

氏 名	藤 田 琢 也
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 0 3 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 9 月 9 日
学 位 論 文 題 目	Inhibition of Transforming Growth Factor- $\beta$ -Mediated Immunosuppression in Tumor-Draining Lymph Nodes Augments Antitumor Responses by Various Immunologic Cell Types  (腫瘍所属リンパ節における形質転換増殖因子ベータの機能阻害による 抗腫瘍免疫応答の増強効果)
審 査 委 員	主 査 教 授 杉 原 洋 行 副 査 教 授 谷 徹 副 査 教 授 藤 山 佳 秀

## 論文内容要旨

※整理番号	608	(ふりがな) 氏名	ふじた たくや 藤田 琢也
学位論文題目	Inhibition of Transforming Growth Factor- $\beta$ -Mediated Immunosuppression in Tumor-Draining Lymph Nodes Augments Antitumor Responses by Various Immunologic Cell Types (腫瘍所属リンパ節における形質転換増殖因子ベータの機能阻害による抗腫瘍免疫応答の増強効果)		
<p>【目的】 より有効な癌免疫治療法の開発のためには担癌患者の免疫学的特徴を理解することが重要である。腫瘍組織は様々な免疫抑制性分子を分泌するが、これらは抗腫瘍免疫応答を抑制し、癌細胞が生体の免疫監視機構から逃れる要因となっている。本研究では全身性の抗腫瘍免疫応答を誘導する上で最も重要な場所である腫瘍所属リンパ節に着目した。腫瘍組織で分泌される免疫抑制性サイトカインである形質転換増殖因子ベータ(Transforming growth factor-<math>\beta</math>, TGF-<math>\beta</math>)は腫瘍所属リンパ節に流入し、制御性 T 細胞の活性化やエフェクター T 細胞の抑制を誘導し抗腫瘍免疫応答を抑制している。そこで本研究の目的は腫瘍所属リンパ節での TGF-<math>\beta</math> の機能を阻害することで全身性の抗腫瘍免疫応答が増強するかどうか担癌マウスモデルで検討することである。</p> <p>【方法】 (1) 腫瘍所属リンパ節内での TGF-<math>\beta</math> の機能阻害 腫瘍所属リンパ節での TGF-<math>\beta</math> 機能を阻害するためにはプラスミドベクターシステムを利用した。TGF-<math>\beta</math> の 2 型受容体の膜外ドメイン (可溶性 TGF-<math>\beta</math> 受容体) の cDNA を組み込んだプラスミドベクター (TGFR DNA) を作成し C57BL/6 マウスの大腿部筋肉内に 5 日間隔で 2 回、接種した。最終接種の 5 日後に接種部位近傍の側腹部リンパ節を採取し蛍光顕微鏡で可溶性 TGF-<math>\beta</math> 受容体の発現の程度を観察し至適投与量を決定した。 担癌マウスモデルでは仮想癌抗原としてニワトリ卵白アルブミン・オブアルブミン(OVA)を用い、OVA 発現腫瘍細胞であるマウスリンパ腫細胞株 E.G7 を <math>2 \times 10^5</math> 個、6-7 週齢の C57BL/6 マウスの右側腹部に皮下移植した。5 日後、腫瘍の生着を確認した後に TGFR DNA を腫瘍近傍の大腿部筋肉内に投与した。対照群として可溶性 TGF-<math>\beta</math> 受容体の cDNA を含まないプラスミドベクター(Mock DNA)を投与する群とリン酸緩衝液(PBS)を投与する群を置いた。プラスミドベクターの投与は 5 日間隔で 2 回行い、最終投与の 5 日後に解析を行った。</p> <p>(2) 腫瘍所属リンパ節内における制御性 T 細胞の機能解析 上記担癌マウスの腫瘍所属リンパ節と腫瘍組織中の可溶性 TGF-<math>\beta</math> 受容体と TGF-<math>\beta</math> を ELISA 法で定量した。腫瘍所属リンパ節中の制御性 T 細胞(CD4 陽性 Foxp3 陽性細胞)の割合と増殖能(BrdUrd 染色)をフローサイトメトリーで解析した。また制御性 T 細胞の機能を混合リンパ球反応試験で評価した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。  
2. ※印の欄には記入しないこと。

### (3) 腫瘍所属リンパ節内におけるエフェクターT細胞の機能解析

上記担癌マウスの腫瘍所属リンパ節における腫瘍抗原特異的な CD4 陽性または CD8 陽性 T 細胞の機能は、リンパ節細胞を OVA の MHC クラス I または II 抗原ペプチドで刺激した後にインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )の細胞内染色を行いフローサイトメトリーで解析した。

