

学位論文題名

Antitumor activity of chimeric immunoreceptor
gene-modified Tc1 and Th1 cells against autologous
carcinoembryonic antigen-expressing colon cancer cells

(キメラ免疫受容体遺伝子を導入した Tc1, Th1細胞の
CEA 発現自家大腸癌細胞に対する抗腫瘍活性)

学位論文内容の要旨

【要約】

癌患者における、癌特異的かつ IFN- γ 産生性 Tc1 細胞、および Th1 細胞の誘導が癌免疫療法において重要であると考えられる。現在までに我々は、ヒト CEA 特異的モノクローナル抗体の単鎖抗体を組み込んだ Chimeric immunoglobulin T-cell receptor(以後 cIgTCR と略す)遺伝子を非特異的に活性化したポリクローナル T 細胞にレンチウイルスベクターを利用して遺伝子導入し、この T 細胞に癌細胞膜表面上の carcinoembryonic antigen (以後 CEA と略す) に対する特異的反応性を付与し抗腫瘍効果を得られることを報告してきた。今回我々は T 細胞機能の低下が認められる担癌患者において同様の免疫活性を持つ T 細胞の誘導が可能であるかどうか、そして誘導された T 細胞が CEA 発現自家癌細胞に対して、CEA 特異的な抗腫瘍活性を付与されるかどうかを検討した。またより効率が高く、臨床応用を視野に入れた遺伝子導入 T 細胞誘導方法の検討として、レトロウイルスベクターを用いた系を確立しその有効性についても検討した。さらに、抗腫瘍活性における Th1, Tc1 細胞間の相互作用についても検討を加えた。

その結果、レトロウイルスベクターを用いた我々の cIgTCR 導入効率は Th1, Tc1 細胞ともに平均 60~70%と非常に良好であり、20cc の末梢血採血より 2週間ほどで約 1×10^8 個程度の cIgTCR 導入 Tc1 細胞 (Tc1-T body) と cIgTCR 導入 Th1 細胞 (Th1-T body) を調整可能であった。またこのプロトコールは担癌患者末梢血にも同様に施行可能であり、担癌患者末梢血由来 Th1-T body、Tc1-T body が、同患者大腸癌肝転移巣切除標本より樹立された自家大腸癌細胞株 SC1 に対し、MHC 分子非拘束性、かつ CEA 特異的に高い抗腫瘍活性をもつことが示された。さらにこれらの T body を用いて、腫瘍拒絶の中心的役割を担う Tc1 細胞の長期生存に必要な因子を調べたところ、Th1 細胞との細胞間接触が重要であることが示された。そしてこれらの T body の抗腫瘍活性は *in vitro* において高い血清 CEA 値をもつ自家血漿中でも、阻害されたり逆に非特異的に活性化されることもなかった。

【材料と方法】

2004 年に北海道大学附属病院にて大腸癌肝転移巣の切除術を受けた 50 代女性の切除組織より、CEA 陽性大腸癌細胞株 SC1 を樹立し、同患者末梢血より EB ウィルスにより不死化した B cell line SLC1 を樹立した。その他 4 種類のヒト腫瘍細胞株、HLC-1 (lung cancer), PCI-10(pancreas cancer), Daudi (lymphoma),

SH10 (gastric cancer)を比較対象とした。SC1、HLC-1、PCI-10はCEA発現細胞株であり、Daudi、SH10、SLC1はCEA非発現細胞株である。いずれもMHC class I発現、MHC class II非発現細胞であった。

抗ヒトCEAモノクローナル抗体の単鎖抗体 (F11-39)、CD8 hinge lesion、CD28の膜貫通部および細胞内シグナル伝達部位、CD3と鎖から構成されるcIgTCR遺伝子 (F39scFV/CIR-2)のcDNAをレトロウイルスベクター (pGCDΔNsamIRESGFP)のmultiple cloning siteに組み込み、このベクターのstable producerである細胞株、PG13を生成した。

