

学位論文題名

Identification of tumor-derived helper peptides  
and generation of tumor-specific Th1  
cells applicable to clinical study.

(腫瘍抗原由来ヘルパーペプチドの同定と  
腫瘍特異的 Th1細胞の臨床応用への基礎検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 腫瘍抗原分子存在が初めて報告されて以来、腫瘍抗原を標的とした腫瘍抗原特異的免疫療法の研究が急速に進んで来ている。当初、腫瘍細胞を直接殺傷することから CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) にのみ注目が集まり、腫瘍特異的 CTL を誘導する為に必要な MHC class I 結合性ペプチドの同定が盛んに行なわれてきた。近年、同定された class I ペプチドを用いた臨床試験が数多く行なわれているが、ほとんどの症例で期待された臨床効果は得られていない。現在では、実験動物を用いた研究により、強力で持続的な抗腫瘍効果を得るには CD4 陽性ヘルパー T (Th) 細胞の存在が必要不可欠であることが分かっている。さらに、Th 細胞の中でも特に IFN- $\gamma$  や IL-2 を高産生する type 1 型 Th (Th1) 細胞を用いることで、より効果的な腫瘍拒絶を誘起できることが報告されているため、癌患者に対する新しい癌ワクチンとして腫瘍抗原特異的 Th1 細胞を利用するのが最良なのではないかと期待される。そこで本研究では腫瘍抗原特異的 Th1 細胞の、効率良く多くの患者に適用可能な腫瘍抗原特異的 Th1 細胞の誘導方法について検討をおこなった。

標的抗原として NY-ESO-1 分子と MAGE-A4 分子を選択した。NY-ESO-1 は精巣以外の正常組織にはほとんど発現が認められない癌精巣抗原の 1 つであり、抗原性が強く癌患者において抗 NY-ESO-1 抗体が認められる場合がある。また、欧米人において幅広い癌種に発現が認められることから、NY-ESO-1 を標的抗原とした臨床試験が既に始められている。MAGE-A4 は精巣と胎盤を除く正常組織において発現が認められない腫瘍抗原であり、欧米人に限らず日本人にも幅広い癌種に高い頻度で発現が認められる。これらの腫瘍抗原分子における Th 細胞を活性化させるための class II 結合性ヘルパーエピトープペプチドは、NY-ESO-1 においては一部に報告されているものの、MAGE-A4 においては全く報告されていないのが現状である。そこで今回の研究では、これら 2 種類の腫瘍抗原由来ヘルパーエピトープペプチドの同定を試みた。

【材料と方法】 健康人から末梢血を採取し、ファイコールを用いて密度勾配分離法にて末梢血単核 (PBMC) を得た。PBMC から Th 細胞を単離し共培養するまで凍結保存した。樹状細胞 (DC) を分化させるために、付着性細胞を GM-CSF と IL-3 の存在下で 1 週間培養した。精製ペプチドを抗原として用いて Th 細胞を刺激する場合には、ペプチドを食食させマイトマイシン C で不活化させた DC を抗原提示細胞 (APC) として用いた。それ以降、同様に処理した PBMC を用いて Th 細胞を刺激した。一方、遺伝子組換え大腸菌から精製した組換え腫瘍抗原蛋白質を抗原として用いる場合には、最初の 2 回の刺激時に、抗原蛋白質を食食させマイトマイシン C で不活化させた DC を用い、3 回目以降の刺激には腫瘍抗原蛋白質の全アミノ酸配列を網羅するオーバーラッピングペプチドを食食させた PBMC を APC とした。この際、オーバ

オーバーラッピングペプチドを4〜5種類ずつにプールし、それぞれの mixture (MIX) を抗原とし、培養している Th 細胞を分けて異なる MIX で刺激を行なった。

Th 細胞の抗原に対する特異性を調べるために、ペプチド刺激を行なった Th 細胞からのサイトカイン産生量を ELISA 法にて測定した。また、HLA 拘束性を調べるために、抗 HLA-DP 抗体、抗 HLA-DQ 抗体、および、抗 HLA-DR 抗体を用いて検討を行った。さらに詳細な拘束性を調べるために、抗原特異的 Th 細胞の HLA 型の一部と適合しているか、もしくは全く適合しない HLA 型をもつ APC を用いた。Th 細胞中に含まれる抗原特異的 Th 細胞の割合を調べるために、細胞内染色法を用いた。樹立した腫瘍抗原特異的 Th 細胞の細胞傷害活性能を調べるために、EB ウイルスで不死化させた自己の B 細胞 (EBV-B 細胞) を標的細胞として 4 時間  $^{51}\text{Cr}$  遊離試験を行った。

