

シニア・リサーチフェロー  
研究成果報告書

平成28年 3月30日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 高山 昭三 殿

報告者氏名： 鳴海 兼太



研究課題：化学療法治療抵抗性の要因となる骨髄由来抑制細胞を  
標的とした、新規治療法の基礎的開発研究

研究期間： 自 平成27年 7月 1日

至 平成28年 3月31日

研究指導者：氏名 青木 一 教



公益財団法人 がん研究振興財団

## (1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

### 【要旨】

近年、胃がん、大腸がんの標準的化学療法症例においても、腫瘍免疫反応が誘導されることが腫瘍縮小効果や予後と相関していることが明らかとなってきた。また、我々は化学療法抵抗性を示した胃がん、大腸がん患者の末梢血中やがん組織中の免疫細胞と化学療法の奏功性や予後との関連を検討したところ、多くの免疫細胞の中でも、唯一、骨髄由来免疫抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells: MDSC)が予後不良因子であることを見出した。さらに動物実験において、MDSC 除去と化学療法薬(5-FU)を組み合わせると、相乗的に抗腫瘍効果を発揮できることを明らかとし、この MDSC が腫瘍細胞特異的 T 細胞や NK 細胞の機能抑制を介して抗腫瘍免疫反応を減弱させている可能性を示した。これらの結果は、MDSC が従来の化学療法の抵抗性の一因になっていること、また MDSC を除去することにより、化学療法抵抗性を解除できる可能性があることを示唆する。MDSC 阻害薬開発のための標的分子を同定し、MDSC 阻害薬と化学療法を併用する化学免疫療法の基礎開発を行うことを本研究の目的とした。

MDSC の免疫生物学や阻害剤の探索を行うためには、大量の MDSC が必要だが、患者の末梢血から得られる MDSC の数は少ない。そこで、健常人の末梢血中単核細胞よりサイトカイン (GM-CSF および IL-6) を用いて MDSC を誘導し、免疫関連遺伝子発現を nCounter により測定した。その結果、誘導 MDSC には CCL17 や IDO-1 など、Regulatory T cell (Treg) の腫瘍内への浸潤および Treg の活性化に関連する遺伝子の発現が上昇していることが分かった。また、誘導した MDSC では Chemokine receptor である CCR4 / CCR7 / CXCR3 / CXCR4 / CXCR6 の発現が上昇しており、これらが MDSC の腫瘍内への浸潤に関与するメカニズムについてさらに検討を進める。

次に、この誘導 MDSC が腫瘍内に浸潤する機序を明らかとするため、がん関連線維芽細胞に対する細胞運動能を Transwell migration assay により検討したところ、誘導 MDSC 細胞はがん関連線維芽細胞 (1128PMCAF) に対して強い走化作用を有することが分かった。同様に p53 の発現が低下した線維芽細胞 (TIG-7-shp53) に対しても走化作用を発揮することから、がん関連線維芽細胞によく見られる p53 の発現低下が MDSC の腫瘍内への浸潤に関与している可能性が示された。

さらに、TIG-7 および 1128PM 細胞を用いて、がん関連線維芽細胞により産生される Cytokine / Chemokine を網羅的に検索したところ、特に IL-8 が p53 の発現が低下した線維芽細胞に、より強く発現していることが分かった。

これらの結果より、MDSC ががん関連線維芽細胞から産生される IL-8 などの Cytokine により腫瘍の中に誘導され、腫瘍内に浸潤した MDSC は CCL17 や IDO-1 を介して、さらに腫瘍内への Treg の浸潤・活性化に関与しているという機序が推測された。これらホーミングに関連する分子を、MDSC 阻害薬の標的の候補として今後研究を継続する。

## 【序】

近年、抗がん剤や分子標的薬による腫瘍免疫誘導が、化学療法の抗腫瘍効果発揮に重大な役割を果たしていることが明らかとなり、「化学免疫療法」という治療概念が登場してきた<sup>1</sup>。しかし、担がん宿主には抗腫瘍免疫誘導を抑制する分子・細胞因子が存在するために、治療抵抗例や耐性獲得例が出現する。現在、これらを回避する治療法の開発が求められている。

先行研究として、胃がん、大腸がん化学療法症例において、実際に腫瘍免疫反応が誘導されることが腫瘍縮小効果や予後と相関していることを示してきた。また、化学療法抵抗性を示した胃がん、大腸がん患者の末梢血中やがん組織中の免疫細胞と化学療法の奏功性や予後との関連を検討したところ、多くの免疫細胞の中でも、唯一、骨髄由来免疫抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells: MDSC)が特徴的に予後不良と相関していることを見出した(未発表データ)。そこで、動物実験において、MDSC 除去と化学療法薬(5-FU)を組み合わせると、相乗的に抗腫瘍効果を発揮できることが示され、この MDSC が腫瘍細胞特異的 T 細胞や NK 細胞の機能抑制を介して抗腫瘍免疫反応を減弱させていることを確認した(未発表データ)。これらの結果から、MDSC が従来の化学療法の抵抗性の一因になっていること、また MDSC を除去することにより、化学療法抵抗性を解除できる可能性があることが示唆される。

MDSC は担がん状態に伴う異常造血が原因として産生されると考えられているが、その詳細な機序については不明な点が多い。MDSC は免疫抑制活性を有する骨髄球系の未熟な細胞と認識される不均質な細胞集団とされ、形質の違いから、顆粒球様 (PMN-MDSC : CD14<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>)・単球様 (M-MDSC : CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low</sup>) と定義される。しかし、これらのマーカーでは MDSC と好中球を正確に鑑別することは困難であり、特に病理学的診断を考えた場合、免疫染色により MDSC と診断できる良いマーカーがないことが、MDSC 研究の支障となっている。そのため、MDSC の簡便な同定方法の開発はコンパニオン診断として重要な要素である。

本研究では、健常人の末梢血中単核細胞より MDSC を誘導し、この誘導した MDSC の特徴を解析することで、MDSC 阻害薬の標的分子を同定し、MDSC 阻害薬と化学療法による化学免疫療法の基礎開発を行うことを目的とする。その過程において、MDSC をより簡便に同定するための特異的なマーカーの探索を行う。

## 【実験方法】

### 健常人の末梢血中単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMC) からの MDSC 誘導

健常人よりヘパリン採血により末梢血を採取し、リンホセパール I を用いて PBMC を分離した。T25 フラスコ (Sigma-Aldrich) 内に  $5 \times 10^5$  cells/ml に調整した PBMC を 5ml ずつ加え、さらに IL-6 10ng/ml、GM-CSF 10ng/ml (Peprotech) のサイトカインを添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で 7 日間培養を行った。培地には RPMI+10%FBS を用いた。また培地とサイトカインは 2-3 日に 1 回、新しいものに取り換えた。誘導後浮遊細胞を回収したのち、フラスコに張り付いた細胞を Detachin (Genlantis) を用いて剥離し、分離前誘導細胞とした。これを EasySep Human CD33 Positive Selection Kit (StemCell) を用いて CD33 陽性細胞を分離し、誘導 MDSC とした。コントロールとしてサイトカインを添加せずに 7 日間培養したものをを用いた<sup>2</sup>。

### May-Giemsa 染色による血球系細胞の染色

誘導した MDSC (CD33 陽性細胞分離後) をスライドガラス上にスメアを引き、以下の要領でギムザ染色を行った。スライドガラスを乾燥後、メタノールで 5 分間固定し、自然乾燥させた。その後、ギムザ染色液 (Merck) 原液を PBS(-) で 10 倍に希釈した溶液で 1 時間染色を行った。流水水洗の後、風乾させ、油浸対物レンズ (×100) を用いて細胞を顕微鏡下で観察した。

## CFSE 希釈法を用いた *in vitro* T 細胞増殖アッセイ

T 細胞は健康人 PBMC から CD3 Microbeads (Miltenyi Biotec) を用いて分離し、T 細胞を Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit (Life technologies) を用いて染色した。具体的には、T 細胞を  $10^6$  cells/ml の濃度で PBS(-)にて調整し、CFSE stock solution を  $5\mu\text{M}$  となるように添加した。8 分間静置の後、RPMI+10%FBS にて 2 回洗浄した。

24well plate に T cell  $5 \times 10^5$ 、誘導 MDSC  $2.5 \times 10^5$ 、 $1.25 \times 10^5$ 、 $6.25 \times 10^4$  (各 T cell:MDSC 比 2:1、4:1、8:1) を混ぜ、抗ヒト CD3 抗体 (OKT3; Affymetrix) 1ng/well、IL-2 (Peprotech) 20 U/ml を添加した。4 日後、細胞を回収し、CFSE の希釈をフローサイトメーターで確認した。1 回以上分裂した細胞を「分裂細胞」と定義した。

## 誘導 MDSC において発現する免疫関連遺伝子の網羅的解析

健康人の末梢血中 PBMC から誘導した MDSC を Isogen (ニッポンジーン) に溶解し、全 RNA を抽出した。この RNA を nCounter PanCancer Immune Profiling Kit (nanoString) を用いて、誘導 MDSC において発現する免疫関連遺伝子 730 個を網羅的に解析した。

