

学位論文題名

サイトカイン遺伝子導入によるPGE₂産生腫瘍細胞のワクチン効果の増強

学位論文内容の要旨

〔目的〕

マウス線維肉腫QRpP細胞は、免疫抑制物質として知られるプロスタグランジンE₂(PGE₂)を大量に産生し、局所におけるTリンパ球の増殖を抑制することにより、同系マウスにおいて致死的に増殖することが知られている。本研究は、この細胞にサイトカインの遺伝子を導入することにより、ワクチン効果が得られるか否か検討した。

〔材料と方法〕

1. 動物および細胞

動物は、C57BL/6マウスおよびBALB/c nu/nuヌードマウス(雌、6~8週齢)を用いた。細胞は、3-メチルコラントレン誘発C57BL/6マウスの可移植性線維肉腫BMT-11由来のQRpP細胞を用いた。

2. 発現ベクターの作成

IL-2とIFN- γ は、プラスミドベクター、pGEM SR α Neoを用いて、それぞれ単独または同時に発現させた。TNF- α は、レトロウイルスベクターを用いて発現させた。

3. 遺伝子の導入およびクローン細胞の樹立

プラスミドベクターはリポフェクション法で、レトロウイルスベクターはポリブレンで腫瘍細胞を処理し、遺伝子を導入した後、G418(400 μ g/ml)の選択培地で14日間培養し、限界希釈法にて各クローン細胞を樹立した。

4. 導入された遺伝子の発現および活性の測定

各クローン細胞よりAGPC法にてRNAを抽出し、RT-PCRを行った。また、各クローン細胞の培養上清中のサイトカインの活性を、IL-2はCTL2、IFN- γ はWEHI279、TNF- α はL929を用いたbioassay法で測定した。

5. PGE₂の測定

各クローン細胞の培養上清を回収し、ELISA法にて測定した。

6. サイトカイン産生腫瘍細胞の腫瘍原性と拒絶マウス再移植抵抗性

各サイトカイン産生腫瘍細胞 (2×10^5 個) を、同系C57BL/6マウスまたはヌードマウスの右背部皮下に移植した。21日目で腫瘍の形成のみられなかった同系マウスには、親株QRpP細胞 (2×10^5 個) を左背部皮下に移植し、再移植抵抗性を観察した。

7. サイトカイン産生腫瘍細胞の免疫原性

各サイトカイン産生腫瘍細胞 (1×10^6 個) に⁶⁰Co (80 Gy) を照射し、同系マウスに皮下接種し、免疫動物を作成した後、親株QRpP細胞を皮下に移植し、免疫原性を検討した。

8. リンパ球腫瘍細胞混合培養

各サイトカイン産生腫瘍細胞 (1×10^6 個) を同系マウスの皮下に移植し、21日目に脾臓を摘出し、ガラスホモジナイザーメッシュを用いて単細胞とし、マイトマイシンCで処理したQRpP細胞と混合培養した。5日後回収してエフェクターとし、親株QRpP細胞を標的として細胞傷害活性を⁵¹Cr遊離試験 (6 hrs) で測定した。

[結果]

1. 導入遺伝子の発現

各サイトカイン遺伝子導入腫瘍細胞から得られたクローンのうち、mRNAの発現を検出できたクローンならびにその培養上清中の活性は、それぞれIL-2遺伝子導入腫瘍細胞では19クローン中8クローン、検出限界以下～40 units/ml, IFN- γ 遺伝子導入腫瘍細胞では22クローン中5クローン、検出限界以下～50 units/ml, TNF- α 遺伝子導入腫瘍細胞では13クローンすべて、12～235 units/mlであった。また、IL-2/IFN- γ 遺伝子導入腫瘍細胞では13クローン中、IL-2は6クローン、検出限界以下～12.5 units/ml, IFN- γ は5クローン、検出限界以下～100 units/mlであった。親株QRpP細胞およびNco' 遺伝子導入細胞では、いずれのサイトカインもmRNAでの発現は認められず、培養上清中の活性は検出限界以下であった。

2. PGE₂の産生量

培養上清中のPGE₂の産生量は、親株QRpP細胞では約8,000 pg/ml, サイトカイン遺伝子導入細胞では検出限界以下～24,000 pg/mlと巾があった。これらのクローンの中からPGE₂の産生量およびin vitroにおける増殖能

が,親株QRpP細胞と同程度のものを選択し,以下の実験に用いた.

