15　がん免疫療法における補剤の活用に関する研究	早川　芳弘

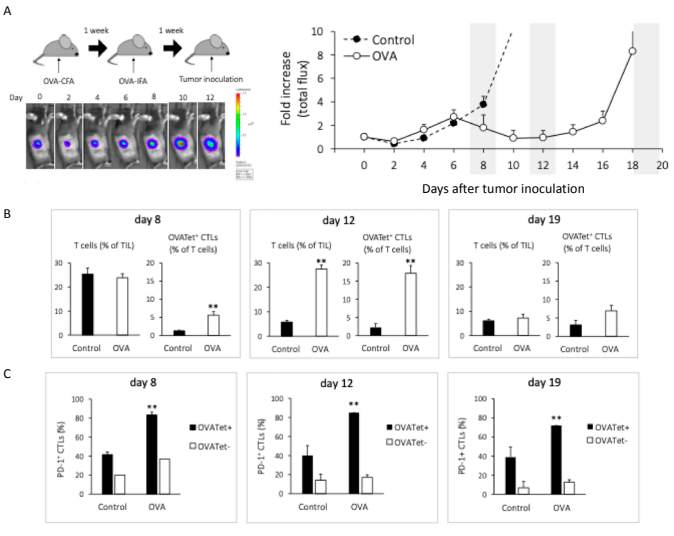
【目的】現在、臨床での免疫チェックポイント阻害剤の成功によってがん免疫療法に多くの注目が集まっているが、十分な薬効を得られずに未だその利益を受けられないがん患者がいることも事実であり、このようながん免疫療法への responder/non-responder の判別やバイオマーカー探索が大きな課題である。また、最近の研究成果からがん細胞はがん抗原の発現低下やがん抗原特異的 T 細胞疲弊の誘導によって免疫監視から逃避すること、化学療法や分子標的治療と同様にがん免疫治療に対する治療抵抗性を獲得することなど課題が明らかになりつつある。一方、このようながん細胞の免疫逃避メカニズムやがん免疫療法に対する抵抗性の獲得メカニズムは明らかでない。

本研究課題では、これらがん免疫療法に応答性を示さない患者背景には「がん虚」、つまりがん患者特有の身体症候が大きく関わると考え、有効ながん免疫治療のためには「がん虚」の理解によるがん細胞の免疫抵抗性獲得メカニズムの解除を目指した研究を行なった。また、がん細胞の免疫抵抗性獲得機構とがん微小環境における免疫機能の補助による抗腫瘍免疫応答の効果的な誘導法について理解することで、さらに漢方薬、特に補剤の有用性について探索を行なった。

【方法】B6 マウス由来 B16 メラノーマ細胞に ovalbumin（OVA）を強制発現させた B16OVA 細胞のルシフェラーゼ安定発現細胞株（B16OVA-Luc2）を取得して樹立した。OVA に対する抗原特異的免疫応答を OVA 抗原と complete Freund's adjuvant で誘導した C57BL/6J マウスに B16OVA-Luc2 細胞を移植し生物発光イメージングを用いてがん細胞の増殖をモニタリングした。腫瘍浸潤リンパ球の解析はフローサイトメトリーにより行った。

【結果】がん細胞増殖をルシフェラーゼ発光活性の *in vivo* イメージングにより測定することで、これまで肉眼的には評価不可能であった移植後のがん細胞増殖期（〜7 日目）、その後の排除期（8 日後）、平衡期（12 日後）、続く逃避期（19 日後）が検出可能であることを示した。この結果に基づく抗原特異的 T 細胞応答の経時解析の結果から、がん細胞の免疫逃避にはすでに指摘されている機能的な T 細胞疲弊ではなく、がん抗原特異的 T 細胞受容体の多様性の拡大によってがん細胞が T 細胞による免疫監視を逃避している可能性が示唆された。またがん細胞の免疫逃避期では $CD8^+$T 細胞でエフェクターT 細胞からメモリー細胞へと分化誘導させるために重要であることが示唆されている Eomes の発現減少が認められた。十全大補湯投与群は対照群と比較して、B16OVA-Luc2 の増殖を顕著に抑制したが、一方で腫瘍浸潤 T 細胞の CD4／CD8 T 細胞浸潤の割合、ならびに OVA 特異的 T 細胞浸潤の割合に大きな変化は認められなかった。これらの結果は少なくとも十全大補湯の投与による B16OVA-Luc2 に対する抗腫瘍効果は、がん抗原特異的な T 細胞の増加やヘルパーT 細胞の増加といった T 細胞性免疫応答を直接的に増強する機序ではなく、その他の制御性メカニズムを介した機序であることを示唆すると考えられる。

