

氏 名	ANCHALEE RAWANGKAN
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学位記番号	博理工甲第 1093 号
学位授与年月日	平成 30 年 9 月 21 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Mechanistic basis of lung cancer prevention with green tea catechins focused on anti-tumor immunity (緑茶カテキンによる肺がん予防の抗腫瘍免疫学的な作用機構に関する研究)
論文審査委員	委員長 教 授 菅沼 雅美 委 員 准 教 授 塚原 伸治 委 員 准 教 授 坂田 一郎 委 員 准 教 授 吉川 洋史

## 論文の内容の要旨

Green tea catechin, (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), and green tea are well known effective non-toxic cancer preventives. To understand the mechanisms of action of EGCG that results in wide beneficial effects on cancer prevention, I studied whether EGCG enhances anti-tumor immunity by focusing on the immune checkpoint. Programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in tumor cells is an immune checkpoint molecule involved in immune evasion of tumor: It inhibits the immune response of T cells by binding to PD-1 on T cells. The PD-L1 expression is induced by cytokines and growth factors in the inflammatory tumor microenvironment. In this thesis, I studied the effects of EGCG on inducible PD-L1 expression in human lung cancer cells, and the stimulation of T-cell functions, examined by the model experiment using tumor specific cluster of differentiation 3 positive (CD3+) T cells co-cultured with F10-OVA cells.

First, I found that PD-L1 protein levels varied among human lung cancer cell lines: Lu99 cells showed the highest PD-L1 expression, A549 cells were moderate, and H1299 were very low. Treatment with interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) increased cell-surface PD-L1 level in A549 and H1299 cells as determined by flow cytometry, but not in Lu99 cells. However, treatment with epidermal growth factor (EGF) increased PD-L1 expression in Lu99 cells. Pretreatment with EGCG and green tea extract (GTE) for 3 h dose-dependently reduced IFN- $\gamma$ -induced PD-L1 mRNA and cell-surface PD-L1 level in A549 and H1299 cells by inhibiting phosphorylation of STAT1. EGCG also inhibited EGF-induced PD-L1 expression by inhibiting the AKT pathway in Lu99 cells.

Next, I examined the relationship between inhibition of PD-L1 expression and lung cancer prevention. The intraperitoneal injection of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induced lung tumors in 100% A/J mice in 16 weeks and oral administration of 0.3% GTE reduced the number of tumors per mouse from 4.1 to 2.6. In addition, the percentage of positive PD-L1 cells in tumors in NNK + GTE group was reduced from 9.6 to 2.9 (70% reduction).

Finally, I studied whether EGCG enhances anti-tumor immunity. I performed an *ex vivo* co-culture experiment using

tumor specific CD3<sup>+</sup> T cells with F10-OVA cells, to determine restoration of T cells activity: Pretreatment with EGCG reduced PD-L1 mRNA level in F10-OVA cells, and it increased IL-2 mRNA expression 1.7-fold. However, EGCG had no effect in non-co-cultured T cells. According to the reduction of PD-L1 by EGCG, apoptosis of F10-OVA cells was increased 3-fold by co-culture with tumor specific CD3<sup>+</sup> T cells.

This is the first finding to show that EGCG and green tea extract act as alternative immune checkpoint inhibitors. This new function of EGCG in anti-tumor immune response plays a vital role in cancer prevention and enhancement of anti-cancer activities.

## 論文の審査結果の要旨

Rawangkan Anchalee 氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成30年7月30日に理学部講義実験棟3番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に審査の概要を示す。

現在、日本では二人に一人ががんに罹患し、今後も高齢化に伴ってがん罹患患者数は益々増加すると予測されており、がんの予防は重要な課題である。緑茶は毒性がないがん予防物質として注目されている。事実、緑茶のがん予防効果は、動物実験、埼玉県民を対象とした疫学調査、さらには、狭山茶から開発した低カフェイン緑茶エキス(GTE)を用いた大腸ポリープ再発予防の臨床介入試験で証明されている。その有効成分は、緑茶カテキン、(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)である。これまでEGCGのがん予防機構は、主にがん細胞に対する直接的な作用について生化学的、分子細胞生物学的な面から研究され、アポトーシス誘導、細胞周期阻害、および、リン酸化酵素阻害などが報告されている。しかし、抗腫瘍免疫におけるEGCGの効果については報告されていない。近年、がん治療において免疫チェックポイントの阻害剤が、驚くべき治療効果をあげて注目されている。免疫チェックポイント分子PD-L1は、がん細胞が腫瘍免疫の攻撃から逃れる、いわゆる「免疫回避」に関与しており、がん細胞におけるPD-L1の発現抑制によってがんの免疫回避を抑制し、腫瘍免疫を回復することができると考えられる。申請者は、EGCGが細胞膜硬化作用によって、がん細胞におけるPD-L1の発現を抑制し、抗腫瘍免疫を再活性化するという仮説を立て、EGCGの抗腫瘍免疫活性について検討した。本論文によって述べられている主要な成果は以下の通りである。