測定は同社より提供されたプロトコールに則って行った。具体的には、Sample RNA 50ng に Hybridization Buffer, Reporter Code Set, Capture Probe Set を添加し、 $65^\circ\text{C}$ にて一晩ハイブリダイゼーションを行った。これをストレプトアビシンで表面コートされたカートリッジにハイブリダイゼーションさせ、レポーターバーコードを固定化させた後に、専用の nCounter Digital Analyzer を用いてカウントすることで発現遺伝子を定量化した (Figure 1)。

## Cancer associated fibroblast を用いた Transwell migration assay による細胞遊走能の評価

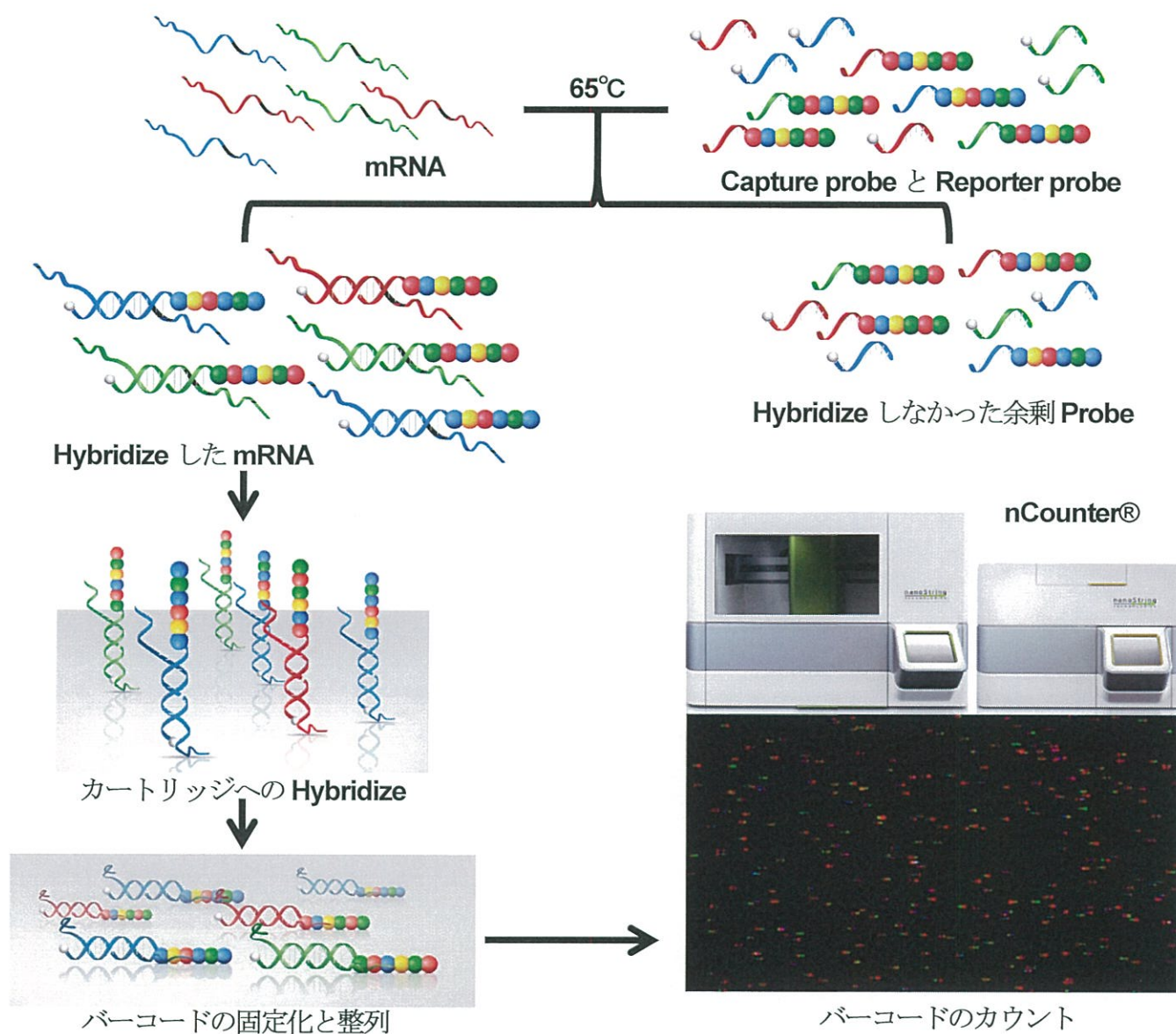
ヒト正常胎児肺由来線維芽細胞 (TIG-7) と、TIG-7 に Lentivirus vector により shp53 を遺伝子導入して p53 を knockdown した細胞 (TIG-7-shp53) は、国立がん研究センター難治進行がん研究分野の江成政人先生、大友亮先生より分与して頂いた。また、ヒト肺腺癌由来のがん関連線維芽細胞 (1128PMCAF) および同一患者の正常肺由来線維芽細胞 (1128PMNF) は、国立がん研究センター東病院臨床腫瘍病理分野石井源一郎先生が樹立したものを分与して頂いた。TIG-7 および TIG-7-shp53 は DMEM+10%FBS の培地にて、1128PMNF/CAF は  $\alpha$ -MEM+10%FBS の培地にて培養を行った。また、TIG-7-shp53 および 1128PMCAF において p53 の発現が減少していることは、Western blot により確認されている。

細胞遊走能を評価するため、24well plate に  $1-2 \times 10^5/800\mu\text{l}$  medium の線維芽細胞を入れ、その上層にチャンバーとして Pore size  $5\mu\text{m}$  のケモタキセルチャンバー (倉敷紡績株式会社) をセットし、 $5 \times 10^4/300\mu\text{l}$  medium の誘導 MDSC 細胞を加えた。培地は FBS 中の走化因子の影響を除外するため、RPMI+1% BSA とした。1 時間の培養後、チャンバーを取り出し、チャンバーを透過した細胞を固定染色液 (0.5%Crystal violet, 12% Formaldehyde, 10% Ethanol) に 15 分浸漬した後、顕微鏡で観察した。10x10 倍視野あたりの透過細胞数を計 5 視野計測した。

## Human Cytokine Antibody Array

ヒトの培養上清中のサイトカイン・ケモカインは、C-Series Human Cytokine Antibody Array C5 (RayBio) を用いて解析した。線維芽細胞 (TIG-7 / TIG-7-shp53 および 1128PMNF / 1128PMCAF) を 24 well plate に  $1 \times 10^5/\text{well}$  ずつ播き、細胞がディッシュに張り付いたことを確認した後に培地を RPMI + 2%BSA に変更し、さらに 48 時間培養した。Array membrane をブロッキングした後、不純物を除いた培養上清を 1ml 添加して Array membrane と 24 時間・ $4^\circ\text{C}$ で反応させた。Membrane を洗浄後、Biotinylated cocktail で 2 時間、HRP-streptavidin 溶液で 2 時間反応させ、化学発光試薬にて処理後、LAS3000 により発光シグナルを検出した。

Figure 1 nCounter<sup>®</sup>の測定原理 (アズワン株式会社より提供、一部改変)



## 【実験結果】

### 1. 健常人 PBMC からの MDSC の誘導

健常人の末梢血中には MDSC は存在せず、またがん患者においても末梢血中の MDSC 数にばらつきが多いことから、実験に用いる MDSC として健常人の PBMC からサイトカインを用いて MDSC を誘導する方法を用いた。手法はすでに報告されている論文を参照した<sup>2</sup>。具体的な手法については【実験方法】に記載した。

IL-6 および GM-CSF を添加したフラスコ内には、貼付細胞の増殖像が多く認められるようになった (Figure 2A)。7 日後、CD33 陽性細胞を分離したところ、CD33 陽性細胞の大部分は偏在した核を持ち、細胞質は好塩基性を呈する (Figure 2B, Left)。細胞質内部には好酸性のある顆粒様構造を認めるものや、Bleb 様突起が目立つものが混在している (Figure 2B, Right)。全体としては前骨髄球様の未熟な細胞に近い形態を呈している。フローサイトメトリーで細胞表面抗原を検索したところ、CD33 陽性細胞集団は CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low</sup> であり、Monocytic MDSC の表面マーカーとして矛盾しなかった (Figure 2C)。CD3 刺激下において T 細胞と共培養したところ、誘導 MDSC では T 細胞の分裂を細胞数依存性に抑制したが、サイトカインを混入しないコントロール細胞ではこの効果は認められなかった (Figure 2D)。これらの結果、ヒトの末梢血中 PBMC より IL-6, GM-CSF を用いて Monocytic MDSC 様の細胞を誘導することができ、これらが実際に T 細胞の増殖抑制能をもつことを確認した。以後この細胞を MDSC として実験に用いることとした。

### 2. 誘導された MDSC において発現する免疫関連遺伝子の網羅的解析

健常人 PBMC から誘導した MDSC 様細胞には T 細胞増殖抑制性活性を有することから、この細胞自体は人工的な細胞であるが MDSC の基本的性質を持ち合わせていると考えられる。この MDSC において発現する遺伝子を特に免疫に関連した遺伝子に特化して網羅的に検討した。検索には n Counter PanCancer Immune Profiling Kit を用いて、730 の免疫関連遺伝子と 40 の内部コントロールからなる遺伝子セット (Table 1) の発現を、1 週間誘導を行った MDSC およびサイトカインを投入せずに 1 週間培養を行ったコントロール細胞において比較した。

