

学位論文題名

The critical role of immune balance
in cancer immunosurveillance

(癌免疫監視機構における免疫バランス制御の重要性)

学位論文内容の要旨

【背景】癌細胞には正常組織には発現していない、あるいは発現が非常に限局している癌抗原遺伝子が存在することが報告され、かつ、その癌抗原に対する細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)が誘導できることが証明されたことにより、癌抗原を標的とした癌免疫療法の可能性が大きく広がった。この現象をもとに、現在、癌抗原を標的とした癌ワクチン療法の研究が盛んに行われているが、担癌生体内では制御性T細胞(Treg)や未熟ミエロイド細胞などによる強固な免疫抑制機構が存在しているため、機能的なCTLを誘導し癌を完全に排除することは非常に困難である。そこで、担癌生体の免疫抑制を打破し、腫瘍拒絶を誘導し得る新たな癌免疫療法を開発するため、強力な細胞傷害性を有し、腫瘍の排除に適したTh1免疫に着目した。生体内の免疫システムは、主にTh1、Th2、Th17、TregなどのヘルパーT細胞サブセットによってそのバランスが厳密に制御されているが、担癌生体内では抗腫瘍免疫を担うTh1免疫は抑制環境にある。そこで、自然免疫からTh1獲得免疫に至る一連の免疫応答(type 1免疫)を惹起するアジュバント、CpGオリゴヌクレオチド(CpG-ODN)を用いて免疫バランスを人為的に制御し、担癌生体内で抗腫瘍type 1免疫を惹起する癌ワクチン療法の抗腫瘍効果とその作用機序を精査した。

(I) 移植腫瘍モデルにおける CpG 癌ワクチン療法の抗腫瘍効果とその作用機序の解明

【目的】CpG-ODNは toll 様受容体 (toll-like receptor: TLR)-9 を介して、type 1 自然免疫、および獲得免疫を惹起することが報告されている。また、ドラッグデリバリーで用いられるリポソームは、樹状細胞への食食亢進や徐放作用などが知られており、リポソーム、CpG-ODN 癌抗原の併用によって、効率的かつ持続的な type 1 免疫の活性化が期待される。そこで、免疫バランス制御を介した新規癌ワクチン療法として、CpG 癌ワクチン療法の抗腫瘍効果とその作用機序を検討した。

【方法と結果】仮想癌抗原として卵白アルブミン (ovalbmin: OVA) 遺伝子を導入した癌細胞株 EG-7 (2×10^6 個) を同系 C57BL/6 マウスの腹部皮内に接種し、担癌マウスを作成した。EG-7 担癌マウスの腫瘍径が 6-7 mm に達した後に、OVA タンパク (OVA, 200 μ g)、CpG-ODN (50 μ g)、OVA+CpG-ODN をリポソームに封入して癌所属リンパ節近傍に皮内接種した。その後の腫瘍増殖の変化を比較したところ、リポソーム封入 OVA+CpG-ODN 治療群において最も強い抗腫瘍効果が認められ、約 60% の個体で完全治癒が確認された。腫瘍退縮の過程において、癌所属リンパ節、および腫瘍内で OVA₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド結合 MHC テトラマー (OVA テトラマー) 陽性 CTL が高頻度に検出され、OVA に対して特異的に強い細胞傷害活性を示した。OVA テトラマー陽性 CTL は特に腫瘍組織に多く局在すること、癌非所属リンパ節近傍への治療や、リンパ節を欠損する Aly/Aly マウスでは検出されないことから、癌特異的 CTL は癌所属リンパ節において効率的に誘導され、腫瘍局所へと浸潤、集積していることが示唆された。また、抗体により、CD4、CD8、NK1.1 陽性細胞を除去

したところ、CD8 陽性細胞を除去したマウスにおいてのみ OVA テトラマー陽性 CTL が誘導されず、CpG 癌ワクチン療法では CD4 陽性 T 細胞非存在下であっても CTL が誘導されることが明らかとなった。さらに、抗体によって IFN- α と IFN- β を阻害した時のみ、OVA テトラマー陽性 CTL の誘導が抑制され、IFN- γ 欠損マウス、IL-12 欠損マウスでは CTL の誘導抑制は認められなかった。すなわち、CpG 癌ワクチン療法によって癌特異的 CTL は IFN- α/β 依存的に誘導されることが示された。

