

学位論文題名

The Critical Role of Th1-dominant Immunity in Tumor Immunology

(腫瘍免疫における Th1 主導型免疫応答の重要性)

学位論文内容の要旨

多くの癌抗原が人癌等で同定された現在、がんに対する免疫治療法に期待がよせられている。しかし現在広く行われている癌ワクチン療法はただ major histocompatibility complex (MHC) class I 結合性癌抗原ペプチドだけを免疫する方法が主流であり、あまり治療効果が期待できないのが現状である。また免疫バランスは Th1/Th2 バランスによって制御されているが、どのような免疫バランスの状態が最も効率良く抗腫瘍免疫を誘導できるのか現時点であまり厳密に吟味されていない。私は担癌生体における免疫抑制を打破し最終目標である癌特異的 cytotoxic T lymphocyte (CTL) を誘導するために、自然免疫、獲得性免疫を含めた Th1 タイプ主導型の環境、すなわち Type-1 型免疫を担癌生体に導入する必要があることを世界に先駆け主張してきた。特に癌特異的 Th1 細胞を中心として Type-1 型免疫を活性化し、最も効率の良い、臨床応用可能な癌免疫治療法の開発とそのメカニズムの解析を行ってきたのでここに報告する。

D) Th1 細胞治療の MHC クラス II 陰性腫瘍への応用とそのメカニズムの解析

【目的】当研究室ではこれまで Th1 が直接反応し得る MHC class II 陽性腫瘍を用いて、Th1 細胞治療が有効であり生着した癌が実際に拒絶されることを実証していった。しかしヒトに応用することを考えた場合、ヒトの腫瘍ではほとんどの腫瘍が MHC class II 陰性腫瘍である。Th1 細胞治療の臨床への応用を考えた場合、MHC class II 陰性腫瘍を拒絶できる新しい戦略を考える必要がある。そこで今回、MHC class II 陰性で MHC class I 陽性腫瘍に対しても Th1 細胞治療が有効であること証明し、その初期腫瘍免疫活性化メカニズムについて検討したので報告する。

【方法および結果】MHC class II 陰性腫瘍として EL-4 に ovalbumin (OVA) 遺伝子を導入した EG-7 を用い、OVA 特異的な Th1 は OT2 トランスジェニックマウスのナイーブ CD4 陽性 T 細胞から誘導した。治療は C57BL/6 に EG-7(2×10^6) を接種し腫瘍径が 8~10mm になったところで開始した。1 回治療につき OVA protein(200 μ g) を腫瘍内投与し、OVA 特異的 Th1(2×10^7) を尾静注により投与した。2 日おきに 3 回治療を行ったところ、Th1 のみ、癌抗原のみを投与したマウスでは全く腫瘍の拒絶は誘導できなかったが、両者を同時に投与した時のみ腫瘍は完全に拒絶された。次ぎに、蛍光ラベルされた Alexa-OVA 抗原、CFSE-Th1 細胞を用い腫瘍拒絶に至る初期腫瘍免疫活性化機構を詳細に検討した。その結果、腫瘍内投与された Alexa-OVA をプロセッシングした APC (dendritic cell: DC, macrophage: M ϕ) は 15 分以内に所属リンパ節に移住し、Th1 細胞も i.v. 投与後 15 分以内に各リンパ節、脾、腫瘍内に移住した。興味深いことに OVA と Th1 細胞両者を投与され腫瘍を完全に拒絶した群においてのみ、治療開始 35 時間前後で所属リンパ節における移入 Th1 細胞の激しい分裂が観察された。また、その現

象に伴って、宿主 DC, Mφ, natural killer (NK) cell, CD4⁺ T, CD8⁺ T 細胞も同時に活性化され、初期活性化マーカー CD69 の強発現が誘導された。さらに、所属リンパ節の初期腫瘍免疫活性化段階において APC/Th1 の直接接着を介した相互作用も観察された。所属リンパ節に引き続き、腫瘍内においても移入 Th1 の活発な分裂が確認され、さらに 2 回治療後には、Th1 による local help の活性化により、腫瘍内に癌特異的 tetramer⁺ CD8⁺ CTL が高頻度に誘導されていることが証明された。所属リンパ節や腫瘍内に浸潤した CD8⁺ T 細胞は EG-7 特異的に細胞傷害活性を示し、OVA-tetramer を添加することで細胞傷害活性が消失した。従って Th1 細胞の local help 導入によって腫瘍内に誘導された tetramer⁺ CD8⁺ CTL が腫瘍拒絶の最終エフェクター細胞として働いているものと考えられた。