検討した 730 の遺伝子のうち、未誘導細胞と比較して、誘導 MDSC 様細胞にて発現が 2 倍以上低下している遺伝子は 49、2 倍以上上昇している遺伝子が 107 認められた。変動の大きかった遺伝子のうち、発現低下した上位 10% (Figure 3A) と発現上昇した上位 10% (Figure 3B) を提示する。興味深いことに、発現が上昇した遺伝子群の中には、T 細胞の機能低下および Treg の活性化に関与しているとされる IDO1 (Indoleamine 2,3-dioxygenase) や、ケモカインレセプターである CCR4 分子を介して Treg の腫瘍内への浸潤に関与していることが示されている CCL17 が認められた。一方、MDSC において高発現されているとされる ARG1 はほとんど発現が見られなかった。このことは、我々が用いた誘導 MDSC 様細胞が M-MDSC の表現型に近いことに矛盾しない。また、MDSC の腫瘍内への浸潤におけるケモカインレセプターの役割を探索するため、特に誘導 MDSC において発現が上昇するケモカインレセプターを抽出したところ、CCR4 / CCR7 / CXCR3 / CXCR4 / CXCR6 の発現が上昇していることが明らかとなった (Figure 3C)。

#### Figure 2 健常人 PBMC からの MDSC の誘導 (次頁)

- A) 誘導した MDSC 様細胞の細胞増殖 (サイトカイン投与後 Day5)
- B) 誘導した MDSC 様細胞の細胞形態 (May-Giemsa 染色)
- C) 誘導した MDSC 様細胞の細胞表面マーカー
- D) 誘導した MDSC 様細胞による *in vitro* T 細胞増殖抑制効果

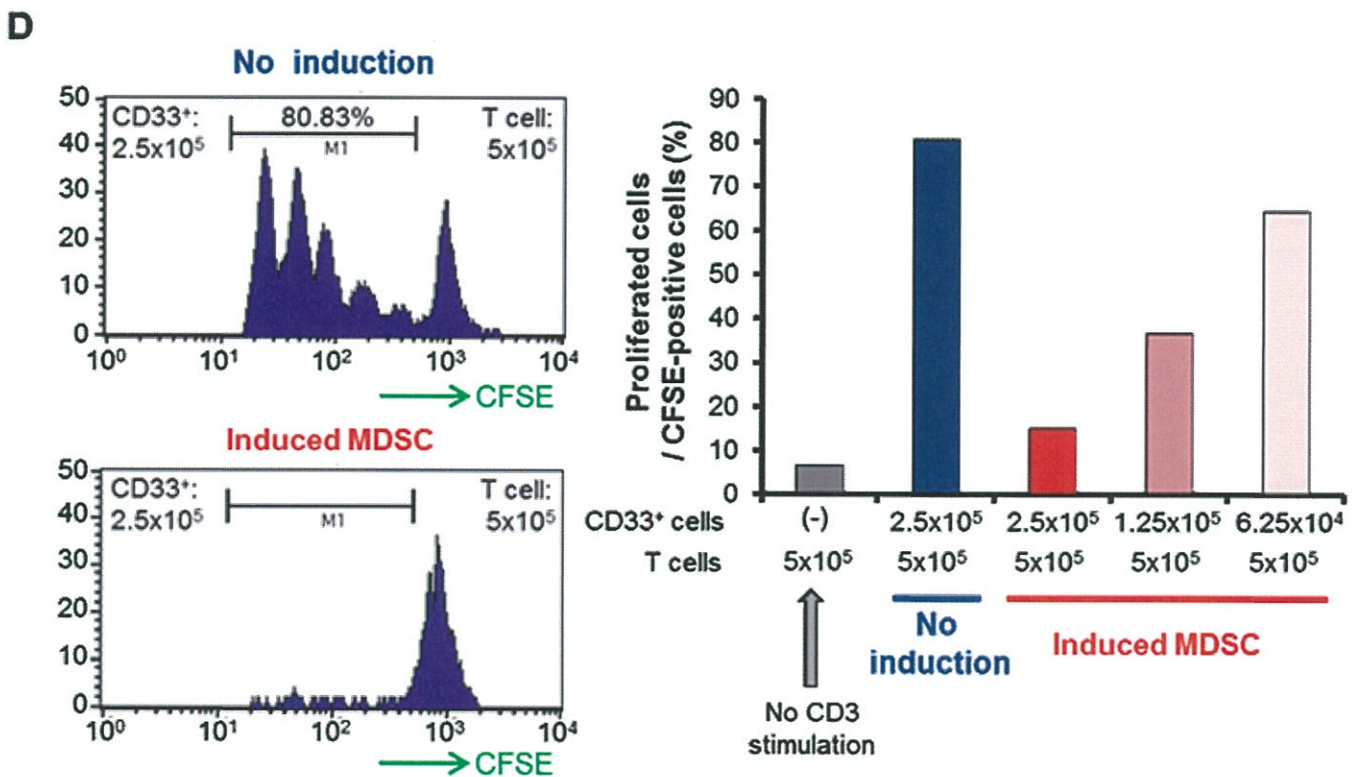
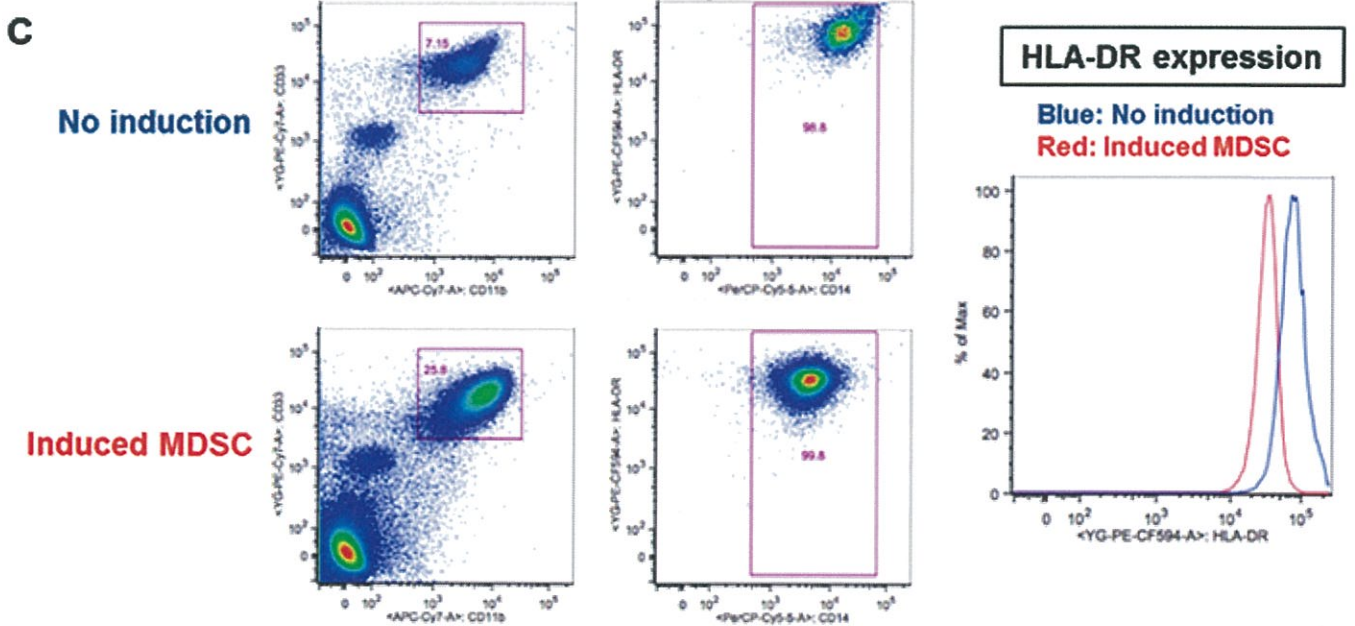
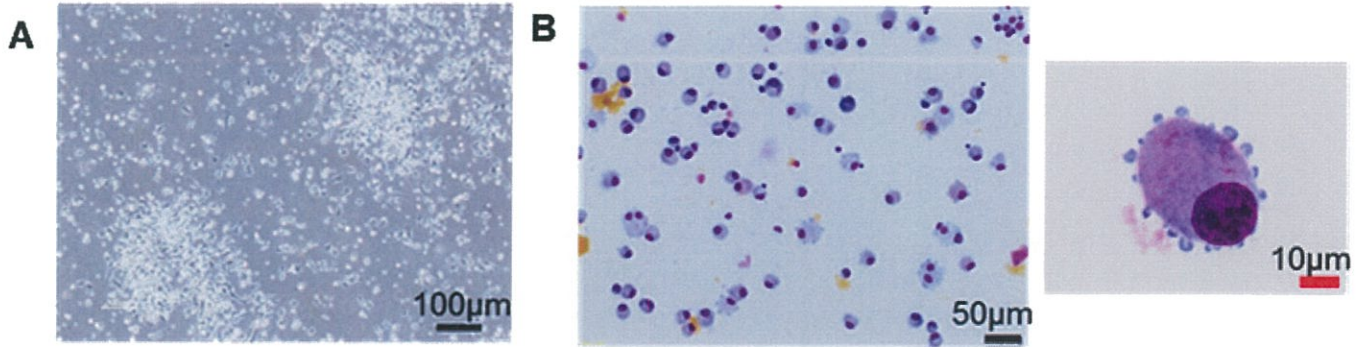


