

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 24 日現在

機関番号： 17401
 研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2010~2011
 課題番号： 22700897
 研究課題名 (和文) ミエロイド系抑制性細胞による T 細胞機能不全の発生機序の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of Myeloid-derived suppressor cell-induced functional defects of CD4⁺ T cells in tumor-bearing animals

研究代表者
 粟井 博文 (AWAI HIROTAKA)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
 研究者番号： 10433020

研究成果の概要 (和文)：がんを攻撃する免疫担当細胞である T 細胞を活性化することにより、がんを排除しようとする免疫療法は、副作用が少なく、長期的効果が期待されることから、有効な治療法として有望視されている。一方、がん患者では、がん細胞を攻撃する T 細胞がうまく機能しないことが、免疫療法の障壁となっている。本研究課題で我々は、T 細胞の活性化を抑制する細胞として注目されているミエロイド系抑制性細胞 (MDSC) の、T 細胞の機能的分化に対する影響を検討した。そして、MDSC が、腫瘍の増大を助ける炎症性サイトカイン、IL-6 の供給源であることを見出した。この MDSC が産生する IL-6 は、腫瘍を攻撃する上で重要な機能を果たすエフェクター T 細胞への分化を著しく阻害することを発見した。この結果は、新たな MDSC の抑制メカニズムを示唆するものであり、MDSC および IL-6 を標的としたがん免疫療法の効率化に、有用な情報を提供すると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Collaborative action between host-derived immune-suppressor cells and tumor cells abrogate the efficient T cell-mediated attack against the tumor cells. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) accumulated in most cancer patients are potent inhibitors of T cell-mediated anticancer immunity. While their inhibitory action on primary T cell activation was well established, their influence on secondary T cell responses or differentiation remains to be investigated. Here, we demonstrated that CD4⁺ T cell differentiation into effector Th1 cells were suppressed by systemic IL-6 trans-signaling in tumor bearing mice. Moreover, we found that we IL-6 was produced by Gr-1⁺MDSC in tumor bearing mice, which was consistent with the fact that the ability to produce IFN- γ was attenuated in effector T cells co-cultured with MDSC *in vitro* in an IL-6-dependent manner. Transfer experiments demonstrated that MDSC-sensitized effector CD4⁺ T cells were less potent to mount anti-tumor CD8⁺ T cell responses and to induce subsequent tumor regression. IL-6^{+/+} MDSC but not IL-6^{-/-} MDSC dampened the efficient induction of antigen-specific Th1 effector T cells in response to active immunization with antigenic peptide pulsed-DC *in vivo*, and counteracted CD4⁺ T cell-mediated anti-tumor immunity. These finding suggest that MDSC-derived IL-6 inhibited functional differentiation into anti-tumor effector CD4⁺ T cells in tumor-bearing mice. We provide the evidence for a novel mode of MDSC-mediated induction of effector CD4⁺ T cell tolerance in tumor-bearing animals, which should be considered for a rational design of effective T cell-mediated antitumor therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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、CD4⁺T 細胞、ミエロイド系抑制性細胞

1. 研究開始当初の背景

がんは日本での死因の第一位であり、がんに対する有効な治療法の開発は急務である。その治療法の一つである、がん特異的な免疫応答を活性化してがんの排除を促す免疫療法は、臨床試験で一部効果が認められ、今後さらなる開発が期待される。近年、腫瘍細胞を直接傷害するがん抗原特異的 CD8⁺T 細胞を担癌固体へ移入する養子移入療法に加え、他の免疫担当細胞 (CD8⁺T 細胞、マクロファージ NK 細胞など) の活性化を促進する能力を有する CD4⁺T 細胞の細胞移入療法も腫瘍排除に効果的であることが、マウスを用いた研究により示唆されている。このことから、効果的な抗腫瘍免疫を誘導する上で、腫瘍特異的 CD4⁺T 細胞は重要な役割を果たすと考えられる。

