

学位論文題名

Generation and Targeting of Human Tumor-specific Tc1 and Th1 Cells Transduced with a Lentivirus Containing a Chimeric Immunoglobulin T Cell Receptor

(レンチウイルスを用いたキメラ免疫受容体遺伝子導入による腫瘍特異的ヒト Tc1, Th1 細胞の作製および抗腫瘍効果の検討)

学位論文内容の要旨

背景と目的

癌の免疫療法においては、Tリンパ球がその主要な役割を担っている。特に、IFN- γ 産生性 Th1、Tc1 細胞は高い抗腫瘍活性を有することが知られ、担癌状態下で腫瘍特異的 Th1、Tc1 主導免疫を確立することがより効果的な治療につながると期待される。Tリンパ球は抗腫瘍効果を示す際に、標的を抗原ペプチドと主要組織適合複合体(MHC)分子との複合体として認識する。一方、腫瘍は MHC や Tリンパ球の完全な活性化に必要な補助刺激分子などを欠き、免疫監視機構を逃れる場合があることが知られている。この問題点を克服する手段として、近年モノクローナル抗体由来の単鎖抗体を Tリンパ球の細胞内シグナル伝達部位につないだキメラ免疫受容体を Tリンパ球に遺伝子導入する方法が注目されている。これら人工的に作製した抗原特異的 Tリンパ球 (T body) は、MHC 非依存的に抗原を認識して活性化され、エフェクター機能を果たすことができる。そこで本研究では、腫瘍特異的な Th1-T body と Tc1-T body を用いることは新たな有効な養子免疫治療法が可能となるものと考え、その遺伝子導入法と抗腫瘍活性を検討した。

方法

抗 CEA モノクローナル抗体由来の単鎖抗体を、CD28 および CD3 と鎖のシグナル伝達領域に結合させたキメラ免疫受容体をコードする遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込み、非特異的に活性化させた T 細胞に導入した。Type-1 T 細胞に分化させるために、感染させた細胞を、IL-2、IL-12、IFN- γ および抗 IL-4 抗体の存在下 (type 1 誘導条件下) で 7-10 日間増殖させた。遺伝子導入効率は GFP の発現を指標にフローサイトメトリーにて評価した。これらを更に CD4⁺GFP⁺ および CD8⁺GFP⁺ 細胞に分け、いずれも最終的に 95% 以上の純度の細胞群にして実験に用いた。これら T body のサイトカイン産生能は各種癌細胞株との 24 時間の共培養後の上清を ELISA にて、また細胞傷害活性は 4 時間の ⁵¹Cr リリース試験にて評価した。さらには、生体内での抗腫瘍活性を RAG-2^{-/-} BALB/c マウスの腹部に腫瘍細胞と T body を皮内注射し、腫瘍径を計測することより評価した。

結 果

- 1 T body の作製：まずレンチウイルスベクターの遺伝子導入効率を測定した。6人の健常成人由来の末梢血単核球を用いて 16 回の独立した遺伝子導入実験を行ったところ、平均で CD4⁺ T 細胞の 42%、CD8⁺ T 細胞の 23 %に CIR 遺伝子を導入できた。同時に行ったコントロールベクターの導入効率は CD4⁺ T 細胞へは約 90%、CD8⁺ T 細胞へは約 80%であった。これらをセルソーティングによりそれぞれ 95%以上の純度の細胞群にして以下の実験に用いた。
- 2 サイトカイン産生能の評価：CEA を発現している癌細胞に対し CD4⁺-T body も CD8⁺-T body も高濃度の IFN- γ の産生を認めしたが、IL-4、IL-5 あるいは IL-13 は産生しなかった。また CEA を発現していない癌細胞に対しては CD4⁺および CD8⁺ T body は IFN- γ を産生しなかった。これらのことは、非特異的に活性化させた T 細胞から type 1 誘導条件下で、抗原特異的な Th1- および Tc1-T body が作製されたことを示している。これに対し、コントロール T 細胞は CEA の発現の有無にかかわらずこの活性を認めていない。また IL-2 産生能の評価では、Th1-T body は CEA⁺ 癌細胞に対して高濃度の IL-2 を産生したが、Tc1-T body はほとんど産生しなかった。

一方、MHC class II を発現していない癌細胞に Th1-T body が反応したことより、T body の反応様式は MHC の有無によらないものであることが確認された。また、これらサイトカイン産生能は抗 CEA 抗体を添加することにより阻害された。
- 3 細胞傷害活性の評価：Tc1-T body は CEA⁺ 癌細胞に対し強力な細胞傷害活性を示す一方、CEA⁻ 癌細胞に対してはこの活性を示さなかった。また Th1-T body は CEA⁺ 癌細胞に対して Tc1-T body に比し弱いながらも有意な細胞傷害活性を示した。これに対してコントロール Th1 あるいは Tc1 細胞は CEA 発現の有無にかかわらず活性を認めなかった。

またこれら細胞傷害活性はサイトカイン産生能と同じく、抗 CEA 抗体により著しく阻害された。以上よりこれら T body は、抗原特異的にサイトカイン産生能や細胞傷害活性を示すことが明らかになった。
- 4 生体内での抗腫瘍活性：生体内における T body の抗腫瘍効果について検討したところ、Th1-T body 単独あるいは Tc1-T body 単独では腫瘍の増殖を遅らせる効果があったものの腫瘍を根治できなかった。ところが Th1-および Tc1-T body の双方を用いた場合、腫瘍は根治された。このような抗腫瘍効果はコントロール T 細胞には認めなかった。以上のことから、Tc1-T body と Th1-T body を併用することにより非常に強力な抗腫瘍効果を示すことが確認された。