**[結果]** 組換 NY-ESO-1 蛋白質を用いて Th 細胞を刺激した結果、3 名の健常人から NY-ESO-1 特異的 Th 細胞が確認された。各 Th 細胞が特異性を示すオーバーラッピングペプチドをそれぞれ同定した。これらの反応は全て抗 HLA-DR 抗体で阻害されたことから、各 Th 細胞は HLA-DRB1\*0101、\*0901、および、\*0802 に拘束されることが明らかとなった。また、NY-ESO-1 ペプチドを用いて誘導された 2 種類の Th 細胞はそれぞれ HLA-DRB1\*0405/\*0410、および、DRB1\*1502 に拘束されることが明らかとなった。また、HLA-DRB1\*0901、DRB1\*1502、および、DRB1\*0405/\*0410 に特異的な各 Th 細胞は NY-ESO-1 中の近い領域を認識することが明らかとなった。誘導された Th 細胞は IFN- $\gamma$  を高産生し、細胞傷害活性能を有することから、Th1 細胞であることが示唆された。

組換 MAGE-A4 蛋白質を用いて検討した結果、3 名の健常人から MAGE-A4 特異的 Th 細胞が確認された。これらの Th 細胞はそれぞれ HLA-DRB1\*0101、DPB1\*0501、および、DRB1\*1403 に拘束されることが明らかとなった。腫瘍特異的 Th1 細胞療法を臨床応用するために、MAGE-A4 ペプチドを用いて臨床応用可能な腫瘍特異的 Th 細胞の誘導方法を検討した。PBMC 由来の付着性細胞を IFN- $\gamma$  にて 2 時間処理することで、class I、class II、および、CD86 分子の発現上昇が見られた。この細胞を APC として用いた結果、効率良く MAGE-A4 特異的 Th1 細胞が誘導された。また、この誘導方法は 4 週間で特異的 Th1 細胞集団を約 10〜25 倍ほどに増殖させることが明らかとなった。

**[考察]** NY-ESO-1 および、MAGE-A4 由来のヘルパーエпитープペプチドが同定された。両者とも、複数の HLA 型に結合することが明らかとなり非常に有用なペプチドであると期待される。特に MAGE-A4 由来ヘルパーペプチドが結合する HLA-DPB1\*0501 は約 60% の日本人に発現されるため、臨床応用に非常に適したペプチドであると言えるであろう。また、Th1 細胞療法を臨床応用するためには、短時間で効率良く、腫瘍特異的 Th1 細胞を樹立する方法を確立する必要がある。今回検討を行った IFN- $\gamma$  処理付着性細胞は、DC と同様に効率良く腫瘍特異的 Th 細胞を誘導するだけでなく、IL-4 をほとんど産生しない Th1 細胞を誘導した。従来、T 細胞を刺激する際には DC が使われていたが、PBMC から DC を樹立するには、約 1 週間の培養期間が必要となるため、患者から PBMC を分離した当日に Th 細胞の誘導を開始することが不可能であった。その点、今回検討した Th 細胞培養法は、PBMC を分離した当日から Th 細胞の誘導を開始することが出来るため、大きな時間短縮を可能とした。

**[結論]** NY-ESO-1 および、MAGE-A4 から、複数の HLA 型に結合可能なヘルパーエпитープペプチドが同定された。ヘルパーペプチドを用いて腫瘍特異的 Th1 細胞の誘導法を検討した結果、IFN- $\gamma$  処理付着性細胞を用いることで短期間に DC と同等の腫瘍特異的 Th1 細胞が誘導可能となった。以上のことから、MAGE-A4 由来ヘルパーエпитープペプチドと IFN- $\gamma$  処理付着性細胞を用いた Th 細胞培養法により、Th1 細胞療法の臨床応用が可能であるものと考えており、現在臨床研究のための準備中である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 諭  
副 査 教 授 藤 堂 省  
副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

## Identification of tumor-derived helper peptides and generation of tumor-specific Th1 cells applicable to clinical study.