(II) 新規上皮性腫瘍発癌モデルによる CpG-ODN 誘発 type 1 免疫の癌免疫監視機構の解明

【目的】CpG 癌ワクチン療法の臨床への応用を考慮した場合、より臨床に近い原発腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果の検討が必要である。これまでに、メチルコラントレン (methylcholanthrene: MCA) 誘発線維芽肉腫を標的とした癌免疫監視機構の解析は進められているが、癌患者では圧倒的に上皮性腫瘍の割合が多いため、簡便な原発上皮性腫瘍の発癌モデルが必要であると考えられる。そこで、まず、MCA を用いた新規原発上皮性腫瘍発癌モデルを確立し、type 1 免疫による癌免疫監視機構と、原発腫瘍に対する CpG 癌ワクチン療法の抗腫瘍効果を検討した。

【方法と結果】上皮細胞が存在する組織へ MCA を接種することで、上皮性腫瘍が発生することが期待される。そこで、腫瘍形成が容易に判断できる皮膚組織において、MCA を皮内接種することによる上皮性腫瘍発癌モデルの確立を試みた。BALB/c マウスに corn oil に溶解した MCA (500 μ g) を腹部皮下、および皮内に接種して腫瘍形成を経時的に観察し、腫瘍組織を HE 染色、免疫組織化学染色法によって解析した。これまでの MCA を用いた発癌実験と同様に、皮下接種群では発生した腫瘍は全て線維芽肉腫であったのに対し、皮内接種群では扁平上皮癌 (60%) と線維芽肉腫 (40%) の発生が認められた。また、皮内接種群では、皮下接種群にくらべ腫瘍の発生が非常に早く、特に扁平上皮癌の発生が早期に認められた。次に、皮膚扁平上皮癌モデルを用い、癌免疫監視機構における type 1 免疫の関与を検討するため、野生型マウス、および IFN- γ 欠損マウスの皮内に MCA を接種した。野生型マウスに比べ、IFN- γ 欠損マウスにおいて扁平上皮癌の発生率が増加したことより、扁平上皮癌に対する癌免疫監視機構に IFN- γ が強く関与することが示された。さらに、CpG-ODN の原発腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討するため、MCA を皮内接種後、2 週目より 10 日毎に CpG-ODN (50 μ g) を所属リンパ節近傍へ皮内接種した。その結果、原発腫瘍の発生が有意に遅延し、扁平上皮癌の発生率の減少が認められた。また、この効果は IFN- γ 欠損マウスでは認められなかったことから、CpG-ODN は IFN- γ 依存的に原発扁平上皮癌の発生を抑制することが示された。

【結論】本研究によって、(I) リポソーム、CpG-ODN、癌抗原による癌ワクチン療法は、腫瘍塊が形成した担癌マウス生体内において、IFN- α/β 依存的に癌特異的 CTL を誘導して癌の完全拒絶をも誘導し得ること、(II) MCA の皮内接種による簡便な皮膚扁平上皮癌の発癌モデルを確立し、扁平上皮癌に対する癌免疫監視機構に IFN- γ が重要な役割を担っていること、(III) CpG-ODN は、原発扁平上皮癌に対して、発癌抑制効果を示すことを明らかとした。以上の結果より、CpG 癌ワクチン療法は非常に有用な免疫療法であり、臨床での効果が期待される。さらに、今後、本研究で確立した発癌モデルを用い、上皮性腫瘍に対する癌免疫監視機構や発癌機序を追求していく予定である。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

The critical role of immune balance in cancer immunosurveillance

(癌免疫監視機構における免疫バランス制御の重要性)

本研究は、CpG オリゴヌクレオチド (CpG-ODN)を用い免疫バランスを人為的に制御することによる新規癌ワクチン療法の抗腫瘍効果、およびその作用機序を証明したものである。申請者は、CpG-ODN と癌抗原をリポソームに封入した癌ワクチン療法によって、担癌生体内の免疫抑制機構を打破し、IFN- α 、IFN- β 依存的に癌特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されること、特に癌所属リンパ節において効率的に CTL の誘導が行なわれ、腫瘍局所へと浸潤、集積することで非常に効果的な抗腫瘍活性を示すことを明らかとした。さらに、化学発癌剤であるメチルコラントレン (MCA)を皮内接種することによる簡便な皮膚上皮性腫瘍の発癌モデルを新たに確立し、CpG-ODN 投与によって IFN- γ 依存的に原発腫瘍の発生が抑制されることを示した。