まとめ

キメラ免疫受容体遺伝子を導入した Th1 および Tc1 細胞の作製法を確立した。これら Type 1-T body は MHC 非依存的、抗原特異的に標的を認識し抗腫瘍効果を示し、さらにはこの効果は Th1-T body と Tc1-T body を併用したときにより強いものとなった。生理的に癌特異的 Tc1/Th1 を誘導することが困難な現状において、本研究で確立した方法は短期間で容易に癌特異的 Th1 細胞や Tc1 細胞を準備でき、さらに MHC 非依存的に抗腫瘍活性を示すことから、非常に多くの患者を対象とできる癌養子免疫治療の有効な方策になるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 西 村 孝 司

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Generation and Targeting of Human Tumor-specific Tc1 and Th1 Cells Transduced with a Lentivirus Containing a Chimeric Immunoglobulin T Cell Receptor

(レンチウイルスを用いたキメラ免疫受容体遺伝子導入による腫瘍特異的ヒト Tc1, Th1 細胞の作製および抗腫瘍効果の検討)

癌の免疫療法においては、T 細胞がその主要な役割を担っている。一方、腫瘍は MHC や T 細胞の完全な活性化に必要な補助刺激分子などを欠き、免疫監視機構を逃れる場合があることが知られている。この問題点を克服する手段として、近年モノクローナル抗体由来の単鎖抗体を T 細胞の細胞内シグナル伝達部位につないだキメラ免疫受容体を T 細胞に遺伝子導入する方法が注目されている。今回申請者は、抗腫瘍効果が高いとされる Type-1 T 細胞誘導条件下でキメラ免疫受容体を発現した T 細胞(T body)を作製し、Th1-T body および Tc1-T body の抗腫瘍活性を検討した。

T body の作製は、抗 CEA モノクローナル抗体由来の単鎖抗体を CD28 および CD3 と鎖のシグナル伝達領域に結合したキメラ免疫受容体遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込み、非特異的に活性化させた T 細胞に導入した。Type-1 T 細胞に分化させるために、感染させた細胞を、IL-2、IL-12、IFN- γ および抗 IL-4 抗体の存在下 (Type 1 誘導条件下) で増殖させた。遺伝子導入効率は GFP の発現を指標にフローサイトメトリーにて評価した。これらを更に CD4⁺GFP⁺ および CD8⁺GFP⁺ 細胞に分け、いずれも最終的に 95%以上の純度の細胞群にして実験に用いた。

これら T body の抗腫瘍効果の検討は、サイトカイン産生能の評価は各種癌細胞株との 24 時間の共培養後の上清を ELISA にて、また細胞傷害活性の評価は 4 時間の ⁵¹Cr リリース試験にて行った。さらには、生体内での抗腫瘍活性を RAG-2^{-/-}マウスの腹部に腫瘍細胞と T body を皮内注射し、腫瘍径を計測することより評価した。

結果は、まずレンチウイルスベクターの遺伝子導入効率を測定したところ、平均でCD4⁺ T 細胞の 42%、CD8⁺ T 細胞の 23 %に CIR 遺伝子を導入できた。同時に行ったコントロールベクターの導入効率はCD4⁺ T 細胞へは約 90%、CD8⁺ T 細胞へは約 80%であった。これらをセルソーティングによりそれぞれ 95%以上の純度の細胞群にして以後の実験に用いた。細胞傷害活性の評価では、Tc1-T body は CEA⁺ 癌細胞に対し強力な細胞傷害活性を示す一方、CEA⁻ 癌細胞に対してはこの活性を示さなかった。また Th1-T body は CEA⁺ 癌細胞に対して Tc1-T body に比し弱いながらも有意な細胞傷害活性を示した。これに対してコントロール Th1 あるいは Tc1 細胞は CEA 発現の有無にかかわらず活性を認めなかった。サイトカイン産生能の評価では、CEA を発現している癌細胞に対し Th1-T body も Tc1-T body も高濃度の IFN- γ の産生を認めた。また CEA を発現していない癌細胞に対しては Th1 および Tc1-T body は IFN- γ を産生しなかった。これに対し、コントロール T 細胞は CEA の発現の有無にかかわらずこの活性を認めていない。また IL-2 は、Th1-T body は CEA⁺ 癌細胞に対して高濃度の IL-2 を産生したが、Tc1-T body はほとんど産生しなかった。

これら細胞傷害活性やサイトカイン産生能は抗 CEA 抗体を添加することにより阻害されたことより、CEA 特異的な反応であることが確認された。さらに MHC class II を発現していない癌細胞に Th1-T body が反応したことより、T body の反応様式は MHC の有無によらないものであることが確認された。生体内での抗腫瘍活性の評価では、Th1-T body 単独あるいは Tc1-T body 単独では腫瘍の増殖を遅らせる効果があったものの腫瘍を根治できなかった。ところが Th1-および Tc1-T body の双方を用いた場合、腫瘍は根治された。このような抗腫瘍効果はコントロール T 細胞には認めなかった。以上のことから、Tc1-T body と Th1-T body を併用することにより非常に強力な抗腫瘍効果を示すことが確認された。

口頭発表において、副査加藤教授より CEA を発現していない癌に対してどう治療に応用するのか、外科的切除後の有効な補助治療となりうるかとの質問があった。ついで主査秋田教授よりレンチウイルスベクターの導入効率、Th1-T body と Tc1-T body とのサイトカイン産生能のちがいについて質問があった。また副査西村教授より今回の T body はマウス抗体を元に作製しているが臨床応用にむけてヒト型抗体を用いて作製した例はあるかとの質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

Type-1 T body は容易に作製でき、抗原特異的、MHC 非依存的に働き、高い抗腫瘍効果を有するなど、臨床応用へ向けた本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。