ヒト末梢血より得られた末梢血単核細胞 (PBMCs)より抗CD4抗体、抗CD8抗体を用いたcell sortingにより99%以上の純度を持つCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞を分離し、このT細胞をphytohemagglutinin存在下にTh1サイトカイン (IFN- γ , IL-2, IL12)添加条件で72時間培養する。こうして得られたポリクローナルに活性化されたTh1, Tc1細胞に対し、PG13より生成されたcIgTCR導入レトロウイルスを用い、24時間置きに2回infectionを行い、固相化anti-CD3刺激により増殖を行う。infection後9~12日後にflow cytometryにて最終的な導入効率の測定を行い、各種assayに用いた。

【結果】

大腸癌担癌患者末梢血より当プロトコールによって得られたTc1-T body、Th1-T bodyのcIgTCR導入効率はそれぞれ71%、66%であり、健康人末梢血を用いた際とほぼ同様の結果であった。cIgTCR非導入ポリクローナル活性化T細胞 (control Tc1、control Th1)も同時に誘導し、CEA発現、非発現細胞株に対する抗腫瘍活性を比較検討したところ、Tc1-T body、Th1-T bodyが自家細胞に対しても、MHC非拘束性、CEA特異的に強い細胞障害活性と、IFN- γ 産生能を付与されていることが証明された。またこの抗腫瘍効果は腫瘍細胞のCEA発現量に比例していると推測された。T bodyとcontrol T細胞の抗腫瘍効果の差異は顕鏡化にも確認された。

上記反応においてSC1細胞により刺激を受けたTc1-T bodyは反応後早期にアポトーシスに陥る。そこで腫瘍免疫において中心的役割を担うとされるTc1細胞の長期生存に寄与する要素を、SC1細胞と自家Tc1-T body、Th1-T bodyの様々な組み合わせた共培養により検討したところ、Th1-T bodyとの細胞間接触がTc1-T bodyの長期生存に重要であることが示された。

癌患者末梢血に存在するsoluble CEAが、Tc1-T body、Th1-T bodyの活性を阻害したり、また非特異的活性を示す可能性がないかを調べるために、高CEA値をもつ自家患者血清、およびrecombinant CEAを用いて、Tc1-T body、Th1-T bodyの自家細胞SC1に対する腫瘍活性のblocking assayを行ったところ、soluble CEAの存在はこれらeffector細胞の腫瘍効果を阻害することもなく、非特異的に活性化することもないことが示された。

【考察】

Chimeric immunoreceptorを用いたT細胞への癌抗原特異的腫瘍活性付与は癌免疫においていくつかのアドバンテージを持っていると考えられる。ひとつは腫瘍特異的T細胞の誘導の容易さであり、もうひとつはその抗腫瘍効果がMHCに拘束されないという点である。今回我々がこのプロトコールが担癌患者においても施行可能であったこと、また自家癌細胞においても応用可能であったことを示したことより、臨床応用可能な癌免疫両方の戦略としてなお一層期待される。Th1細胞の細胞間接触によるTc1細胞へのサポート能については、今後その分子生物学的機序について解明が期待される。

当プロトコールを用いた癌免疫療法は、生体内におけるI型免疫の誘導とその汎用性において、今後大いに期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Antitumor activity of chimeric immunoreceptor gene-modified Tc1 and Th1 cells against autologous carcinoembryonic antigen-expressing colon cancer cells

(キメラ免疫受容体遺伝子を導入した Tc1, Th1細胞の
CEA 発現自家大腸癌細胞に対する抗腫瘍活性)

癌患者における、癌特異的かつ IFN- γ 産生性 Tc1 細胞、および Th1 細胞の誘導が癌免疫療法において重要であると考えられる。しかし担癌患者の T 細胞機能の抑制状態、MHC の個体差、それに伴う T 細胞認識エピトープの多様性などの障壁により、その誘導には困難を伴う。そこで申請者は、癌抗原特異的単鎖抗体と T 細胞受容体の細胞内シグナル伝達部位との融合蛋白である cIgTCR(chimeric immunoglobulin T cell receptor)の遺伝子を強制発現させた Tc1 細胞と Th1 細胞を *in vitro* にて誘導し、それを体内に戻す癌免疫療法を想定し、その臨床応用に向けた基礎的研究を行った。癌抗原としては carcinoembryonic antigen(CEA)をターゲットとし、CEA 特異的 cIgTCR 遺伝子を導入した Tc1 細胞、Th1 細胞をそれぞれ Tc1-T body, Th1-T body と呼称し、さまざまな分析を行った。また、より効率が高く、臨床応用を視野に入れた遺伝子導入 T 細胞誘導方法の検討として、レトロウイルスベクターを用いた系を確立しその有効性についても報告した。さらに、抗腫瘍活性における Th1, Tc1 細胞間の相互作用についても検討を加えた。