腫瘍内浸潤がん抗原特異的 T 細胞の経時的解析



15. がん免疫療法における補剤の活用に関する研究

早川　芳弘

富山大学 和漢医薬学総合研究所 病態生化学分野

Key words：がん，免疫療法，補剤，細胞傷害性 T 細胞

緒　言

免疫システムは、外来または内因性の病原・病因に対して免疫バランスを調節することで恒常性を維持するシステムであるが、このバランスが崩れることで様々な疾患に結びつくことが知られている。一方、漢方薬の特徴として、疾病や症状ごとの治療が目的ではなく、身体症候の全体を診ることでその原因を追求し、身体全体のバランスを整え回復させ、生体恒常性を維持するための治療を目的とすることが挙げられる。漢方薬の中でも特に補剤と呼ばれるカテゴリーに属する方剤は、漢方医学的に身体が「虚」した状態を「補う」効果があるとされ、免疫調節作用があることも知られている。実際に十全大補湯や補中益気湯といった補剤が免疫アジュバント（賦活）作用を示すことがこれまでに報告されている。一方、がん病態において、①免疫応答はがん微小環境で「疲弊（虚）」した状態に陥ること、②「虚」した微小環境に適応することで、がん細胞は免疫監視からの逃避メカニズムを備えていることが明らかになってきた。

現在、臨床での免疫チェックポイント阻害剤の成功によってがん免疫療法に多くの注目が集まっているが、十分な薬効を得られずに未だその利益を受けられないがん患者がいることも事実であり、このようながん免疫療法への responder/non-responder の判別やバイオマーカー探索が大きな課題である。また、最近の研究成果からがん細胞はがん抗原の発現低下やがん抗原特異的 T 細胞疲弊の誘導によって免疫監視から逃避すること［1］、化学療法や分子標的治療と同様にがん免疫治療に対する治療抵抗性を獲得すること［2］など課題が明らかになりつつある。一方、このようながん細胞の免疫逃避メカニズムやがん免疫療法に対する抵抗性の獲得メカニズムは明らかでない。

本研究課題では、これらがん免疫療法に応答性を示さない患者背景には「がん虚」、つまりがん患者特有の身体症候が大きく関わると考え、有効ながん免疫治療のためには「がん虚」の理解によるがん細胞の免疫抵抗性獲得メカニズムの解除を目指した研究を行なった。また、がん細胞の免疫抵抗性獲得機構とがん微小環境における免疫機能の補助による抗腫瘍免疫応答の効果的な誘導法について理解することで、さらに漢方薬、特に補剤の有用性について探索研究を行なった。

方　法

1.　ルシフェラーゼ安定発現がん細胞株の樹立

B6 マウス由来 B16 メラノーマ細胞に ovalbumin（OVA）を強制発現させた B16OVA 細胞のルシフェラーゼ安定発現細胞株（B16OVA-Luc2）は CMV プロモータールシフェラーゼレポーター発現ベクターpGL4.50[luc2/CMV/Hygro]（promega）を Lipofectamine2000（invitrogen）を用いて遺伝子導入し、ハイグロマイシン B による薬剤耐性遺伝子発現によるセレクションと限界希釈法によりシングルコロニーを取得して樹立した。