Table 1 nCounter PanCancer Immune Profiling Kitに含まれる遺伝子セット

A2M	CCL21	CD81	CYBB	HSD11B1	IL27	LCP1	NLR5	SH2D1B	TNFRSF4
ABCB1	CCL22	CD83	CYFIP2	ICAM1	IL2RA	LGALS3	NLRP3	SIGIRR	TNFRSF8
ABL1	CCL23	CD84	CYLD	ICAM2	IL2RB	LIF	NOD1	SIGLEC1	TNFRSF9
ADA	CCL24	CD86	DDX43	ICAM3	IL2RG	LILRA1	NOD2	SLAMF1	TNFSF10
ADORA2A	CCL25	CD8A	DDX58	ICAM4	IL3	LILRA4	NOS2A	SLAMF6	TNFSF11
AICDA	CCL26	CD8B	DEFB1	ICOS	IL32	LILRA5	NOTCH1	SLAMF7	TNFSF12
AIRE	CCL27	CD9	DMBT1	ICOSLG	IL34	LILRB1	NRP1	SLC11A1	TNFSF13
AKT3	CCL28	CD96	DOCK9	IDO1	IL3RA	LILRB2	NT5E	SMAD2	TNFSF13B
ALCAM	CCL3	CD97	DPP4	IFI16	IL4	LILRB3	NUP107	SMAD3	TNFSF14
AMBP	CCL3L1	CD99	DUSP4	IFI27	IL4R	LRP1	OAS3	SMPD3	TNFSF15
AMICA1	CCL4	CDH1	DUSP6	IFI35	IL5	LRRN3	OSM	SOCS1	TNFSF18
ANP32B	CCL5	CDH5	EBI3	IFIH1	IL5RA	LTA	PASD1	SPA17	TNFSF4
ANXA1	CCL7	CDK1	ECSIT	IFT1	IL6	LTB	PAX5	SPACA3	TNFSF8
APOE	CCL8	CDKN1A	EGR1	IFT2	IL6R	LTBR	PBK	SPANXB1	TOLLIP
APP	CCND3	CEACAM1	EGR2	IFTM1	IL6ST	LTF	PDCD1	SPINK5	TP53
ARG1	CCR1	CEACAM6	ELANE	IFTM2	IL7	LTK	PDCD1LG2	SPN	TPSAB1
ARG2	CCR2	CEACAM8	ELK1	IFNA1	IL7R	LY86	PDGFC	SPO11	TPTE
ATF1	CCR3	CEBPB	ENG	IFNA17	IL8	LY9	PDGFRB	SPP1	TRAF2
ATF2	CCR4	CFB	ENTPD1	IFNA2	IL9	LY96	PECAM1	SSX1	TRAF3
ATG10	CCR5	CFD	EOMES	IFNA7	ILF3	LYN	PIK3CD	SSX4	TRAF6
ATG12	CCR6	CFI	EP300	IFNA8	INPP5D	MAF	PIK3CG	ST6GAL1	TREM1
ATG16L1	CCR7	CFP	EPCAM	IFNA1	IRAK1	MAGEA1	PIN1	STAT1	TREM2
ATG5	CCR9	CHIT1	ETS1	IFNA2	IRAK2	MAGEA12	PLA2G1B	STAT2	TTK
ATG7	CCRL2	CHUK	EWSR1	IFNB1	IRAK4	MAGEA3	PLA2G6	STAT3	TXK
ATM	CD14	CKLF	F12	IFNG	IRF1	MAGEA4	PLAU	STAT4	TXNIP
AXL	CD160	CLEC4A	F13A1	IFNGR1	IRF2	MAGEB2	PLAUR	STAT5B	TYK2
BAGE	CD163	CLEC4C	F2RL1	IFNL1	IRF3	MAGEC1	PMCH	STAT6	UBC
BATF	CD164	CLEC5A	FADD	IFNL2	IRF4	MAGEC2	PNMA1	SYCP1	ULBP2
BAX	CD180	CLEC6A	FAS	IQF1R	IRF5	MAP2K1	POU2AF1	SYK	USP9Y
BCL10	CD19	CLEC7A	FCER1A	IQF2R	IRF7	MAP2K2	POU2F2	SYT17	VCAM1
BCL2	CD1A	CLU	FCER1G	IQLL1	IRF8	MAP2K4	PPARG	TAB1	VEGFA
BCL2L1	CD1B	CMA1	FCER2	IKBKB	IRGM	MAP3K1	PPBP	TAL1	VEGFC
BCL6	CD1C	CMKLR1	FCGR1A	IKBKE	ISG15	MAP3K5	PRAME	TANK	XCL2
BID	CD1D	COL3A1	FCGR2A	IKBKG	ISG20	MAP3K7	PRF1	TAP1	XCR1
BIRC5	CD1E	COLEC12	FCGR2B	IL10	ITCH	MAP4K2	PRG2	TAP2	YTHDF2
BLK	CD2	CR1	FCGR3A	IL10RA	ITGA1	MAPK1	PRKCD	TAPBP	ZAP70
BLNK	CD200	CR2	FEZ1	IL11	ITGA2	MAPK11	PRKCE	TARP	ZNF205
BMI1	CD207	CREB1	FLT3	IL11RA	ITGA2B	MAPK14	PRM1	TBK1	ABCF1
BST1	CD209	CREB5	FLT3LG	IL12A	ITGA4	MAPK3	PSEN1	TBX21	AKK
BST2	CD22	CREBBP	FN1	IL12B	ITGA5	MAPK8	PSEN2	TCF7	ALAS1
BTK	CD24	CRP	FOS	IL12RB1	ITGA6	MAPKAPK2	PSMB10	TFE3	AMMECR1L
BTLA	CD244	CSF1	FOXJ1	IL12RB2	ITGAE	MARCO	PSMB7	TFEB	CC2D1B
C10A	CD247	CSF1R	FOXP3	IL13	ITGAL	MASP1	PSMB8	TFRC	CNOT10
C10B	CD27	CSF2	FPR2	IL13RA1	ITGAM	MASP2	PSMB9	TGFB1	CNOT4
C10BP	CD274	CSF2RB	FUT5	IL13RA2	ITGAX	MAVS	PSMD7	TGFB2	COG7
C1R	CD276	CSF3	FUT7	IL15	ITGB1	MBL2	PTGDR2	THBD	DDX50
C1S	CD28	CSF3R	FYN	IL15RA	ITGB2	MCAM	PTGS2	THBS1	DHX18
C2	CD33	CT45A1	GAGE1	IL16	ITGB3	MEF2C	PTPRC	THY1	DNAJC14
C3	CD34	CTAG1B	GATA3	IL17A	ITGB4	MEFV	PVR	TICAM1	EDC3
C3AR1	CD36	CTAGE1	GNLY	IL17B	ITK	MERTK	PYCARD	TICAM2	EIF2B4
C4B	CD37	CTCFL	GPI	IL17F	JAK1	MFGE8	RAQ1	TIGIT	ERCC3
C4BPA	CD38	CTLA4	GTF3C1	IL17RA	JAK2	MICA	REL	TIRAP	FCF1
C5	CD3D	CTSG	GZMA	IL17RB	JAK3	MICB	RELA	TLR1	G6PD
C6	CD3E	CTSH	GZMB	IL18	JAM3	MIF	RELB	TLR10	QPATCH3
C7	CD3EAP	CTSL	GZMH	IL18R1	KIR3DL1	MME	REPS1	TLR2	GUSB
C8A	CD3G	CTSS	GZMK	IL18RAP	KIR3DL2	MXN1	RIPK2	TLR3	HDAC3
C8B	CD4	CTSW	GZMM	IL19	KIR3DL3	MPPED1	ROPN1	TLR4	HPRT1
C8G	CD40	CX3CL1	HAMP	IL1A	KIR Activ S 1	MR1	RORA	TLR5	MRPS5
C9	CD40LG	CX3CR1	HAVCR2	IL1B	KIR Activ S 2	MRC1	RORC	TLR6	MTMR14
CAMP	CD44	CXCL1	HCK	IL1R1	KIR Inhib S 1	MS4A1	RPS6	TLR7	NOL7
CARD11	CD46	CXCL10	HLA-A	IL1R2	KIR Inhib S 2	MS4A2	RRAD	TLR8	NUBP1
CARD9	CD47	CXCL11	HLA-B	IL1RAP	KIT	MSR1	RUNX1	TLR9	POLR2A
CASP1	CD48	CXCL12	HLA-C	IL1RAPL2	KLRB1	MST1R	RUNX3	TMEFF2	PPIA
CASP10	CD5	CXCL13	HLA-DMA	IL1RL1	KLRC1	MUC1	S100A12	TNF	PRPF38A
CASP3	CD53	CXCL14	HLA-DNB	IL1RL2	KLRC2	MX1	S100A7	TNFAIP3	SAP130
CASP8	CD55	CXCL16	HLA-DOB	IL1RN	KLRD1	MYD88	S100A8	TNFRSF10B	SDHA
CCL1	CD58	CXCL2	HLA-DPA1	IL2	KLRF1	NCAM1	S100B	TNFRSF10C	SF3A3
CCL11	CD59	CXCL3	HLA-DPB1	IL21	KLRG1	NCF4	SAA1	TNFRSF11A	TBP
CCL13	CD6	CXCL5	HLA-DQA1	IL21R	KLRK1	NCR1	SBNO2	TNFRSF11B	TLK2
CCL14	CD63	CXCL6	HLA-DQB1	IL22	LAG3	NEFL	SELE	TNFRSF12A	TMUB2
CCL15	CD68	CXCL9	HLA-DRA	IL22RA1	LAIR2	NFATC1	SELL	TNFRSF13B	TRIM39
CCL16	CD7	CXCR1	HLA-DRB3	IL22RA2	LAMP1	NFATC2	SELPLG	TNFRSF13C	TUBB
CCL17	CD70	CXCR2	HLA-DRB4	IL23A	LAMP2	NFATC3	SEMG1	TNFRSF14	USP39
CCL18	CD74	CXCR3	HLA-E	IL23R	LAMP3	NFATC4	SERPINB2	TNFRSF17	ZC3H14
CCL19	CD79A	CXCR4	HLA-G	IL24	LBP	NFKB1	SERPING1	TNFRSF18	ZKSCAN5
CCL2	CD79B	CXCR5	HMGB1	IL25	LCK	NFKB2	SH2B2	TNFRSF1A	ZNF143
CCL20	CD80	CXCR6	HRAS	IL26	LCN2	NFKB1A	SH2D1A	TNFRSF1B	ZNF346

