能を示さず、単球 (Gr-1<sup>low</sup>) のみが MDSCs であることを複数の腫瘍細胞株を用いた実験系により確認した。また、腫瘍組織内の CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>high</sup> (分葉核球)、Gr-1<sup>low</sup> (単球) は共に強い免疫抑制能を示すことから、脾臓内好中球が腫瘍内微小環境の影響によって MDSCs へと分化する可能性を、in vitro 培養系にて検証した。担癌マウス脾臓より各 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 細胞を単離し、腫瘍細胞の培養上清存在化にて培養したところ、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>mid</sup> の桿状核球は分葉核球へと分化し、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>high</sup> の分葉核球は、過分葉核好中球の形態を示した。腫瘍組織内では桿状核球は存在せず、分葉核球のみが確認され、その大部分が過分葉核を呈することから、脾臓より浸潤した好中球が腫瘍内微小環境によって分化していることが示唆された。さらに、培養後の脾臓由来好中球を混合リンパ球培養系に添加し、免疫抑制能を評価したところ、非常に強力な免疫抑制活性を獲得していることが確認された。



脾臓のCD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>はTDFに曝され、腫瘍内のCD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>細胞の様に形態が変化するとともに、強い免疫抑制能を獲得する。

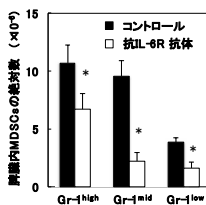
そこで、脾臓内、および腫瘍内の各 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 細胞をそれぞれ単離し、免疫抑制因子の発現を PCR にて検討した。脾臓内に比較し、腫瘍組織内では対応するサブセットにおいて Cox2, Arg1, iNOS の発現が強く認められ、腫瘍内因子により免疫抑制分子の発現が誘導されていることが示唆された。また、脾臓より単離した各 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> を腫瘍細胞の培養上清存在化にて培養したところ、腫瘍内の CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 細胞と同様に各免疫抑制因子の遺伝子発現が増加することを確認した。

(2) MDSCs の制御を介した新規がん免疫療法の確立

腫瘍内微小環境における IL-6 に着目し、IL-6 シグナルの阻害による骨髄由来未熟細胞の制御機構と抗腫瘍効果について検討した。抗 IL-6R 抗体によって IL-6 シグナルを阻害すると、脾臓内、腫瘍内両方において骨髄由来未熟細胞が著しく減少することを確認した。また、髓由来未熟細胞における免疫抑制因子の

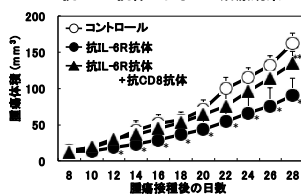
発現を検討したところ、抗 IL-6 受容体 (IL-6R) 抗体の投与によって Arg1 等の発現が低下することが示され、IL-6 が骨髄由来未熟細胞の数的、機能的制御に関与していることが示唆された。さらに、抗 IL-6R 抗体の継続的な投与によって腫瘍の増殖が有意に抑制される結果が得られた。このとき、コントロール抗体投与群に比べ、抗 IL-6R 抗体投与群において、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞の IFN- $\gamma$  産生が増加した。さらに、抗 IL-6R 抗体投与群において抗 CD8 抗体にて CTL を除去したところ抗 IL-6R 抗体による抗腫瘍効果が阻害された。これらの結果より、抗 IL-6R 抗体による免疫抑制性骨髄細胞の除去によって、T 細胞機能が回復し、抗腫瘍免疫が増強されたと考えられ、抗 IL-6R 抗体のがん治療への応用が期待される。

抗IL-6R抗体によるMDSCsの排除



抗IL-6R抗体の投与によって、担癌生体内のMDSCsが除去され、CD8<sup>+</sup>細胞依存的な抗腫瘍効果が認められた。

抗IL-6R抗体によるがん治療効果



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T. First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci*. 査読有 2012 Jan;103(1):150-3. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02106.x.
2. Kobayashi M, Ashino S, Shiohama Y, Wakita D, Kitamura H, Nishimura T. IFN- $\gamma$  elevates airway hyperresponsiveness via upregulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a severe asthma model. *Eur J Immunol*. 査読有 2012 Feb;42(2):393-402. doi: 10.1002/eji.201141845.
3. Tajima M\*, Wakita D\*, Satoh T, Kitamura H, Nishimura T. IL-17/IFN- $\gamma$  double producing CD8<sup>+</sup> T (Tc17/IFN- $\gamma$ ) cells: A novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *Int Immunol*. 査読有 2011 Dec;23(12):751-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039016> (\*equally contributed)
4. Takahashi D, Azuma H, Sakai H, Sou K, Wakita D, Abe H, Fujihara N, Horinouchi H, Nishimura T, Kobayashi K, Ikeda H. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有 2011 Apr;337(1):42-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212161>
5. Noguchi D, Wakita D, Ohkuri T, Tajima M, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Blockade of IL-6-signaling inhibits the pathogenesis of CD4(+) T cell-mediated lethal graft-versus-host reaction against minor histocompatibility antigen. *Immunol Lett*. 査読有 2011 May;136(2):146-55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256159>
6. Tanaka S, Koizumi SI, Masuko K, Makiuchi N, Aoyagi Y, Quivy E, Mitamura R, Kano T, Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Toll-like receptor-dependent IL-12 production by dendritic cells is required for activation of natural killer cell-mediated Type-1 immunity induced by *Chrysanthemum Coronarium* L. *Int Immunopharmacol*. 査読有 2011 Feb;11(2):226-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144920>
7. Tanaka S, Koizumi S, Makiuchi N, Aoyagi Y, Quivy E, Mitamura R, Kano T, Wakita D, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. The extract of Japanese soybean, Kurosengoku activates the production of IL-12 and IFN- $\gamma$  by DC or NK1.1(+) cells in a TLR4- and TLR2-dependent manner. *Cell Immunol*. 査読有 2011;266(2):135-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971456>
8. Ikeda U, Wakita D, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Iwakura Y, Nishimura T. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of Th17 cells. *Immunol Lett*. 査読有 2010 Nov 30;134(1):7-16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655952>
9. Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor via promoting angiogenesis. *Eur J Immunol*. 査読有 2010 Jul;40(7):1927-37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397>