2. *in vivo*イメージングシステムによるがん細胞増殖過程のモニタリング

C57BL/6J マウスの右背部に 1×10^5/100 μL の B16OVA-Luc2 細胞を皮下移植した。OVA に対する抗原特異的免疫応答を誘導するために、腫瘍移植 2 週間前に OVA 抗原と complete Freund's adjuvant（CFA、Sigma）で免疫し、さらにその 1 週間後に OVA タンパクと incomplete Freund's adjuvant（IFA）で追加免疫した。移植初日より IVIS LUMINA Ⅱ（Caliper Life Sciences）にて細胞の発光活性を経時的に測定し、発光イメージを撮影した。担がんマウスには撮影 10 分前に 2 mg/mouse の D-Luciferin を腹腔内投与した。測定中はマウスに 2%イソフルランにより麻酔をかけ、体温維持のため、ステージは 37℃設定とした。取得したデータは Living Imaging Software にてデータ解析を行った。

3. Flow cytometry による解析

腫瘍浸潤リンパ球の解析のため、腫瘍組織を採取し、ハサミにて細切した後 1 mg/mL collagenase（Roche）および 0.1 mg/mL DNase Ⅰ（Roche）を含む無血清 RPMI1640（Nissui）中にて 37℃で 90 分インキュベーションを行った。さらに金網上にて組織片をすりつぶし濾過した後、PBS（Nissui）で 2 回洗浄し遠沈することで細胞サンプルを得た。フローサイトメトリーによる解析は、Fcγレセプターへの抗体の非特異的結合をブロックするため細胞サンプルと抗 CD16/32（2.4G2）をインキュベーションした後、各種蛍光標識抗体を用いて染色を行った。フローサイトメトリーによる解析は FACSCanto Ⅱ（BD Bioscience）にて行った。データ解析は Flowjo ソフトウェア（Tree Star）にて行った。

結果および考察

１．がん抗原特異的 T 細胞応答の経時解析

B16OVA-Luc2 細胞を同系 B6 マウス背部皮下に移植し、*in vivo* におけるがん細胞増殖をルシフェラーゼ発光活性の *in vivo* イメージングにより測定することで、これまで肉眼的には評価不可能であった移植後のがん細胞増殖期（～7 日目）、その後の排除期（8 日後）、平衡期（12 日後）、続く逃避期（19 日後）が検出可能であることを示した（図 1A）。

このイメージングで得られたデータをもとに、生体内での各免疫監視のフェーズにおける抗腫瘍エフェクター細胞の解析を Flow cytometry により行った（図 1B および C）。まず排除期（day 8）においては腫瘍内で OVA による免疫の有無にかかわらず早期の T 細胞浸潤が見られるが、抗原特異的な T 細胞の浸潤は OVA 免疫群で顕著であった（図 1B）。これらの傾向は平衡期（day 12）で最も顕著になり、一方で逃避期（day 19）では腫瘍浸潤 T 細胞の顕著な消失が認められた（図 1B）。またそれぞれの免疫監視フェーズで免疫チェクポイント分子としてがん抗原特異的 T 細胞応答を抑制的に制御していることが知られている PD-1 分子の発現を解析したところ、ステージにかかわらず高い発現が認められた（図 1C）。これらの結果に加え、T 細胞受容体レパトア解析の結果を考察すると、がん細胞の免疫逃避にはすでに指摘されている機能的な T 細胞疲弊ではなく、がん抗原特異的 T 細胞受容体の多様性の拡大によってがん細胞が T 細胞による免疫監視を逃避している可能性が示唆された。

2. がん免疫逃避期における抗原特異的 T 細胞分化の解析

次に抗腫瘍エフェクター細胞で重要であることが知られている転写因子 Eomes と T-bet の発現について［3］、がん細胞が免疫監視から逃避する過程における抗腫瘍エフェクター細胞での発現を解析した（図 2）。その結果、がん細胞の免疫逃避期（day 19）では平衡期（day 12）に比べて Eomes の発現減少が認められた。$CD8^+$T 細胞での Eomes の活性化はエフェクターT 細胞をメモリー細胞へと分化誘導させるために重要であることが示唆されている。今回得られた結果は、がん細胞の免疫監視からの逃避期にはエフェクター細胞がメモリー細胞への分化を起こすことで十分に腫瘍抑制的に機能できなくなっている可能性を示すのではないかと考察できる。

