

図 4. レポーターアッセイによる AhR 作動薬同定 2nd スクリーニング

### 3. AhR アンタゴニスト活性の検証と機序の解析

XRE レポーターアッセイで同定されたアンタゴニストの作用を AhR の標的遺伝子 CYP1A1 の発現によっても検証した。アンタゴニスト候補 8 種類の漢方薬成分のうち 4 種類について 10  $\mu$ M の MCF-7 に加え、その 1 時間後に 10nM の TCDD を加えた後、さらに 24 時間後に抽出した RNA において CYP1A1 の発現量を定量 PCR により解析した(図 5)。その結果、24 時間後、TCDD による CYP1A1 の発現誘導を、AhR アンタゴニスト CH-223191 が顕著に抑制したのに対して、4 種類の漢方成分のうち 2 種類で軽度の発現抑制が見られた。

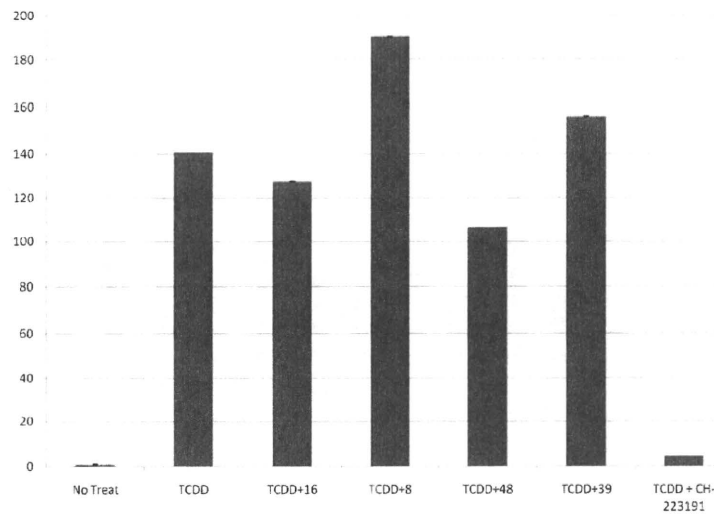


図 5. CYP1A1 の発現比較による AhR アンタゴニストの同定

AhR アンタゴニストの作用機序の一つとして、AhR の核移行阻害が考えられるため、アンタゴニスト候補が AhR 核移行阻害活性をもつかどうかを検討した。MCF-7 細胞では TCDD による AhR 核移行が明確でなかったが、前立腺がん細胞株 PC3 において TCDD による核移行や AhR アンタゴニスト CH-223191 による核移行阻害が認められた (図 6)。今後、PC3 細胞を用いて、アンタゴニスト候補が AhR 核移行阻害により AhR 活性を阻害するかを検証予定である。

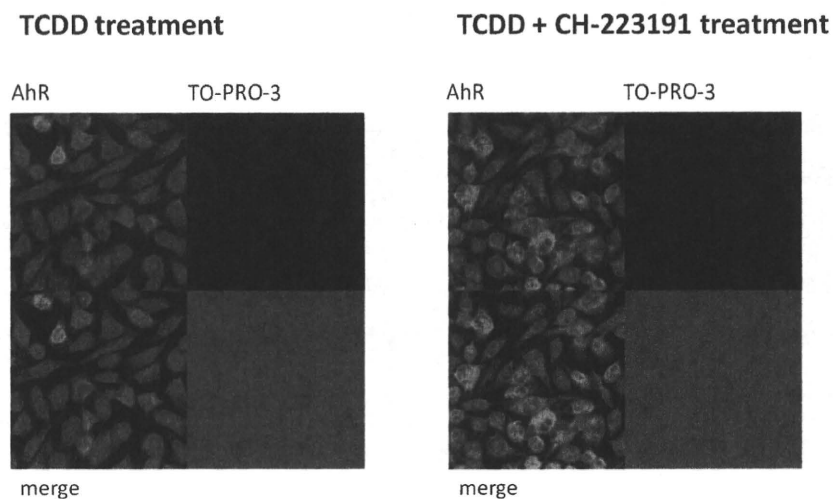
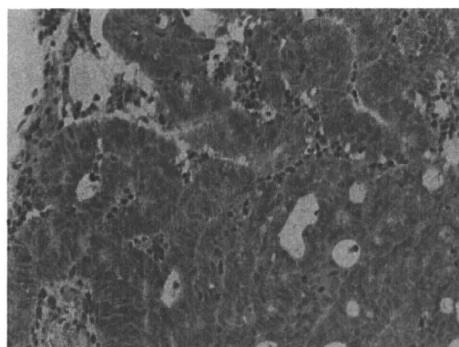


図 6. AhR アンタゴニストによる AhR 核移行の阻害

#### 4. ヒトがん組織における AhR 発現の検討

がん組織には、がん細胞に加えて、様々な免疫細胞やその他の間質細胞が存在し、がん微小環境を構成している。我々は 泌尿器系がん組織において、がん細胞とがん浸潤リンパ球における AhR の核内発現、すなわち AhR が活性化されていることを見いだしていたが、今回は、大腸がん手術検体から作成したパラフィン切片を抗 AhR 抗体で免疫染色したところ、がん細胞の一部、およびがん組織に浸潤するリンパ球で強い発現および核移行が認められた (図 7)。

Stage 1 (中分化)



Stage 2 (中分化)

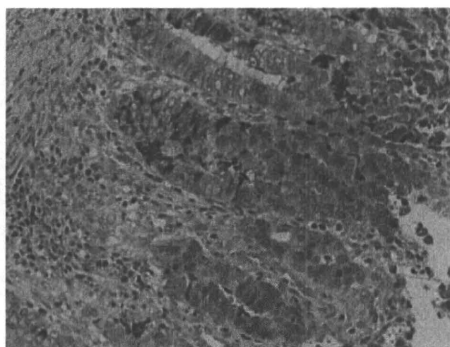


図 7. 大腸癌組織での AhR の発現

#### 5. iTreg 誘導への作用の検討

上記の漢方成分のナイーブ T 細胞からの TGF- $\beta$  誘導性 iTreg の分化誘導系において、XRE レポーターアッセイによって同定された漢方薬成分中の AhR アゴニスト (9, 58) は iTreg への分化を誘導し、また AhR アンタゴニスト (8, 26, 27, 28, 29, 39, 48) は iTreg への分化を軽度であるが抑制した(図 4、3) 誘導性制御性 T 細胞(iTreg)の誘導を抑制する漢方成分化合物の同定 (図 1)。

#### 考察

本研究では、62 種類の漢方成分の中から、AhR 作動薬を、XRE レポーターアッセイと CYP1A1 発現アッセイでスクリーニングし、4 種類の漢方薬成分がアゴニスト候補として、8 種類の成分がアンタゴニスト候補として同定された。これらの一部は、すでに報告されているものも含まれ、本研究で開発したスクリーニング系が機能していることが確認された。AhR アンタゴニスト候補は、TGF- $\beta$ による iTreg 分化誘導を抑制したので、これらの AhR 作動薬候補は、Treg 活性の抑制など、全身性に直接的に、あるいは腸管 Treg 抑制などを介して間接的に、がん微小環境免疫抑制環境の改善や抗腫瘍免疫応答増強に有用である

可能性が示唆された。逆に、AhR アゴニスト候補は Treg 誘導促進により、炎症性腸疾患や自己免疫疾患の治療薬となる可能性がある。

今後、これらの同定した漢方成分の AhR 作用や Treg 抑制作用、あるいはがん細胞への作用の強度の判定を行う必要がある。また、AhR が EMT や MMP 発現誘導により、がん細胞の浸潤能を促進することが報告されているので、がん細胞自体の浸潤能などへの作用も検討する予定である。特に効果の高い漢方成分については、マウス腫瘍モデルを用いて *in vivo* 効果を検討する。また、本年度に開発したアッセイを用いて、AhR 核移行阻害など、漢方成分の AhR 作用機序を明らかにする必要がある。さらに、現在、開発中の *in vivo* イメージングシステムを用いて、生体内で AhR 活性をモニターして、がんの進行や転移などと AhR の挙動の関係を明らかにするとともに、漢方成分投与による AhR 活性調節が生体内でも起こるのか、起こるとすれば、どの程度の量をどの経路で投与すればいいのかなど、より詳細な解析を可能にしたいと考えている。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
河上裕、工藤千恵、塚本信夫、植田良、住本秀敏、谷口智憲	担がん生体における免疫病態とがん転移	丸義朗	細胞工学別冊「がん転移」	学研ディカ秀潤社	東京	2010	170-175