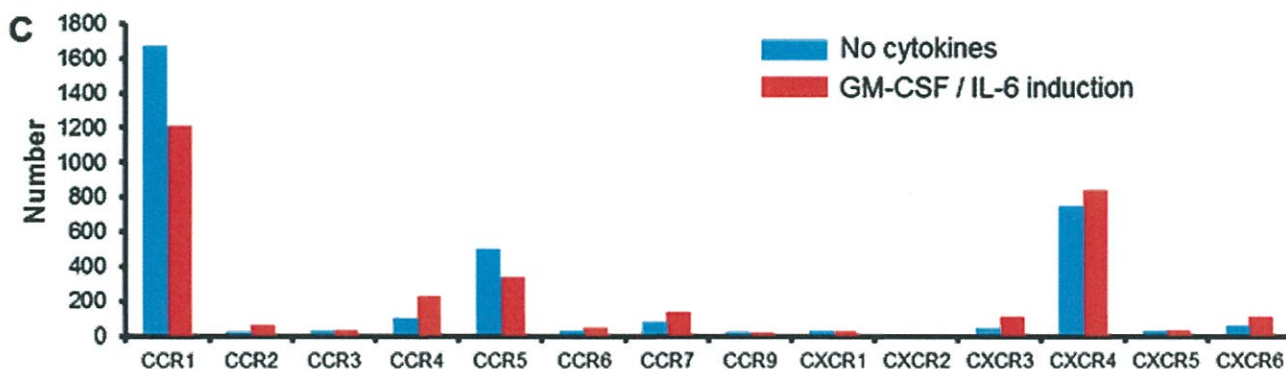
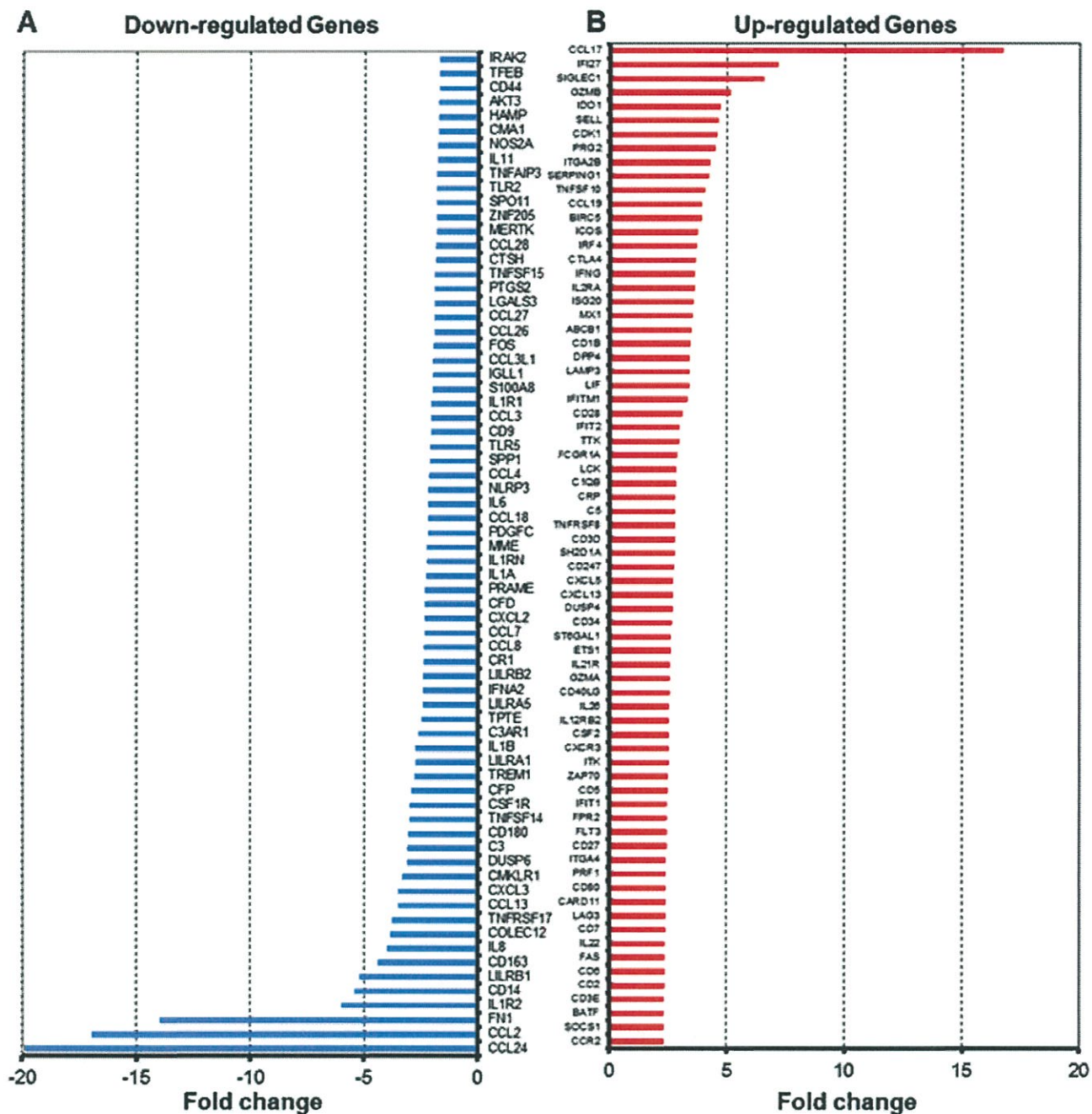


Figure 3 誘導 MDSC に発現する遺伝子の網羅的解析

A) 誘導した MDSC において発現低下が見られる遺伝子群 (下位 10%)

B) 誘導した MDSC において発現上昇が見られる遺伝子群 (上位 10%)

C) Chemokine receptor の発現量の比較



### 3. Cancer associated fibroblast への誘導 MDSC の遊走

MDSC は循環血中から腫瘍内へ浸潤することにより、腫瘍局所における免疫抑制性環境の構築に寄与していると考えられており、腫瘍への MDSC の浸潤メカニズムを知ることはがん免疫微小環境の分子細胞学的背景を明らかにする上で重要である。腫瘍関連線維芽細胞 Cancer associated fibroblast (CAF) において p53 の発現低下が見られ、TSPAN12 の発現上昇および CXCL6 の発現上昇が見られることが大友らの先行研究により示されているが<sup>3</sup>、MDSC には CXCL6 を Ligand とする CXCR2 が発現することが知られており、MDSC の腫瘍内への浸潤に CAF が関与しているのではないかと仮説を立てた。これを検証するため、Transwell migration assay を行い、p53 の発現が低下した細胞 (TIG-7-shp53) および肺癌由来 CAF (1128PMCAF) に対する誘導 MDSC の遊走能について検討を行った。

GM-CSF および IL-6 で末梢血中 PBMC より誘導した MDSC 様細胞をチャンバー内に、線維芽細胞を well 底面に播種し、チャンバー孔を通過した MDSC 様細胞を観察した (Figure 4)。p53 を Knockdown した線維芽細胞 (TIG-7-shp53 : CAF を想定した細胞) へは、親細胞 (TIG-7) と比較して 3.2 倍多くチャンバー孔を透過した。また、ヒト肺癌由来 CAF (1128PMCAF) に対しては、同一症例の正常肺由来の線維芽細胞 (1128PMNF) と比較して 1.5 倍多くチャンバー孔を透過した。これらのことより、特に p53 の発現した CAF において、何らかの液性因子 (chemotactic factor) が分泌され、それに反応して循環血中の MDSC が腫瘍内に誘導される可能性が示唆された。

