

(書式12)

氏名	ふるだて さだのり 古館 禎騎
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成28年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学 専攻
学位論文題目	腫瘍随伴性マクロファージおよび循環血中の骨髄細胞を介したイミキモド外用による免疫制御効果の解明
論文審査委員	主査 教授 相場 節也 教授 岡田 克典 教授 田中 伸幸

## 論文内容要旨

イミキモド(imiquimod: IQM)はイミダゾキノリン系に属する免疫調節に関与する低分子化合物の1つであり、Toll-like receptor(TLR)-7を通して抗腫瘍効果を誘導する。TLR-7アゴニストであるIQMは腫瘍随伴性マクロファージ(tumor-associated macrophages: TAMs)などを含む自然免疫を賦活化する。TAMsは循環血中の骨髄細胞と共に様々な機序を通じて腫瘍環境の維持において重要な役割を担う。本研究で我々は、腫瘍環境におけるIQMの効果을明らかにする目的で、B16F10メラノーママウスモデルを用いて腫瘍の増生に対するイミキモドの免疫制御効果について検討した。

最初にIQM外用群が未治療群と比較して有意にB16F10メラノーマの増生が抑制されたことを確認した後、腫瘍部において産生されるケモカインに着目した。未治療群と比較してIQM治療群では、有意にTh2/Tregs関連ケモカインであるCCL17, CCL22のmRNAの発現量が低下した。一方、Th1関連ケモカインであるCXCL9, CXCL10, CXCL11に加え、IQMの抗腫瘍効果の誘導に関与するケモカインとして知られるCCL2のmRNA発現量は治療群と未治療群で有意差はみられなかった。また、IQM外用群から分離した腫瘍由来および脾臓由来のCD11b陽性細胞では未治療群と比較してCCL22の蛋白産生量が有意に減少していた。

次に、*in vivo*において脾臓由来のCD11b陽性細胞のB16F10メラノーマに対する抗腫瘍効果について検証した。B16F10メラノーマを未治療群マウスの脾臓由来CD11b陽性細胞とともに担癌した群では腫瘍の増生が促進した一方で、B16F10メラノーマをIQM治療群マウスの脾臓由来CD11b陽性細胞と担癌した群では腫瘍の増生が抑制された。さらに腫瘍部において、未治療群ではTregsのマスター遺伝子であるFoxp3の発現が有意に増加していたが、IQM治療群ではFoxp3の発現が有意に減少していた。

IQM治療マウスにおける脾臓由来のCD11b陽性細胞がB16F10メラノーマの増生を抑制することが確認できたため、さらに我々はこれらの細胞によるIQMの腫瘍抑制効果に関与する因子を検討した。その結果、脾臓由来のCD11b陽性細胞において、抗腫瘍免疫との関与が報告されているIFN- $\gamma$ の産生量はIQM治療群で有意に増加していた一方、腫瘍免疫を抑制するサイトカインとして報告されているIL-10の産生量はIQM治療群と未治療群で有意差はみられなかった。またIQM治療によるIFN- $\gamma$ の産生量増加と一致して、脾臓由来CD11b陽性細胞における細胞表面のFc $\gamma$ 受容体IIIa(CD16)およびPD-L1の発現量はIQM治療群において有意に増加した。

本研究においてIQM外用の治療効果は限定的であったため、さらに我々はIQM治療に加えて、免疫チェックポイント阻害薬である抗CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4)抗体および抗PD-L1(programmed death-ligand 1)抗体を併用すると抗腫瘍効果が増強するか検証

(書式12)

した。過去の文献より、抗CTLA-4抗体であるイピリムマブがTregsの細胞表面分子であるCTLA4に結合し、さらに末梢血中の非古典的単球 (non-classical monocytes) 上のCD16と結合することにより、抗体依存性細胞障害 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity:ADCC) を活性化させ、末梢血中のTregsを減少させることで抗腫瘍効果と関連することが報告されている。B16F10メラノーマモデルにおいて、IQM治療と抗CTLA-4抗体を併用した結果、各々の単独群と比較して有意に腫瘍の増生を抑制し、より強い抗腫瘍効果を示した。また、脾臓由来CD11b陽性細胞において、Tregsの誘導やその免疫抑制能の維持に必須であるPD-L1の発現量が増加した結果を受け、抗PD-L1抗体の併用についても抗CTLA-4抗体と同様に検証した。その結果、IQM治療と抗PD-L1抗体を併用した群では各々の単独群と比較して有意に腫瘍の増生を抑制し、より強い抗腫瘍効果を示した。

以上よりIQMによる抗腫瘍免疫反応がTAMsを介して誘導される可能性が示され、今後免疫チェックポイント阻害薬を用いたメラノーマの治療においてIQMはその治療効果を増強する可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 腫瘍随伴性マクロファージおよび循環血中の骨髄細胞を介したイミキモド外用による免疫制御効果の解明