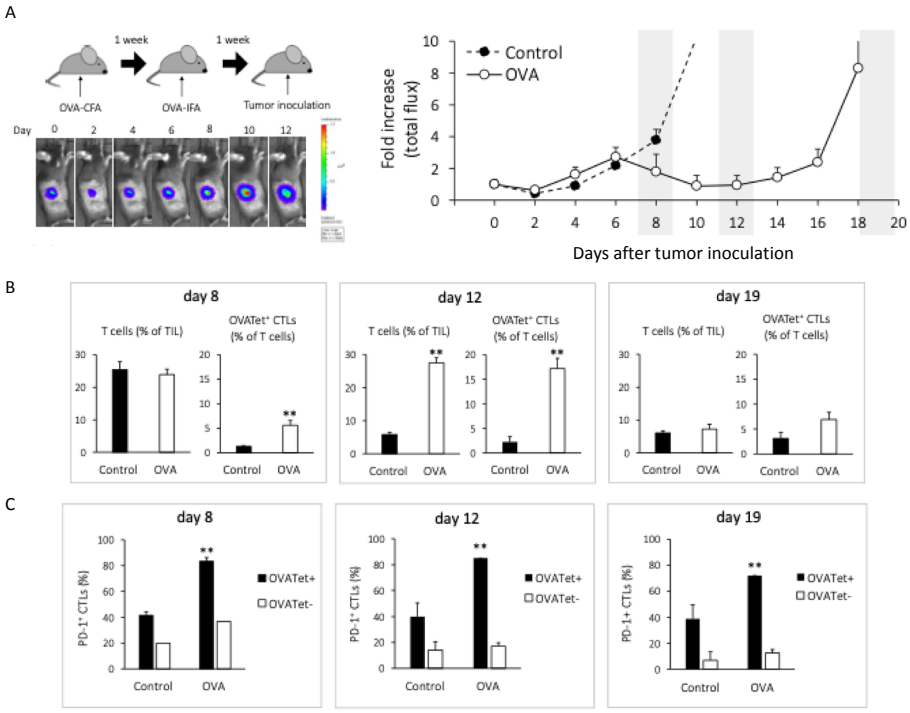


図 1. 腫瘍内浸潤がん抗原特異的 T 細胞の経時的解析

A) 生物発行イメージングによるがん抗原特異的免疫応答の経時モニタリング。

B) 各免疫監視フェーズにおける腫瘍浸潤 T 細胞の解析。

C) 各免疫監視フェーズにおける腫瘍浸潤 T 細胞の PD-1 発現解析。

** : $p < 0.01$, Student's t-test。

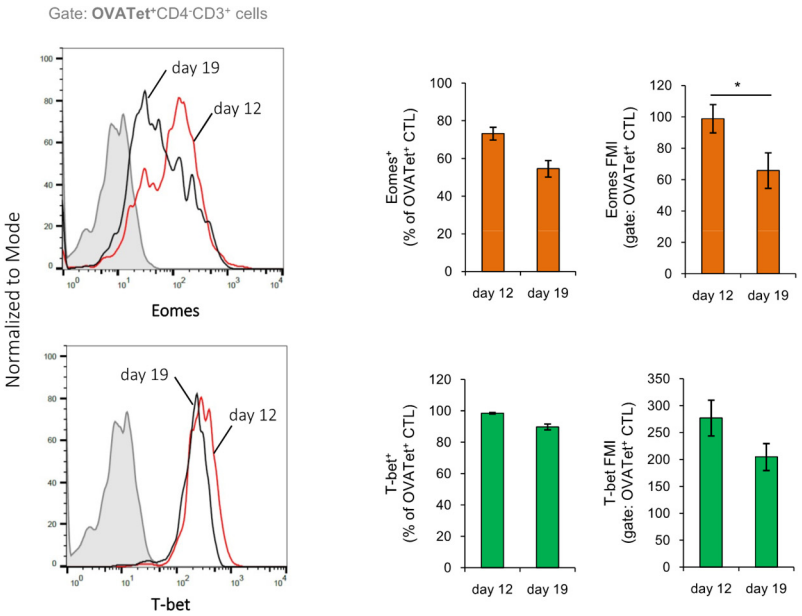


図 2. 腫瘍内浸潤がん抗原特異的 T 細胞の転写因子発現解析

腫瘍移植後12日（day 12）または19日後（day 19）におけるOVA特異的 $CD8^+$T細胞におけるEomes（上段）およびT-bet（下段）の発現解析。