### 4. Cancer associated fibroblast の産生するケモカインの網羅的解析

CAF が MDSC を腫瘍内に遊走させるために使用する液性因子を調べるために、サイトカインアレイを用いて線維芽細胞から発現される chemotactic factor を Array Map (Figure 5A) に示す計 69 のサイトカイン・ケモカインについて網羅的に検索した。TIG-7 と TIG-7-shp53 の培養上清中のサイトカイン・ケモカインでは、TIG-7-shp53 において特に IL-8 が特に発現が上昇 (4.61 倍) していた。また、TIG-7 と比較して TIG-7-shp53 において 10% 以上の発現上昇がみられたものは、GRO / IL-6 / MIG / FGF6 / IGFBP3 / OPN / OPG であった (Figure 5B Left and 5C)。一方、1128PMNF と 1128PMCAF を比較した場合、10% 以上の発現上昇がみられたものは、ENA-78 / IGF-1 / Eotaxin2 / Eotaxin3 / HGF / MIP3 $\alpha$  であった (Figure 5B Right and 5D)。

Figure 4 CAF への誘導 MDSC の遊走能

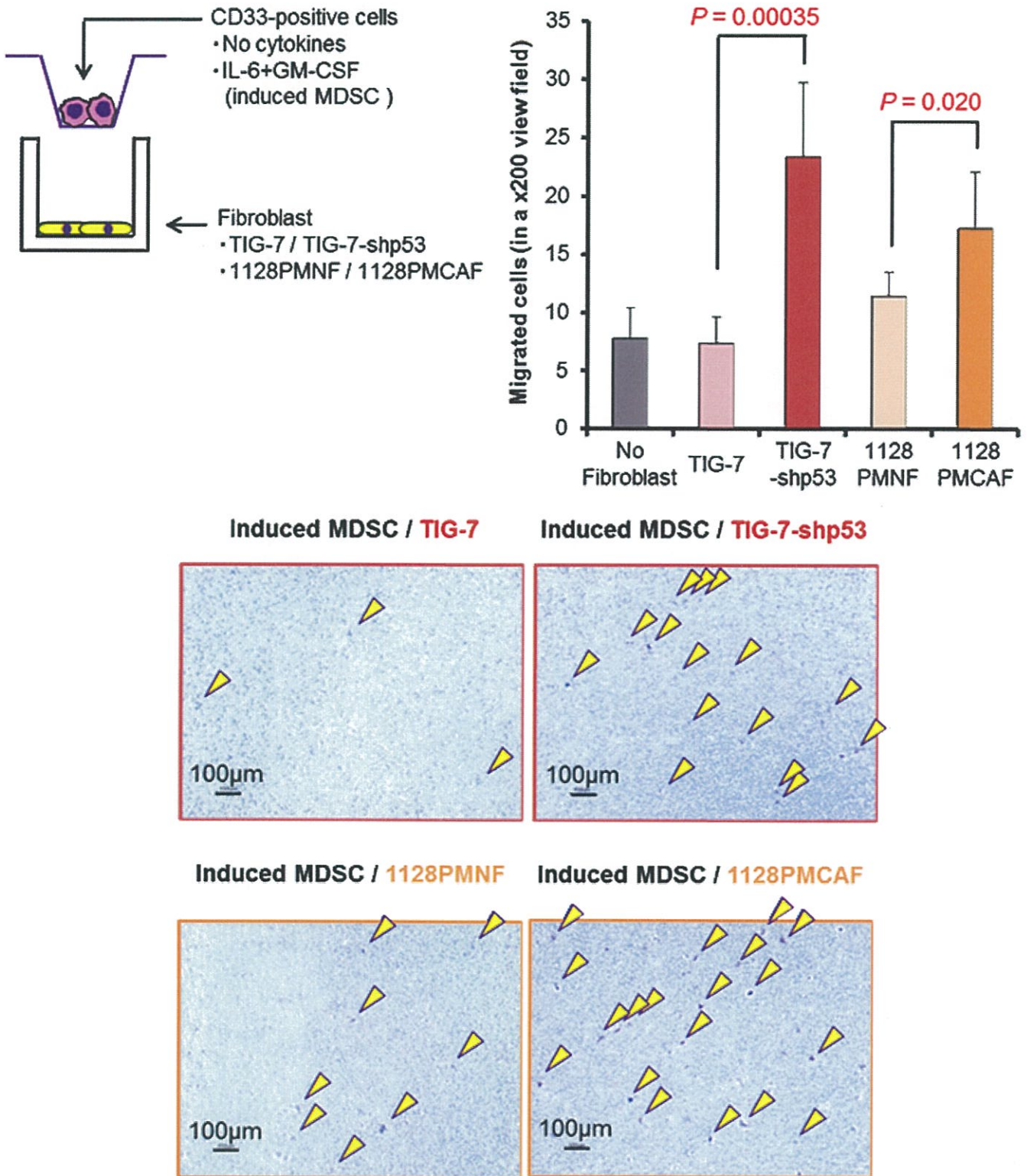


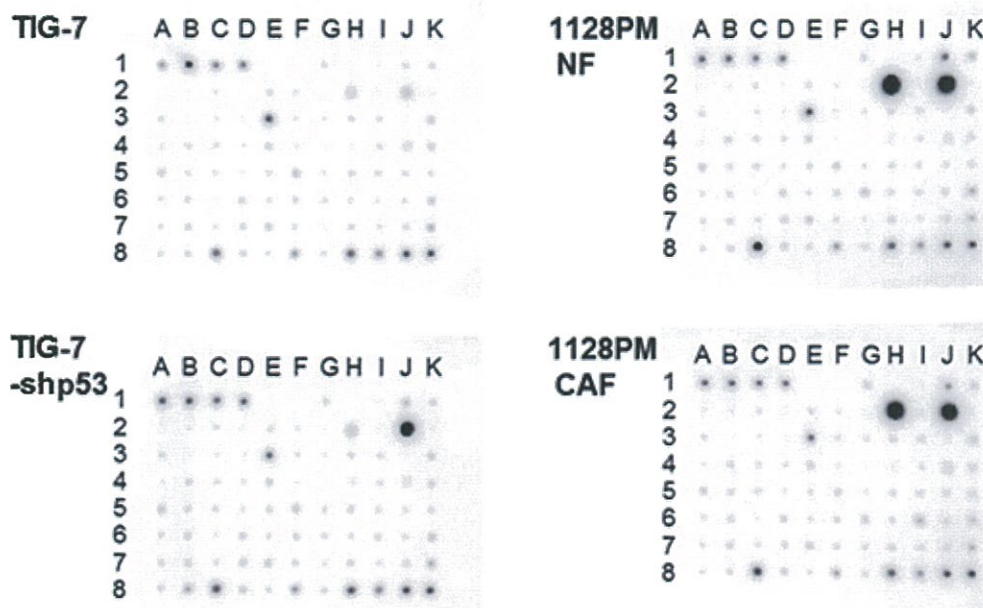
Figure 5 CAF の発現する Cytokine / Chemokine の網羅的解析 (次頁)

- A) Human Cytokine Antibody Array C5 (RayBio) の Array map
- B) Array の Membrane 写真
- C) 定量化した発光シグナル (TIG-7 と TIG-7-shp53 の比較)
- D) 定量化した発光シグナル (1128PMNF と 1128PMCAF の比較)

**A**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	ENA-78 (CXCL5)	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g	GRO alpha (CXCL1)
2	I-309 (ICL1)	IL-1 alpha (IL-1F1)	IL-1 beta (IL-1F2)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8 (CXCL8)	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-gamma	MCP-1 (ICL2)	MCP-2 (ICL8)	MCP-3 (ICL7)	M-CSF	MDC (ICL22)	MKG (ICL9)	MIP-1 beta (ICL4)
4	MIP-1 delta (ICL15)	RANTES (ICL5)	SCF	SDF-1 alpha	TARC (ICL17)	TGF beta 1	THF alpha	THF beta (THFS1B)	EGF	IGF-1	Angiogenin
5	OSM	TPO	VEGFA	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC (CXCL13)	Ck beta s-1 (ICL23)	Eotasin-1 (ICL11)	Eotasin-2 (ICL24)	Eotasin-3 (ICL26)
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7 (KGF)	FGF-9	FLT-3 Ligand	Fractalkine (CXCL1)	GCP-2 (CXCL6)	GM-CSF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10 (CXCL10)	LIF	LIGHT (THFS14)	MCP-4 (ICL13)	MIF	MIP-3 alpha (CXCL20)	NAP-2 (ICL2)	NT-3
8	NT-4	OPN (SP1)	OPG (THRSF11B)	PARC	PLGF	TGF beta 2	TGF beta 3	TMP-1	TMP-2	POS	POS

