

学 位 論 文 題 名

Induction of CTL responses by simultaneous
administration of liposomal peptide vaccine
with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb

(ペプチド封入リポソームと抗 CD40 及び抗 CTLA-4 モノクローナル抗体
同時投与による細胞障害性 T 細胞の誘導)

学位論文内容の要旨

はじめに

樹状細胞 (DC) の細胞表面に発現している CD40 と、主に活性化 CD4 T 細胞に発現している CD40 リガンド (CD40L) とが結合することにより、抗原提示細胞 (APC) の活性化、すなわち B7 などの補助刺激分子の発現や IL-12 産生の増強が起こる。最近、抗原特異的 CD8 T 細胞のプライミングにおける CD4 T 細胞の役割が、CD40-CD40L シグナリングを介した DC の活性化であることが報告され、さらに抗 CD40 モノクローナル抗体 (mAb) により DC 活性化における CD4 T 細胞の役割を代替できることが示された。一方、ナイーブ T 細胞の活性化には、APC からの 2 つのシグナルが必要とされる。1 つは T 細胞受容体が抗原ペプチド-MHC 分子複合体と結合することにより供給される抗原特異的シグナルであり、もう 1 つは、前述の補助刺激分子 B7 と CD28 の結合を介した補助刺激シグナルである。活性化された T 細胞は、その細胞表面に cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4) を発現する。CTLA-4 は CD28 よりも高い親和性をもって B7 と結合し、T 細胞の negative regulator として作用する。最近、抗 CTLA-4 mAb による B7-CTLA-4 経路の遮断が抗腫瘍免疫反応を増強し、腫瘍拒絶へと導くと報告された。また近年、腫瘍関連抗原の同定が進められ、これを用いた抗腫瘍ペプチドワクチンによる臨床治験が進められている。しかし抗原特異的 cytotoxic T lymphocyte (CTL) を抗原ペプチド単独投与で誘導することは困難であり、効果的で安全な免疫増強因子や免疫方法の開発が求められている。

本研究では、マウス実験腫瘍モデルにおいて、免疫増強因子として抗 CD40 mAb と抗 CTLA-4 mAb を用い、抗原ペプチド封入リポソームと同時に投与することにより、腫瘍特異的 CTL の誘導を試みた。加えて、ペプチド封入リポソームとこれらの mAb の投与による、in vivo での抗腫瘍効果も検討した。

方法と結果

腫瘍モデルとしては、C57BL/6 由来の 胸腺腫である EL4 にニワトリ卵白アルブミン (OVA) の cDNA をトランスフェクトした EG7 細胞と、その抗原ペプチド OVA257-264 (SIINFEKL; K^b 結合性)、BALB/c 由来の白血病 RL δ 1 細胞と、その抗原ペプチド pRL1a (IPGLPLSL; L^d 結合性) を使用した。ペプチド (100 μ g/マウス) 封入リポソームと抗 CD40

mAb (50 μ g/マウス) をマウスの皮下に投与し、その1週間後、免疫されたマウスの脾細胞を 2×10^6 個/ml の濃度に調整し、100 ng/ml の抗原ペプチド存在下で4日間培養してエフェクター細胞とし、 ^{51}Cr 遊離試験にて細胞障害活性を評価した。OVA257-264 封入リポソームと抗 CD40 mAb を投与した C57BL/6 からの エフェクター細胞は EG7 に対する細胞障害活性を示した。しかし、抗原ペプチド、リポソーム、抗 CD40 mAb のいずれかを免疫の際投与しなかったマウスのエフェクター細胞は、細胞障害活性を示さなかった。またこのエフェクター細胞は EG7 特異的な細胞障害活性を示し、その主な細胞集団は CD8 T 細胞であった。C57BL/6 マウスを OVA257-264 封入リポソームと抗 CTLA-4 mAb (50 μ g/マウス) で免疫しても同様の結果が得られた。また CD4 T 細胞の欠損している C57BL/6 $A_{\beta}^{b/b}$ を OVA257-264 封入リポソームと抗 CD40 mAb、または抗 CTLA-4 mAb で免疫することにより CTL の誘導が可能であった。従って、これらの方法による CTL 誘導は、CD4 T 細胞を必要としないことが判明した。