#### 論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y.	The mechanisms of cancer immune escape and development of overcoming strategies	Int J Hematol	93(3)	294-300	2011
河上裕	がん免疫ネットワークの総合的制御によるがん治療の可能性	日本臨床	68(6)	1094-1099	2010
河上裕、梶原-岩田知子、宮崎潤一郎、川村直	がんに対する免疫応答の細胞分子機構とその制御法	Mebio	27(12)	19-27	2010

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# 担がん生体における免疫病態とがん転移

河上 裕 工藤千恵 塚本信夫 植田 良 住本秀敏 谷口智憲

免疫細胞はがん排除だけでなくがんの増殖・浸潤・転移を促進する場合がある。がん形成過程で多様な機序により免疫抵抗性と免疫抑制性を獲得したがん細胞は、がん組織・所属リンパ節・骨髄などの抗腫瘍免疫応答に重要ながん関連微小環境において免疫細胞や間質細胞との相互作用により免疫抑制病態を構築し、がん転移を促進させる。特に、がん幹細胞や上皮間葉転換(EMT)がん細胞は免疫抵抗性・抑制作用の強いがん細胞集団であり、転移や再発に関与する。がん細胞や免疫細胞上の標的に対する免疫制御法は免疫抑制の是正だけでなく転移抑制にもつながるので、免疫病態の解明により新しいがん診断法や治療法の開発が期待される。

## key word

免疫抑制, 免疫抵抗性, 免疫療法

## はじめに

がん細胞は転移と治療抵抗性獲得のために治療が困難となる。筆者らは、ヒトがん細胞に対する免疫応答の研究と、その制御によるがん治療の可能性を追究している。免疫防御系は、がん細胞の排除に関わることが期待されてきたが、近年、自然免疫系の細胞群は、むしろがん細胞の浸潤・転移を促進する場合があること、また、がん細胞は形成過程で免疫抵抗性や免疫抑制性を獲得して、免疫監視機構から逃避し、がん細胞の転移を促進することが明らかになってきた。臨床で見られるがんでは、がん細胞と各種免疫細胞、および線維芽細胞や間葉系幹細胞などの間質細胞との相互作用により、抗腫瘍免疫細胞が機能すべきがん組織、抗腫瘍T細胞が誘導されるべき所属リンパ節、抗腫瘍メモリーT細胞が豊富に存在する骨髄などの、抗腫瘍免疫応答にとって重要ながん関連微小環境において、局所性また全身性の免疫抑制病態が構築され、浸潤・転移の促進だけでなく、免疫療法などの治療に対する抵抗性をもたらしている。したがって、効果的な免疫療法の開発のためには、担がん生体における免疫抑制病態の細胞分子機構を解明して、その是正法を開発することが重要課題となっている。

本稿では、がん細胞の浸潤・転移の促進に関与する免疫病態について紹介するが、免疫抑制と浸潤・転移の分子機構には共通点も多く、免疫抑制病態の制御は、抗腫瘍免疫増強を介した間接的な抗転移作用だけでなく、直接的ながん細胞の転移抑制につながる場合がある。

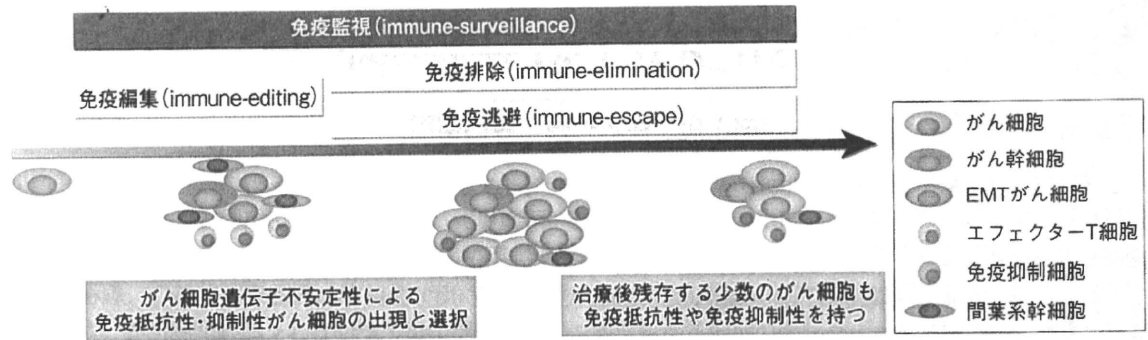
## I. 自然免疫系細胞によるがん細胞浸潤・転移の促進

腫瘍に浸潤する白血球はがん細胞の排除に働くと考えられていたが、エフェクターT細胞の浸潤が良好な予後と関連する場合が多いのに対して、マクロファージや肥満細胞の浸潤は、むしろ予後不良と関連することが判明した。詳細は他稿を参照していただきたいが、がん細胞はケモカインの産生を介してマクロファージや肥満細胞などの白血球や線維芽細胞や間葉系幹細胞などの間質細胞をリクルートする。それらが産生するTNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )などのサイトカインやケモカインは、直接的ながん細胞の増殖生存浸潤能を高め、また血管新生誘導を介して、がんの進展を促進する。また、原発巣のがん細胞が産生する炎症性サイトカインなどは遠隔臓器へ作用して単球系細胞などをリクルートし、がん細胞が定着しやすい微小環境 (pre-metastatic niche) を構築して、その後ながん細胞が転移する可能性も報告されている<sup>1)~4)</sup>。

## II. がん形成過程における免疫抵抗性・免疫抑制性がん細胞の選択的増殖

### 1. がん細胞と免疫細胞の相互作用による免疫編集

がんの形成過程においては、がん発生初期から、がん細胞と自然免疫系と獲得免疫系細胞、および線維芽細胞や骨髄由来間葉系幹細胞などの間質細胞との相互作用が起り、その後のがんの免疫学的性質が規定されていく。マクロファージなどの自然免疫系は、がんの排除ではなく、むしろがんの増



■図1 がん進展過程での免疫抵抗性ががん細胞の選択的増殖

遺伝子不安定性を基本性質として持つがん細胞は、その形成過程において、NK細胞やT細胞などの免疫細胞による免疫監視機構 (immune-surveillance) によりがん細胞の排除 (immune-elimination) や免疫逃避 (immune-escape) が起こり、その後のがん細胞の免疫学的性質が規定されていく (免疫編集: immune-editing)。

殖浸潤を促進させるが、ナチュラルキラー (NK) 細胞やT細胞などの免疫細胞は、免疫監視 (immune-surveillance) により、がん細胞を排除 (immune-elimination) する (図1)。しかし、遺伝子不安定性という基本性質を持つがん細胞は、その過程で免疫抵抗性や免疫抑制性を獲得し、免疫防御機構をすり抜けて (免疫逃避: immune-escape)、臨床で認められるがんとなる。マウスの化学発がん実験において、免疫不全マウスではがん発生の増加が見られるが、発生したがん細胞は免疫機構が正常なマウスに発生するがん細胞と比べて免疫感受性であることが判明している。すなわち、がん形成過程で免疫監視機構が作動していることを示しており、免疫抵抗性ががん細胞が選択される過程は免疫編集 (immune-editing) と呼ばれている<sup>5)</sup>。