しかしながら、腫瘍を有する個体では、腫瘍に対する免疫応答を惹起する CD8⁺ および、CD4⁺ 細胞の機能不全が観察され、このことが腫瘍を排除できない原因の一つであると考えられる。この現象は、担癌固体での効果的な抗腫瘍免疫応答の誘導を妨げ、結果的にがんの増生の一因となると考えられ、これを改善することは効率的な抗腫瘍免疫応答を誘導する上で必須であると思われる。

一方、担癌個体ではミエロイド系抑制性細胞 (Myeloid-derived suppressor cells; MDSC) と呼ばれる細胞群が増加し、これにより CD8⁺ および CD4⁺ 細胞の活性化 (一次応答) が抑制されるという現象が報告されている。しかし、T 細胞のその後の運命、特に活性化後のエフェクター CD4⁺T 細胞の二次応答に対する MDSC の影響は不明であった。

2. 研究の目的

申請者は、CD4⁺T 細胞を介した抗腫瘍免疫応答を、マウスを用いたモデル実験により解析を行っている。そして、担癌固体において誘導される Gr-1⁺CD11b⁺MDSC が、一次応答後に誘導されるエフェクター CD4⁺T 細胞の機能的分化 (二次応答) に対して及ぼす影響を検討し、担癌個体における MDSC を介した免疫逃避機構を解明することを目的とした。MDSC の抑制メカニズムの解明は、担癌個体での免疫機能不全による抗腫瘍免疫の低下を是正するための治療および予防法の開発に資すると期待できる。

3. 研究の方法

申請者は、モデル腫瘍抗原として、OVA を発現する fibrosarcoma 細胞株 (MCA205) を樹立し、また、OVA を認識して活性化する CD4⁺T 細胞として、OT-II TCR トランスジェニックマウス由来の CD4⁺T 細胞を主に用いて、研究を行った。

- (1) 担癌固体において、抗 Gr-1 抗体により Gr-1⁺CD11b⁺MDSC を除去することにより、MDSC 存在下、あるいは非存在下で OVA ペプチドを負荷した DC によって、*in vivo* で OT-II CD4⁺T 細胞をプライミングした。その後、刺激を受けて分化したエフェクター CD4⁺T 細胞の IFN- γ の産生能を評価した。IFN- γ は抗腫瘍免疫を担う重要なサイトカインである。
- (2) CD4⁺T 細胞に対する直接的な効果を検討するため、*in vitro* においても、MDSC と CD4⁺T 細胞を共培養して、抗原刺激を与えて増殖したエフェクター CD4⁺T 細胞の Th1 サイトカインの産生能を検討した。その結果、MDSC は抗腫瘍効果を発揮する IFN- γ 産生性の Th1 細胞への機能的分化を抑制することが示唆された。その際に、MDSC が発現する CD8⁺T 細胞に対する制御因子である IL-10、NO、PD-L1 その他の因子について、Th1 分化抑制との関与を検討した。その結果、MDSC による Th1 分化抑制は炎症性サイトカインである IL-6 シグナルの抑制によって解除されることを見出した。
- (3) MDSC に感作されて分化したエフェクター T 細胞の抗腫瘍効果を検討するため、(2)と同様に、MDSC 存在下、あるいは非存在下で分化した OVA 特異的エフェクター CD4⁺T 細胞を作成し、モデル抗原である OVA 発現腫瘍を有する個体へ移入して、その後の腫瘍の増大を検討した。
- (4) 担癌個体において、実際に IL-6 の濃度の上昇がみられ、さらに MDSC が IL-6 を産生することを ELISA および、MDSC 細胞内サイトカイン染色により確認した。
- (5) MDSC 由来の IL-6 が、*in vivo* におけるエフェクター CD4⁺T 細胞の分化に及ぼす影響を検討するため、IL-6 欠損マウスよ

り MDSC を作成し、これを野生型マウスへ移入後、*in vivo*でのエフェクター CD4⁺T 細胞の分化、およびその後の抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