次にペプチド封入リポソーム、抗 CD40 mAb、抗 CTLA-4 mAb 同時投与により、細胞障害活性の増強を試みた。OVA257-264 封入リポソームと抗 CD40 mAb、または抗 CTLA-4 mAb をそれぞれ単独で投与するよりも、二種の抗体を同時投与したほうが、EG7 に対して有意に強い細胞障害活性を誘導した。他の腫瘍モデルである BALB/c 由来の RL δ 1 と、その抗原ペプチド pRL1a を用いても同様の結果が得られた。またこのエフェクター細胞は RL δ 1 特異的 CD8 T 細胞であることが判明した。

次に in vivo での抗腫瘍効果を検討した。pRL1a 封入リポソームと抗体を BALB/c の皮下に投与し、最終免疫の1週間後に免疫されたマウスの皮下に RL δ 1 を移植した後、生存率を観察した。コントロール群は全例47日以内に死亡したのに対して、抗 CD40 mAb、または抗 CTLA-4 mAb 単独投与群では、それぞれ40%、抗 CD40 及び抗 CTLA-4 mAb 同時投与群では100%の80日生存率が観察された。また担癌マウスを作成して治療効果を検討した。RL δ 1 を BALB/c の皮下に移植し、全例皮下に腫瘍形成が確認された後に、pRL1a 封入リポソームと抗 CD40 及び抗 CTLA-4 mAb をマウスの皮下に投与して、その後の生存期間、並びに生存率を観察した。コントロール群は全例42日以内に死亡し、平均生存日数32.8日であったのに対して、治療群は5例中1例で腫瘍の完全消失が認められた。また死亡したマウスの平均生存日数は44.5日で、コントロール群に比べ有意に平均生存期間の延長が認められた。

考察

抗 CD40 mAb 及び抗 CTLA-4 mAb を抗腫瘍ペプチドワクチン封入リポソームと共に投与すると、免疫増強因子として作用することを示した。この方法では、T細胞活性化に必要最小限のマテリアルしか用いないため、副作用を最小限に抑え、十分な腫瘍特異的 CTL の誘導が可能であると思われる。しかし、本法は担癌マウスの治療においては、十分な効果を示さなかった。その原因としては、腫瘍誘発性 T 細胞アポトーシス、抗原ペプチドに対する末梢でのトレランス誘導、腫瘍誘発サプレッサー細胞の産生などの可能性が挙げられる。抗腫瘍免疫療法を発展させていく上で、これらの阻害因子による影響を克服していくことが、これからの課題になると思われる。またこの方法による CTL 誘導は、ヘルパー T 細胞を必要としない。それゆえ、このアプローチは人癌の治療に対してだけでなく、CD4 T 細胞の重篤な欠損をきたす HIV 感染患者の免疫治療にも応用できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 犬 山 征 夫

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

Induction of CTL responses by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb

(ペプチド封入リボソームと抗 CD40 及び抗 CTLA-4 モノクローナル抗体
同時投与による細胞障害性 T 細胞の誘導)

最近、癌の免疫療法において、主要組織適合抗原分子に組み込まれる癌抗原ペプチドをワクチンとした免疫により、抗腫瘍細胞傷害性 T 細胞(CTL)を活性化することが期待されている。しかし、これら癌抗原ペプチドをワクチンとする効果的免疫方法はまだ確立されていない。そこで、申請者は、T 細胞の抗原認識機構およびペプチドの抗原提示細胞(APC)への取り込み効率の観点から、癌抗原ペプチドによる免疫効果の増強を試みた。まず、抗 CD40 抗体が APC である樹状細胞 (DC) の細胞表面に発現している CD40 を架橋し B7 などの補助刺激分子の発現や IL-12 産生を増強すること、および活性化された T 細胞表面の cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4) は CD28 よりも高い親和性をもって B7 と結合するが、抗 CTLA-4 抗体が T 細胞の negative regulator として作用する B7—CTLA-4 経路を遮断することに着目し、これらモノクローナル抗体(mAb)をペプチドワクチンでの免疫に併用した。つぎに、抗原ペプチドの APC への取り込み効率を上げるためにペプチドをリボソームに封入して免疫に用いた。腫瘍モデルとしては、C57BL/6 由来の胸腺腫である EL4 にニワトリ卵白アルブミン (OVA) の cDNA をトランスフェクトした EG7 細胞と、その抗原ペプチド OVA257-264 (SIINFEKL; K^b 結合性)、BALB/c 由来の白血病 RL σ 1 細胞と、その抗原ペプチド pRL1a (IPGLPLSL; L^d 結合性)を使用した。実験の結果、ペプチド (100 μ g/マウス) 封入リボソームと抗 CD40 mAb (50 μ g/マウス) をマウスの皮下に投与し、その 1 週間後、免疫されたマウスの脾細胞を 2×10^6 個/ml の濃度に調整し、100 ng/ml の抗原ペプチド存在下で 4 日間培養してエフェクター細胞とし、⁵¹Cr 遊離試験にて細胞障害活性を評価した。OVA257-264 封入リボソームと抗 CD40 mAb を投与した C57BL/6 からの エフェクター細胞は EG7 に対する細胞障害活性を示した。しかし、抗原ペプチド、リボソーム、抗 CD40 mAb のいずれかを免疫の際投与しなかったマウスのエフェクター細胞は、細胞障害活性を示さなかった。またこのエフェクター細胞は EG7 特異的な細胞障害活性を示し、その主な細胞集団は CD8 T 細胞であっ