**B**

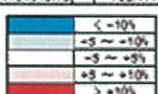


**C**

	TIG-7	TIG-7-shp53	% Increase
ENA-78	858151	842282.778	98.20562
G-CSF	791422	772136.712	97.58321
GM-CSF	822972	761864.434	92.50454
GRO	888730	1056370.3	117.5403
GROalpha	888774	926517.331	104.2461
I-309	783708	845606.712	107.8962
IL-1alpha	810087	848729.073	104.5219
IL-1beta	818581	831039.781	101.322
IL-2	773717	800502.434	102.9826
IL-3	841400	828445.388	98.50789
IL-4	817951	801180.447	97.84264
IL-5	782888	780334.124	98.29274
IL-6	1021488	1186741.71	113.847
IL-7	834031	828807.088	99.38564
IL-8	1314923	8067794.36	461.4563
IL-10	893135	927848.244	103.8943
IL-12p40	858006	866421.309	101.1768
IL-13	789137	818784.706	102.2068
IL-15	824219	811200.943	98.42104
IFNgamma	787862	794606.458	101.1021
MCP-1	2002762	1588168.58	77.32028
MCP-2	818778	809875.027	99.13073
MCP-3	749474	794179.422	99.33724
M-CSF	842840	858058.11	101.5183
MDC	844823	857779.844	101.5897
MIF	830017	818868.888	110.4397
MIP-1beta	891188	1023413.33	103.2914
MIP-1delta	837968	849369.934	101.3568
RANTES	838624	805978.706	103.5152
SCF	808624	815520.247	100.867
SDF-1	784938	809809.93	101.3562
TGFbeta1	894608	895320.859	100.2133
TGFbeta2	789762	783347.978	99.07349
THFalpha	760777	750789.312	101.3156
THFbeta	811732	827419.131	101.813
VEGF	838449	828418.071	99.37253
IGF-1	833759	847864.883	101.3044
ANG	858218	863187.634	103.5414
OSM	827478	897841.071	107.5975
THPO	828243	803125.227	108.8093
YGF	802329	865907.882	104.7414
PDGFRB	775884	813148.458	104.8273

**D**

	1128PM	CAF	% Increase
ENA-78	833728	1027326	110.0232
G-CSF	855826	1037533	108.5803
GM-CSF	827974	1001478	107.6317
GRO	2074771	1809317	77.37319
GROalpha	1190477	1122370	94.27903
I-309	807207	883285.2	98.48368
IL-1alpha	868788	807000.9	104.5392
IL-1beta	875883	821464.4	106.2401
IL-2	831244	871680.1	102.4002
IL-3	888288	823443.7	103.2882
IL-4	842100	885228.2	105.1343
IL-5	850763	848734.2	101.8902
IL-6	1642032	16457835	89.34851
IL-7	1116205	1153929	103.3534
IL-8	15008078	13853244	88.05247
IL-10	1091348	1089240	99.80703
IL-12p40	804377	820187.9	101.7258
IL-13	827373	888794.1	105.0063
IL-15	873872	887022.7	101.5313
IFNgamma	878821	880183.3	101.3219
MCP-1	2092380	1888422	80.68624
MCP-2	858068	822783.8	107.7889
MCP-3	871423	827041.1	106.3824
M-CSF	1098964	1078202	88.0294
MDC	879718	1038082	108.9574
MIF	1068788	1113283	104.2824
MIP-1beta	1081184	1184991	107.7334
MIP-1delta	854588	874840	102.3464
RANTES	844741	851411	100.8933
SCF	801171	808318	100.8038
SDF-1	883891	807838	102.7441
TARC	874379	1000745	102.8484
TGFbeta1	823183	878427.2	106.8323
TGFbeta2	813328	858082.3	105.5462
TGFbeta3	813002	842330.858	103.7305
TMP-1	1883731	1938111.43	103.8413
TMP-2	1413723	1481945.13	103.411
Leptin	891688	920468.3	103.2878
BDNF	882878	923814.1	99.0883
BLC	864740	877502.8	101.4748
CCL21	808774	847228.2	104.8787
Eotasin-1	813788	1004222	106.8588
Eotasin-2	874788	1083870	111.0582
Eotasin-3	891187	1108888	111.0488
FGF4	873031	887068.8	99.33288
FGF6	812078	902923.8	99.21533
FGF7	872044	851832.2	97.88222
FGF9	848707	848114.7	97.88883
Fractalkine	888351	883251.8	99.42997
Fractalkine	828614	836059.8	100.8920
GCP-2	1077788	984157.1	92.48883
GDNF	832324	846417.3	101.4888
HGF	838082	1341432	140.3052
IGFBP1	1037811	1138688	109.8492
IGFBP2	1333209	1289123	97.43388
IGFBP3	873702	885847.5	101.4032
IGFBP4	812588	824816.1	101.2684
IL-16	812120	880287.8	98.52108
IP-10	888838	940821.1	95.48004
LIF	1068188	1002600	94.01788
LIGHT	848684	831152	98.07113
MCP-4	817385	891784.5	103.7294
MIF	890494	1030882	103.5952
MIP1alpha	832608	1054828	111.0833
NAP-2	1118222	1163052	105.7032
NT-3	1354800	1383774	102.1537
NT-4	887582	848818.1	94.88374
OPN	844440	817448.9	97.18248
OPG	8078100	8328281	82.24888
PARC	1048980	889320.8	92.80183
PLGF	883802	883443.1	90.80613
TGFbeta2	1371304	1268444	89.42808
TGFbeta3	1000803	970381.3	96.18441
TMP-1	2138238	2142234	100.1982
TMP-2	1319091	1572588	103.8243



## 【考察】

がんを免疫の力を用いて叩くという試みは、がん免疫研究の進歩とともに、急速な進歩を遂げている。IL-2 や Interferon を用いたサイトカイン療法に始まり、細胞療法（活性化 T 細胞／樹状細胞療法）、がんワクチン療法を経て、現在では免疫チェックポイント阻害効果を持つ Immunomodulatory monoclonal antibody が大規模臨床試験を経てその有効性が示され、臨床の現場でも広く施行されるに至っている<sup>4, 5</sup>。

MDSC は骨髄由来細胞であり<sup>6</sup>、Treg と並び抗腫瘍免疫を抑制する宿主側の細胞として、免疫療法の治療効果を減弱させる効果について注目されている。2006 年に Yang らが、マウスにおいて Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloid cell が CD80 依存性に抗原特異的な免疫抑制を来すことを報告し<sup>7</sup>、それ以降この細胞集団ががんの進展に重要な役割を担っていることが次々と報告されるようになった。この Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloid cell は Heterogeneous な集団であるが、免疫抑制性活性を有する以外にも、未熟な骨髄系細胞であること、ROS の産生能が高く、Arginase I が活性化しているなど、共通点が多く認められた。一方で、多くの研究において用語が統一されず混乱を来したため、Gabriovich らのグループにより、この細胞集団を「Myeloid-derived suppressor cell (MDSC)」と呼称することで名称が統一されることになった<sup>8</sup>。

本研究においては、先行の臨床研究 (NCC-IRB 2012-367) により、標準的化学療法を施行した大腸がん症例（主に FOLFOX±BEV、XEROX+BV）において治療前後の末梢血中の免疫細胞を検討したところ、Monocytic MDSC のみが唯一特徴的に予後不良と相関していることが示された。この臨床研究において注目される点は、従来型の化学療法（いわゆる免疫療法ではない）の抵抗性にも MDSC が関与している可能性が示唆されたことである。現在化学療法抵抗性となった症例においても、MDSC を除去する治療が化学療法抵抗性を解除できる可能性を示唆するものであり、従来の化学療法との併用療法における Proof of concept となりうる。

本研究においては MDSC として健常人末梢血からサイトカインを用いて誘導した細胞を用いることにした。これは、健常人には末梢血中に MDSC が存在しないとされていること、またがん患者においても MDSC が存在する症例と存在しない症例がいること、PMN-MDSC/M-MDSC 比率が症例によってまちまち（がん種によっても一定しない）であること、実験に使用するには大量の末梢血を採取する必要があること、などの問題点が存在する。

一方で、PBMC から GM-CSF と IL-6 を用いて MDSC 様細胞を誘導する方法が Lechner らにより報告され<sup>2</sup>、同方法を用いた研究報告も数多く報告されている。同様の方法において検討したところ、誘導された細胞（CD33 陽性細胞集団）は CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low</sup> であり、Monocytic MDSC の表面マーカーとして矛盾しなかった (Figure 2C)。さらにこれらは T 細胞と共培養をした際に T 細胞の分裂を細胞数依存性に抑制した (Figure 2D)。これらの事実より、この誘導 MDSC 細胞は MDSC としての一定の特徴は備えていると考えられる。一方で、本方法はすでに成熟した末梢血中の細胞を GM-CSF により人工的に未熟な細胞へ変化させたものであり、この細胞から得られた結果は artificial であることを常に念頭に置きつつ解釈する必要がある。事実、Lechner らはもっとも MDSC として効率のよいサイトカインの組み合わせとして GM-CSF と IL-6 を選択しているが、GM-CSF 単独で培養した場合でも抑制性活性を示すことを確かめている<sup>2</sup>。MDSC が産生されるのはがんによる異常な造血が原因ではないかと考えられており、MDSC と GM-CSF および他のサイトカインとのかかわりについては、さらなる検討が必要である。

nCounter は米国 NanoString 社が製造する遺伝子解析装置であり、調べたい遺伝子の種類、発現量などを PCR による増幅なしにダイレクトに最大 800 種類の遺伝子を正確に検出・カウントすることができる<sup>9</sup>。本方法を用いて誘導 MDSC に発現する免疫関連の遺伝子を検討したところ、CCL17 や IDO-1 など、Treg に関連する分子の高発現が認められた (Figure 3A)。CCL17 は CCR4 を介して Treg の腫瘍内への浸潤に重要であるとされ<sup>10</sup>、IDO-1 は腫瘍局所において Treg を活性化さ