3. *in vivo*における腫瘍原性およびワクチン効果

親株QRpP細胞およびQRpP-Nco細胞を移植されたマウスは,全例腫瘍死した.しかし,QRpP-IL-2細胞を移植されたマウスでは,12例中11例,QRpP-IFN- γ 細胞を移植されたマウスでは12例中11例,QRpP-TNF- α 細胞を移植されたマウスでは10例中4例,QRpP-IL-2/IFN- γ 細胞を移植されたマウスでは12例全例が腫瘍を拒絶した.さらに,QRpP-IL-2細胞を拒絶したマウスの11例中8例(72.7%),QRpP-IFN- γ 細胞を拒絶したマウスの11例中3例(27.3%),ならびにQRpP-IL-2/IFN- γ 細胞を拒絶したマウスの12例中5例(41.7%)は親株QRpP細胞の再移植に対して抵抗性を示したが,QRpP-TNF- α 細胞を拒絶したマウスでは4例とも全て抵抗性を示さなかった.

また,ヌードマウスでの増殖性をみると,親株QRpP細胞,QRpP-Nco細胞,QRpP-IL-2細胞,QRpP-TNF- α 細胞の全例が生着したのに対して,QRpP-IFN- γ 細胞,QRpP-IL-2/IFN- γ 細胞は全例が拒絶された.

4. サイトカイン産生腫瘍細胞の免疫原性

照射された細胞の免疫原性は,いずれのサイトカイン産生腫瘍細胞においても親株QRpP細胞と比較して上昇しておらず,逆にIFN- γ 産生腫瘍細胞では免疫原性は低下していた.

5. サイトカイン産生腫瘍細胞担癌マウスのT細胞の抗腫瘍応答性

QRpP/IL-2細胞以外のサイトカイン産生腫瘍細胞を皮下に移植されたマウスの脾細胞から誘導された細胞傷害性T細胞(CTL)は,親株QRpP細胞のそれと同程度の活性しか示さなかった.しかし,QRpP/IL-2細胞を移植されたマウスの脾細胞から誘導されたCTLの活性は有意に高かった.

[考察]

PGE₂を大量に産生し,局所において宿主の抗腫瘍免疫反応を抑制するQRpP細胞に,遺伝子導入によりIL-2,IFN- γ およびTNF- α のサイトカインを産生させると,宿主の抗腫瘍免疫反応が増強され,サイトカイン産生QRpP細胞は同系マウスで拒絶されることが*in vivo*の移植実験より明らかになった.しかし,ワクチン効果は,各サイトカイン産生腫瘍細胞において効果に差がみられた.これは,おのこの腫瘍細胞において細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導能が異なるためと考えられ,*in vivo*の移植実験の結果から,IFN- γ 産生腫瘍細胞,IL-2/IFN- γ 産生腫瘍細胞では,主としてNK細胞

やマクロファージにより拒絶され、T細胞が関与しないと推察された。また、*in vivo*の移植実験ならびにCTL誘導能の結果から、TNF- α 産生腫瘍細胞は、腫瘍局所に大量のPGE₂が存在すると、TNF- α が産生されてもCTLを誘導できないと推察された。再移植抵抗性ならびにCTL誘導能の結果から、ワクチン効果を増強するには、IL-2の存在が最も重要であることが示唆された。

[結 語]

PGE₂高産生マウス線維肉腫QRpP細胞にIL-2、IFN- γ 、TNF- α の遺伝子を導入し以下の結果を得た。

1. 免疫抑制因子PGE₂を大量に産生する癌細胞の腫瘍原性は各サイトカイン遺伝子導入により低下した。
2. 親株腫瘍細胞に対する移植抵抗性はIL-2遺伝子導入細胞退縮マウスで有意に増強された。
3. IL-2遺伝子導入腫瘍細胞担癌マウスにおいて強いCTL前駆細胞が検出された。

以上より免疫抑制物質、PGE₂を大量に産生する腫瘍細胞に対するサイトカインの免疫遺伝子治療には、IL-2が最も有効であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 雨 宮 璋