北海道大学附属病院にて大腸癌肝転移巣の切除術を受けた症例の切除組織より、CEA 陽性大腸癌細胞株 SC1 を樹立し、同患者末梢血より EB ウィルスにより不死化した B cell line SLC1 を樹立した。その他 4 種類のヒト腫瘍細胞株、HLC-1 (lung cancer), PCI-10(pancreas cancer)、Daudi (lymphoma), SH10 (gastric cancer)を比較対象とした。SC1, HLC-1, PCI-10 は CEA 発現細胞株であり、Daudi, SH10, SLC1 は CEA 非発現細胞株であった。いずれも MHC class I 発現、MHC class II 非発現細胞であった。

抗ヒト CEA モノクローナル抗体の単鎖抗体 (F11-39), CD8 hinge lesion, CD28 の膜貫通部および細胞内シグナル伝達部位、CD3 と鎖から構成される cIgTCR 遺伝子 (F39scFV/CIR-2) の cDNA をレトロウイルスベクター (pGCD Δ NsamIRESGFP) の multiple cloning site に組み込み、このベクターの stable producer である細胞株、PG13 を生成した。

SC1 樹立を行った同一患者末梢血より得られた末梢血単核細胞より抗 CD4 抗体, 抗 CD8 抗体を用いた cell sorting により 99%以上の純度を持つ CD4⁺T 細胞, CD8⁺T 細胞を分離し, この T 細胞を phytohemagglutinin 存在下に Th1 サイトカイン (IFN- γ , IL-2, IL12) 添加条件で 72 時間培養した. こうして得られたポリクローナルに活性化された Th1, Tc1 細胞に対し, PG13 より生成された cIgTCR 導入レトロウィルスを用い, 24 時間置きに 2 回 infection を行い, 固相化 anti-CD3 刺激により増殖させ infection 後 9~12 日後に flow cytometry にて最終的な導入効率の測定を行い, その抗腫瘍効果を検討した.

その結果, レトロウィルスベクターを用いた cIgTCR 導入効率は癌患者末梢血を用いても, Th1-T body, Tc1-T body とともに平均 60~70%と非常に良好であり, 20cc の末梢血採血より 2 週間ほどで約 1×10^8 個程度の Tc1-T body と Th1-T body を調整可能であった. 担癌患者末梢血由来 Th1-T body, Tc1-T body が, 自家大腸癌細胞株 SC1 に対し, CEA 特異的に高い抗腫瘍活性を付与されることが示された. さらにこれらの T body を用いて, 腫瘍拒絶の中心的役割を担う Tc1 細胞の長期生存に必要な因子を調べたところ, Th1 細胞との細胞間接触が重要であることが示された. そしてこれらの T body の抗腫瘍活性は *in vitro* において高い血清 CEA 値をもつ自家血漿中でも, 阻害されることや, 逆に非特異的に活性化されることもなかった. よって本法を用いた癌免疫療法は, 多くの適応患者をもち, 担癌生体において効率的に癌特異的 I 型免疫を誘導する可能性があり, 今後の臨床応用が期待される.

公開発表において, 副査近藤哲教授より Th1-T body の Tc1-T body へのサポート能とそれらの同時投与の際の強い癌拒絶との関連性について, T body の実際における適切な誘導, 培養方法, ウィルスベクターとしてレトロウィルスを選択した理由, 細胞株樹立の際の工夫点について質問があった. 続いて副査西村孝司教授より, 臨床応用にむけて乗り越えるべき障壁について, Th1 細胞の Tc1 細胞へのサポート能と表面分子, サイトカインとの関連性について質問があった. 最後に主査今村雅寛教授より, 臨床応用へのハードルについて, また鏡検像において Th1-T body と Tc1-T body の腫瘍細胞周囲への集塊形成パターンが異なる理由についての質問があった. いずれの質問に対しても, 申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえて適切に回答した.

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と判定した.