せ、腫瘍における免疫抑制性環境の形成に重要な役割を担っているとされている<sup>11</sup>。一方で、腫瘍局所の MDSC が免疫抑制性活性を發揮するには、腫瘍局所に Treg が存在することが必須である<sup>12</sup>。今回我々は、健常人 PBMC から GM-CSF および IL-6 を用いて MDSC を誘導したが、MDSC の中でも特に腫瘍局所に Treg を浸潤・活性化させる役割を担う特定の MDSC を誘導した可能性が考えられる。MDSC としてより詳細に検討するには従来の MDSC の表面マーカーを元にした集団としての解析から発展して、より細胞レベルの解析 (Single-cell 解析) による MDSC の機能別の細分化が必要である。また、先行研究において末梢血中に M-MDSC の多い症例では予後不良であることを示したが、さらに CCL17 陽性 MDSC 様細胞分画の多少によって予後に差がでないかについて、検討することが必要である。

MDSC が腫瘍内において免疫抑制性活性を發揮するにあたり、MDSC を制御している細胞集団を把握することは、MDSC を標的化する治療を開発する上で重要である。MDSC の腫瘍内への浸潤に関連する Chemokine-Chemokine receptor の関係として、CCR2(or CCR4)-CCL2 / CXCR4-CXCL12 / CXCR2-CXCL5 などが報告をされているが、これら Chemokine の多くは腫瘍が産生しており、間質細胞など腫瘍以外の構成成分の産生する Chemokine と MDSC 遊走の関連についての知見はほとんど得られていない。当研究所の大友らは腫瘍関連線維芽細胞 (CAF) において p53 の発現低下が見られ、TSPAN12 の発現上昇および CXCL6 の発現上昇が見られることを報告した<sup>3</sup>。そこで、p53 の発現が低下している CAF への MDSC の走化能を Transwell migration assay にて検討したところ、p53-knockdown fibroblast および CAF は MDSC に対して強い走化作用を有することが確かめられた (Figure 4)。当初はこの走化に CXCL6 が関与していると考えていたが、CXCL6 の Receptor である CXCR2 が誘導 MDSC にほとんど発現していない (Figure 3C) ことから、CXCL6 以外の Chemokine の関与を考え、各線維芽細胞の産生する Cytokine/Chemokine を Antibody array を用いて網羅的に検討した。その結果、p53-knockdown fibroblast および CAF において、Cytokine/Chemokine の産生は非常に酷似しており (Figure 5B)、唯一 IL-8 のみ、p53-knockdown 細胞において強く発現していることが分かった。IL-8(CXCL8)-CXCR2 による MDSC の腫瘍内への浸潤については、CXCR2 knockout mice では腫瘍内に浸潤する MDSC (Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cell) が減少し、また小児肉腫症例の血液中 CXCL8 濃度が予後と負の相関を示す報告が 1 報あるのみであり<sup>13</sup>、MDSC と IL-8 のかわりについては明らかとなっていない。一方で、IL-8 の Receptor である CXCR2 は先ほども述べたように本研究に用いた誘導 MDSC では発現がほとんど見られておらず、誘導 MDSC の腫瘍内への浸潤については未だ知られていない別の Chemokine-Chemokine receptor の関与が存在するのではないかと推測された。

MDSC を標的とする治療としては、大きく 4 つのカテゴリーが提唱されている。

- ・ MDSC の活性を低下させるもの (PDE5 inhibitor<sup>14</sup>、NO-aspirin)
- ・ MDSC を分化させるもの (ATRA<sup>15</sup>、Vit.D3)
- ・ MDSC 発達の抑制 (VEGF inhibitor<sup>16</sup>、Sunitinib)
- ・ MDSC の除去 (Gemcitabine<sup>17, 18</sup>、Paclitaxel、5-FU)

いくつかの薬剤については MDSC を標的とした治療として臨床試験が遂行中であるが、現段階でヒトにおいて有効性が証明されたものはない。今後より詳細に MDSC の Biology について検証を行い、①MDSC が腫瘍内に浸潤するのに利用している Chemokine/Chemokine receptor の組み合わせを突き止め、それをターゲットとした分子標的薬を作成すること、②MDSC の存在が化学療法抵抗性に関与している直接的な原因を突き止め、それをターゲットとした創薬を行うこと、③MDSC と p53-decreased CAF の関連を突き止め、p53 発現を回復させる賦活薬が MDSC の腫瘍内浸潤を妨げるかの検証、の 3 つの方面から、MDSC を標的とした新規治療法の基礎的開発研究を継続していきたい。

## 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、p53-knockdown fibroblast を供与していただきました、国立がん研究センター研究所 難治進行がん研究分野の江成 政人先生・大友 亮先生、ヒト肺癌由来 CAF を供与して頂きました、国立がん研究センター東病院 臨床腫瘍病理分野の石井 源一郎先生、研究の指導をして頂きました、国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野の青木 一教先生・工藤 千恵先生、そしてシニア・リサーチフェローとして研究する機会を与えてくださいました、国立がん研究センター研究所長の中釜 齊先生に心より御礼申し上げます。

## 【参考文献】

- [1] Pol J, Vacchelli E, Aranda F, et al. Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2015; 4: e1008866.
- [2] Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 2010; 185: 2273-84.
- [3] Otomo R, Otsubo C, Matsushima-Hibiya Y, et al. TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: 18691-6.
- [4] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010; 363: 711-23.
- [5] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366: 2443-54.
- [6] Bennett JA, Rao VS, Mitchell MS. Systemic bacillus Calmette-Guerin (BCG) activates natural suppressor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75: 5142-4.
- [7] Yang R, Cai Z, Zhang Y, Yutzy WHt, Roby KF, Roden RB. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res*. 2006; 66: 6807-15.
- [8] Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. 2007; 67: 425; author reply 6.
- [9] Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*. 2008; 26: 317-25.
- [10] Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int Immunol*. 2015; 27: 11-20.
- [11] Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1147-54.
- [12] Holmgaard RB, Zamarin D, Li Y, et al. Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. *Cell Rep*. 2015; 13: 412-24.
- [13] Highfill SL, Cui Y, Giles AJ, et al. Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 237ra67.
- [14] Weed DT, Vella JL, Reis IM, et al. Tadalafil reduces myeloid-derived suppressor cells

and regulatory T cells and promotes tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2015; 21: 39-48.

[15] Iclozan C, Antonia S, Chiappori A, Chen DT, Gabrilovich D. Therapeutic regulation of myeloid-derived suppressor cells and immune response to cancer vaccine in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62: 909-18.

[16] Yuan H, Cai P, Li Q, et al. Axitinib augments antitumor activity in renal cell carcinoma via STAT3-dependent reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation. *Biomed Pharmacother.* 2014; 68: 751-6.

[17] Annels NE, Shaw VE, Gabitass RF, et al. The effects of gemcitabine and capecitabine combination chemotherapy and of low-dose adjuvant GM-CSF on the levels of myeloid-derived suppressor cells in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63: 175-83.

[18] Bunt SK, Mohr AM, Bailey JM, Grandgenett PM, Hollingsworth MA. Rosiglitazone and Gemcitabine in combination reduces immune suppression and modulates T cell populations in pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62: 225-36.



## (2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てるか

がん免疫療法は、長くその有効性が疑問視されてきたが、Immune checkpoint inhibitor の登場により、手術療法・化学療法・放射線療法と並ぶ第 4 のがん治療としてその地位を確立した。シニア・リサーチフェローとして研究に携わる中で、腫瘍免疫学についてより深い知識を習得する機会が得られたことは、治療の選択肢としてのがん免疫療法としてだけでなく、宿主因子（微小環境や宿主免疫）を含めたがんの生物学にまで踏み込んだ知識を習得することができ、今後の臨床・研究を行う上で、大変有意義な経験をする事ができた。

Immune checkpoint inhibitor が広く使用される中で、特に固形がんにおいては免疫療法無効例・耐性例が経験されるようになってきた。本研究でテーマとしてきた MDSC は、Checkpoint inhibitor 無効例の原因の一つとされている。本研究により、GM-CSF 高値が持続した場合、PBMC が MDSC 様の形質を獲得し、Treg を腫瘍内に浸潤させる、もしくは腫瘍局所で活性化させることが示唆される CCL17 や IDO-1 などの興味深い分子の発現が上昇することが明らかとなった。がん患者の末梢血中の MDSC 分画の中で、CCL17 または IDO-1 を発現する細胞の細胞数ないし割合と、患者予後や治療反応性との相関を検討することは興味深いと考えている。

これまでの研究では、腫瘍細胞の因子と MDSC との関連を示す報告が多く見られる一方で、CAF などを含めたがん微小環境と MDSC の関連については十分に解明されていない。本研究では CAF に対する MDSC の遊走を証明することで、CAF と MDSC の腫瘍内への走化を検討したが、CAF をはじめとした間質細胞が産生する因子が、MDSC をより違う表現型へと変化させる可能性もある。CAF を突破口として間質細胞と MDSC をはじめとした免疫抑制性細胞の関連をより詳細に検討することで、免疫抑制性環境における細胞ネットワーク機構を理解し、それをターゲットとした治療法の開発を目指す。