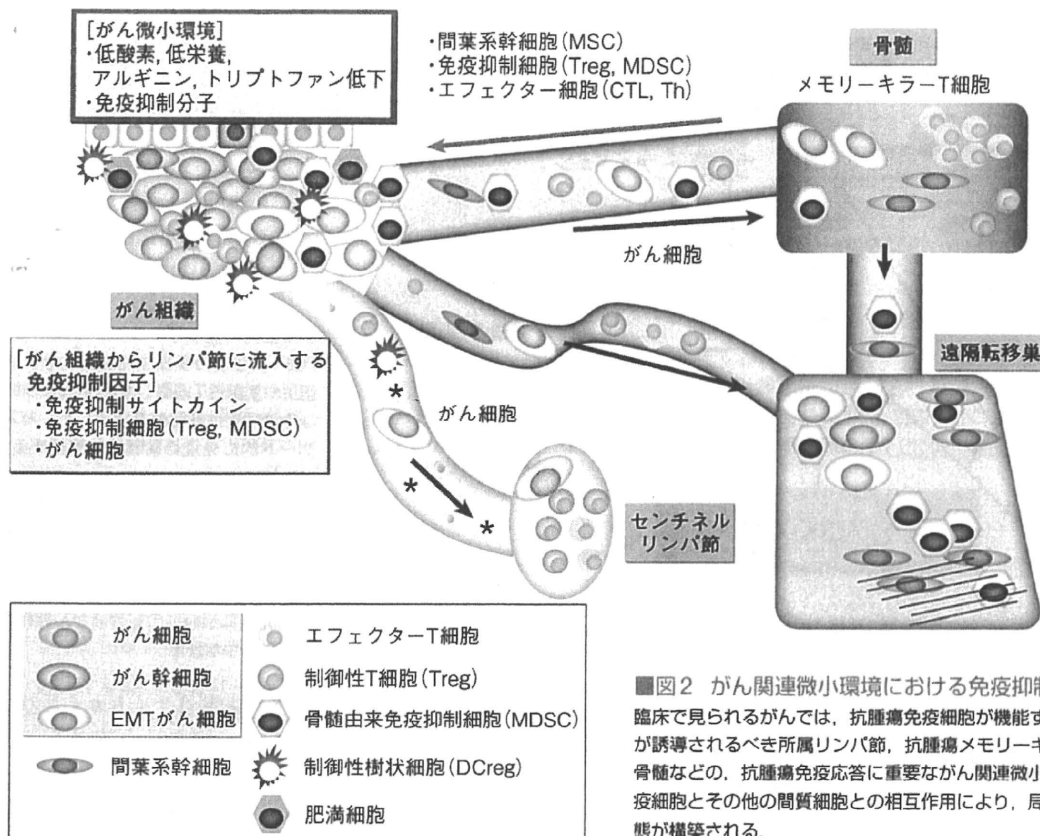
ヒトでも免疫不全状態が続くと、短期的には悪性リンパ腫などの増加が認められ、長期的には、最近のAIDS長期生存例で観察されるように、複数の遺伝子異常の蓄積により発生するがん腫の増加も認められている。免疫不全状態で発生するEB (Epstein-Barr) ウイルス関連リンパ腫は免疫感受性であるのに対して、通常の患者に発生するがんは後述するように、多様な機序による免疫抵抗性や免疫抑制性を獲得しており、ヒトでも免疫編集が起こっていると推定される。がん細胞自体の免疫学的性質の変化に加えて、がん細胞と免疫細胞の相互作用は患者の免疫系への変化を来す。がん患者体内の腫瘍抗原認識T細胞レセプターを持つT細胞の解析から、抗腫瘍T細胞の消失 (deletion) や不応答性 (anergy) が起こること、また抗腫瘍免疫抑制性細胞群が増加することが示されている<sup>6), 7)</sup>。

## 2. 免疫療法によるがん細胞排除の可能性

このように、すでに免疫防御機構から逃避したがん細胞、

あるいはがん細胞に対する免疫応答系が変化している患者に対して、はたして免疫療法によりがん細胞の排除が可能であるのか。最近、制御性T細胞 (Treg) などの免疫抑制細胞群も減少させるリンパ球抑制作用を持つ薬剤や全身性放射線照射などの前処置後に、体外培養抗腫瘍T細胞を投与する養子免疫療法の臨床試験において、多発転移巣を持つ進行悪性黒色腫に対しても、RECIST (response evaluation criteria in solid tumors) 基準で、長期生存が期待できるCR (complete response, 完全奏効) 例を含む72%の奏効率が得られている<sup>8)</sup>。さらに、抗腫瘍T細胞レセプター遺伝子をレトロウイルスで導入した末梢血リンパ球を用いた養子免疫療法では、悪性黒色腫だけでなく、多発転移を持つ進行滑膜肉腫に対しても強い抗腫瘍効果が得られており、強力な免疫制御により、いったんは免疫機構を逃避してきたヒトがん細胞に対しても免疫による排除が可能であることが示されている<sup>9)</sup>。一方、がんワクチンなどの患者体内で抗腫瘍免疫応答を誘導する能動免疫法ではまだ十分な抗腫瘍効果が得られていない<sup>10), 11)</sup>。がんワクチンにより末梢血中の抗腫瘍T細胞を増加させても、腫瘍組織内に浸潤した抗腫瘍T細胞は免疫抑制病態のためにパーフォリンやグランザイムなどの細胞傷害性分子や抗腫瘍性IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) などのサイトカインの産生が低下し、十分に機能しないなどの問題が指摘されている。がん細胞量が少なれば免疫抑制状態も軽減されるので、免疫療法では標準治療後に残存したがん細胞の再発抑制効果が期待されているが、悪性黒色腫では、そのようなアジュバント設定でも腫瘍抗原ペプチドワクチンによって末梢血中に抗腫瘍T細胞が増加しているにもかかわらず、腫瘍抗原も、HLA (human leukocyte antigen) も十分発現するがん細胞が再発する症例が認められており、すでに





■図2 がん関連微小環境における免疫抑制病態

臨床で見られるがんでは、抗腫瘍免疫細胞が機能すべきがん組織、抗腫瘍T細胞が誘導されるべき所属リンパ節、抗腫瘍メモリーキラーT細胞が豊富に存在する骨髄などの、抗腫瘍免疫応答に重要ながん関連微小環境において、がん細胞と免疫細胞とその他の間質細胞との相互作用により、局所性また全身性の免疫抑制病態が構築される。

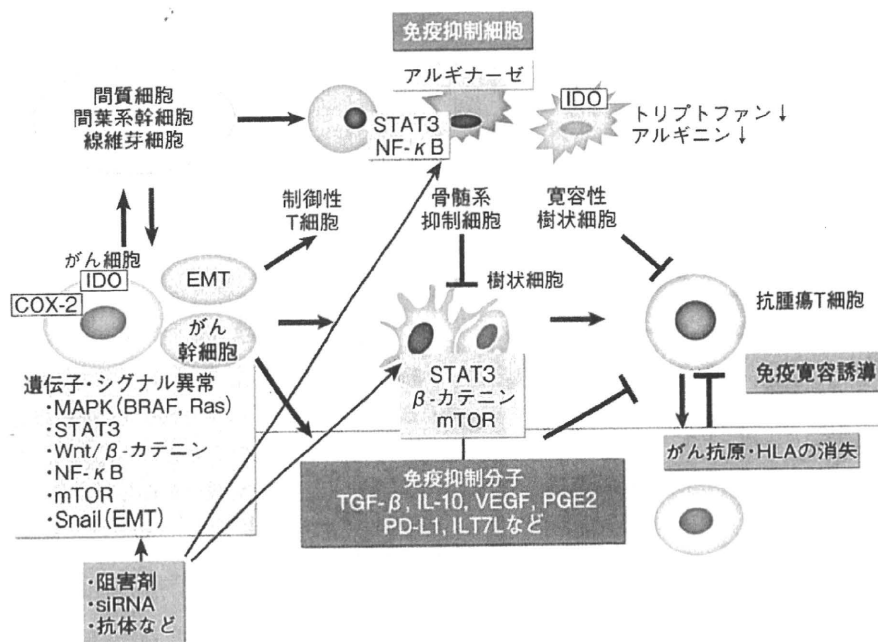
免疫編集で選択されたがん細胞は、少数であっても簡単には免疫排除できるわけではないことが指摘されている<sup>12)</sup>。したがって、臨床で見られるがん細胞の免疫抵抗性・免疫抑制性の細胞分子機構を解明して、その是正法を開発することが、がん治療、特に免疫療法の開発にとって重要と考えられている。

### Ⅲ. ヒトがん細胞の免疫抵抗性・免疫抑制性をもたらす多様な機序

主に動物実験により、免疫抵抗性や免疫抑制性を持つがん細胞が転移しやすいことや、NK細胞やT細胞ががん細胞の転移を抑制することが示されている。がん細胞の免疫抵抗性・抑制性機構に関してはまだ完全には理解されていないものの、多様な細胞・分子機構が報告されている(図2)<sup>1), 6), 7)</sup>。

ヒトがん細胞では腫瘍抗原やHLAなどの抗原処理提示に関わる分子異常が認められ、T細胞の認識から逃れることがある。その分子機構は多様であるが、悪性黒色腫ではβ2ミクログロブリン遺伝子変異によるHLAクラスIの全消失が