### (4) TGFR DNA 投与による局所的な TGF- $\beta$ の機能阻害

両側側腹部に E.G7 を皮下移植した担癌マウスモデルで、片側の腫瘍近傍にのみ TGFR DNA を投与して、両側の腫瘍の所属リンパ節での TGF- $\beta$  量と制御性 T 細胞の増殖能、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の機能を評価した。

### (5) 全身性の抗腫瘍免疫応答の解析

(1)の担癌マウスより脾細胞を用いて全身性の抗腫瘍免疫応答の解析をした。脾細胞を OVA の MHC クラス I または II 抗原ペプチドで刺激した後に IFN- $\gamma$ の細胞内染色を行いフローサイトメトリーで解析した。E.G7 に対する細胞傷害性と Natural Killer(NK)細胞の活性をクロム遊離試験で評価した。血清中の腫瘍抗原に対する抗体価を ELISA 法で測定した。

### (6) 腫瘍増殖抑制効果の検討

(1)の担癌マウスで経過中、腫瘍径を測定し腫瘍増殖抑制効果を評価した。より増殖能の強いマウス肺癌細胞株 LLC1 を皮下移植した担癌マウスモデルでも腫瘍増殖抑制効果を評価した。さらにマウスメラノーマ細胞株 B16F10 の肺転移モデルで TGFR DNA の投与による肺転移の抑制効果を評価した。

#### 【結果】

(1) 担癌マウスで腫瘍組織近傍に TGFR DNA を投与することで腫瘍所属リンパ節に可溶性 TGF- $\beta$  受容体が高濃度で蓄積し TGF- $\beta$  の濃度が低下した。

(2) 腫瘍所属リンパ節での TGF- $\beta$  の機能阻害により制御性 T 細胞の割合が低下し増殖が抑制された。

(3) 腫瘍所属リンパ節での TGF- $\beta$  の機能阻害により腫瘍所属リンパ節で腫瘍抗原特異的に IFN- $\gamma$  を産生する CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞が増加した。

(4) 両側腹部に腫瘍細胞を皮下移植した担癌マウスでは、TGFR DNA を投与した側の腫瘍所属リンパ節で TGF- $\beta$  濃度が低下し制御性 T 細胞の増殖が抑制され抗原特異的に IFN- $\gamma$ を産生する CD8 陽性細胞が増加した。しかし TGFR DNA を投与していない側の腫瘍所属リンパ節ではこれらの反応は弱かった。

(5) 腫瘍所属リンパ節での TGF- $\beta$  の機能阻害により脾細胞で抗原特異的に IFN- $\gamma$ を産生する CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞が増加した。また標的細胞に対する細胞傷害能の増強、NK 活性の増強、血中の腫瘍抗原に対する抗体価の上昇が認められた。

(6) 腫瘍所属リンパ節での TGF- $\beta$  の機能阻害により 80%のマウスで E.G7 腫瘍は完全に消失した。LLC1 腫瘍においても腫瘍増殖は抑制され、B16F10 肺転移モデルの肺転移巣においても抗腫瘍効果が認められた。

#### 【考察】

腫瘍所属リンパ節における TGF- $\beta$  の機能阻害により同部位において抗腫瘍免疫応答が増強したが、これが多彩な免疫細胞の活性化に影響を与え全身性の抗腫瘍免疫応答の増強につながった。このことは、腫瘍所属リンパ節は全身性の抗腫瘍免疫応答の誘導に大きく関与している部位であることを裏付けている。

#### 【結論】

腫瘍所属リンパ節で TGF- $\beta$  の機能を阻害すると全身性の抗腫瘍免疫応答が増強した。本研究の結果は、担癌患者の免疫学的特徴を理解する上で重要であり抗癌治療法の開発に有用である。

### 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	608	氏名	藤田 琢也
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>より有効な癌免疫治療法を開発するため、本研究は免疫応答を誘導する上で最も重要な場所である腫瘍所属リンパ節に着目し、同部で TGF-<math>\beta</math> が抗腫瘍免疫を抑制していることから、所属リンパ節で TGF-<math>\beta</math> を中和することによる免疫抑制の解除を試み、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 担癌マウスで腫瘍組織近傍に、可溶性 TGF-<math>\beta</math> 受容体の cDNA を組み込んだプラスミドベクター (TGFR DNA) を投与することで、腫瘍所属リンパ節での TGF-<math>\beta</math> の濃度が低下した。</li><li>2. この TGF-<math>\beta</math> 阻害により腫瘍所属リンパ節での制御性 T 細胞の割合が低下し増殖が抑制され、エフェクター T 細胞による腫瘍抗原特異的な免疫応答が増強された。</li><li>3. 更に、全身性の腫瘍抗原特異的な抗腫瘍免疫応答や自然免疫が活性化された結果、対側の皮下腫瘍や肺転移巣においても抗腫瘍効果が認められた。</li></ol> <p>本論文は、担癌患者の免疫学的特徴について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(平成21年 8月31日)</p>			