緒言では、緑茶に含まれる緑茶カテキンの化学構造、および、がん予防効果に関するこれまでの知見とその生化学的作用メカニズム、さらに、EGCGの細胞膜硬化作用と「シーリング効果」について詳細に記述している。次に、免疫チェックポイント分子であるPD-L1とその受容体PD-1に関する知見と免疫チェックポイント阻害剤によるがん治療効果とその意義について述べ、これらの知見を基に本研究の仮説と目的を述べている。

本論では、肺がんの培養細胞株を用いた *in vitro* の実験系で、EGCGによるPD-L1の発現抑制効果を見出し、次に、*in vivo* のマウス肺発がん実験で、肺がん予防効果とPD-L1発現抑制の関連性を証明した。最後に、腫瘍細胞とT細胞の相互作用を共培養の実験系で検証した。これらの結果を基に、EGCGが新しい免疫チェックポイント阻害剤であると論じている。

始めに、肺がん培養細胞株における、interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) と EGF による PD-L1 mRNA 発現誘導と PD-L1 タンパク質を検出する実験系を確立した。この実験条件を用い、緑茶抽出物 (GTE) および、EGCG 等の緑茶カテキンが INF- $\gamma$  誘導性、および、EGF 誘導性の PD-L1 mRNA とタンパク質を有意に抑制することを明らかにした。更に、EGCG による PD-L1 発現抑制機構について、シグナル伝達経路を解析し、EGCG は INF- $\gamma$  によって活性化される JAK2/STAT1 経路、および、EGF によって活性化される Akt 経路の両者を抑制して、PD-L1 の発現を抑制すること述べている。この結果は、EGCG が2つの異なった因子による PD-L1 の発現誘導を抑制することを示している。

次に、EGCGの肺がん予防効果と免疫チェックポイント分子PD-L1の発現抑制との関連を明らかにするため、A/Jマウスを用いて、たばこ特異的発がん物質 (NNK) による肺発がん実験を行った。NNKをマウスの腹腔内に投与すると16週後には肺に腫瘍が生じる。0.3%の緑茶抽出物 (GTE) を飲料水に混ぜて飲ませると、肺の腫瘍個数は有意に減少した。これに伴い、PD-L1陽性細胞の割合が、30%まで減少していることを

明らかにしている。この結果は、緑茶の飲用が、肺がんにおける PD-L1 の発現抑制を介して肺がんを予防することを示唆する重要な結果であると述べている。

最後に、EGCG による PD-L1 の発現抑制が、PD-L1/PD-1 シグナルによって抑制されていた T 細胞の活性を回復するかについて、新たに腫瘍細胞と腫瘍特異的 T 細胞の共培養実験系を用いて検討している。モデル腫瘍細胞として F10-OVA 細胞を樹立した後、F10-OVA 細胞で免疫したマウスの脾臓から腫瘍特異的 T 細胞を分離してこれらを共培養した。共培養によって F10-OVA 細胞で誘導される PD-L1 の発現は、EGCG の処理によって抑制された。一方、腫瘍特異的 T 細胞においては、共培養によって抑制された IL-2 の発現が EGCG によって回復し、T 細胞数も増加することを明らかにしている。さらに、B16-F10 細胞のアポトーシスの増加によって EGCG が T 細胞の免疫活性を回復させたことを証明している。

考察では、本論文の結果をまとめ、緑茶カテキンは免疫チェックポイント阻害剤としての新しい機能をもつと結論している。これらの結果を基に、緑茶カテキンのがん予防やがん治療にける有用性について論じ、今後の展望についても述べられている。

本論文で明らかにされた緑茶カテキンによる抗腫瘍免疫の活性化は新しい発見であり、緑茶カテキンの新しい作用機構を提示している。

なお、上記の内容は査読付き国際学術誌に申請者を筆頭著者として発表されている。これらの成果から、本審査委員会は本学位論文を博士（学術）の学位を授与するに値するものと判断し、学位論文審査に合格とした。