しばしば見られ、その回復は難しく、他の治療法が必要となる<sup>13)</sup>。しかし、肺小細胞がんではIFN-γによる、乳がんや前立腺がんではHDAC阻害剤による転写レベルでの回復が認められており、HLA発現誘導法を併用した免疫療法が期待されている。さらに、がん細胞はTGF-β (transforming growth factor-β), IL-10, VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-6, MICA/B (MHC class I chain related A, B)などの免疫抑制分子を分泌したり、B7-H1 (PD-L1)やFasLやCD200やILT7Lなどの免疫抑制性膜分子を発現したり、トリプトファン欠乏や代謝産物キヌレニンによりT細胞機能を抑制するトリプトファン代謝酵素IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase)や、免疫抑制活性を持つPGE2 (prostaglandin E2)の産生に関わるCOX-2 (cyclooxygenase-2)などの細胞内酵素を発現して、免疫抑制活性を発揮する<sup>14)~20)</sup>。また、がん細胞は分泌分子や膜分子を介して、Treg, 骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid derived suppressor cell: MDSC), 腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophage: TAM), M2マクロファージ, 制御性樹状細胞 (regulatory DC: DCreg), 形質



■図3 がん微小環境における免疫抑制性カスケードの作動とその制御  
 がん細胞の遺伝子・シグナル異常は、TGF-βなどの多様な免疫抑制分子の産生や制御性T細胞(Treg)などの多様な免疫抑制性細胞群を誘導して、カスケード的に免疫抑制環境を構築する。がん細胞垂集団として、がん幹細胞やEMTがん細胞は免疫抑制や免疫抵抗性に関与する。また、HLAやがん抗原の消失や細胞傷害耐性などにより、がん細胞の免疫抵抗性が獲得される。これらの免疫抑制病態の制御はがん転移の抑制にもつながる。

細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC ; pDC), タイプII NKT細胞, 免疫抑制性  $\gamma / \Delta$  T細胞など, 多様な免疫抑制活性を持つ細胞群を誘導する<sup>21)~24)</sup>。さらに, がん細胞はCCL21やCCL22などのケモカインを産生し, それぞれCCR7やCCR4などを発現する免疫抑制細胞をがん関連微小環境にリクルートする。通常は抗腫瘍免疫を増強しうる免疫細胞も, がん関連微小環境において免疫抑制性細胞になってしまう<sup>25), 26)</sup>。

担がん生体では, がん細胞を起点として複数の免疫抑制カスケードが作動し, 免疫抑制環境が構築される(図3)。例えば, がん細胞が産生するTGF-βやIL-10は, 直接的にTregを誘導するだけでなく, DCregの誘導を介してTregを誘導する。また, 免疫抑制サイトカインはがん細胞からだけでなく, がん関連組織に浸潤する免疫細胞や間質細胞からも産生され, 様々ながんで血液中のTGF-βやIL-10の増加と予後不良との相関が認められている。これらの免疫抑制サイトカインは, がん遺伝子異常などにより恒常的に亢進したシグナルを介して産生されるため, 特異的シグナル阻害剤やシグナル分子のRNAiにより, その下流の複数の免疫抑制分子の産生を同時に阻害することができる。例えば, ヒト悪性黒色腫で高頻度に見られる共通変異BRAFによるMAPKシグナル亢進, あるいはSTAT3の亢進をRNAiや阻害剤で抑えると, IL-10, VEGF, IL-6などの複数の樹状細胞抑制性サイトカインの産生が同時に阻害された<sup>14)</sup>。興味深いことに, これらの免疫抑制性サイトカインは, 樹状細胞やMDSCにおいてSTAT3を活性化させることにより, 免疫抑制性の細胞に変化させる。したがって,

STAT3阻害剤はがん細胞からの免疫抑制性サイトカインの産生を減弱させるだけでなく, さらに免疫細胞にも作用してその機能を増強させたり, 免疫抑制性細胞への変化を阻害することにより, 抗腫瘍免疫応答を増強する作用を持つ。米国のグループも, 全身性のSTAT3阻害が抗腫瘍T細胞誘導を起こすことを報告している<sup>27)</sup>。筆者らは, STAT3だけでなくMAPK, NF-κB, β-カテニンなどもがん細胞の免疫抑制活性に関与すること, がん細胞によって重要な免疫抑制作用経路が異なることを見だしており, 症例ごとに異なる制御法(個別化治療)の必要性が考えられる。また, これらのシグナルはがん細胞の増殖・浸潤・転移能に直接関与する場合もあり, 総合的ながん制御が期待できる。最近, 通常の化学療法剤でも, 直接的な抗腫瘍効果に加えてユニークな免疫作用を持つものが報告されている。例えば, ゲムシタビンはMDSC増加の阻害作用, アントラサイクリン系化学療法剤はがん細胞表面へのカルレチキユリン発現を増強し, そのレセプターを持つ樹状細胞への腫瘍抗原の取り込みによる抗腫瘍免疫誘導が報告されており, 化学療法剤や分子標的薬の免疫制御作用が期待されている<sup>28)~30)</sup>。

#### IV. がん幹細胞や上皮間葉転換がん細胞の免疫抵抗性と免疫抑制性

多様ながん細胞集団の中でも, 近年, 化学療法耐性でがん再発の原因になるがん幹細胞の存在が報告され, 免疫療法に

よる排除が期待されている。筆者らは、ヒト脳腫瘍幹細胞を排除できる可能性のあるSOX6抗原と特異的CTL (cytotoxic T cell) を同定したが、一方、がん幹細胞は免疫抵抗性である可能性も考えている。多発転移巣を持つ進行悪性黒色腫で培養T細胞を用いた養免疫療法による完全寛解後に、数年ごとに再発した症例を経験した<sup>31), 32)</sup>。本例では、再発したがん細胞には腫瘍抗原もHLAも発現しており、がん幹細胞様の休止期がん細胞が免疫抵抗性で、強力な免疫療法後も残存し、数年ごとに再発を繰り返した可能性が考えられた。そこで、ヒト悪性黒色腫細胞からSP (side population) 法で濃縮し、免疫不全マウスへの少数細胞の移植でも腫瘍形成を示した悪性黒色腫幹細胞様の細胞 (SP分画) の免疫抵抗性を検討したところ、non-SP分画と比較して、活性化NK細胞による傷害に抵抗性であり、その機序としてNK細胞レセプターの認識分子群や接着分子群の低下の関与が示唆された。また、ヒトがん幹細胞においては、TGF- $\beta$ やトリプトファン代謝酵素IDOを高発現することにより免疫抑制活性が高いとの報告もあるが、様々な異なる結果が報告されており、ヒトがん幹細胞の濃縮法が確立していない現時点では、結論が得られていない。

上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition ; EMT) は、E-カドヘリンの低下による上皮細胞からの離脱、細胞運動能の上昇やタンパク質分解酵素の分泌により、がんの浸潤・転移に関与することが判明している。筆者らは、TGF- $\beta$ -Snail誘導性EMTにおいては、がん細胞自体の浸潤能の充進に加えて、TGF- $\beta$ 、IL-10、TSP-1 (thrombospondin-1) などの免疫抑制性サイトカイン産生が充進して、DCのT細胞活性化能の低下や制御性樹状細胞 (DCreg) の誘導、さらにTGF- $\beta$ やTSP-1は直接的に、あるいはDCregを介してTregを誘導して、強力に免疫を抑制することを見いだした<sup>33)</sup>。マウス腫瘍モデルでは、Snail siRNAや抗TSP-1抗体を腫瘍内投与すると、DC機能の回復やTreg減少とともに、抗腫瘍エフェクターT細胞が誘導されて腫瘍増殖が抑制され、転移も減少した。すなわち、TGF- $\beta$ -Snail誘導性EMTでは、がん細胞の浸潤能充進に加えて、免疫抑制活性の増強により、転移が促進されることが判明した。また、マウス悪性黒色腫において、TGF- $\beta$ -Snail誘導性のEMTがん細胞は、抗腫瘍T細胞による傷害にも抵抗性を持つ

ていた。ヒト乳がんでは、EMTを起こしたがん細胞ががん幹細胞となることも示唆されており、がん幹細胞やEMT細胞が、がん細胞集団の中で、免疫抵抗性や免疫抑制性を一因として転移や再発に関与している可能性がある。

## おわりに

本稿では、ヒトがん細胞の免疫抵抗性と免疫抑制性の獲得機構とその多様な分子機序、また、がん転移との直接的・間接的な関与について紹介した。筆者らは、ヒトがん細胞の免疫学的排除を1つの目標として研究をしているが、その際、重要となる担がん生体免疫抑制機構の解明と是正法の開発は、がん転移機構の解明と制御法の開発と共通点を有しており、これらの研究によるがんの診断法や治療法の開発が期待できる。

## PROFILE

### 河上 裕

■ 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門 教授/同研究所所長  
■ E-mail : yutakawa@sc.itc.keio.ac.jp  
1980年慶應義塾大学医学部卒業。1984年同内科(血液)助手。1985年南フロリダ大学免疫学教室。1987年米国NIH国立がん研究所(NCI)外科。1989年カリフォルニア工科大学生物学教室。1990年米国NIH-NCI外科。1997年慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門教授。2005年同所長。

### 工藤千恵

■ 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門

### 塚本信夫

■ 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門

### 植田 良

■ 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門

### 住本秀敏

■ 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門

### 谷口智憲

■ 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門

## 文献

- 1) de Visser KE, et al: Nat Rev Cancer (2006) 6: 24-37
- 2) Joyce JA, et al: Nat Rev Cancer (2009) 9: 239-252
- 3) Murdoch C, et al: Nat Rev Cancer (2008) 8: 618-631
- 4) Psaila B, et al: Nat Rev Cancer (2009) 9: 285-293
- 5) Smyth MJ, et al: Adv Immunol (2006) 90: 1-50
- 6) Zou W: Nat Rev Cancer (2005) 5: 263-274
- 7) Gajewski TF, et al: Immunol Rev (2006) 213: 131-145
- 8) Dudley ME, et al: J Clin Oncol (2008) 26: 5233-5239
- 9) Johnson LA, et al: Blood (2009) 114: 535-546
- 10) Rosenberg SA, et al: Nat Med (1998) 4: 321-327
- 11) Rosenberg SA, et al: Nat Med (2004) 10: 909-915
- 12) Rosenberg SA, et al: J Immunol (2005) 175: 6169-6176
- 13) Campoli M, et al: Oncogene (2008) 27: 5869-5885
- 14) Sumimoto H, et al: J Exp Med (2006) 203: 1651-1656
- 15) Groh V, et al: Nature (2002) 419: 734-738
- 16) Zou W, et al: Nat Rev Immunol (2008) 8: 467-477
- 17) Kawasaki BT, et al: Trends Immunol (2008) 29: 464-468
- 18) Tsukamoto N, et al: Clin Cancer Res (2009) 15: 5733-5743
- 19) Muller AJ, et al: Nat Med (2005) 11: 312-319
- 20) Greenhough A, et al: Carcinogenesis (2009) 30: 377-386
- 21) Zou W: Nat Rev Immunol (2006) 6: 295-307
- 22) Gabilovich DI, et al: Nat Rev Immunol (2009) 9: 162-174
- 23) Mantovani A, et al: Hum Immunol (2009) 70: 325-330
- 24) Terabe M, et al: Adv Cancer Res (2008) 101: 277-348
- 25) Gobert M: Cancer Res (2009) 69: 2000-2009
- 26) Shields JD, et al: Science (2010) 328: 749-752
- 27) Yu H, et al: Nat Rev Immunol (2007) 7: 41-51
- 28) Suzuki E, et al: Clin Cancer Res (2005) 11: 6713-6721
- 29) Obeid M, et al: Nat Med (2007) 13: 54-61
- 30) Muller AJ, et al: Nat Rev Cancer (2006) 6: 613-625
- 31) Ueda R, et al: Int J Cancer (2009) 126: 919-929
- 32) Wang E, et al: J Invest Dermatol (2006) 126: 1372-1377
- 33) Kudo-Saito C, et al: Cancer Cell (2009) 15: 195-206

for beginners .....

- ・“癌細胞の免疫回避機構” 河上 裕ら: 感染・炎症・免疫39, 24-37 (2009)
- ・“なぜ、今自然免疫か?—自然免疫系細胞による癌進展の促進とその制御による癌治療の可能性” 河上 裕: Cancer Frontier11, 91-99 (2009)
- ・“ヒト腫瘍免疫学の進歩と癌免疫療法開発” 河上 裕: 細胞工学29, 267-273 (2010)

## The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies

Tomonori Yaguchi · Hidetoshi Sumimoto · Chie Kudo-Saito ·  
Nobuo Tsukamoto · Ryo Ueda · Tomoko Iwata-Kajihara ·  
Hiroshi Nishio · Naoshi Kawamura · Yutaka Kawakami

Received: 31 January 2011 / Revised: 14 February 2011 / Accepted: 14 February 2011 / Published online: 5 March 2011  
© The Japanese Society of Hematology 2011

**Abstract** Cancer-induced immunosuppression is a major problem as it reduces the anti-tumor effects of immunotherapies. In cancer tissues, cancer cells, immune cells, and other stromal cells interact and create an immunosuppressive microenvironment through a variety of immunosuppressive factors. Some cancer subpopulations such as cancer cells undergoing epithelial–mesenchymal transition and cancer stem-like cells have immunosuppressive and immunoresistant properties. The production of immunosuppressive factors by cancer cells is mechanistically attributed to oncogenic signals frequently activated in cancer cells, including the STAT3, MAPK, NF- $\kappa$ B, and Wnt/ $\beta$ -catenin signals, which are upstream events leading to immunosuppressive cascades. Moreover, some of these signals are also activated in immunosuppressive immune cells stimulated by cancer-derived factors and contribute to their immunosuppressive activities. Therefore, targeting these signals both in cancer cells and immunosuppressive immune cells may result in the restoration of immunocompetence in cancer patients and improve current immunotherapy.

**Keywords** Cancer immunotherapy · Immunosuppression · EMT · Cancer stem cell · Mesenchymal stem cell · Oncogenic signal

### 1 Introduction

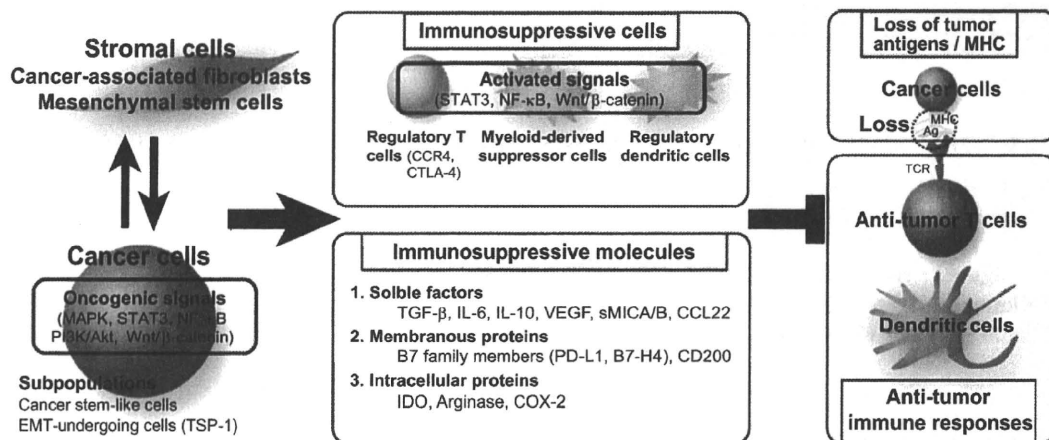
Immunoescape via immunosuppression and immunoresistance is one of the major malignant phenotypes of cancer cells as well as altered proliferation, survival, and invasion/metastasis. During the tumorigenesis, cancer cells interact with various immune cells and other stromal cells. It has recently been shown that these immune cells sometimes promote cancer cell proliferation and invasion during tumor development. In addition, cancer cells are shown to be eliminated by immune system in mouse tumor models (immunosurveillance). However, selective growth of cancer cells which acquired immunosuppressive and immunoresistant abilities due to their genetic instability occurs. The process is called cancer immunoediting. Finally, clinically apparent cancer cells are believed to have acquired immunoresistant features through a variety of mechanisms such as reduced immunogenicities and inducing immunosuppressive molecules and cells (Fig. 1). In fact, many immunotherapies such as cancer vaccines often showed insufficient anti-tumor effects partly because of these immunoescaping mechanisms in patients [1], although T cell-based adoptive immunotherapies following lymphodepletive treatment, which is believed to reduce immunosuppressive conditions, had dramatic impacts on the advanced large tumors [2, 3]. In this mini-review, we discuss the mechanisms involved in the cancer cell-induced immunosuppression and possible strategies to overcome it.

---

T. Yaguchi (✉) · H. Sumimoto · C. Kudo-Saito ·  
N. Tsukamoto · R. Ueda · T. Iwata-Kajihara · H. Nishio ·  
N. Kawamura · Y. Kawakami  
Division of Cellular Signaling, Institute for Advanced  
Medical Research, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo, Japan  
e-mail: beatless@rr.iij4u.or.jp

Y. Kawakami  
e-mail: yutakawa@sc.itc.keio.ac.jp

H. Nishio  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Keio University School of Medicine,  
35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo, Japan



**Fig. 1** In cancer tissues, cancer cells, immune cells, and other stromal cells interact with each other and built an immunosuppressive microenvironment through the production of immunosuppressive molecules and the induction of immunosuppressive immune cells. Cancer cells directly escape from T cell recognition by loss of tumor antigens and MHC. Some cancer subpopulations such as EMT-undergoing cancer cells or cancer stem-like cells have

immunosuppressive and immunoresistant properties. Some oncogenic signals are activated and contribute to immunosuppressive activities both in cancer cells and in immunosuppressive immune cells. Thus, these signaling pathways are ideal targets for restoration of immunocompetence of cancer patients. *TCR* T cell receptor, *Ag* antigen, *MHC* major histocompatibility complex

## 2 Problems in the processing and presentation of tumor antigens

Cancer cells escape from T cell recognition by various mechanisms, including loss of tumor antigens, human leukocyte antigen (HLA), and other antigen-processing molecules such as TAP (transporter associated with antigen processing). Because cancer cells generally express multiple tumor antigens, the loss of some tumor antigens does not result in loss of antigenicity. The molecules associated with tumor survival and growth can be ideal tumor antigens because antigenic modulation (down-regulation) rarely occurs. The causes of HLA down-regulation include gene defects or mutations of HLA heavy chain and  $\beta$ 2-microglobulin, their low transcription, and the dysfunction of antigen-processing molecules. In human melanoma, loss of all HLA class I often occurs due to mutations of  $\beta$ 2-microglobulin [4]. Although recovery of HLA expression is difficult in the cases with the mutational changes, HLA down-regulation via epigenetic changes observed in breast and prostate cancers can be reversed with pharmacologic agents such as histone deacetylase (HDAC) inhibitors.

## 3 Immunosuppressive and immunoresistant properties of cancer cell subpopulations

Cancer tissues consist of heterogeneous cancer subpopulations. From the immunological aspects, we have been particularly interested in cancer stem cells (CSCs) and EMT (epithelial–mesenchymal transition)-undergoing

cancer cells. CSCs or cancer-initiating cells are small subpopulations which have the strong ability to initiate tumor by self-renewal and the multi-lineage differentiation ability [5]. CSCs are thought to be resistant to chemotherapies partly due to expression of ABC transporters which pump out the chemotherapeutic agents. Thus, possibility of immunotherapy to eliminate CSCs has been exploited. Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) specific for SOX2, which is reported to be expressed in CSCs, may eliminate SOX2-positive cancer stem-like cells in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), a precursor lesion to multiple myeloma [6]. We have identified that SOX6 might be expressed in human glioma stem-like cells enriched by sphere forming methods, which had high tumor-initiating ability and differentiation ability to both glial cells and neurons, and SOX6-specific CTL could lyse the glioma stem-like cells [7]. However, CSCs may also have immunoresistant property in some cases. We had experienced a patient with malignant melanoma who suffered from repeated recurrences even after complete remission by T cell-based immunotherapies over a decade [8]. In this case, dormant cancer stem-like cells might be resistant to the immunotherapy and repeatedly relapsed. We also found that some cancer stem-like cells enriched by the side population method defined by Hoechst dye exclusion showed high tumorigenicity in immunodeficient and relatively strong resistance to CTLs.

Recently, human breast cancers under EMT were reported to have the similar phenotypes to CSCs [9]. EMT is involved in cancer cell invasion and metastasis through

loss of E-cadherin-dependent cell–cell adhesion and increased invasion ability induced by EMT-related transcriptional factors such as Snail, Slug, Twist, and ZEB. We then evaluated immunologic properties of snail-induced EMT cancer cells and found that EMT melanoma were relatively resistant to CTLs [10]. In addition, the snail-induced EMT cancer cells induced immunosuppression via multiple mechanisms, including the production of immunosuppressive cytokines such as TGF- $\beta$ , IL10, and TSP-1, impairment of dendritic cells (DCs), and induction of regulatory T cells (Treg). Intratumoral administration of Snail-1-specific siRNA or anti-TSP-1 Ab resulted in tumor growth inhibition accompanied by the recovery of DC function, the reduction of Tregs, and the induction of tumor-specific CTL. These observations suggest that cancer cell subpopulations, CSC, and EMT-undergoing cancer cells have immunoresistant and immunosuppressive properties and that we may need additional interventions to eliminate these cancer subpopulations.

#### 4 Expression of immunosuppressive molecules by cancer cells

##### 4.1 Immunosuppressive molecules expressed by cancer cells

Cancer cells express a variety of immunosuppressive cytokines and chemokines such as TGF- $\beta$ , IL6, IL10, and VEGF, which directly suppress DCs or effector T cells [11]. Moreover, cytokines such as TGF- $\beta$  and IL10 can induce immunosuppressive immune cells such as regulatory DCs (DCregs) and Tregs. DCregs can also induce Tregs, which amplifies the loop cascade in building an immunosuppressive cancer microenvironment. These immunosuppressive cytokines and chemokines are produced not only by cancer cells but also by tumor-infiltrating immune cells. Soluble MICA/B (MHC class I chain-related A, B), a membrane ligand of NKG2D, are shed from some cancer cells, down-regulate NKG2D expression on NK cells and T cells and suppress their functions [12]. A variety of human cancers ectopically express inhibitory B7 family members, PD-L1 and B7-H4, and inhibit anti-tumor T cells [13]. A clinical trial using MDX-1106, a humanized antibody against PD-1, a receptor for PD-L1, was conducted for patients with various cancers, and some partial response (PR) and complete response (CR) cases were observed [14].

Ectopic expression of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) which suppresses the T cell function through catabolizing tryptophan, an essential amino acid for T cell proliferation and differentiation, has been reported in various cancers and the tumor-infiltrating DCs. Administration of IDO inhibitors, methyl-tryptophan (1-MT) and methylthiohydantoin-

tryptophan (MTH-Trp) [11], combined with paclitaxel induced the regression of mouse breast carcinomas, and a phase I clinical trial using 1-MT is currently being carried out. Arginase (ARG), an enzyme catabolizing arginine important for immune cell function, is also over-expressed in cancer microenvironment by cancer cells and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and tumor-associated macrophages (TAMs) and is involved in immunosuppression.

Expression of CD200, a type-1 membrane glycoprotein, which was reported to have multiple immunosuppressive abilities, including reduction of Th1 cytokine production and T cell activation, and induction of DCregs and Tregs [15], has been found in several human cancer cells, including ovarian cancers, melanoma, and leukemia. CD200 is implicated as a prognostic factor in multiple myeloma [15] and acute myeloid leukemia [16]. Since CD200 is expressed in hair follicle bulge stem cells [17] and embryonic stem cells [18], and possibly in cancer stem cells of prostate, breast, brain, and colon cancers [19], CD200 may be involved in immune evasion mechanisms of cancer stem cells.

##### 4.2 Oncogenic signals inducing production of immunosuppressive molecules

Recently, we and others have reported that the production of immunosuppressive molecules such as TGF- $\beta$ , IL10, VEGF, and IL6 were induced by constitutively activated oncogenic signals in human cancer cells and that inhibition of these signals by small molecule inhibitors or specific RNAi could reduce the production of multiple immunosuppressive cytokines simultaneously [20, 21]. MAPK signals, which are frequently activated by mutated BRAF<sup>V600E</sup> in human melanoma, were involved in the production of IL6, IL10, and VEGF, and treatment of BRAF<sup>V600E</sup>-specific RNAi or MEK inhibitors inhibited these cytokine productions [20]. Immunization with MEK-depleted cancer cells could induce anti-tumor cytotoxic T cells in vivo compared with control cancer cells in the mouse tumor model. CD200 has been reported to be induced by the activated MAPK signal in human melanoma, and it may be one of the immunosuppressive effector molecules in the MAPK-activated cancer cells [22].

Inhibition of STAT3, which are frequently activated in various human cancers, also showed reduced immunosuppressive cytokine productions [20, 21]. Systemic administration of STAT3 inhibitors not only inhibited tumor growth and the production of immunosuppressive cytokines but also induced the production of inflammatory cytokines and chemokines, leading to augmentation of DC function and CTL induction [23]. We found that Wnt/ $\beta$ -catenin signal was frequently activated in human

melanoma and involved in the production of immunosuppressive cytokines (Yaguchi et al., manuscript in submission). In human glioma, PI3K/Akt signal is involved in PD-L1 expression [24]. To identify signaling pathways associated with the production of immunosuppressive molecules in human cancer cells, we performed a comprehensive screening using RNAi libraries and found a novel kinase involved in TGF- $\beta$  and IL10 production. New potential signaling targets for restoring immunocompetence may be identified by this technique.