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 皮膚科学 分野

学籍番号 B2MD5112 氏名 古館 禎騎

申請者はイミキモドが腫瘍随伴性マクロファージおよび骨髄細胞に及ぼす免疫学的影響について研究した。以下、その内容を要約する。

イミキモド (imiquimod: IQM) はイミダゾキノリン系に属する免疫調節に関与する低分子化合物の1つであり、Toll-like receptor (TLR)-7を通して抗腫瘍効果を誘導する。TLR-7アゴニストであるIQMは腫瘍随伴性マクロファージ (tumor-associated macrophages: TAMs) などを含む自然免疫を賦活化する。TAMsは循環血中の骨髄細胞と共に様々な機序を通じて腫瘍環境の維持において重要な役割を担う。本研究で我々は、腫瘍環境におけるIQMの効果を明らかにする目的で、B16F10メラノーママウスモデルを用いて腫瘍の増生に対するイミキモドの免疫制御効果について検討した。

最初にIQM外用群が未治療群と比較して有意にB16F10メラノーマの増生が抑制されたことを確認した後、腫瘍部において産生されるケモカインに着目した。未治療群と比較してIQM治療群では、有意にTh2/Tregs関連ケモカインであるCCL17, CCL22のmRNAの発現量が低下した。一方、Th1関連ケモカインであるCXCL9, CXCL10, CXCL11に加え、IQMの抗腫瘍効果の誘導に関与するケモカインとして知られるCCL2のmRNA発現量は治療群と未治療群で有意差はみられなかった。また、IQM外用群から分離した腫瘍由来および脾臓由来のCD11b陽性細胞では未治療群と比較してCCL22の蛋白産生量が有意に減少していた。

次に、*in vivo*において脾臓由来のCD11b陽性細胞のB16F10メラノーマに対する抗腫瘍効果について検証した。B16F10メラノーマを未治療群マウスの脾臓由来CD11b陽性細胞とともに担癌した群では腫瘍の増生が促進した一方で、B16F10メラノーマをIQM治療群マウスの脾臓由来CD11b陽性細胞と担癌した群では腫瘍の増生が抑制された。さらに腫瘍部において、未治療群ではTregsのマスター遺伝子であるFoxp3の発現が有意に増加していたが、IQM治療群ではFoxp3の発現が有意に減少していた。

IQM治療マウスにおける脾臓由来のCD11b陽性細胞がB16F10メラノーマの増生を抑制することが確認できたため、さらに我々はこれらの細胞によるIQMの腫瘍抑制効果に関与する因子を検討した。その結果、脾臓由来のCD11b陽性細胞において、抗腫瘍免疫との関与が報告されているIFN- $\gamma$ の産生量はIQM治療群で有意に増加していた一方、腫瘍免疫を抑制するサイトカインとして報告されているIL-10の産生量はIQM治療群と未治療群で有意差はみられなかった。またIQM治療によるIFN- $\gamma$ の産生量増加と一致して、脾臓由来CD11b陽性細胞における細胞表面のFc $\gamma$ 受容体IIIa (CD16)およびPD-L1の発現量はIQM治療群において有意に増加した。

本研究においてIQM外用の治療効果は限定的であったため、さらに我々はIQM治療に加えて、免疫チェックポイント阻害薬である抗CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4) 抗体および抗PD-L1 (programmed death-ligand 1) 抗体を併用すると抗腫瘍効果が増強するか検証した。過去の文献より、抗CTLA-4抗体であるイピリムマブがTregsの細胞表面分子であるCTLA4に結合し、さらに末梢血中の非古典的単球上のCD16と結合することにより、抗体依存性細胞障害 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) を活性化させ、末梢血中のTregsを減少させることで抗腫瘍効果と関連することが報告されている。B16F10メラノーマモデルにおいて、IQM治療と抗CTLA-4抗体を併用した結果、各々の単独群と比較して有意に腫瘍の増生を抑制し、より強い抗腫瘍効果を示した。また、脾臓由来CD11b陽性細胞において、Tregsの誘導やその免疫抑制能の維持に必須であるPD-L1の発現量が増加した結果を受け、抗PD-L1抗体の併用についても抗CTLA-4抗体と同様に検証した。その結果、IQM治療と抗PD-L1抗体を併用した群では各々の単独群と比較して有意に腫瘍の増生を抑制し、より強い抗腫瘍効果を示した。

以上よりIQMによる抗腫瘍免疫反応がTAMsを介して誘導される可能性が示され、今後免疫チェックポイント阻害薬を用いたメラノーマの治療においてIQMはその治療効果を増強する可能性が示唆された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。