【結論】腫瘍内投与された癌抗原を提示した APC は、抗原投与 15 分以内に腫瘍組織から所属リンパ節に移住し、移入 Th1 と相互作用を示し、Th1 細胞の活発な増殖および宿主抗腫瘍エフェクターの活性化を誘導する。次に、腫瘍内において移入 Th1 細胞の活性化、さらには腫瘍特異的な tetramer⁺ CD8⁺ CTL の活性化が誘導され、腫瘍の拒絶を誘導することが証明された。以上、Th1 細胞治療は MHC class II 陰性 MHC class I 陽性腫瘍を用いた治療モデルにおいても、local help 導入を介した抗腫瘍活性の増強が可能であることが示された。

II) 癌特異的 T cell receptor (TCR) 遺伝子導入による非特異的 Th1 細胞の腫瘍へのターゲッティング

【目的】I) では MHC class II 陰性腫瘍においても癌特異的 Th1 を用いて全身的な抗腫瘍免疫を惹起でき、癌を完全治療できることを述べた。しかしヒトに応用することを考えると癌特異的 Th1 を短時間で大量に誘導することは現状では困難であるというもう一つの壁が存在する。今回私は、癌特異的 TCR 遺伝子導入によって非特異的な Th1 細胞の癌細胞へのターゲッティングに成功し、短期間で大量に癌特異的 Th1 細胞を人工的に作り出すことに成功したので報告する。

【方法および結果】ここでは純粋に Th1 細胞の腫瘍へのターゲッティング能力をみるため MHC class II 陽性 A20-OVA を用いた。パッケージング細胞 : Plat-E と OVA 特異的な TCR 遺伝子をインサートしたプラスミドベクター pMX-DOTAE, pMX-DOTBE をもちいてトランスフェクションを行い、OVA 特異的 TCR 遺伝子をコードしたレトロウイルスベクターを作製した。マウスの脾臓から αCD3 刺激によってあらかじめ誘導してきた非特異的 Th1 に、このように作製したレトロウイルスを用いて OVA 特異的 TCR を遺伝子導入し抗原特異性を付与したところ、80% の効率で CD4⁺ KJ1-26⁺ (KJ1-26; OVA 特異的 TCR 特異的に反応する抗体) のヘルパー T 細胞が得られ、この細胞群を精製して各種 assay に用いた。こうして得られた KJ1-26⁺ Th1 は MHC class II 結合性 OVA ペプチドに特異的に反応し、IL-4 を産生せず IFN-γ のみを産生し、直接 A20-OVA に対して killer activity やサイトカイン産生を示した。そこで次ぎにこの人工的に加工された抗原特異的 Th1 細胞が生体内において抗腫瘍効果を示すことができるか否かについて検討した。ここでは A20-OVA 担癌マウスを cyclophosphamide (CY) と Th1 細胞の併用で治療する実験系を用いた。A20-OVA 担癌マウスを低濃度 CY(80mg/kg) で処置した後に OVA-TCR-introduced Th1 (5x10⁶) とコントロールである GFP-introduced Th1 を尾静注により投与したところ、OVA 特異的 TCR 遺伝子を導入した Th1 を用いた群でのみ、全てのマウスにおいて腫瘍が完治した。これは in vivo においても腫瘍特異的に反応し、抗腫瘍免疫を誘導できたものと考えられる。

【結論】以上より腫瘍特異的な Th1 細胞の誘導が困難な場合においても TCR の遺伝子を導入することによって腫瘍へのターゲッティングが可能であることが示され、実際に腫瘍が拒絶されることが明らかとなった。このことは Th1 細胞療法の実用範囲の拡大に繋がるものと期待できるものである。

まとめ

これらの研究により、MHC class II が発現していない腫瘍においても Th1 細胞治療は可能であり、癌特異的 Th1 細胞が誘導困難な場合においても迅速かつ簡便に特異的 Th1 を誘導できることが示された。これらのことはどんな場合においても理論上、癌抗原と癌特異的 Th1 が少量でもあれば、癌特異的 Th1 細胞療法が可能であることを示唆している。今回はモデル癌抗原 OVA を使用したが、今後は natural tumor antigen で同様の結果が得られるか検討する必要がある。また Th1 細胞を用いた細胞治療では所属リンパ節が中心的な役割を果たしており、Th1 細胞と癌抗原の投与方法もさらに追求していく予定である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