10. 西村孝司、脇田大功：「腫瘍微小環境由来 TGF- $\beta$ によって誘導される腫瘍増殖促進免疫制御細胞群の性状とその克服によるがん免疫治療」臨床免疫・アレルギー科 56(1)：7-17, 2011. 7月号 査読無
  11. 西村孝司、脇田大功、富樫裕二、北村秀光：「がん特異的な細胞治療の現状」カレントセラピー 29(12)：61-66 (2011) 12月号 査読無
  12. 西村孝司、脇田大功、大栗敬幸、富樫裕二、北村秀光：「巷間で行われるリンパ球移入療法の問題点」. メジカルビュー社 月刊 Mebio Vol. 27, No. 12, 124-133, 2010年12月号 査読無
  13. 西村孝司、脇田大功、小林稔、北村秀光、芦野滋：「Th17細胞による気道過敏反応増強とその機序 Th1/Th細胞 依存的気道炎症との異同」臨床免疫・アレルギー科 54(6)：631-638. 査読無
  14. 池田詩子、但馬正樹、芦野 滋、脇田大功、北村秀光、西村孝司：「活性型ビタミンD<sub>3</sub>と all-trans レチノイン酸(ATRA)による Th17細胞の分化制御とその疾病治療への応用」臨床免疫・アレルギー科 53(3)：247-259, 2010. 査読無  
[学会発表] (計9件)
    1. 第7回北海道癌免疫制御研究会 「IL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞による発癌促進機構」 脇田大功 (シンポジウム) 2011.6.11 札幌パークホテル
    2. The Joint International Meeting of The 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Interferon and Cytokine Research, The 19<sup>th</sup> International Symposium of Macrophage Molecular and Cell Biology 2011. 「IL-17-producing  $\gamma\delta$ T cells induce genetically controlled chronic inflammation and promote carcinoma development in BALB/c mouse skin」 Daiko Wakita, Kentaro Sumida, Takayuki Satoh, Yoichiro Iwakura, Hiroyoshi Nishikawa, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura. 2011.5.25 全日空ゲートタワーホテル大阪
    3. 第15回日本がん免疫学会総会 「慢性炎症微小環境における IL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞制御機構とその発がんへの関与」 脇田大功、角田健太郎、佐藤崇之、寺田聖、西川博嘉、岩倉洋一郎、北村秀光、西村孝司 2011.7.1. 千里ライフサイエンスセンター
    4. 第70回日本癌学会学術総会 「Cancer-associated inflammation mediated by IL-17-producing  $\gamma\delta$ T cells and its genetic control (IL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞を介した炎症性発がん機構とその遺伝子支配)」 脇田大功、角田健太郎、佐藤崇之、寺田聖、西川博嘉、岩倉洋一郎、北村秀光、西村孝司 2011.10.3. 名古屋国際会議場
  5. 第40回日本免疫学会総会 「IL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞による慢性炎症の遺伝子支配と発がんへの関与/ Genetic control of chronic inflammation mediated by IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells during carcinogenesis」 脇田大功、角田健太郎、佐藤崇之、寺田聖、岩倉洋一郎、西川博嘉、北村秀光、西村孝司 2011.11.27. 幕張メッセ
  6. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology 「A crucial role for IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells as a major tumor-promoting T cells at tumor microenvironments」 D. Wakita, T. Nishimura 2010.8.27. 神戸国際会議場
  7. 第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 「IL-6依存的に異常増殖する担癌マウス immature myeloid cellsの制御と癌治療への応用」 脇田大功、角田健太郎、北村秀光、西村孝司 2010.6.25. 北九州国際会議場
  8. 第14回がん免疫学会総会 「発癌過程ほよび腫瘍増殖における IL-17産生細胞の意義とその遺伝子支配」 脇田大功、角田健太郎、佐藤崇之、久保田那月、西川博嘉、岩倉洋一郎、大栗敬幸、北村秀光、西村孝司 2010.7.23. KKRホテル熊本
  9. 第69回日本癌学会学術総会 「Genetic control of generation of IL-17-producing cells during carcinogenesis. (発癌過程における IL-17産生細胞制御の遺伝子支配)」 脇田大功、角田健太郎、佐藤崇之、久保田那月、西川博嘉、岩倉洋一郎、大栗敬幸、北村秀光、西村孝司 2010.9.22. リーガロイヤルホテル大阪/大阪国際会議場  
[図書] (計1件)
    1. 西村孝司、脇田大功、大栗敬幸、北村秀光：「ヘルパーT細胞を軸とした抗腫瘍免疫の制御：基盤研究から臨床応用まで」. シーエムシー出版 がん免疫療法-実用化へのチャレンジ」 p116-p128, 2010年9月
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.igm.hokudai.ac.jp/immreg/>
6. 研究組織
    - (1) 研究代表者  
脇田 大功 (WAKITA DAIKO)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：30555404

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :