

Table 3 Prediction of pCR using (a) simple logistic regression model, (b) multiple logistic regression model with Ki67

Factor	# pat	# res	OR	95 %CI	<i>p</i> value
(a)					
Age					
≤49	248	56	0.880	0.577–1.343	0.5534
≥50	229	57	1		
Initial tumor size					
≤2.0	29	7	1.047	0.409–2.682	0.9919
2.1–4.0	315	75	1.028	0.637–1.659	
≥4.1	133	31	1		
Axillary lymph node					
Positive	268	62	0.932	0.610–1.426	0.7467
Negative	209	51	1		
Menopausal status					
Pre	266	60	0.868	0.568–1.326	0.5135
Post	211	53			
Stage					
I/IIa	54	211	1.849	0.818–4.179	0.3355
IIb	51	215	1.671	0.738–3.786	
III	8	51	1		
Nuclear grading					
G1	78	9	0.240	0.112–0.517	<.0001
G2	229	46	0.463	0.293–0.731	
G3	162	57	1		
ER and/or PgR					
Positive	327	58	0.265	0.167–0.422	<.0001
Negative	116	52	1		
HER2					
Positive	62	33	4.552	2.604–7.958	<.0001
Negative	380	76	1		
Baseline of Ki67 (%)					
≥10	299	95	4.572	2.348–8.903	<.0001
<10	119	11	1		
Continuous	418		1.043	1.027–1.059	<.0001
TP-CI					
1 + , 2 + , 3+	282	73	1.715	0.851–3.456	0.1316
0	65	11	1		
2 + , 3+	119	33	1.332	0.801–2.213	0.2690
0, 1+	228	51	1		
TP-SI					
1 + , 2 + , 3+	324	84	4.025	0.929–17.438	0.0627
0	25	2	1		
2 + , 3+	197	59	1.979	1.182–3.315	0.0095
0, 1+	152	27	1		
OR	95 %CI	<i>p</i> value	Sensitivity specificity	ROC (95 % CI)	Contrast with final model
(b)					
Grading					
1	0.312	0.129–0.756	0.0027	Random cv	Apparent
2	0.461	0.274–0.773		Sen: 0.8113	0.7510

Table 3 continued

	OR	95 %CI	<i>p</i> value	Sensitivity specificity	ROC (95 % CI)	Contrast with final model
3	1			(0.6034, 0.8958)	(0.6999, 0.8021)	
ER and/or PgR						
Positive	0.384	0.230–0.642	0.0003			
Negative	1			Spe: 0.6097	Random cv	
HER2						
Positive	3.816	2.056–7.081	<.0001	(0.5517, 0.7391)	0.7353	
Negative	1				(0.6664, 0.7901)	
Grading						
1	0.402	0.163–0.991	0.00281	Random cv	Apparent	Apparent
2	0.536	0.316–0.909		Sen: 0.8000	0.7657	0.0147
3	1			(0.6599, 0.8889)	(0.7172, 0.8143)	(–0.0055, 0.0350)
ER and/or PgR						
Positive	0.413	0.247–0.692	0.0008			
Negative	1			Spe: 0.6458		
HER2						
Positive	3.522	1.890–6.563	<.0001	(0.5792, 0.7452)	Random cv	Random cv
Negative	1				0.7489	0.0168
Ki67 (%)						
≥10	2.718	1.331–5.549	0.0061		(0.6827, 0.7986)	(–0.0303, 0.041)
<10	1					
Grading						
1	0.418	0.169–1.035	0.0298	Random cv	Apparent	Apparent
2	0.530	0.312–0.900		Sen: 0.8333	0.7774	0.0264
3	1			(0.6735, 0.9400)	(0.7289, 0.8259)	(0.0015, 0.0513)
ER and/or PgR						
Positive	0.447	0.265–0.754	0.0026			
Negative	1			Spe: 0.6344	Random cv	Random cv
HER2						
Positive	3.794	2.038–7.065	<0.0001	(0.5063, 0.7713)	0.7607	0.0274
Negative	1				(0.6993, 0.8099)	(–0.0175, 0.0596)
Ki67 (continuous)	1.031	1.014–1.048	0.0004			

#*pat* number of patients, #*res* number of responders, *CI* confidence interval, *ER* estrogen receptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *OR* odds ratio, *PgR* progesterone receptor, *TP-CI* thymidine phosphorylase, interstitial, *TP-SI* thymidine phosphorylase, stromal

ER estrogen receptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *PgR* progesterone receptor, *OR* odds ratio

95 % CI 0.941–0.993; $p = 0.0125$), pCR, and post-treatment Ki67LI (pCR/Ki67 <10/≥10: HR 0.269, 95 % CI 0.110–0.655; $p = 0.0038$) were all significantly associated with DFS (Table 4).

Safety profile

The frequency of major adverse events (≥grade 3) of docetaxel/capecitabine and docetaxel group were as follows: leukopenia (36 and 34 %, respectively), neutropenia (38 and 34 %, respectively), febrile neutropenia (8 and 5 %, respectively), and hand-foot syndrome (15 and 2 %, respectively). Docetaxel/capecitabine was associated with more capecitabine-related toxicity, including hand-foot

syndrome, nausea, mucositis, and increased alanine aminotransferase. Six serious adverse events were reported for 3 patients in the docetaxel/capecitabine group (pneumonitic cough, muscle pain, neutropenia fever) and 3 patients in the docetaxel group (suicide, loss of eyesight of left eye, hematological toxicity). The event of suicide in the docetaxel alone group occurred after completion of treatment and was considered as unrelated to study treatment.

Discussion

We have presented results from a randomized study comparing preoperative capecitabine/docetaxel with docetaxel

Table 4 Hazard ratio for disease-free survival using a multiple cox model in landmark analysis

Factors	HR	(95 % CI)	<i>p</i> value
The final model			
Stage			
I/IIa	0.160	0.059–0.436	0.0016
IIb	0.390	0.170–0.893	
III	1		
ER and/or PgR			
Positive	0.468	0.235–0.932	0.0308
Negative	0.974	0.953–0.996	0.0193
TP-CP			
Continuous	1		
Extended model 1			
Stage			
I/IIa	0.170	0.065–0.444	0.0011
IIb	0.360	0.165–0.787	
III	1		
ER and/or PgR			
Positive	0.327	0.160–0.670	0.0023
Negative	1		
TP-CP			
Continuous	0.975	0.954–0.997	0.0253
pCR			
Responder	0.191	0.052–0.696	0.0121
Nonresponder			
Extended model 2			
Stage			
I/IIa	0.133	0.051–0.349	0.0002
IIb	0.308	0.134–0.706	
III	1		
ER and/or PgR			
Positive	0.441	0.221–0.878	0.0198
Negative	1		
TP-CP			
Continuous	0.974	0.953–0.996	0.0199
Treatment			
Completion	0.633	0.209–1.917	0.3560
Reduction	1.125	0.339–3.729	
Discontinuation	1		
Extended model 3			
Stage			
I/IIa	0.134	0.051–0.350	0.0002
IIb	0.309	0.135–0.706	
III	1		
ER and/or PgR			
Positive	0.439	0.220–0.878	0.0200
Negative	1		
TP-CP			
Continuous	0.974	0.953–0.996	0.0183

Table 4 continued

Factors	HR	(95 % CI)	<i>p</i> value
Treatment			
Completion	0.584	0.278–1.226	0.1554
Otherwise	1		
Extended model 4			
Stage			
I/IIa	0.153	0.056–0.419	0.0006
IIb	0.279	0.116–0.673	
III	1		
ER and/or PgR			
Positive	0.577	0.229–1.454	0.2433
Negative	1		
TP-CP			
Continuous	0.967	0.941–0.993	0.0144
p CR & PostKi67			
Responder	0.137	0.034–0.549	0.0140
PostKi67 < 10	0.388	0.143–1.052	
PostKi67 ≥ 10	1		
Extended model 5			
Stage			
I/IIa	0.144	0.051–0.404	0.0006
IIb	0.264	0.107–0.651	
III	1		
ER and/or PgR			
Positive	0.756	0.334–1.712	0.5030
Negative	1		
TP-CP			
Continuous	0.966	0.941–0.993	0.0125
pCR & PostKi67			
Responder	0.269	0.110–0.655	0.0038
PostKi67 < 10			
PostKi67 ≥ 10	1		
Extended model 5			
Stage			
I/IIa	0.200	0.072–0.561	0.0031
IIb	0.264	0.103–0.676	
III	1		
ER and/or PgR			
Positive	0.385	0.152–0.977	0.0445
Negative	1		
TP-CP			
Continuous	0.970	0.943–0.997	0.0301

ER estrogen receptor, HER2 human epidermal growth factor receptor 2, PgR progesterone receptor, OR odds ratio, TP-CP thymidine phosphorylase, plasma

alone after FEC in early-stage breast cancer, and have identified Ki67 as a predictive biomarker that may be used to identify patients likely to respond to this neoadjuvant regimen.

In contrast to previous reports, we observed no difference in the pCR rate between the docetaxel/capecitabine and the docetaxel group. Our observation was similar to that from the GeparQuattro study, in which docetaxel/capecitabine did not improve pCR rate in comparison to docetaxel after epirubicin/cyclophosphamide treatment in the neoadjuvant setting [21]. Although a 16 % pCR rate was expected in the docetaxel group based on previous observations [5], the pCR rate in our study was higher (24 %). The variation in clinical outcome may be attributed to the currently limited means with which to select patient subpopulations most likely to respond to a given treatment regimen.

The docetaxel/capecitabine regimen was less well tolerated than docetaxel alone, with withdrawal rates of 22.2 and 5.5 % and dose reduction rates of 33.1 and 5.9 %, respectively. Despite treatment withdrawals and dose reductions, achievement of higher pCR rates in the docetaxel/capecitabine group in comparison to the docetaxel group in this subpopulation suggests that dose reduction does not negatively impact capecitabine efficacy. Our data confirms a similar observation in a MBC study, which reported no significant effect on efficacy when dose reduction occurred in 65 and 36 % of patients receiving the docetaxel/capecitabine regimen and docetaxel alone, respectively. However, an increased risk of disease progression was seen in patients with a dose reduction to 50 % of the starting dose in the docetaxel group (HR 1.91) [15]. As reported by other groups [22], our data demonstrate that the capecitabine dose can be reduced to minimize adverse effects without compromising efficacy. It was, however, interesting to observe that patients who discontinued or received a dose reduction in the docetaxel/capecitabine group achieved a higher pCR compared with the docetaxel alone group, while there was no difference in pCR between both groups in patients that completed the study at the original dose. Although the reason for this observation is unclear, the observation that the relative dose intensity for docetaxel was significantly lower in the combination arm compared with the single agent docetaxel arm may at least in part, account for the lack of difference in pCR. In addition, levels of toxicity may have had an impact on drug delivery and thus, pCR.

In addition to comparing the efficacy of neoadjuvant docetaxel/capecitabine with docetaxel alone, our study also sought to identify biomarkers that can identify patients likely to respond to treatment with docetaxel/capecitabine in early-stage breast cancer. Previously identified biomarkers, such as nuclear grading, ER and/or PgR status, HER2 status and Ki67, correlated with pCR in our study, as in other published studies [23]. Of particular interest was pre-treatment Ki67LI, which had a strong correlation with pCR and added to the predictive value of the multivariate

logistic regression model. Indeed, data from several other studies suggest that high Ki67 levels in breast cancer are a predictive factor for pCR rate [5, 24–27]. This effect was present in our study, as patients with ≥ 10 % pre-treatment Ki67LI achieved a higher pCR rate in both the docetaxel/capecitabine (32.6 %) and docetaxel alone (31 %) groups, in comparison to patients with < 10 % pre-treatment Ki67LI (pCR rates 6.5, 12.3 %, respectively). These findings support the suggestion that detection of pre-treatment Ki67LI could identify patients most likely to benefit from neoadjuvant chemotherapy. The prognostic value of Ki67 was also confirmed in our study, as post-treatment Ki67LI and pCR were significantly associated with DFS using a multiple Cox model in a landmark analysis. Thus, prognostic and predictive value was detected for Ki67, showing it to be a feasible marker for development of individualized treatment options for early-stage breast cancer patients.

To our knowledge, this is the first multicenter randomized study showing that assessment of pre- and post-treatment Ki67 may be a useful tool in predicting pCR and DFS with neoadjuvant docetaxel treatment with or without capecitabine in patients with early-stage breast cancer. Although further studies are required, our data suggests that the routine detection of the Ki67 proliferation marker in early-stage breast cancer could be a useful prognostic tool for the identification of patients most likely respond to preoperative docetaxel with or without capecitabine. As such, in addition to the current leading parameters (ER, PgR, and HER2 status), we propose that Ki67 should be included in the list of required routine biological markers that are used to define treatment recommendations in patients with early-stage breast cancer. Indeed, detection of predictive biomarkers prior to chemotherapy is likely to prove to be of the greatest advantage for neoadjuvant chemotherapy.

Acknowledgments This study was made possible by the generous support and supply of knowledge by Product Research Department, Kamakura Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. and Sanofi K.K., Japan. This work was supported by an unconditional grant from Sanofi K.K., Japan.

Conflict of interest The authors have declared no conflicts of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

1. Wolmark N, Wang J, Mamounas E et al (2001) Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: 9-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* 30:96–102

2. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD et al (2008) Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol* 26(5):778–785
3. Rouzier R, Perou C, Symmans W et al (2005) Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11:5678–5685
4. Nolen B, Marks KJ, Ta'san S et al (2008) Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* 10:R45
5. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L et al (2011) Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* 11:486
6. Bear HD, Anderson S, Smith RE et al (2006) Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 24:2019–2027
7. Toi M, Nakamura S, Kuroi K et al (2008) Phase II study of preoperative sequential FEC and docetaxel predicts of pathological response and disease free survival. *Breast Cancer Res Treat* 110:531–539
8. Sawada N, Ishikawa T, Fukase Y et al (1998) Induction of thymidine phosphorylase activity and enhancement of capecitabine efficacy by taxol/taxotere in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 4:1013–1019
9. Miwa M, Ura M, Nishida M et al (1998) Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 34:1274–1281
10. Blum JL, Jones SE, Buzdar AU et al (1999) Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 17:485–493
11. Blum JL, Dieras V, Lo Russo PM et al (2001) Multicenter, phase II study of capecitabine in taxane-pretreated metastatic breast carcinoma patients. *Cancer* 92:1759–1768
12. Jinno H, Sakata M, Hayashida T et al (2010) A phase II trial of capecitabine and docetaxel followed by 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide (FEC) as preoperative treatment in women with stage II/III breast cancer. *Ann Oncol* 21:1262–1266
13. Natoli C, Cianchetti E, Tinari N et al (2007) A phase II study of dose-dense epirubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel plus capecitabine and pegfilgrastim support as preoperative therapy for patients with stage II, IIIA breast cancer. *Ann Oncol* 18:1015–1020
14. Lebowitz PF, Eng-Wong J, Swain SM et al (2004) A phase II trial of neoadjuvant docetaxel and capecitabine for locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:6764–6769
15. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S et al (2002) Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 20:2812–2823
16. Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K et al (1989) Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer* 59:943–947
17. Mikami Y, Ueno T, Yoshimura K, Tsuda H, Kurosima M, Masuda S et al. (2013) Inter-observer concordance of Ki67 labeling index in breast cancer. Japan Breast Cancer Research Group (JBCRG) Ki67 Ring Study. *Cancer Sci.* doi:10.1111/cas.12245
18. Stefanou D, Batistatou A, Nonni A, Arkoumani E, Agnantis NJ (2004) p63 expression in benign and malignant breast lesions. *Histol Histopathol* 19(2):465–471
19. Dewar R, Fadare O, Gilmore H, Gown AM (2011) Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology. *Arch Pathol Lab Med* 135(4):422–429
20. Werling RW, Hwang H, Yaziji H, Gown AM (2003) Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol* 27(1):82–90
21. von Minckwitz G, Rezai M, Loibl S et al (2010) Capecitabine in addition to anthracycline- and taxane-based neoadjuvant treatment in patients with primary breast cancer: phase III Gepar-Quattro Study. *J Clin Oncol* 28(12):2015–2023
22. Leonard R, O'Shaughnessy J, Vukelja S et al (2006) Detailed analysis of a randomized phase III trial: can the tolerability of capecitabine plus docetaxel be improved without compromising its survival advantage? *Ann Oncol* 17:1379–1385
23. Caudle AS, Ganzalez-Angulo AM, Hunt KL et al (2010) Predictors of tumor progression during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 28(11):1821–1828
24. Houssami N, Macaskill P, von Minckwitz G, Marinovich ML, Mamounas E et al (2012) Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer* 48(18):3342–3354
25. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM et al (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 11:174–183
26. Zhang GC, Qian XK, Guo ZB et al (2012) Pre-treatment hormonal receptor status and Ki67 index predict pathological complete response to neoadjuvant trastuzumab/taxanes but not disease-free survival in HER2-positive breast cancer patients. *Med Oncol* 29(5):3222–3231
27. Luporsi E, Andre F, Spyrtos F et al (2012) Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* 132(3):895–915

III がん薬物治療薬の作用機序

がん免疫療法・細胞療法

革新的がんワクチン, helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP) の開発とその作用

Development of an innovative cancer vaccine, helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)

北村 秀光¹ 富樫 裕二² 西村 孝司^{1,2}

Key words : がんワクチン治療, H/K-HELP がんワクチン, ヘルパー T 細胞, Th1 細胞, CTL

はじめに

1991 年のテリー・ブーン博士らによるがん抗原の発見¹⁾以来, アミノ酸 8-9 個からなるクラス I 結合性がん抗原キラーペプチド(ショートペプチド)を用いたがんワクチン治療が盛んに行われてきている。しかし, 最近, ショートペプチドと IFA のワクチンでは CTL が投与部位で死滅し, CTL メモリーが形成されず, 十分な抗腫瘍免疫が誘導できない機構が明確にされた²⁾。また, このショートペプチドによるトレランスはヘルパーペプチドの添加あるいはロングペプチドへの改変によって克服されることも示された。したがって, ここで紹介する, ヘルパーペプチドとキラーペプチドのハイブリッドロングペプチド, H/K-HELP は期せずしてこれらの条件を兼ね備えており, 今後, 更に革新的がんワクチンペプチドとして注目を集める可能性が高い。H/K-HELP は Melief ら³⁾によって開発された単にクラス I ペプチドを伸張した synthetic long peptide (SLP) より強い抗腫瘍活性を有しており, ロングペプチドゆえに, 投与部位の所属リンパ節においてのみ, プロフェッショナル DC によりヘルパー/キラーエピソードがプロ

セッシング, 提示され, 強力に抗原特異的な Th1, Tc1 を活性化してがんの拒絶をも誘導することができる理想的ながんペプチドワクチンと考えられる。

1 Helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP) ワクチンの開発と臨床研究への応用

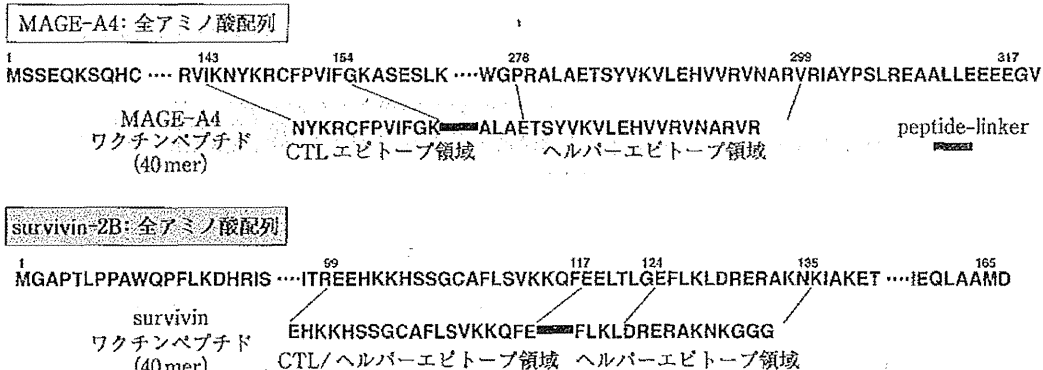
MHC クラス I 結合性がん抗原ペプチド (8-10 アミノ酸: ショートペプチド) を用いたがんワクチン治療の臨床研究が一般的に行われている⁴⁾。しかし, CTL を軸としたがん免疫治療は当初期待されたほどの有効な治療効果は報告されていない。①担がん生体における強い免疫抑制と②CTL の活性化のみに照準を合わせ, Th の活性化を無視していることが大きな要因と思われる。それに加え, 最近, ショートペプチドと IFA を用いたがんワクチン方法は最良の方法ではなく, CTL の死滅を誘導し, CTL メモリーは誘導されないことが示された²⁾。この負のワクチン効果は Th エピソードの添加やロングペプチドへの変換によって克服されることが証明された。すなわち, ヘルパーペプチドの存在とロ

がん薬物治療薬の作用機序

¹Hidemitsu Kitamura, ²Yuji Togashi, ^{1,2}Takashi Nishimura: ¹Division of Immunoregulation, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University 北海道大学遺伝子病制御研究所 免疫制御分野 ²Bioimmulance Co. Ltd. バイオイミュランス

ヘルパー T 細胞とキラー T 細胞の両者を活性化できる人工長鎖がんペプチドワクチン

Helper/Killer Hybrid Epitope Long Peptide (H/K-HELP) 40 mer



がん抗原	非小細胞がん	食道がん	大腸がん	胆道がん	黒色腫	卵巣がん	頭頸部がん	乳がん
MAGE-A4	28.4%	58.8%	30.0%	16.7%	20.0%	25.0%	42.9%	13.0%
survivin	83.5%	70.6%	63.5%	—	98.4%	—	80.0%	93.6%

HLA 抗原	発現頻度			発現頻度	
	日本人	白人		日本人	白人
MAGE-A4	DPB1*0501	64%	little	DRB1*0101	10%
	DRB1*1403	10%	0%	DR53	50%>
	DRB1*1501	20%	33%	DQB1*0601	30%
	DRB1*1502	19%	0.7%	DPB1*050	64%
	DRB1*0101	10%	15%		little
survivin					

図 1 Th1 細胞と CTL の両者を活性化する H/K-HELP の開発

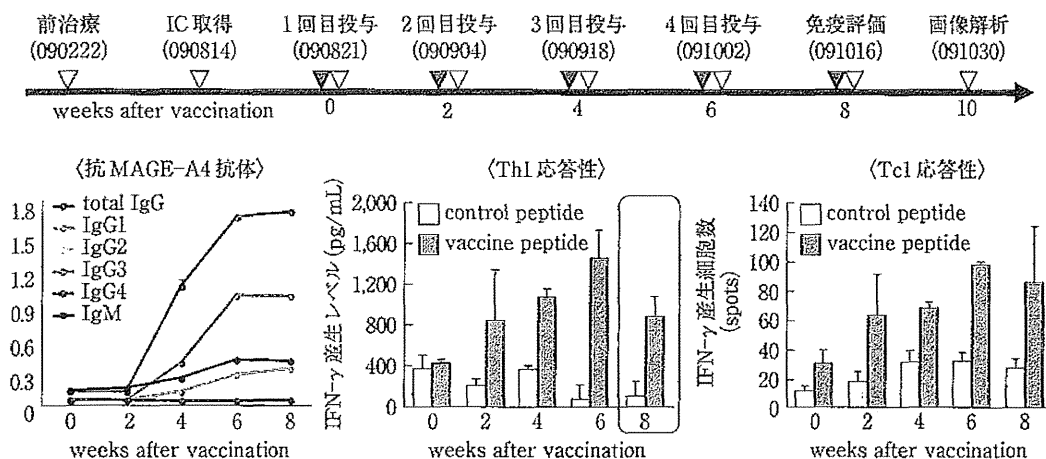
がん抗原である MAGE-A4 および survivin について、キラーエピトープとヘルパーエピトープを peptide-linker を用いて結合した 40 個のアミノ酸からなるロングペプチド(helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)) を作出した。MAGE-A4, survivin は多くのがん種で高頻度に発現が認められ、がん免疫治療の標的として非常に有用である。また、H/K-HELP 作成に用いたキラーエピトープ、ヘルパーエピトープは様々な HLA アレルへの拘束性を確認しており、ほぼ 100 % の日本人に適応可能である有効ながんワクチンペプチドである。

ングペプチドのデザインが優れたがんワクチン開発には重要であることが示された。

著者らは、MAGE-A4 や survivin ががん抗原から MHC クラス II がん抗原ヘルパーペプチドを単離し⁵⁾、ヘルパーエピトープとキラーエピトープを人工的に結合させた 40 アミノ酸からなる H/K-HELP を開発し(図 1)⁶⁾、その第一相試験を北海道大学病院を中心として終了している。OK-432 と Montanide をアジュバントとして用いて、MAGE-A4-H/K-HELP および Survivin-H/K-HELP がんワクチン治療の臨床研究を施行したところ、驚くべきことに、従来のキラー

T 細胞のみをターゲットとしたショートペプチドに比べ、ワクチン投与後、早期にがん特異 Th1 細胞、Tc1 細胞の活性化誘導が確認された。更に、がんペプチド特異的な抗体価も早期に上昇、特筆すべきは、Th1 依存的に誘導される IFN- γ 依存的にクラススイッチを起こす補体結合性の IgG1, IgG3 サブクラスのがん特異的抗体の上昇が確認された⁶⁾。これまで評価可能患者 11 例中 9 例で H/K-HELP 特異的な免疫反応が確認されている。この中には、トリプルネガティブの乳がん患者の制がん剤耐性、放射線耐性、頸部転移がんが CT 画像上消失する CR 1

a. MAGE-A4-H/K-HELP がんワクチン投与による大腸がん患者におけるがん特異的免疫応答の誘導



b. survivin-H/K-HELP がんワクチン投与による制がん剤耐性・放射線耐性の転移性乳がん患者の CR 例



図2 MAGE-A4-H/K-HELP および Survivin-H/K-HELP がんワクチンを用いた臨床研究

MAGE-A4-H/K-HELP の投与によって、がん患者生体内でペプチド特異的な抗体産生が誘導された。また、その抗体の種類は、Th1 (IFN- γ) 依存的にクラススイッチを起こす補体結合性 IgG1 および IgG3 サブタイプであることが確認された。更に、ペプチド特異的な Th1, Tc1 免疫応答も増強していたことから、H/K-HELP はがん患者生体内で効果的に Th1 依存的免疫応答を惹起できることが確認された(a) [北海道大学第一外科, 高橋先生, 藤堂教授との共同研究]。

また、survivin-H/K-HELP がんワクチン投与によって、制がん剤耐性・放射線耐性のトリプルネガティブ乳がん患者のリンパ節転移がん細胞が CT 画像上消失したことが確認された(b) [近畿大学外科, 奥野教授との共同研究]。

例、およびがんの増殖が抑えられた SD 1 例も観察された(図2)。この結果を受けて、著者らは、厚生労働省の創薬基盤研究推進事業で Survivin-H/K-HELP の大腸がん、乳がんに対する効果に関する第二相臨床研究を北海道大学と近畿大学で開始している。

2 ロングペプチド(H/K-HELP)がんワクチンはなぜ従来のショートペプチドより有効なのか？

従来のショートペプチドを上回る H/K-HELP のワクチン効果のメカニズム解明のため、著者らは再び、bedside から bench へと戻りマウス基盤研究を開始した。その結果、H/K-HELP とショートペプチドの間で、驚くべき免疫賦活機構の差異が示された(図3)。マウス足臓に



がん薬物治療薬の作用機序

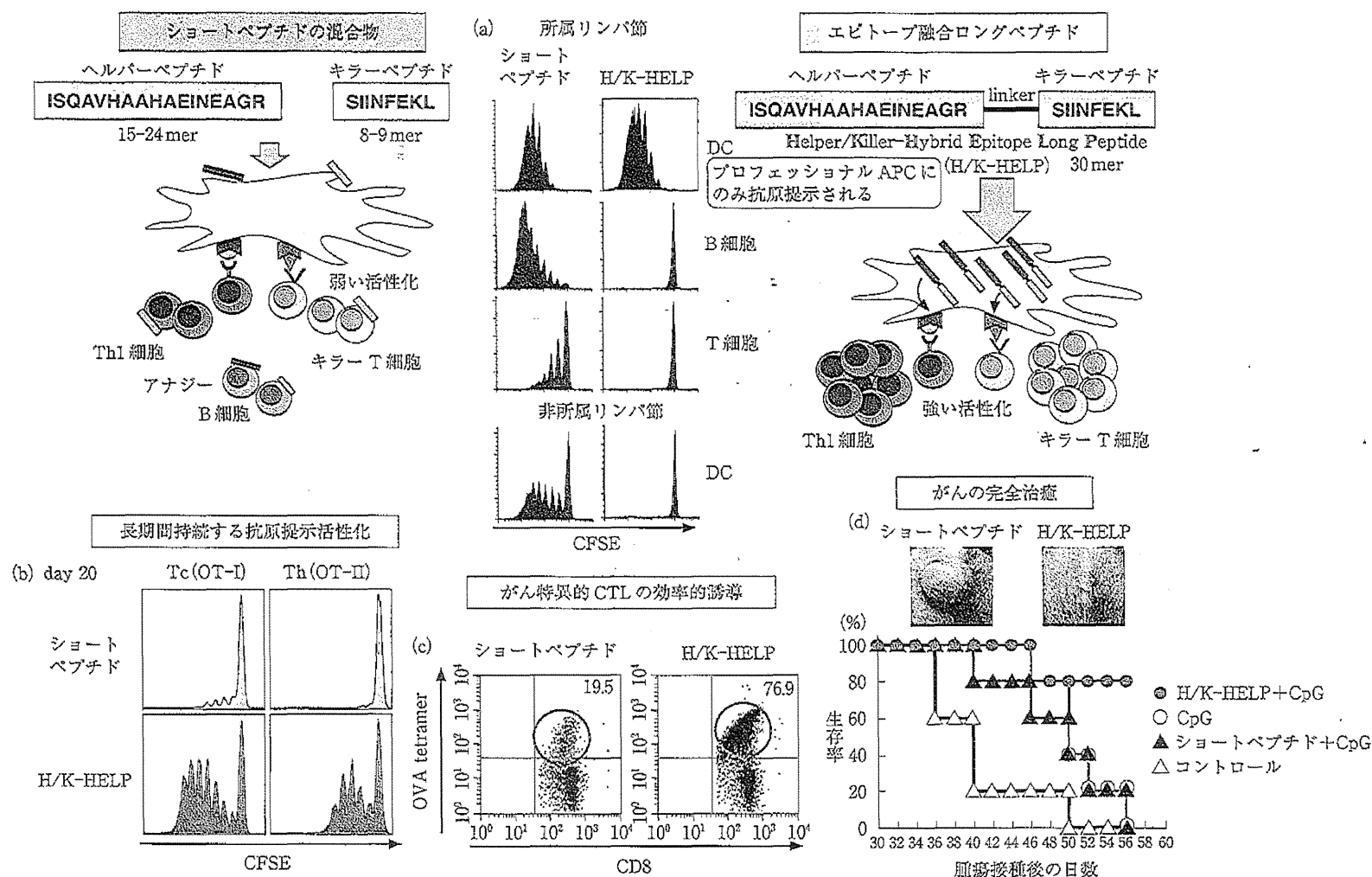


図3 H/K-HELP による抗腫瘍免疫増強の作用機序

- H/K-HELPががんワクチンの効果的な免疫賦活効果のメカニズムを解明するため、卵白アルブミン(OVA)のヘルパーエペイトープ、キラーエペイトープを peptide-linker で化学的に結合させ H/K-HELP を作成し、マウスモデルにおいて詳細な検討を実施した。
- H/K-HELP を足腫に投与、膝下リンパ節、遠隔リンパ節から APC を採取し、CFSE ラベル下 OT1 細胞と混合培養した。
 - CFSE ラベル OT1, OT2 を iv 投与し、所属リンパ節における抗原提示能の特長を検討した。所属リンパ節の DC 特異的に、かつ長期間、抗原提示されることが確認された。
 - また、マウス生体内においてショートペプチドに比べて、H/K-HELP で効果的に OVA 特異的 CTL が誘導された。
 - 担がんマウスを用いた治療実験では H/K-HELP がワクチンでは約 80 % のマウスで完全治癒が認められたがショートペプチドでは延命効果のみであった。

CpG をアジュバントとして、OVA-H/K-HELP あるいは OVA-ショートペプチド(ヘルパーエペイトープとキラーエペイトープの混合物)をワクチン接種し、投与後 36 時間後に所属リンパ節である膝下リンパ節あるいは遠隔リンパ節中に存在する抗原提示細胞について解析した(図3-a)。H/K-HELP は所属リンパ節のプロフェッショナル DC にのみ提示されていたのに対し、ショートペプチドは所属リンパ節の DC のみならず、T, B 細胞にも提示され、遠隔のリンパ節にまで抗原提示細胞が分布していた。ショートペプチドをパルスされた T 細胞や B 細胞は抗原特異的 T 細胞の分裂を惹起できるが、抗腫瘍免疫に重要な Th1 主導免疫を誘導する能力は DC に比べ著しく劣っていた。それに比べ、H/K-HELP の場合は、ロングペプチドゆえに DC の中に取り込まれてから提示され、抗原提示した DC は H/K-HELP を摂取した所属リンパ節のみにとどまるという、奇跡に近いほど魅力的なデータであった。30mer のアミノ酸からなり、MHC との直接的結合は不可能で、一度 DC に取り込まれてからプロセッシングされ、ヘルパーエペイトープとキラーエペイトープに切断され、DC 細胞表面上のクラス I, クラス II に提示され、対応する特異的 T 細胞を刺激する。担がん生体におけるがん治療過程では、所属リンパ節における「Treg と Th1 の攻防」が、その後のがん特異的 CTL 誘導を決定する重要因子であることを考慮すると⁷⁻⁹⁾、H/K-HELP が従来のショートペプチドと異なり、所属リンパ節の DC にのみ提示され、Th1 細胞、Tc1 細胞を効果的に誘導できることが、ヒト臨床研究で H/K-HELP で予想外の良い効果を示した理由の一つと考えられる。

図3-bに示したように、H/K-HELP ワクチンはショートペプチドに比べ、より長くワクチン効果が持続する。また H/K-HELP はショートペプチドに比べて、効果的にがん特異的テトラマー陽性のキラー T 細胞やヘルパー T 細胞を誘導でき、担がんマウスを完全治癒させることができる強い抗腫瘍免疫を誘導できることが示された(図3-c, -d)。

参考文献

- 1) van der Bruggen P, et al: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643–1647, 1991.
- 2) Hailemichael Y, et al: Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8⁺ T cell sequestration, dysfunction and deletion. *Nat Med* 19: 465–472, 2013.
- 3) Kenter GG, et al: Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361: 1838–1847, 2009.
- 4) Rosenberg SA, et al: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10: 909–915, 2004.
- 5) Ohkuri T, et al: Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br J Cancer* 100: 1135–1143, 2009.
- 6) Takahashi N, et al: First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci* 103: 150–153, 2012.
- 7) Nishimura T, et al: Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med* 190: 617–627, 1999.
- 8) Chamoto K, et al: An essential role of antigen-presenting cell/T-helper type 1 cell-cell interactions in draining lymph node during complete eradication of class II-negative tumor tissue by T-helper type 1 cell therapy. *Cancer Res* 66: 1809–1817, 2006.
- 9) Zhang Y, et al: Th1 cell adjuvant therapy combined with tumor vaccination: a novel strategy for promoting CTL responses while avoiding the accumulation of Tregs. *Int Immunol* 19: 151–161, 2007.



解 説

IL-17の各種疾病における役割と
樹状細胞を介した新たな免疫抑制機構*寺 田 聖** 喜 多 俊 行***
北 村 秀 光** 西 村 孝 司***

Key Words : helper T cell, Th17 cell, IL-17, immune-related diseases, immunosuppression

はじめに

CD4⁺ヘルパーT(Th)細胞は、免疫応答の制御の中核として重要な役割を果たしていることが知られている。近年、新たなThサブセットとして定義されたIL-17を産生するTh17細胞が自己免疫疾患の発症に強く関与していることが解明され、免疫バランスの新たなパラダイムが提唱されている(図1)。担癌生体におけるIL-17の機能については、まだ論争があるが¹、われわれは、IL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞が血管新生を亢進し、癌の増殖を促進していることを明らかにしてきた。このような血管新生の亢進を介した間接的なIL-17のprotumor作用は明らかになってきているが、IL-17の直接的な免疫抑制作用については明確にされていない。しかし、われわれは、最近IL-17が樹状細胞に直接作用して、Toll-like receptor (TLR)を介した樹状細胞の活性化を負に制御できることを見出した。本稿では、IL-17の癌を含む各種疾病における役割とIL-17の新たな免疫抑制機構について総説したい。

IL-17について

IL-17(IL-17A)は1993年にRouvierらによって発見され、当初はCTLA-8と呼ばれていた²⁾。その後、

IL-17と改名され、現在ではIL-17Aとして知られている。155個のアミノ酸で構成される糖蛋白質であり、ホモダイマー(35kDa)を形成して機能する²⁾。マウスのIL-17AはヒトのIL-17Aと62%の構造的な相同性を示し、共によく保存されている糖鎖修飾領域を持つ。また、近年、相同性検索によって、IL-17B~IL-17Fの5つのIL-17 family分子が同定されている。特に、IL-17AとIL-17Fは相同性が高く、これらをコードする遺伝子は同じ染色体上に位置する³⁾。

IL-17Aの受容体(IL-17R)は、1型膜貫通蛋白質であり、そのmRNAは肺、腎臓、肝臓、脾臓など幅広い発現が確認されている²⁾。また、IL-17Rの相同分子としてIL-17RB~IL-17REの4つの分子が同定されている³⁾。IL-17AがIL-17Rへ結合すると、Act1, TRAF6を介して、MAPK(p38, ERK, JNK)のリン酸化を誘導し、NF- κ B, AP-1が活性化化する。これらのシグナル経路を介して、繊維芽細胞や上皮細胞よりCXCL1, CXCL2, IL-6, TNF- α などのケモカイン、サイトカインが産生されることが報告されている^{3)~5)}。

大腸炎モデルの確立とIL-17の関与

リンパ球の減少した環境において、免疫の恒常性の維持のためにT細胞は生体内でhomeostatic

* The role of IL-17 in various immune-related diseases and its novel immunosuppressive mechanism.

** Satoshi TERADA, Toshiyuki KITA, Ph.D., Hidemitsu KITAMURA, Ph.D. & Takashi NISHIMURA, Ph.D.: 北海道大学遺伝子病制御研究所疾患制御部門免疫制御分野(〒060-0815 北海道札幌市北区北15条西7丁目); Division of Immunoregulation, Research Section of Disease Control, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0815, JAPAN

*** 北海道大学遺伝子病制御研究所ROYCE'健康バイオ

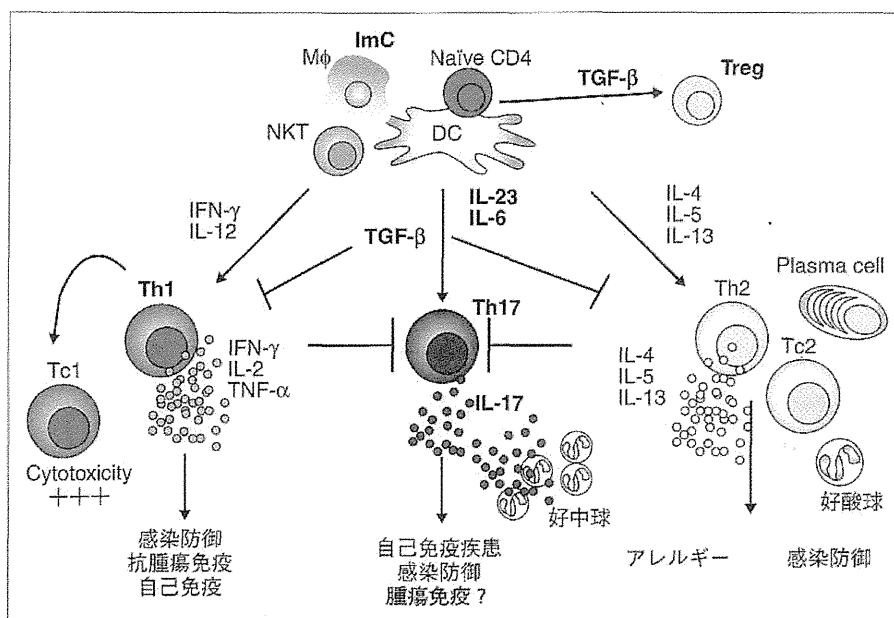


図1 免疫バランス制御の新しいパラダイム

CD4⁺ヘルパー T(Th)細胞は、免疫バランス制御の中核を担う細胞として広く知られており、産生するサイトカインパターンによってTh1細胞とTh2細胞とに分類されていた。長い間、このTh1/Th2細胞バランスを基にさまざまな免疫応答や疾患の発症メカニズムが説明されてきたが、Th1/Th2細胞だけでは説明しえない現象も多々存在していた。近年、新たなThサブセットとしてIL-17を産生するTh17細胞が発見され、免疫バランス制御の新しいパラダイムが提唱された。Th17細胞はIL-6とTGF-β存在下で誘導され、多くの自己免疫疾患に関与することが示されており、これまで不明であったメカニズムが明らかになりつつある。

proliferation(HP)を起こすことが広く知られている⁶⁾。このHPのメカニズムについてはすでに多くの研究がなされ、自己抗原由来のペプチドとMHCの複合体、さらにIL-7やIL-15といった生存因子によって制御されていることが証明されてきた⁷⁾。HPは、これらの因子の競合が存在しないSCIDマウス、またRag2^{-/-}マウスにT細胞を移入することで誘導できることは知られているが、この際、HPよりもはるかに速い速度で分裂を起こす細胞群が存在することが知られている。この速い分裂は2004年、William Paulによってspontaneous proliferation(SP)として定義され、これはHPとは違い、非自己由来の抗原に反応していることが示唆されているが、その詳細なメカニズムはまだ明らかになっていない⁸⁾。われわれはこのSPに注目し、CD8⁺T細胞の急速な増殖におけるIL-17の産生と自己免疫疾患への関与を検討した。

C57BL/6マウス由来のナイーブCD8⁺T細胞を

CFSEラベルし、Rag2^{-/-}マウスに移入して7日目にその分裂を解析すると、細胞分裂の非常に速いSPが腸間膜リンパ節で特異的に起こることをはじめて明らかとした。このSPは、IL-7、IL-15といった生存因子非依存的に起こることから、従来から知られていたHPとはまったく異なるメカニズムによって制御されていることがわかる。では、一体どのような因子によってこの早い細胞分裂は制御されているのだろうか？ Rag2^{-/-}マウスにおいて、腸間膜リンパ節でIL-6が特異的に発現している。このことから、IL-6のシグナルを遮断した状態において細胞分裂を検討したところ、HPにはほとんど影響がなかったのに対して、驚くべきことにSPは非常に強く抑制された。また、抗生剤を投与して腸内細菌叢に存在する抗生剤感受性細菌を除去したRag2^{-/-}マウスにおいても同様に早い分裂が抑制された。これらのことから、腸内細菌叢を認識したCD8⁺T細胞がIL-6シグナル依存的に急速な分裂(SP)を

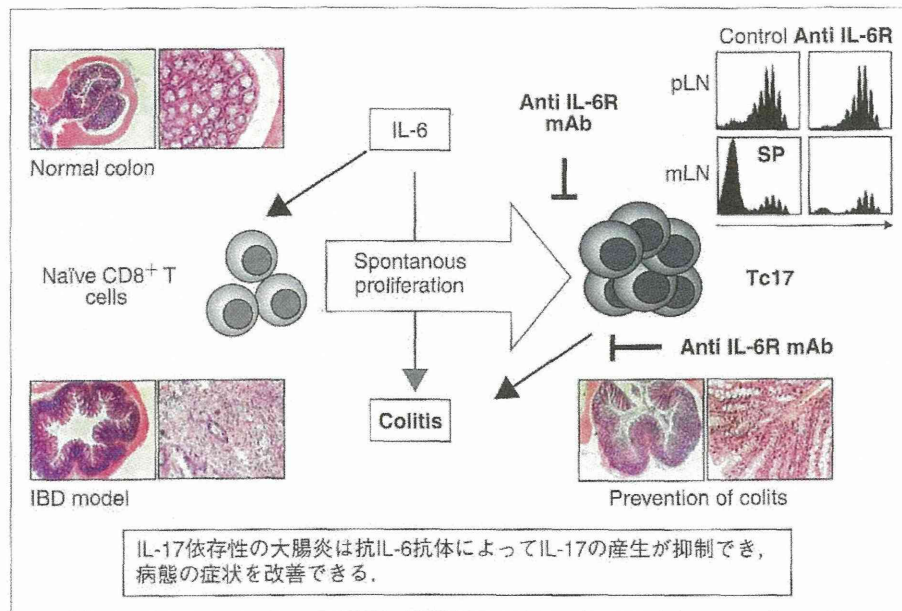


図2 CD8⁺T細胞のspontaneous proliferation(SP)を介した大腸炎モデル

リンパ球の減少した生体にT細胞を移入すると、恒常性維持のためにhomeostatic proliferation(HP)と呼ばれる分裂を起こす。また、リンパ球の減少した生体内の外来抗原を認識しHPよりも急速に分裂を起こすSPという現象の存在も明らかとなっている。ナイーブCD8⁺T細胞をRag2^{-/-}マウスに移入すると腸管膜リンパ節でのみSPが認められ、このSPは抗IL-6R抗体によって完全に抑制されることを見出した。ナイーブCD8⁺T細胞をRag2^{-/-}マウスに移入するとSPを介して大腸炎を発症し、抗IL-6抗体によってその発症が抑えられた。また、この大腸炎はIL-17^{-/-}由来のナイーブCD8⁺T細胞では発症せず、IL-17依存的な疾患であった。

起こすことが明らかになった。

さらに、SPを起こしたCD8⁺T細胞について詳しく検討したところ、effector/memory phenotypeを示し、IFN- γ やTNF- α だけでなく、IL-17も産生する細胞群であることがわかった。また、SPが腸管膜リンパ節で特異的に起こり、炎症性サイトカインを激しく産生していることより、クローン病(CD)や潰瘍性大腸炎(UC)に代表される炎症性腸疾患(IBD)への関与を検討したところ、Rag2^{-/-}マウスにC57BL/6マウス由来のナイーブCD8⁺T細胞を移入すると、体重減少とともに大腸組織への激しい細胞浸潤による強い炎症が認められた。リンパ球欠損マウスにナイーブCD4⁺T細胞を移入することで大腸炎をはじめとする種々の免疫疾患を誘導できることについてはすでに多くの報告がなされているが、このように、われわれはCD8⁺T細胞によって誘導される大腸炎モデルをはじめて確立した。

次に、この大腸炎モデルを用いて、SPと自己

免疫疾患の関連性を調べた。前述のように、CD8⁺T細胞のSPは抗IL-6R抗体投与によって完全に抑制される。そこで、ナイーブCD8⁺T細胞のSPと大腸炎の発症への関与を抗IL-6R抗体投与によって検討したところ、抗体投与によってSPを抑制することで、体重減少、および大腸組織への細胞浸潤が著しく抑制された。したがって、CD8⁺T細胞によって起こる大腸炎は、IL-6のシグナルを介して起こるSPによって誘導されていることが強く示唆された。さらに、抗IL-6R抗体投与によるCD8⁺T細胞の機能の変化について調べたところ、IL-17などの炎症性サイトカイン産生も抑制されることが明らかとなった。そこで、IL-17^{-/-}マウス由来のナイーブCD8⁺T細胞をRag2^{-/-}マウスに移入したところ、大腸炎の発症はほとんど認められなかった。したがって、CD8⁺T細胞による大腸炎の発症にIL-17が深く関与していることが示された。以上より、ナイーブCD8⁺T細胞をRag2^{-/-}マウスに移入することによって、腸

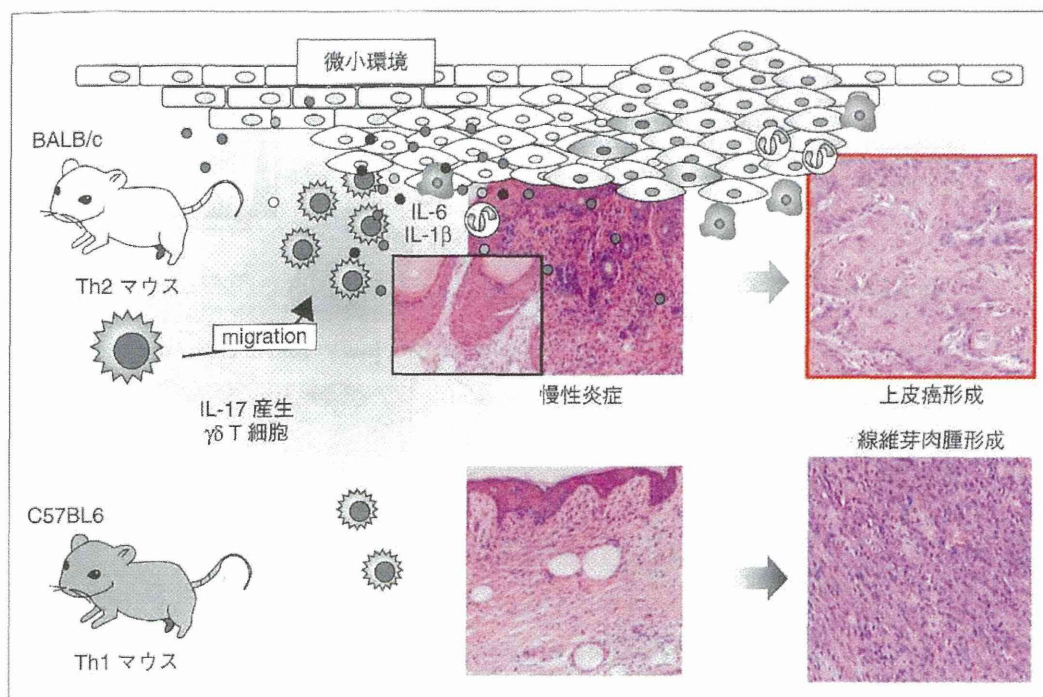


図3 遺伝的背景の差異により誘発される癌種が異なる

BALB/cマウスおよびC57BL/6マウスにメチルコラントレンをi.d.投与したところ、BALB/cマウスにはcarcinomaが誘発されたのに対し、C57BL/6マウスからはsarcomaが誘発される。

間膜リンパ節特異的にSPが引き起こされ、大腸炎を発症することが示された。さらに、抗IL-6R抗体投与によって、SPは完全に抑制され大腸炎も発症しないことが明らかとなった。以上、腸内細菌に特異的CD8⁺T細胞によって引き起こされる大腸炎は、IL-17依存的事であることが示された(図2)。しかし、CD4⁺T細胞のRag2^{-/-}マウス移入によってHP依存的に引き起こされる大腸炎は、IL-17^{-/-}マウス由来CD4⁺T細胞の移入によっても誘導され、CD4⁺T細胞依存的な大腸炎はIL-17非依存的であることが示された⁹⁾。

IL-17と癌、アレルギー

近年、腫瘍組織におけるIL-17の発現が数多く報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。そこで、IL-17と腫瘍形成の関連について検討したところ、IL-17^{-/-}マウスでは腫瘍内の血管新生が抑制され、腫瘍増殖が遅くなることが明らかとなった。したがって、担癌生体内で産生されるIL-17は腫瘍増殖をポジティブに制御していることが示された。さらに、腫

瘍組織内でIL-17を産生する細胞群を同定したところ、これまでIL-17を産生することが報告されているCD4⁺T細胞やCD8⁺T細胞ではなく、γδT細胞が主な産生細胞であることがわかった。また、腫瘍内のγδT細胞からのIL-17産生は抗IL-6R、抗TGF-β、抗IL-23p19抗体によって抑制されることより、これらのサイトカインが腫瘍内の微小環境においてIL-17産生を誘導し、腫瘍増殖に有利な環境形成を促していることが明らかとなった¹²⁾。また、C57BL/6マウスとBALB/cマウスにおいては、メチルコラントレンをi.d.投与した際、同じ投与方法にもかかわらず異なる種類の癌が誘発される。すなわち、BALB/cにおいてはcarcinomaが誘導されるが、C57BL/6マウスにおいては、sarcomaが誘導された。両マウスの遺伝的背景の違いにより、発癌剤投与部位で異なる炎症反応が惹起され、結果として異なる種類の癌が発生したのであろう(図3)。

Th17細胞やTc17細胞が抗腫瘍エフェクターとして働くという報告もあるが、そのほとんどは

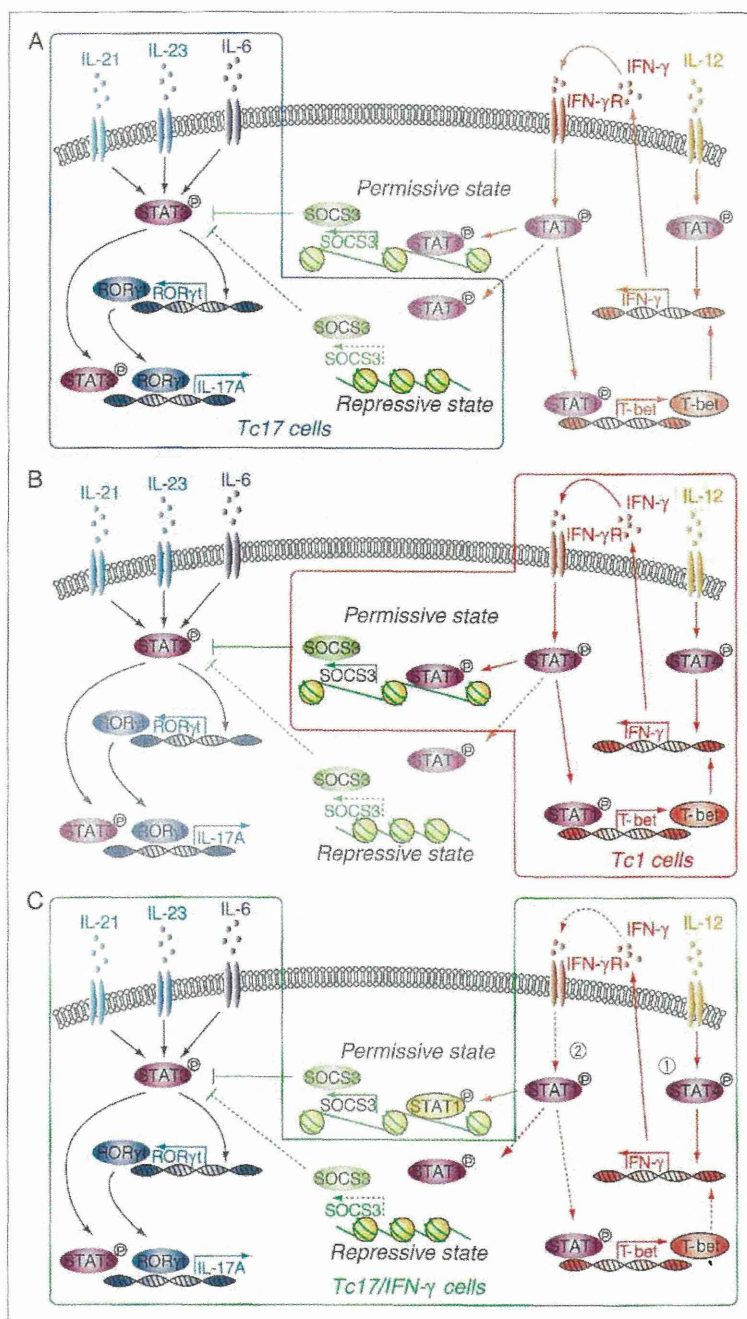


図4 Tc17/IFN- γ 細胞の運命と性質を決定する分子メカニズム

- A: Tc17細胞においてはSTAT3依存性のROR γ tの働きによりIL-17が産生され、その経路を負に制御するSOCS3の発現は抑制されている。
- B: 一方、Tc1細胞においては、IL-12の刺激とそれに続く刺激によりSOCS3の発現が上昇し、IL-17を産生する経路が負に制御される。
- C: IL-17/IFN- γ 共陽性CD8 $^{+}$ T細胞においては、ヒストン修飾の状態が抑制型になっているためにSOCS3の発現が抑制され、その結果としてIL-17とIFN- γ の産生というこれまでの知見と相反する発現が起きている。また、この細胞のIL-17とIFN- γ の産生という点ではIFN- γ /STAT1経路を介する必要はないが①、細胞傷害活性のような性能を最大限に発揮するにはIFN- γ /STAT1経路が重要である②。

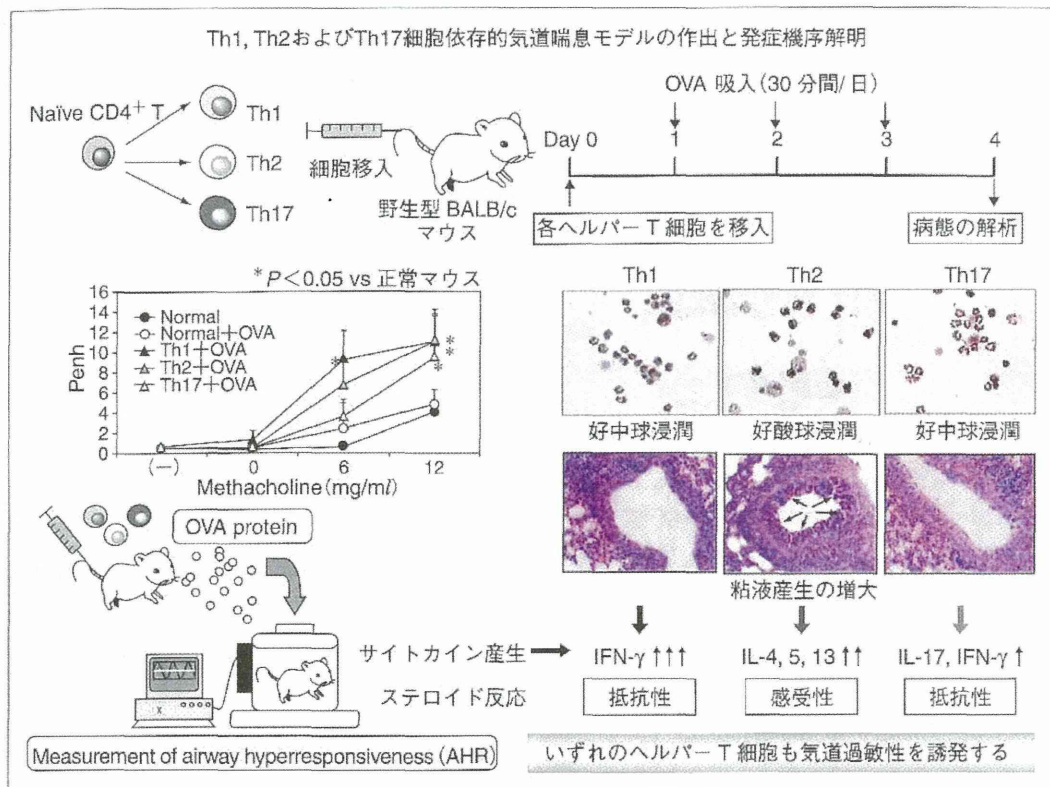


図 5 Th17細胞依存性気道炎症モデル

Th17細胞依存的気道炎症では、肺組織におけるIFN- γ 産生細胞へのconversionにより気道過敏性が誘発される。

IFN- γ 依存的に抗腫瘍活性が発現したとの記載がある。すなわち、担癌生体の中で、Th17細胞あるいはTc17細胞がエピジェネティック変化を起こしてIFN- γ 産生細胞へと変化し、抗腫瘍効果を発現した可能性が高い。事実、われわれは最近、Tc17細胞は細胞傷害活性を有しないが、IL-12の存在下でTc17細胞を培養すると、granzyme Bを発現し、強い細胞傷害活性を有した抗腫瘍エフェクター細胞へと変換されることを証明した¹³⁾。このTc17細胞からTc17/IFN- γ 細胞へのエピジェネティック変化は図4に示す機構で制御されている。

また、われわれはこれまでに、Th1, Th2細胞を移入することによる気道炎症モデルを確立し、Th1, Th2細胞による気道炎症の発症メカニズムを解明してきている。そこで、新たなT細胞サブセットであるTh17細胞の気道炎症への関与を、DO11.10マウスより誘導したTh17細胞を移入し、OVAを吸入する実験系で検討した(図5)。その

結果、Th17細胞の移入によっても気道過敏性の上昇が認められたが、Th1, Th2細胞に比べると低いものであった。また、肺への細胞浸潤を検討したところ、Th17細胞を移入した場合、Th1細胞と同様に好中球の浸潤を認めた。また、粘液沈着が起こらない点においては、Th1細胞依存的気道炎症と一致したが、Th17細胞の移入では、CD8⁺T細胞の集積が認められ、Th1細胞とは異なる炎症反応であることが示唆された。Th17細胞移入によるマウス気道炎症誘導メカニズムを精査した結果、肺組織において移入したTh17細胞から誘導されるIFN- γ 産生細胞(IFN- γ single-producing Th17細胞とIL-17/IFN- γ double-producing Th17細胞)が気道炎症の惹起には不可欠であることが示された。IL-17^{-/-} Th17細胞ではIFN- γ 産生細胞が誘導されないことより、IFN- γ 産生細胞へのconversionはIL-17依存的に起こっていると考えられる。また、IL-12に対する抗体を用いて検討を行った結果、Th17細胞移入後に肺組織内でIL-12

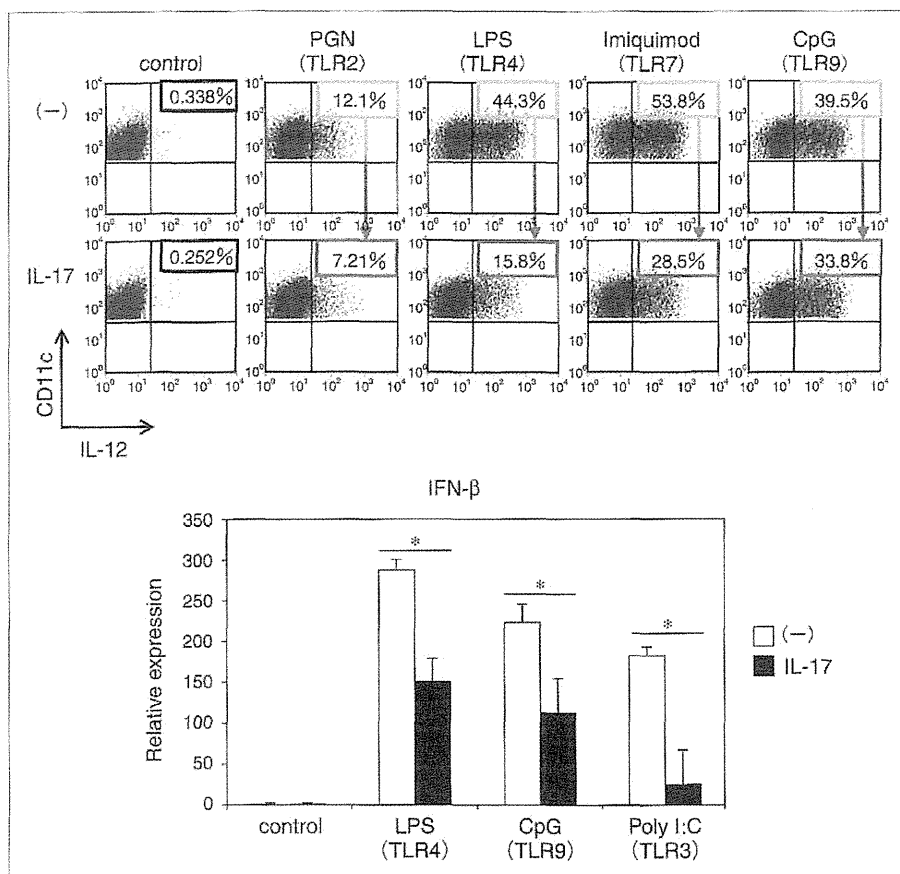


図6 IL-17は各種TLRリガンド刺激による樹状細胞のサイトカイン産生を抑制する
IL-17前処理をした樹状細胞へ各種TLRリガンドで刺激を与えたところ、IL-17前処理で各種サイトカイン産生が抑制されていることがわかった。核酸やLPSによって産生が誘導されるIFN- β についても、その発現が抑制されていることがわかった。* $P < 0.05$

依存的にIFN- γ -single-producing Th17細胞およびIL-17/IFN- γ -double-producing Th17細胞が誘導され、IFN- γ 依存的に気道炎症を起こすことが明らかとなった¹⁴⁾。ヒトの喘息患者においても肺でのIL-17発現が確認されており、IL-17による気道炎症誘導メカニズムの解析に有用であると思われる。

IL-17の樹状細胞を介した 新たな免疫抑制機構

腫瘍局所においてIL-17が高産生されており、それが血管新生を介して腫瘍の増生を促進していることは上に述べたとおりである。われわれは現在、腫瘍の免疫逃避機構に及ぼすIL-17の影響を検討している。今回は抗腫瘍免疫を形成す

るために必要不可欠な細胞といえる樹状細胞に着目し、IL-17によるその活性化への影響を調べたので記載する。

GM-CSF存在下で誘導したbone-marrow derived dendritic cells(BMDCs)またはマウス脾臓由来CD11c⁺樹状細胞をIL-17で前処理し、LPSによる刺激を与えた。その培養上清中のサイトカイン産生およびmRNA発現レベルを調べたところ、IFN- β 、IL-12、TNF- α およびIL-6といった種々のサイトカインの産生がIL-17処理によって抑制され、免疫抑制性サイトカインであるIL-10の産生については上昇することがわかった。また、LPS以外の各種TLRリガンドによる刺激においても、IL-17による樹状細胞からのサイトカイン産生の減弱がみられた(図6)。さらに、T細胞応答に参与する樹状

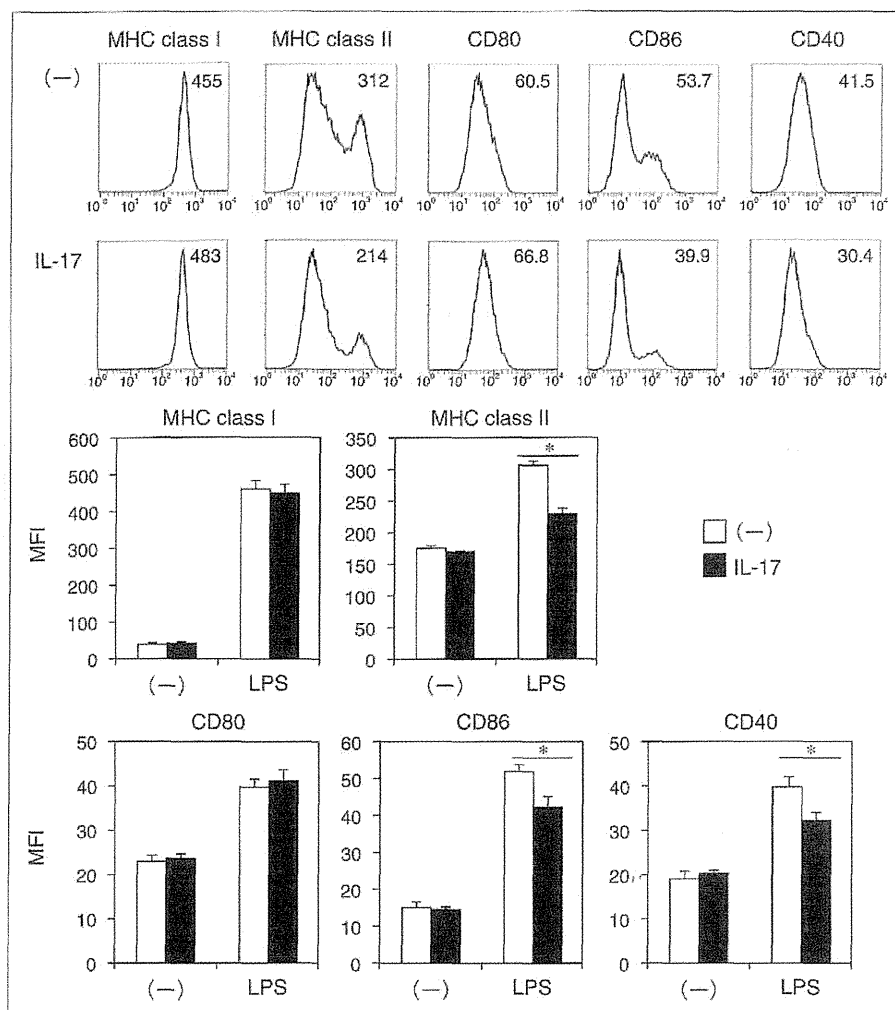


図7 IL-17は樹状細胞の活性化に伴う表面分子発現上昇を抑制する
活性化によって発現が上昇することが知られている樹状細胞表面分子の発現について検討したところ、IL-17の前処理によってMHC class II, CD40, CD86の発現上昇が抑制されていることがわかった。IL-17は樹状細胞に作用し、サイトカイン産生だけでなく表面分子の発現上昇も抑制していることがわかった。* $P < 0.05$

細胞表面分子の発現についてフローサイトメトリーで検討した。その結果、BMDCsのLPS刺激によるMHC class IとCD80の発現変化についてはIL-17による影響がみられなかったが、MHC class II, CD40およびCD86の発現上昇はIL-17処理群において有意に抑制されていることが判明した。したがって、IL-17は樹状細胞の活性化を負に制御することが明らかとなった(図7)。

次に、IL-17による樹状細胞機能を介した免疫応答、特にT細胞活性化との関連性を検討した。

IL-17で処理したBMDCsまたは無処理のBMDCsを同種異型(アロ)の脾臓細胞と混合培養した。その結果、IL-17処理によってアロ抗原特異的なIFN- γ の産生、細胞増殖能および細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte; CTL)の誘導能が減弱することがわかった。さらに、樹状細胞のT細胞に対する抗原提示能におけるIL-17の影響を評価した。OVAを特異的に認識するOT-1由来CD8 $^{+}$ T細胞またはOT-2由来CD4 $^{+}$ T細胞とIL-17処理または未処理のBMDCsをOVA peptide

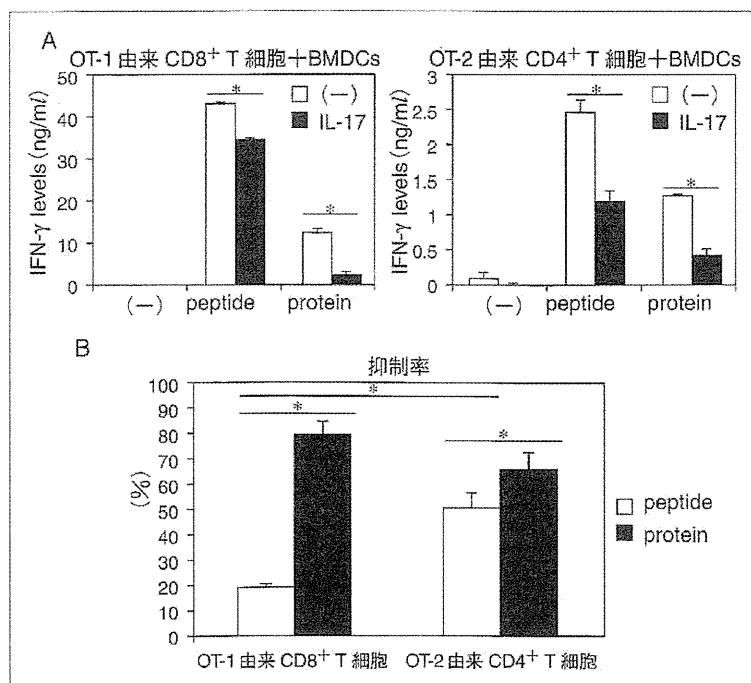


図8 IL-17は樹状細胞を介した抗原特異的T細胞の活性化を抑制する。BMDCsおよびOT-1由来CD8⁺T細胞あるいはOT-2由来CD4⁺T細胞と、OVA peptideあるいはOVA proteinの共培養を行い、培養上清中に含まれるIFN-γ量について測定した。BMDCsをIL-17処理することにより、CD8⁺T細胞あるいはCD4⁺T細胞のいずれを用いても、IFN-γの産生が抑制されていた(A)。さらに、CD8⁺T細胞を用いた実験においてその抑制作用はproteinを用いた方がpeptideを用いた場合に比べ、有意に高いことがわかった。また、peptideを用いた実験において、IFN-γ産生の抑制率はCD8⁺T細胞と比較し、CD4⁺T細胞の方が有意に高いことがわかった(B)。なお、BはAの抑制率を示している。* $P < 0.05$

あるいはOVA protein存在下に混合培養し、培養上清中のIFN-γを測定した。その結果、IL-17処理をすることにより、CD8⁺T細胞およびCD4⁺T細胞のいずれにおいても、IFN-γ産生が抑制されていることがわかった(図8)。したがって、IL-17は樹状細胞からのサイトカイン産生や表面分子発現を介してT細胞活性化を負に制御していることが明らかとなった。

最後に、今回の実験系ではIL-17による前処理時間が16時間と長いことから、IL-17の作用が直接樹状細胞に作用しているのか、IL-17刺激による二次的物質の産生によるものなのか明らかとするため、抗IL-17抗体を用いて検討を行った。その結果、IL-17処理16時間後の培養上清から抗IL-17抗体でIL-17の作用を阻害したものでBMDCsを処理した際にも、樹状細胞活性化の抑制が認

められた。このことから、IL-17は樹状細胞へ作用し、抑制性の二次的物質の産生を促していることが明らかとなった。次に、IL-17の樹状細胞への直接的な関与を検討するため、蛋白質合成阻害剤であるCycloheximide(CHX)を用いて実験を行った。結果として、CHX処理時においてもIL-17処理によるサイトカイン発現の抑制が認められた。したがって、IL-17による樹状細胞活性化の抑制は、IL-17によって産生が誘導される抑制性の二次的物質と、IL-17の直接的な樹状細胞への作用の双方がもたらしていると考えられた。ここで、IL-17処理後の活性化樹状細胞において産生が亢進している抑制性サイトカインであるIL-10の関与について、IL-10KOマウス由来の樹状細胞を用いて検討したところ、IL-10の若干の関与は認められたもののIL-10以外の抑制因子の存