

学 位 論 文 題 名

B7-1遺伝子導入癌細胞を用いたワクチン療法とRGD 擬似ペプチド
を用いた抗接着療法による癌転移抑制とそれらの併用効果

学位論文内容の要旨

癌の転移に関する基礎的研究は、近年急速な発展を遂げ、その複雑なメカニズムが分子レベルで解明されつつある。この転移形成過程において癌細胞は、宿主細胞(血管内皮細胞や免疫系細胞など)や周辺組織(細胞外マトリックスや基底膜など)と接着相互作用することにより、転移を形成しているものと考えられる。それゆえ、その担い手となる細胞接着分子およびその機能の重要性が注目されている。これらの接着分子は、本来は細胞の発生、分化、増殖、炎症、創傷治癒、血液凝固などの生命現象の調節、維持を司る分子である。癌細胞は転移の各段階で関る接着分子の基質特異性や親和性、あるいは量的な違いなど巧みに使いわけながら遠隔臓器へ転移すると考えられる。

接着分子を介した細胞の接着相互作用の機能を細胞接着性ペプチドを用いて転移のいくつかの段階を調節、制御することにより、癌の転移・浸潤を抑制しようとする試みが以前からなされている。特に、フィブロネクチン分子中のRGDS配列やラミニン分子中のCDPGYIGSR配列を用いた研究が数多くなされている。一方、転移形成過程における免疫系細胞と癌細胞との接着相互作用は、むしろ亢進することにより抗腫瘍免疫や殺腫瘍作用を誘導し、結果として転移の抑制に導くことができると考えられる。

本研究では細胞接着性ペプチドが生体内で各種プロテアーゼによる切断を受けやすいことを改善する目的で、プロテアーゼ耐性の高い化合物の探索を行うとともに、癌転移の抑制効果を検討した。さらに、癌細胞にB7分子を強制発現させ、免疫系細胞と癌細胞との接着相互作用を亢進することにより、免疫系細胞を効率良く活性化させ抗腫瘍免疫を誘導し、その抗腫瘍免疫に基づく癌転移の抑制効果と、B7を発現した癌細胞を癌ワクチンとして応用可能かどうかについて検討した。本論文の要旨は以下の4点である。

1. 転移性癌細胞にB7-1あるいはMB7-2分子を強制発現させることにより、同系マウスへの静脈内移植による癌転移を有意に抑制することを示した。この転移抑制効果はT細胞を介した免疫反応が関係していることを明かにした。癌細胞上のB7分子の発現が癌細胞の浸潤能には影響を及ぼさず、RGDS配列を認識するインテグリンレセプターが浸潤に関与していることを示した。

以上の結果より、癌細胞と免疫系細胞(T細胞)の活性化にはB7分子が、一方癌細胞の

基底膜浸潤にはインテグリンレセプターが関与していることが示され、癌の転移過程において異なった接着分子が巧みに使い分けられていることを示唆している。

2. 予めX線照射し不活化したB7-1⁺/BL6細胞で免疫することによって、BL6細胞の静脈内移植による肺転移を、BL6細胞あるいはB7-1⁻/BL6細胞で免疫した群と比較して有意に抑制することを示した。この抑制効果(ワクチン効果)は腫瘍特異的であることを明らかにした。

さらに、腫瘍移植前のみならず後にX線照射B7-1⁺/BL6細胞で免疫を行っても、BL6細胞の静脈内移植による肺転移の抑制に有効であることを示した。

一方、自然肺転移モデルにおいても、X線照射B7-1⁺/BL6細胞で原発巣切除前あるいは後に免疫した群は、いずれも肺への転移を抑制し、その効果は、免疫の回数に依存した。

3. RGDペプチドにおいて血中プロテアーゼに対して切断されやすいアルギニンとグリシンの間のアミド結合を反転させた、レトロ型擬似ペプチドFC-63は、強いプロテアーゼ耐性を獲得すると共に、in vitroにおける基底膜浸潤、実験的および自然転移のいずれにおいても、RGDSと比較して非常に強い抑制効果を示した。さらに、FC-63のアミド結合をアルキルアミノ基に置き換えたカルボニルエチレン型擬似ペプチド(FC-303)およびFC-303を二分子含む誘導体

(FC-336)は、FC-63に比べて強い転移抑制効果を示した。特に、FC-336はin vitroにおける細胞外マトリックスへの接着、移動および基底膜浸潤を抑制し、RGDSでは見られなかったHT1080細胞由来のMMP-2、-9による基底膜分解活性を阻害することが認められた。

4. 上記2および3の結果に基づき、不活化B7-1⁺/BL6細胞を用いた「癌ワクチン」とRGD関連擬似ペプチドFC-336による「抗接着療法」との併用は、それぞれ単独使用群に比較して強い転移抑制効果が認められ、それぞれの療法の効果を互いに干渉、相殺することなく増強効果が得られることを明らかにした。

