

## 学 位 論 文 題 名

# Th1 Cell Adjuvant Therapy Combined with Tumor Vaccination: A Novel Strategy for Promoting CTL Responses while Avoiding the Accumulation of Tregs

(Th1 cell adjuvant therapy: CTL の誘導増強と Treg の誘導抑制を伴う  
新規癌治療法の開発)

## 学位論文内容の要旨

We have demonstrated a critical role of Th1 immunity for induction of tumor-specific CTL in tumor-bearing mice. In a previous report, we demonstrated that adoptive transfer of OVA-specific Th1 cells into mice bearing established-MHC class II<sup>+</sup> A20-OVA tumors resulted in the induction of tumor-specific CTL, which were able to completely eradicate the tumor mass. However, in contrast to MHC class II<sup>+</sup> A20-OVA tumors, it was hard to eradicate established-MHC class II<sup>-</sup> EG-7 (OVA gene-transfected EL-4) tumors by OVA-specific Th1 cell transfer alone.

In the present study, we succeeded to develop a novel tumor immunotherapy technique, termed Th1 cell adjuvant therapy to eradicate established-MHC class II<sup>-</sup> EG-7. When tumor mass became large (6~8mm), the mice were intradermally (i.d.) treated with OVA-specific Th1 cells, combined with the model tumor antigen (OVA), near the tumor-draining lymph node (DLN). After 3 round of therapy, tumor regression was induced in all mice treated with this vaccination and about 50~60% of all mice showed complete tumor rejection. Tumor eradication was dependent on host-derived CD8<sup>+</sup> CTL, because OVA tetramer-specific CTL was enriched in CD8<sup>+</sup> T cells, and depletion of CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by anti-CD8 mAb injection completely abrogated the therapeutic effect of Th1 cell adjuvant therapy. Moreover, we found that Th1 cells injected i.d. with OVA vigorously proliferated and accelerated the activation of dendritic cells (DC), as evidenced by profound up-regulation of the expression of costimulatory molecules such as CD86, CD80 and early activation marker CD69. In addition to DC, various immunoregulatory cells including CD8<sup>+</sup> T cells, NK cells, Mφ, and B cells were found to be activated in the tumor DLN upon treatment of Th1 cell adjuvant therapy.

Immunotherapy against large tumor masses has generally been ineffective since tumors themselves often elicit strong immunosuppressive responses. The success of our strategy indicated that Th1 cell adjuvant could effectively induce anti-tumor responses by overcoming the strong immunosuppressive environment in the tumor-bearing host. To investigate the possible impact of Th1 cell adjuvant therapy on these regulatory cells, we examined the frequency of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) in tumor DLN. The number of Tregs in DLN of tumor-bearing mice was markedly increased as compared with tumor-free mice. Whereas, the number of Tregs was significantly reduced, when tumor-bearing mice were treated with Th1 cell adjuvant plus OVA. In contrast to treated wild-type mice, the strong accumulation of Tregs was induced in the IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> tumor-bearing hosts even when the mice were treated with Th1 cell adjuvant therapy. Thus, we could provide the first evidence that injection of Th1 cells together with tumor antigen suppressed the accumulation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs in DLN, and this downregulation is controlled by IFN- $\gamma$  secreted by Th1 cells.

In summary, we have established a novel protocol using Th1 cell adjuvant for tumor immunotherapy, which permits the generation of potent tumor-specific CTL responses and avoids the generation of tumor-specific Tregs. We believe that Th1 cell adjuvant therapy may be effective and applicable to clinical trials.

# 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

### Th1 Cell Adjuvant Therapy Combined with Tumor Vaccination: A Novel Strategy for Promoting CTL Responses while Avoiding the Accumulation of Tregs

(Th1 cell adjuvant therapy: CTL の 誘導増強と Treg の誘導抑制を伴う  
新規癌治療法の開発)

申請者は、癌特異的 Th1 細胞をセルアジュバンドとして癌抗原蛋白質と併用し、腫瘍を排除する有効な免疫治療法の開発を目的として研究を行なった。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、免疫系により癌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。この観点に基づき、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。ここでヘルパーT細胞はMHC class II 拘束的に反応するが、一般にヒトの腫瘍ではMHC class II を発現していない腫瘍がほとんどであるため、MHC class II 陰性腫瘍も Th1 細胞を用いて治療可能な方法の開発を目指した。そこで仮想癌抗原としてOVAを発現させたMHC class II 陰性腫瘍(EG-7)担癌マウスを治療する系を構築し、本研究に用いた。まず始めにC57BL/6 マウスにEG-7を皮内接種し、腫瘍径が7~8ミリメートルになった段階で本治療を開始した。OVA蛋白、OVA特異的Th1細胞及びTh1細胞とOVAを共に(Th1+OVA)、それぞれ癌所属リンパ節近傍に皮内投与した。OVA蛋白とOVA特異的Th1細胞単独の場合では癌は治らなかったが、Th1+OVAで治療したマウスは癌が有為に拒絶された。

この治療過程において、癌所属リンパ節でTh1細胞が激しく分裂しするとと

もに、樹状細胞をはじめ全ての免疫細胞は著しく活性化された。さらに OVA-tetramer 陽性の癌抗原特異的 CTL が誘導されていることも分かった。以上の結果から、MHC class II 陰性腫瘍の場合でも、癌抗原と癌特異的 Th1 細胞を併用することで、癌治療が可能であることが示された。

一般的に、担癌生体は免疫抑制状態にあるため、抗腫瘍免疫反応を誘導とするだけでは十分な効果が得られない事が報告されている。そこで Th1 セルアジュバンド癌ワクチン療法が、担癌生体における Treg を介した免疫抑制状態を解除できるかどうかについて検討した。担癌生体に存在している Treg の所属リンパ節への増加は Th1 セルアジュバンド癌ワクチン治療によって著しく抑制された。この抑制効果は IFN- $\gamma$  依存的事であることが IFN- $\gamma$ R 欠損マウスを用いて明らかとなった。

以上の実験結果から癌所属リンパ節に投与を行う本治療法が癌の退縮に非常に有効であることが示されたが、一部の腫瘍はその癌所属リンパ節自体が体内の深くに存在している場合があるため、実際に臨床での応用が困難であることが予想される。そこで、次にこの問題を克服し Th1 セルアジュバンド療法の臨床への応用を最大限に拡大するために、癌非所属リンパ節に投与し、その癌治療の効果がみられるかどうかを検討した。その結果 Th1+OVA を癌非所属リンパ節近傍に投与しても、投与した Th1 細胞の癌所属リンパ節への移動により、腫瘍特異的 CTL が効率よく誘導され、腫瘍の完全退縮を導くことが分かった。従って、systemic な Th1 セルアジュバンド療法の癌治療効果も非常に有望であることが示唆された。

公開發表の質疑応答では副査の上出利光教授から、本治療モデルにおける抗原提示細胞やエフェクター細胞の免疫応答に関するカイネティクスおよび Treg の作用部位に関する質問があった。また副査の西村孝司教授から今後の研究の方向性に関する質問があった。さらに主査の小野江和則教授から癌抗原特異的な複数のエピトープからなる CTL が誘導されたかどうかに関して、また治療に用いた癌抗原以外の癌特異的 CTL が誘導される可能性に関する質問があった。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 セルアジュバンド癌ワクチン療法が MHC class II 陰性腫瘍にも応用できるという点、腫瘍特異的な CTL を効率的に誘導できる点、さらに Treg の機能を抑制する効果を持つという点で高く評価され、今後の癌治療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。