学位論文発表後、副査の福田諭教授から、CpG-ODN の癌ワクチン療法を行なう際、ワクチンの投与経路による抗腫瘍効果の相違について質問があった。この点に対して、腫瘍局所への投与の場合、CpG-ODN 単独でも強い抗腫瘍効果を示した実験結果、および腫瘍周辺への投与であっても抗腫瘍効果が認められる文献を例に、腫瘍に近い部位に接種することで CpG-ODN の抗腫瘍効果は増強できる可能性があることを返答した。また、本研究で確立した上皮性腫瘍の発癌モデルは皮膚扁平上皮癌であるが、口腔内などでは粘膜に癌が発生するケースが多いため、粘膜における発癌モデルについて質問があった。この質問に対して、本研究では MCA を上皮組織内に接種することで、その局所に存在する上皮細胞の癌化が認められたことから、粘膜への接種方法を開発することで粘膜における発癌モデルも確立可能であると返答した。さらに、CpG-ODN によって原発腫瘍の発生抑制効果は認められるが、治療効果はあるかとの質問に対し、MCA で誘導した上皮性原発腫瘍に対して CpG-ODN を局所投与による治療実験を行なったが、治療効果は認められなかったことから CpG-ODN と癌抗原による治療が必要であることを返答した。

次に主査の藤堂省教授から、CpG-ODN の臨床応用の現状について質問があり、癌、およびアレルギー疾患において既に臨床試験が行なわれていることを返答した。また、本研究で用いた仮想癌抗原は外来抗原であり、自己の癌抗原に対する免疫応答とは異なる点について質問があった。この質問に対し、本研究の過程で作成した多くの癌細胞株を用いて広範な発現を示す癌抗原を探索中であり、癌抗原の同定を経て移植腫瘍、原発腫瘍に対する CpG-ODN 癌ワクチン療法の抗腫瘍効果を検討予定であることを返答した。さらに、CpG-ODN による癌ワクチン療法における主な免疫制御細胞についての質問に対し、CpG-ODN に直接反応し免疫応答を開始する樹状細胞、および CTL や樹状細胞の活性化を

補助する Th1 細胞が重要であり、最終的に CTL によって腫瘍の排除が行なわれることを返答した。また、MHC クラス I 分子の発現が消失する癌の免疫逃避機構があるため、CTL による抗腫瘍効果に対して耐性を示す可能性があるとの質問に対し、CpG-ODN による癌ワクチン療法では CTL だけでなく NK 細胞の活性化も誘導されており、MHC 分子の発現が低下した癌細胞に対しても対応できる可能性を返答した。

最後に、副査である西村孝司教授から、CpG-ODN を用いた癌ワクチン療法の臨床試験の現状とその改善点についての質問があった。これに対して、CpG-ODN と癌抗原 MHC クラス I 結合性ペプチドによる癌ワクチン臨床試験では、末梢血中において癌抗原特異的 CTL の増加が認められたが癌の退縮などは認められていないことを返答し、CTL と同時にヘルパー T 細胞を活性化させる為に、MHC クラス II 結合性ペプチド、あるいは癌抗原タンパク質と CpG-ODN を用いた癌ワクチン療法の有効性について述べた。さらに、発癌機構と免疫に関する最近の知見と今後の展望についての質問に対して、免疫システムは慢性炎症による発癌促進の側面と免疫監視機構による発癌抑制の側面とが存在し、この両側面がどのように制御されているかが注目されている点であることを例に挙げ、Th1、Th2、Th17 細胞による免疫バランスによって免疫の発癌に対する作用機序が異なる可能性があるとの考察を述べた。

この論文は、移植腫瘍担癌モデルだけでなく、原発腫瘍モデルを用い抗腫瘍免疫の作用機序を詳細に示した点で高く評価され、今後の CpG-ODN を用いた癌ワクチン療法の臨床での効果が期待される。

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。