副 査 教 授 渡 邊 継 男

副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

サイトカイン遺伝子導入によるPGE₂産生腫瘍細胞のワクチン効果の増強

審査は、審査員全員の出席のもとに、申請者に対し、口頭試問により、提出論文の内容とそれに関連した学科目について行われた。

近年、腫瘍細胞への遺伝子導入による腫瘍原性の減弱やワクチン効果の増強に関連した研究が広く行われているが、それらの詳細については未だ不明な点が少ない。本研究は、サイトカインが抗腫瘍免疫の増強やワクチン効果の成立にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で、免疫抑制物質であるプロスタグランジンE₂(PGE₂)を大量に産生し、局所におけるTリンパ球の増殖を抑制することにより同系マウスにおいて致死的に増殖するマウス線維肉腫QRpP細胞に、生体の抗腫瘍免疫の増強に関与することが知られているサイトカイン(IL-2、IFN- γ 、IL-2/IFN- γ ならびにTNF- α)を遺伝子導入し、抗腫瘍免疫反応ならびにワクチン効果の発現を検討したものである。

研究に先立ち、QRpP細胞に各サイトカイン遺伝子を導入して、mRNAの発現ならびに培養上清中のサイトカインの活性を確認した。次いで、各サイトカイン遺伝子導入腫瘍細胞から得られたクローンの中から、mRNAの発現と培養上清中の活性が認められ、かつPGE₂の産生量およびin vitroにおける増殖能が、親株QRpP細胞と同程度のもので選択し、以下の実験に用いた。

同系マウスならびにヌードマウスの右背部皮下に各サイトカイン産生腫瘍細胞を移植して、増殖性(腫瘍原性)を観察し、親株QRpP細胞およびQRpP-Neo細胞移植マウスは全例が腫瘍死するが、QRpP-IL-2細胞移植マウスは12例中11例、QRpP-IFN- γ 細胞移植マウスは12例中11例、QRpP-TNF- α 細胞移植マウスは10例中4例、QRpP-IL-2/IFN- γ 細胞移植マウスは12例全例が腫瘍を拒絶することを確認した。また、ヌードマウスでは、親株QRpP細胞、QRpP-Neo細胞、QRpP-IL-2細胞、QRpP-TNF- α 細胞は全例が生着し、QRpP-IFN- γ 細胞とQRpP-IL-2/IFN- γ 細胞は全例が拒絶されることを示し、遺伝子導入により

腫瘍細胞にIL-2などのサイトカインを産生させると宿主の抗腫瘍免疫反応が増強されること、ならびにその際抗腫瘍免疫反応の担当細胞はサイトカインにより異なっていることを明らかにした。

次いで、各サイトカイン産生腫瘍細胞のワクチン効果を確認するため、サイトカイン産生腫瘍を拒絶したマウスの左背部皮下に、サイトカイン産生腫瘍細胞移植後21日目に親株QRpP細胞を移植して再移植抵抗性を観察し、QRpP-IL-2細胞拒絶マウスの11例中8例(72.7%)、QRpP-IFN- γ 細胞拒絶マウスの11例中3例(27.3%)ならびにQRpP-IL-2/IFN- γ 細胞拒絶マウスの12例中5例(41.7%)が親株QRpP細胞の再移植に対して抵抗性を示すことを明らかにした。

^{60}Co 処理した各サイトカイン産生腫瘍細胞の免疫原性は親株QRpP細胞に比べて上昇していないことを確認した後、各サイトカイン産生腫瘍細胞を皮下移植したマウスの抗腫瘍応答性を、細胞傷害性T前駆細胞(pre-CTL)の誘導能により検討し、QRpP-IL-2細胞移植マウスの脾細胞から誘導された細胞傷害性T細胞(CTL)の活性のみが有意に高く、他の細胞移植マウスでは、CTLの活性は親株QRpP細胞の場合と同程度であることを認め、PGE₂が局所に大量に存在しても、IL-2が十分に産生される場合は、腫瘍細胞を傷害するばかりでなく、ワクチン効果も成立させうることを明らかにした。その成立機序については、IL-2産生腫瘍細胞では遺伝子導入により多量に産生されたIL-2がpre-CTLを活性化させたことによりワクチン効果が成立し、一方IFN- γ ならびにTNF- α 産生腫瘍細胞においては、大量のPGE₂存在下では、pre-CTLを十分に誘導できず、ワクチン効果が十分に成立しなかったものと考察し、免疫抑制物質、PGE₂を大量に産生する腫瘍細胞のワクチン効果の増強には、IL-2が最も重要であると結論している。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について、主査および副査より質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、免疫抑制物質PGE₂を大量に産生する腫瘍細胞に遺伝子導入を行うことによりワクチン効果を誘導できること、ならびにその増強にはIL-2によるpre-CTLの活性化が最も重要であることを明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。