The Critical Role of Th1-dominant Immunity in Tumor Immunology

(腫瘍免疫における Th1主導型免疫応答の重要性)

申請者は、癌特異的 Th1 細胞を用いて MHC class II 陰性腫瘍を治療する方法を検討し、遺伝子工学的手法を用いて癌特異的 Th1 細胞を大量に作り出す手法を確立した。近年、免疫バランスは主に Th1/Th2 バランスによって担われていることが知られており、癌を免疫で治療するためには免疫バランスを Th1 型に傾向する必要があることが明らかになってきている。この観点に基づいて癌特異的 Th1 細胞を担癌生体に移入することで生体内の免疫バランスを Th1 型免疫に傾け、癌を治療することを検討した。ヘルパー-T 細胞は MHC classII 拘束的に反応するが、ヒトの腫瘍では MHC classII を発現していない腫瘍がほとんどであるため、MHC classII 陰性腫瘍も Th1 細胞を用いて治療できる手法の開発を目指した。そこで仮想癌抗原 OVA を発現させた MHC classII 陰性腫瘍 (EG-7) 担癌マウスを治療する系を用いた。EG-7 担癌マウスに癌抗原 OVA 特異的 Th1 細胞のみを尾静注投与しても癌は治らなかったが、同時に癌抗原 (OVA protein) を腫瘍内接種すると全てのマウスにおいて癌が拒絶された。この時所属リンパ節で Th1 細胞が激しく分裂し、OVA-tetramer 陽性の癌抗原特異的 CTL が誘導されていることが分かった。また所属リンパ節が存在しない AlyAly マウスでは OVA-tetramer 陽性 CTL が誘導されず、癌が全く治癒しなかったことより、この治療系における免疫反応の中心の場は所属リンパ節であることが明らかとなった。以上のことより MHC classII 陰性腫瘍でも癌抗原と癌特異的 Th1 細胞を用いれば癌治療が可能であることが証明された。

これらの実験より癌治療における癌抗原と癌特異的 Th1 細胞の必要性が示されたが、実際癌患者から癌特異的 Th1 細胞を短期間で大量誘導することは困難

である。そこで次にこの問題を解決するため、癌特異的 TCR 遺伝子を非特異的活性化 Th1 に遺伝子導入することで、癌特異性を有した Th1 細胞を短期間で大量に誘導する画期的な手法を開発した。OVA 特異的 TCR 遺伝子を組み込んだレトロウイルスを作製し、これをあらかじめ α CD3 抗体刺激により活性化した非特異的 Th1 細胞に感染させた。その結果、OVA 特異的 TCR 陽性(KJ 1.26 陽性)Th1 細胞を大量に得ることができた。この Th1 細胞は MHC classII 結合性 OVA ペプチド特異的に反応し、MHC classII 陽性 OVA 発現細胞株 A20-OVA に対して細胞傷害活性を示した。また A20-OVA 担癌マウスに OVA 特異的 TCR 遺伝子を導入した Th1 細胞を尾静注により接種すると A20-OVA は完全に拒絶された。このことより、生体内においても抗腫瘍免疫を誘導できる癌特異的 Th1 細胞を人工的に作り出せることが明らかになった。

公開発表の質疑応答では副査の上出利光教授から、腫瘍内 APC の所属リンパ節への migration に関する質問、接種した Th1 細胞の生体内分布についての質問、さらに仮想癌抗原ではなく natural 癌抗原を用いるとどうなるかという質問があった。次いで副査の西村孝司教授から Th1 細胞を使用する利点は何かという質問があった。さらに主査の小野江和則教授から、OVA を腫瘍内でなく皮下に接種したらどうなるのかという質問と natural 癌抗原では helper epitope が少ないのではないかという質問があった。いずれの質問に対しても申請者は自身のデータや関連する論文報告などを引用し、滞りなく適切な回答をした。

この論文は、Th1 細胞治療法を MHC classII 陰性腫瘍にも応用できるという点、迅速かつ大量に癌特異的 Th1 細胞を人工的に作り出せるという点で、高く評価され今後の臨床への応用も期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。