以上、癌転移過程において、癌細胞-免疫細胞、癌細胞-細胞外マトリックスで見られる相互作用で、異なった接着分子を用いた制御機構が存在することが示唆された。癌細胞と細胞外マトリックスとの接着相互作用をRGD関連擬似ペプチドによって阻害する「抗接着療法」と、癌細胞とリンパ球との接着相互作用を高める目的で、B7-1分子を癌細胞に導入し免疫を行う「癌ワクチン療法」を併用することにより、転移抑制効果が増強することが明かとなったことから、癌転移抑制の新たな治療法として臨床応用可能であるかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 講 師 劉 永 春

学 位 論 文 題 名

B7-1遺伝子導入癌細胞を用いたワクチン療法と RGD 擬似ペプチド を用いた抗接着療法による癌転移抑制とそれらの併用効果

癌の転移に関する基礎的研究は、近年急速な発展を遂げ、その複雑なメカニズムが分子レベルで解明されつつある。この転移形成過程において癌細胞は、宿主細胞(血管内皮細胞や免疫系細胞など)や周辺組織(細胞外マトリックスや基底膜など)と接着相互作用することにより、転移を形成しているものと考えられる。それゆえ、その担い手となる細胞接着分子およびその機能の重要性が注目されている。これらの接着分子は、本来は細胞の発生、分化、増殖、炎症、創傷治癒、血液凝固などの生命現象の調節、維持を司る分子である。癌細胞は転移の各段階で関る接着分子の基質特異性や親和性、あるいは量的な違いなど巧みに使いわけながら遠隔臓器へ転移すると考えられる。

接着分子を介した細胞の接着相互作用の機能を細胞接着性ペプチドを用いて転移のいくつかの段階を調節、制御することにより、癌の転移・浸潤を抑制しようとする試みが以前からなされている。特に、フィブロネクチン分子中のRGDS配列やラミニン分子中のCDPGYIGSR配列を用いた研究が数多くなされている。一方、転移形成過程における免疫系細胞と癌細胞との接着相互作用は、むしろ亢進することにより抗腫瘍免疫や殺腫瘍作用を誘導し、結果として転移の抑制に導くことができると考えられる。

本研究では細胞接着性ペプチドが生体内で各種プロテアーゼによる切断を受けやすいことを改善する目的で、プロテアーゼ耐性の高い化合物の探索を行うとともに、癌転移の抑制効果を検討した。さらに、癌細胞にB7分子を強制発現させ、免疫系細胞と癌細胞との接着相互作用を亢進することにより、免疫系細胞を効率良く活性化させ抗腫瘍免疫を誘導し、その抗腫瘍免疫に基づく癌転移の抑制効果と、B7を発現した癌細胞を癌ワクチンとして応用可能かどうかについて検討した。本論文の要旨は以下の4点である。

1. 転移性癌細胞にB7-1あるいはMB7-2分子を強制発現させることにより、同系マウスへの静脈内移植による癌転移が有意に低下することを示し、この転移抑制効果はT細胞

胞を介した免疫反応が関係していることを明かにした。さらに癌細胞上のB7分子の発現が癌細胞の浸潤能には影響を及ぼさず、RGDS配列を認識するインテグリンレセプターが浸潤に関与していることを示した。

2. 予めX線照射し不活化したB7-1⁺/BL6細胞で免疫することによって、BL6細胞の静脈内移植による肺転移を、BL6細胞あるいはB7-1⁻/BL6細胞で免疫した群と比較して有意に抑制することを示した。この抑制効果(ワクチン効果)は腫瘍特異的であることを明かにした。

さらに、腫瘍移植前のみならず後にX線照射B7-1⁺/BL6細胞で免疫を行っても、BL6細胞の静脈内移植による肺転移の抑制に有効であることを示した。

一方、自然肺転移モデルにおいても、X線照射B7-1⁺/BL6細胞で原発巣切除前あるいは後に免疫した群は、いずれも肺への転移を抑制し、その効果は、免疫の回数に依存した。

3. RGDペプチドにおいて血中プロテアーゼに対して切断されやすいアルギニンとグリシンの間のアミド結合を反転させた、レトロ型擬似ペプチドFC-63は、強いプロテアーゼ耐性を獲得すると共に、in vitroにおける基底膜浸潤、実験的および自然転移のいずれにおいても、RGDSと比較して非常に強い抑制効果を示した。さらに、FC-63のアミド結合をアルキルアミノ基に置き換えたカルボニルエチレン型擬似ペプチド(FC-303)およびFC-303を二分子含む誘導体

(FC-336)は、FC-63に比べて強い転移抑制効果を示した。特に、FC-336はin vitroにおける細胞外マトリックスへの接着、移動および基底膜浸潤を抑制し、RGDSでは見られなかったHT1080細胞由来のMMP-2、-9による基底膜分解活性を阻害することが認められた。

4. 上記2および3の結果に基づき、不活化B7-1⁺/BL6細胞を用いた「癌ワクチン」とRGD関連擬似ペプチドFC-336による「抗接着療法」との併用は、それぞれ単独使用群に比較して強い転移抑制効果が認められ、それぞれの療法の効果を互いに干渉、相殺することなく増強効果が得られることを明かにした。

このように申請者は、癌細胞-免疫細胞、癌細胞-細胞外マトリックスとの相互作用を制御することにより転移の抑制が可能なことを明らかにし、癌転移の治療法を確立するうえでの基礎的研究に対し貢献するところ大なるものがある。

よって、申請者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認めた。