た。C57BL/6 マウスを OVA257-264 封入リボソームと抗 CTLA-4 mAb (50 μ g/マウス) で免疫しても同様の結果が得られた。また CD4 T 細胞の欠損している C57BL/6 A β ^{b/-} を OVA257-264 封入リボソームと抗 CD40 mAb、または抗 CTLA-4 mAb とを投与することにより CTL の誘導が可能であった。従って、これらの方法による CTL 誘導は、CD4 T 細胞を必要としないことが判明した。次にペプチド封入リボソーム、抗 CD40 mAb、抗 CTLA-4 mAb 同時投与により、細胞障害活性の増強を試みた。OVA257-264 封入リボソームと抗 CD40 mAb、または抗 CTLA-4 mAb をそれぞれ単独で投与するよりも、2 種の mAb を同時投与したほうが、EG7 に対して有意に強い細胞障害活性を誘導した。他の腫瘍モデルである BALB/c 由来の RL σ 1 と、その抗原ペプチド pRL1a を用いても同様の結果が得られた。またこのエフェクター細胞は RL σ 1 特異的 CD8 T 細胞であることが判明した。また、pRL1a 封入リボソームを BALB/c の皮下に投与し、最終免疫の 1 週間後に免疫されたマウスの皮下に RL σ 1 を移植した後、生存率を観察した。コントロール群は全例 47 日以内に死亡したのに対して、抗 CD40 mAb、または抗 CTLA-4 mAb 単独投与群では、それぞれ 40%、抗 CD40 及び抗 CTLA-4 mAb 同時投与群では 100% の 80 日生存率が観察された。さらに、担癌マウスを作成して治療効果を検討した。RL σ 1 を BALB/c の皮下に移植し、全例皮下に腫瘍形成が確認された後に、pRL1a 封入リボソームと抗 CD40 および抗 CTLA-4 mAb をマウスの皮下に投与して、その後の生存期間、並びに生存率を観察した。コントロール群は全例 42 日以内に死亡し、平均生存日数 32.8 日であったのに対して、治療群は 5 例中 1 例で腫瘍の完全消失が認められた。また死亡したマウスの平均生存日数は 44.5 日で、コントロール群に比べ有意に平均生存期間の延長が認められた。

公開発表にあたって、主査の細川真澄男教授より、抗 CD40 と抗 CTLA-4 両抗体が情報伝達として正と負の相反する効果を示す理由、用いた癌抗原ペプチドの選択方法、OVA 遺伝子導入 EG7 細胞の免疫で親 EL4 細胞に対する抵抗性が誘導できる可能性、リボソームの有用性などについて、副査犬山征夫教授より、予防効果に比べ、治療効果が不十分な理由、HIV の治療に応用する具体的な方法、副査小野江和則教授より、OVA は外来性抗原なのに class I によって抗原提示される理由、用いた 2 つの腫瘍のマウスの系統がたまたま Th1 dominant の B6、Th2 dominant の BALB/c であるが、両者の反応の差、新鮮リンパ球の CTL 活性と *in vitro* で抗原刺激の役割についてなど多くの質問があった。申請者はこれらの質問に対して適正に回答し得た。

本論文は、抗 CD40 mAb 及び抗 CTLA-4 mAb をリボソーム封入癌ペプチドワクチンによる免疫に併用すると、抗腫瘍免疫エフェクターである CTL が効率的に誘導されることおよびそれが抗腫瘍移植抵抗性の成立を増強することを示した研究であり、癌ペプチドワクチンの臨床応用に多大な示唆を与えるものである。

審査員一同は、これらの研究成果ならびに大学院おける研鑽や取得単位などを併せ高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。