* : $p < 0.05$、Student's t-test。

3. 補剤のがん抗原特異的免疫応答に及ぼす効果

以上の経時解析の結果をふまえ、次に補剤、とくに免疫賦活作用が期待される十全大補湯［4］のがん抗原特異的 T 細胞応答に及ぼす効果を検討した（図 3）。十全大補湯投与群（Juzentaihoto、1 mg/kg で腫瘍移植初日から連日経口投与）は対照群（Control）と比較して、B16OVA-Luc2 の増殖を顕著に抑制した。この時の腫瘍浸潤 T 細胞の解析では十全大補湯投与群と対照群で CD4／CD8 T 細胞浸潤の割合、ならびに OVA 特異的 T 細胞浸潤の割合に大きな変化は認められなかった。これらの結果は少なくとも十全大補湯の投与による B16OVA-Luc2 に対する抗腫瘍効果は、がん抗原特異的な T 細胞の増加やヘルパーT 細胞の増加といった T 細胞性免疫応答を直接的に増強する機序ではなく、その他の制御性メカニズムを介した機序であることを示唆すると考えられる。今後さらに補剤による抗腫瘍免疫応答の制御メカニズムを明らかにし、臨床での活用へと繋げたい。

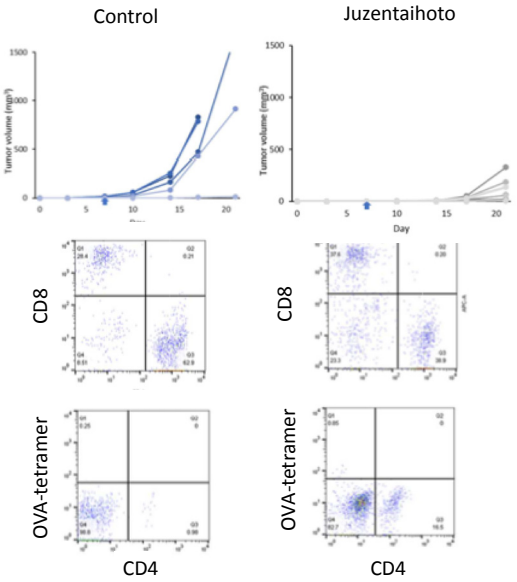


図 3. B16OVA-Luc2 に対する抗原特異的免疫応答における十全大補湯の効果
B16OVA-Luc2の増殖に対する十全大補湯の効果（上段）、腫瘍浸潤リンパ球中の CD4およびCD8 T細胞（中段）、OVA特異的$CD8^{+}$T細胞（下段）の解析。

文　献

1） Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. Clin Cancer Res. 2015; 21(4): 687–692. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1860.

2） Takeda K, Nakayama M, Hayakawa Y, Kojima Y, Ikeda H, Imai N, Ogasawara K, Okumura K, Thomas DM, Smyth MJ, IFN-γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. Nat Commun. 2017;8:14607. doi: 10.1038/ncomms14607.

3） McLane LM, Banerjee PP, Cosma GL, Makedonas G, Wherry EJ, Orange JS, Betts MR. Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations. J Immunol. 2013;190(7):3207-15. doi: 10.4049/jimmunol.1201556.

4） Ohnishi Y, Fujii H, Hayakawa Y, Sakukawa R, Yamaura T, Sakamoto T, Tsukada K, Fujimaki M, Nunome S, Komatsu Y, Saiki I. Oral administration of a Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. Jpn J Cancer Res. 1998;89(2):206-13. doi: 10.1111/j.1349-7006.1998.tb00550.x