- (1) 担癌個体において、MDSC 存在下では、MDSC を除去した場合と比較して、DC によってプライミングを受けて分化したエフェクター CD4⁺T 細胞の IFN- γ の産生能が有意に減弱した。しかし、抗原刺激に伴う CD4⁺T 細胞の増幅は MDSC の影響を受けなかった。このことから、MDSC は IFN- γ 産生性の Th1 エフェクター CD4⁺T 細胞の分化を抑制することが示唆された。
- (2) *In vitro* で、CD4⁺T 細胞と MDSC を共培養しても、*in vivo* の検討(1)と同様、Th1 細胞への機能的分化は MDSC 存在下で抑制され、この現象は IL-6 依存的に誘導されることが見出された。また、IL-6 依存性 Th1 分化の抑制は、Th1 分化を促進するサイトカインである IFN- γ 、IL-12 の添加により、回復しなかった。さらに、樹状細胞ではなく、抗 CD3/CD28 抗体による刺激でも、Th1 分化は抑制されたことから、MDSC が抗原提示細胞の機能を制御して Th1 分化を抑制するという可能性が否定された。
- (3) *In vitro*、*in vivo* の検討により、実際に、IL-6 は MDSC により分泌され、CD4⁺T 細胞に作用するものと考えられた。
- (4) *In vivo* において、野生型 MDSC に感作されて分化したエフェクター CD4⁺T 細胞は、その後 MDSC 非存在下であっても、再刺激に対して、その IFN- γ 産生能および、抗腫瘍効果が有意に減弱していた。しかし、IL-6 を欠損する MDSC では、Th1 エフェクター CD4⁺T 細胞の分化抑制は起こらなかった。さらに、MDSC 由来の IL-6 を阻害することで、CD4⁺T 細胞による抗腫瘍効果の減弱は、ある程度回復した。

申請者は上記の結果により、がん患者、あるいはマウス担癌個体において観察される Th1 エフェクター CD4⁺T 細胞の分化抑制に、MDSC が深くかかわることを明らかにした。さらに本研究により、これまで考えられてきた T 細胞の一次応答の抑制効果に加えて、MDSC が IL-6 の産生を介して、抗腫瘍効果を示す Th1 エフェクター CD4⁺T 細胞への機能的分化を阻害するという、新たな抑制メカニズムを示唆した。その結果、担癌個体における IL-6

の阻害および、MDSC の除去は、T 細胞による効果的な抗腫瘍免疫療法の開発において解決すべき課題である”担癌個体における免疫抑制状態の是正”のための標的として有用な候補であると考えられた。MDSC が腫瘍特異的な CD4⁺T 細胞の機能的分化を不可逆的に抑制し、その結果、持続的な機能不全を誘導するという発見は国内外においても初めてであり、本研究課題におけるメカニズムの解明は、抗腫瘍免疫活性化の臨床的アプローチへの応用が期待できる発展性のある基盤研究である。申請者は現在、上記研究結果の論文発表の準備をしている。

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 1 件)

- ① Tsukamoto, H., Huston, G. E., Dibble, J., Duso, D. K. and Swain, S.
Bim dictates naïve CD4 T cell lifespan and the development of age-associated functional defects.
J. Immunol. 185, 4535-4544, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 塚本博丈、千住覚、西村泰治
タイトル: Gr-1⁺MDSC は腫瘍特異的 CD4⁺T 細胞の機能不全を誘導する
日本免疫学会総会・学術集会 (千葉、幕張メッセ) 2011、12 月 2 日
- ② Tsukamoto, H., Huston, G. E., Dibble, J., Duso, D. K. and Swain, S.
Title: Bim dictates the development of age-associated functional defects in naïve CD4 T cells by regulating their lifespan.
14th International Congress of Immunology, Kobe (International Exhibition Hall), Japan. August 25, 2010.

[図書] (計 1 件)

- ① 塚本博丈、西村泰治
炎症・免疫分野とノーベル賞、**炎症と免疫** (先端医学社) 18: 192-196、2010

6. 研究組織

(1)研究代表者

粟井（塚本） 博丈（AWAI HIROTAKE ）
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：10433020

(2)研究分担者

該当なし（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

該当なし（ ）

研究者番号：