(腫瘍抗原由来ヘルパーペプチドの同定と  
腫瘍特異的 Th1細胞の臨床応用への基礎検討)

本研究は、ヒトの腫瘍抗原である NY-ESO-1 および MAGE-A4 における MHC class II 結合性ヘルパーペプチドの同定と、それを用いて誘導される腫瘍特異的 Th1 細胞の臨床応用への基礎検討を行ったものである。NY-ESO-1 と MAGE-A4 はともに広範囲の癌の種類に高頻度で発現が確認されていることから、癌の免疫療法において有望な標的抗原であるとされている。申請者は、組換え蛋白質とオーバーラッピングペプチドを用いて NY-ESO-1 および MAGE-A4 由来のヘルパーペプチドを同定した。それぞれのペプチドは共に多くの日本人に発現が見られる複数の class II 分子に結合可能であることが示され、promiscuous ペプチドであるということが証明された。また、腫瘍特異的 Th1 細胞療法を臨床応用するために、腫瘍特異的 Th1 細胞の効率的な誘導方法を検討した結果、末梢血単核球 (PBMC) 由来の接着性細胞を IFN- $\gamma$  処理することにより腫瘍特異的 Th 細胞が効率的に誘導されるということを示した。この方法は従来から用いられてきた GM-CSF と IL-4 にて誘導された樹状細胞を抗原提示細胞として用いた誘導方法に匹敵する程の誘導効率を示した。さらに、この方法を用いて誘導された腫瘍特異的 Th 細胞は IFN- $\gamma$  を高産生し IL-4 をほとんど産生しない Th1 細胞であることが証明され、Th1 細胞を用いた養子免疫療法に応用可能であることが示唆された。また、この方法を用いることにより 4 週間で 20 倍程度の Th1 細胞の増殖が確認され、腫瘍特異的 Th1 細胞療法の臨床応用に向けて非常に有用な誘導方法であることが示唆された。

学位論文発表後、副査の藤堂省教授から、同一の腫瘍抗原と HLA の組み合わせを有している癌患者であっても、腫瘍特異的キラーT細胞が認識する抗原ペプチドの種類が異なることが報告されており、全ての癌患者に 1 種類の抗原ペプチドを用いて腫瘍特異的 Th1 細胞を誘導しようとした場合、患者間で効果が大きく異なるのではないかと質問があった。この点に対して、健常人のリンパ球を用いた検討では、HLA の型が適合していれば特異的 Th1 細胞を誘導することが可能であったことから、癌患者の場合においても生体外で腫瘍特異的 Th1 細胞を誘導することは可能であると返答した。また、その Th1 細胞を抗原ペプチドとともに生体内に戻すことにより、患者生体内の免疫系を活性化し腫瘍退縮効果が得られると期待できると返答した。さらに、申請者が同定したペプチドは、組換え蛋白質を食させた樹状細胞を用いて刺激していることから、蛋白質からプロセッシングされて提示される抗原部位であるため、より Th1 細胞を刺激するのに適したペプチドであると述べた。

次に主査の福田諭教授から、実際に MAGE-A4 を標的とした臨床試験を行う場合の患者の選別方法について質問があり、標準治療では治療効果が期待できない癌患者の中で腫瘍の組織切片を用いて免疫染色法により MAGE-A4 の発現の有無を調べ、採取したリンパ球からゲノムを抽出し、HLA の型が HLA-DPB1\*0501、DRB1\*1403、DRB1\*1502 のいずれかであることを確認すると返答した。また、頭頸部腫瘍患者の場合ではどのくらいの割合が対象患者になり得るのかとの質問があり、頭頸部腫瘍における MAGE-A4 の発現頻度が 50% 弱であることと、ペプチドが結合する HLA 頻度が 60% 程度であるということ considering、全体で 30% 強の患者が対象となると返答した。

最後に、副査である西村孝司教授から、ヒト腫瘍特異的 Th1 細胞療法の臨床応用に向けた基礎検討における今後の展望について質問があった。これに対して、同一の血液供与者から得られた PBMC から EB ウイルスを用いて B リンパ腫細胞 (LCL) を、CD4 陽性 T 細胞からヒト腫瘍特異的 Th1 細胞を樹立し、ヒト腫瘍特異的 Th1 細胞の抗腫瘍効果を *in vivo* で検討する予定である。そのために免疫不全マウスである BALB/c-*rag2*<sup>-/-</sup>*γc*<sup>-/-</sup> マウスを用いて LCL とヒト腫瘍特異的 Th1 細胞の移植実験を検討中であると返答した。すでに、MAGE-A4 特異的 Th1 細胞と MAGE-A4 遺伝子を導入した癌細胞を既に樹立しており、BALB/c-*rag2*<sup>-/-</sup>*γc*<sup>-/-</sup> マウス脾臓内において癌細胞が生着することを確認していると回答した。

この論文は、新しい癌の免疫療法である Th1 細胞療法を臨床応用する上で非常に有用な知見を提供するだけでなく、今後の Th1 細胞療法の抗腫瘍効果が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過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。