Some signaling pathways mentioned above are also activated in immunosuppressive immune cells. Cancer-derived factors present in cancer tissue microenvironment such as VEGF, IL6, and IL10 activate STAT3 in tumor-infiltrating DC and MDSC, and induced their immunosuppressive functions [21]. Inhibition of STAT3 in these immune cells renders them resistant to cancer-derived factors as well as enhancing production of cytokines such as IL12 due to blockade of negative feedback mechanism of cytokine production by DC (Iwata et al., manuscript in revision). Wnt/ $\beta$ -catenin is also reported to be involved in the generation of DCregs [25] and the enhancement of Treg survivals [26]. Thus, targeting STAT3 or Wnt/ $\beta$ -catenin both in cancer cells and these immunosuppressive immune cells may result in restoration of immunocompetence of cancer patients. These observations indicate that inhibitors on these signaling molecules upstream of immunosuppressive cascades may be useful for improving current immunotherapies by simultaneous inhibition of multiple immunosuppressive mechanisms, in addition to their direct inhibiting effects on cancer cells (Fig. 1).

When signal inhibitors are used for cancer treatment, their adverse effects on normal cells including T cells need to be considered. For example, as MAPK signal is also utilized by T cell proliferation, the MAPK signal inhibition may also reduce the anti-tumor immune T cell responses. However, cancer cells harboring BRAF<sup>V600E</sup> are more depending on MAPK signaling than normal cells, and more sensitive to MEK inhibitors [27], indicating possible use of appropriate dose of MAPK inhibitors without inhibiting anti-T cell responses. In addition, new BRAF inhibitors such as PLX4032 and GSK2118436 which have higher inhibitory activity on the mutant BRAF<sup>V600E</sup> over wild-type BRAF have recently been developed, and their administration demonstrated significant anti-tumor activity on patients with the mutant BRAF<sup>V600E</sup> in clinical trials [28, 29]. Thus, the mutant BRAF-selective inhibitors are attractive reagents for combined use with immunotherapy. Administration of multi-kinase inhibitor, sunitinib, which has direct anti-tumor effects on RCC cancer cells, has shown to induce Th1 responses accompanied by reduction of MDSC and Treg [30, 31]. Therefore, signal inhibitors may be useful for reversal of cancer-induced

immunosuppressive condition without inhibiting anti-tumor T cell responses.

## 5 Cells responsible for immunosuppression in cancer microenvironment

### 5.1 Immunosuppressive immune cells

A variety of immunosuppressive immune cells, including Tregs, MDSCs, TAMs, and DCregs, are involved in generation of cancer microenvironment [11]. Tregs include CD4+ CD25+ FOXP3+ Tregs, which are divided into two groups, natural occurring Tregs and peripherally induced Tregs, IL10-producing Tr1 cells, and TGF- $\beta$ -producing Th3 cells. In both mouse experiments and cancer patients, Tregs increased in tumor tissues, draining lymph nodes, and peripheral blood. High ratio of FOXP3+ Tregs versus CD8+ effector T cells in tumor tissues was reported to be correlated with poor prognosis of cancer patients [32]. TGF- $\beta$  and IL10 produced by cancer cells and DCregs induce Tregs. We observed that Treg is involved in the immunosuppression during snail-induced EMT [10] and that depletion of Treg is important for DC-based immunotherapy [33]. Depletion of Tregs or inhibition of their suppressive activity has been attempted by targeting cell surface molecules predominantly expressed in Tregs, such as CD25, CTLA4, GITR, and OX40 [34]. Recently, it has been showed in a phase III clinical study that patients with metastatic melanoma who received an antibody to CTLA-4 (Ipilimumab) with or without a gp100 vaccine survived nearly 4 months longer than those who received the gp100 vaccine alone [35]. CCL22 produced by cancer cells and macrophages plays an important role in the recruitment of CCR4-expressing Tregs [36]. A humanized anti-CCR4 Ab has recently been developed and shown anti-tumor effects on CCR4-expressing ATL (adult T cell leukemia) in clinical trials [37]. Considering that CCR4 is also expressed on Tregs and Th2 cells, both of which have negative impacts on anti-tumor immune responses, we are currently evaluating whether the anti-CCR4 Ab is useful for reversal of immunosuppressive condition in tumor-bearing hosts.

The MDSCs are heterogeneous populations of the cells derived from immature myeloid cells and show abilities to suppress the T cell function. In mice, MDSCs are identified as Gr1+ CD11b+ cells. But, in humans, specific markers have not been identified, and combinations of several markers are suggested, such as Lin- HLA-DR- CD33+ or CD14- CD11b+ CD33+ [38]. MDSCs are induced in peripheral blood, spleens, and tumor tissues in both cancer patients and tumor-bearing mice. T cell dysfunction is induced by MDSCs via various molecules, including IL10, TGF- $\beta$ , reactive oxygen species (ROS), arginase, and



nitric-oxide synthase (NOS). We observed that STAT3 and NF- $\kappa$ B contribute to MDSC's expansion and immunosuppressive function (Nishio et al., manuscript in preparation; Iwata et al., manuscript in preparation). Administration of a NF- $\kappa$ B inhibitor to tumor-bearing mice inhibited the immunosuppressive function of MDSC. A variety of therapeutic strategies to reduce immunosuppression by MDSC are currently explored. The mechanisms of the MDSCs depletion include promoting myeloid-cell differentiation, inhibiting MDSC expansion, and inhibiting MDSC function using diverse reagents including all-*trans* retinoic acid (ATRA), vitamin D3, anti-VEGF Ab, chemotherapies such as gemcitabine and doxorubicin, COX-2 inhibitor, sunitinib (tyrosine kinase inhibitor), and sildenafil (phosphodiesterase-5) [38].

Dendritic cells are professional antigen-presenting cells that are indispensable for the induction of antigen-specific anti-tumor immune responses. But DCs become functionally defective both in tumor sites and peripheral blood due to tumor-derived immunosuppressive factors such as IL6, IL10, VEGF, TGF- $\beta$ , and PGE2. Moreover, we and others found that DCs showing immunosuppressive phenotypes including Treg induction are induced in tumor-bearing hosts, such as high IL10-producing DCs, IDO-expressing DCs, and PD-L1-expressing DCs [10, 11]. As for plasmacytoid DCs (pDCs), they also show immunosuppressive phenotypes in tumor sites, such as low Type I interferon (IFN) production and the ability to induce Treg. We found that ILT-7 ligands expressed on human cancer cells suppressed the pDC function to produce type I IFN [39].

## 5.2 Other immunosuppressive stromal cells

Tumor tissues consist of cancer cells and a variety of stromal cells including immune cells, fibroblasts, adipocytes, vascular endothelial cells, and mesenchymal stem cells. These cancer-associated stromal cells may contribute to the malignant phenotypes of cancer cells, such as transformation, tumor growth and survival, invasion, and immunosuppression. Major stromal cells other than immune cells in cancer microenvironment are fibroblasts and mesenchymal stem cells (MSCs), which originate from surrounding normal tissues and bone marrow [40, 41]. The fibroblasts from tumor tissues show activated phenotypes similar to fibroblasts involved in wound healing and have been termed cancer-associated fibroblasts (CAFs). TGF- $\beta$ , PDGF, and FGF2 secreted from cancer cells activate fibroblasts, which have generally been considered as the major source of CAFs [42].

The CAFs produce a variety of soluble factors, including classical growth factors such as HGF, EGF, and TGF- $\beta$  and angiogenesis stimulators such as VEGF, FGF, and CTGF,

all of which directly and indirectly enhance the ability of tumor progression [40, 43]. Recently, CAFs are reported to produce chemokines such as CXCL12 (SDF-1) [44] or CXCL14 [45], which recruit bone marrow-derived endothelial precursor cells or macrophages to cancer tissues. Additionally, it has recently been reported that CAFs themselves harbored gene mutations in p53 [46]. Altogether, through production of these molecules, CAFs have strong influences on building cancer microenvironment. Considering CAFs produce immunosuppressive molecules such as TGF- $\beta$  and VEGF, CAFs may also be associated with cancer immunoescape. Actually, CAF depletion by a DNA vaccination targeted to fibroblast activation protein resulted in a shift of the immune microenvironment from a Th2 to Th1 polarization accompanied by up-regulation of IL2 and IL7 and decrease of MDSCs, TAMs, and Tregs [47]. However, the molecular mechanism leading to CAF-induced immune suppression still remains to be elucidated.

Mesenchymal stem cells are heterogeneous subsets of stromal stem cells that can differentiate into a variety of mesenchymal cells such as adipocytes, chondrocytes, and osteocytes. Although the major source of the MSCs is a bone marrow, MSCs can be isolated from many adult tissues and can be recruited at sites of injury and inflammation, where they contribute to tissue remodeling. Recently, MSCs are reported to migrate into tumor tissues from bone marrow and can be one of the major sources of CAF [48–50]. A variety of growth factors, cytokines, and chemokines in cancer microenvironment such as EGF, HGF, bFGF, PDGF, VEGF, and IL-8 can recruit MSC into tumors [51]. When incorporated into tumor tissues, MSCs have anti-apoptotic effects on cancer cells, promote tumor vascularization by producing VEGF [51], and promote their invasion and metastases by producing CCL5 [52]. Moreover, MSCs may also be involved in immunosuppression during the tumor development. By producing immunosuppressive molecules such as TGF- $\beta$ , IDO, IL10, IL6, and prostaglandin E2, MSCs show immunosuppressive effects on a variety of immune cells, including inhibition of T cell proliferation, dendritic cell maturation, NK cell activation, and induction of Tregs [53]. Clinical trials of MSC administration for patients with steroid-resistant severe graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic bone marrow transplantation have been performed, and it reduced occurrence of GVHD [54]. Co-injection of MSC cell lines allowed cancer cells grow in allogeneic recipients along with the inhibition of lymphocyte infiltration into the tumor tissues [55]. We have also confirmed the MSC infiltration into tumor tissues and are currently investigating the molecular mechanisms for the MSC-induced immunosuppression in tumor microenvironments.

## 6 Concluding remarks

Immunoescaping ability of cancer cells is now believed to be one of the important malignant phenotypes of cancer cells. Correction of the immunosuppressive microenvironment of cancer patients may lead to better anti-tumor effects of cancer treatment, particularly immunotherapy. Modification of anti-tumor immune responses in patients by targeting the immunoregulatory molecules, including CTLA-4, PD-1, and IDO, has recently been in progress, and some promising results have already been observed. Therefore, appropriate combination of immunotherapy and the modification of immunosuppressive condition is a really promising strategy. In addition, personalized immunotherapies may also be ideal where appropriate combinations can be chosen for each patient because of the differential mechanisms of immunosuppression among patients. Further understanding of the mechanisms for the cancer-induced immunosuppression and development of methods to overcome them is critical to improve current cancer treatment.

## References

- Rosenberg SA, Yang JC, et al. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004;10:909–15.
- Dudley ME, Yang JC, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol.* 2008;26:5233–9.
- Kawakami Y, Fujita T, et al. Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci.* 2004;95:784–91.
- Campoli M, Ferrone S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene.* 2008;27:5869–85.
- Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science.* 2009;324:1670–3.
- Spisek R, Kukreja A, et al. Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med.* 2007;204:831–40.
- Ueda R, Ohkusu-Tsukada K, et al. Identification of HLA-A2- and A24-restricted T-cell epitopes derived from SOX6 expressed in glioma stem cells for immunotherapy. *Int J Cancer.* 2009;126:919–29.
- Wang E, Voiculescu S, et al. Clonal persistence and evolution during a decade of recurrent melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1372–7.
- Mani SA, Guo W, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133:704–15.
- Kudo-Saito C, Shirako H, et al. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell.* 2009;15:195–206.
- Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:263–74.
- Groh V, Wu J, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002;419:734–8.
- Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:467–77.
- Brahmer JR, Drake CG, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol.* 2010;28:3167–75.
- Kawasaki BT, Farrar WL. Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion. *Trends Immunol.* 2008;29:464–8.
- Tonks A, Hills R, et al. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2007;21:566–8.
- Ohyama M, Terunuma A, et al. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest.* 2006;116:249–60.
- Moreaux J, Hose D, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2006;108:4194–7.
- Kawasaki BT, Mistree T, et al. Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;364:778–82.
- Sumimoto H, Imabayashi F, et al. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med.* 2006;203:1651–6.
- Yu H, Kortylewski M, et al. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:41–51.
- Petermann KB, Rozenberg GI, et al. CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest.* 2007;117:3922–9.
- Kortylewski M, Kujawski M, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med.* 2005;11:1314–21.
- Parsa AT, Waldron JS, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med.* 2007;13:84–8.
- Manicassamy S, Reizis B, et al. Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science.* 2010;329:849–53.
- Ding Y, Shen S, et al. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. *Nat Med.* 2008;14:162–9.
- Solit DB, Garraway LA, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature.* 2006;439:358–62.
- Kefford R, Arkenau H, et al. Phase III study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. *J Clin Oncol.* 2010;28:8503.
- Flaherty KT, Puzanov I, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:809–19.
- Hipp MM, Hilf N, et al. Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses. *Blood.* 2008;111:5610–20.
- Ozao-Choy J, Ma G, et al. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.* 2009;69:2514–22.
- Salama P, Phillips M, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:186–92.
- Udagawa M, Kudo-Saito C, et al. Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryoablative tumor pretreatment and Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton stimulation. *Clin Cancer Res.* 2006;12:7465–75.
- Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer.* 2010;127:759–67.
- Hodi FS, O'Day SJ, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:711.

36. Curiel TJ, Coukos G, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004;10:942–9.
37. Yamamoto K, Utsunomiya A, et al. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28:1591–8.
38. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:162–74.
39. Tsukamoto N, Okada S, et al. Impairment of plasmacytoid dendritic cells for IFN production by the ligand for immunoglobulin-like transcript 7 expressed on human cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5733–43.
40. Udagawa T, Wood M. Tumor-stromal cell interactions and opportunities for therapeutic intervention. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10:369–74.
41. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:392–401.
42. Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*. 2001;264:169–84.
43. Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth—bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19:67–73.
44. Orimo A, Gupta PB, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121:335–48.
45. Augsten M, Hagglof C, et al. CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:3414–9.
46. Patocs A, Zhang L, et al. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med*. 2007;357:2543–51.
47. Liao D, Luo Y, et al. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune micro-environment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One*. 2009;4:e7965.
48. Mishra PJ, Mishra PJ, et al. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res*. 2009;69:1255–8.
49. Kidd S, Spaeth E, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*. 2009;27:2614–23.
50. Direkze NC, Hodiola-Dilke K, et al. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res*. 2004;64:8492–5.
51. Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:249–61.
52. Karnoub AE, Dash AB, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449:557–63.
53. Uccelli A, Moretta L, et al. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:726–36.
54. Le Blanc K, Frassoni F, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371:1579–86.
55. Djouad F, Bony C, et al. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2006;82:1060–6.

# がんに対する免疫応答の細胞分子機構とその制御法

河上 裕 (慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門教授)

梶原-岩田知子 (慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門)

宮崎潤一郎 (慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門)

川村 直 (慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門)

## Point

- 免疫システムは、がん細胞の排除だけでなく、がん細胞の増殖浸潤転移を促進する作用もある。
- がん細胞に対しては、多様な正負の免疫応答が起こり、抗腫瘍免疫ネットワークを形成する。
- 臨床でみられるがん細胞は、免疫監視機構をすり抜けて、免疫抵抗性や免疫抑制性を獲得している。
- 免疫抵抗性をもつヒトがん細胞に対しても、総合的な免疫制御により、免疫によるがん排除が可能な場合がある。

免疫システムは、がん細胞を排除するだけでなく、がんの進展を促進することがわかってきた。がん形成過程において、がん細胞と各種免疫細胞、さらにその他の間質細胞との相互作用により、がん細胞自体、また担がん生体の免疫系は変化して、臨床でがんが認められる状況では、免疫では簡単にはがん細胞を排除できない状態になっている。しかし、最近の免疫学の進歩による免疫操作技術を駆使して総合的な免疫制御を行うことにより、ヒトの

進行がんであっても免疫によるがん細胞の排除も不可能ではないことがわかってきた。本稿では、科学的ながん免疫療法開発の基礎となるがんに対する免疫応答の細胞分子機構について概説する。

## がんの形成と免疫のかかわり

がん形成過程では、発生初期から、がん細胞と自然免疫系と獲得免疫系