

学位論文題名

細胞内腫瘍抗原に対する新規抗体療法の開発

学位論文内容の要旨

【背景と目的】細胞表面に発現する腫瘍抗原に対する抗体療法は、現在臨床現場で応用されており、その効果も広く認められている。その作用機序には、がん細胞への直接的な細胞増殖シグナル抑制作用が挙げられるが、抗原抗体免疫複合体の Fc 領域を介した造血細胞による抗体依存性細胞傷害や補体による補体依存性細胞傷害も知られている。また、腫瘍抗原が免疫複合体として Fc 受容体経路で抗原提示細胞に取り込まれることで、抗原提示細胞が活性化を受け、CD8 陽性 T 細胞への抗原提示（クロスプレゼンテーション）が促進され結果的に抗腫瘍効果が誘導されることも明らかとなってきた。このように、生体内で受動的に形成された腫瘍抗原と抗原特異的抗体とによる免疫複合体は、がん治療における幅広い応用性を期待させるが、多くの腫瘍抗原は細胞表面に発現を認めず、細胞内に局在しており、従来これらは、抗体療法の対象としては不適切と考えられてきた。NY-ESO-1 はがん精巣抗原で、精巣を除いた正常組織で発現を認めないものの、様々な組織由来の腫瘍組織の 20-30%程度で発現を認めるため、臨床応用が期待される腫瘍抗原の一つである。NY-ESO-1 はがん患者において高い免疫原性をもち、腫瘍抗原特異的免疫療法の理想的な標的抗原として考えられているが、細胞膜への結合配列を含まず、局在は細胞内であるため、従来、抗体療法の対象とは考えられていなかった。一方で、がん患者における血清中抗 NY-ESO-1 抗体濃度と NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の頻度の相関や、*in vitro* 実験系で NY-ESO-1 と抗体との免疫複合体が効率的にクロスプレゼンテーションされることが示されている。こうした背景は、何らかの手段で細胞を破壊することにより、細胞内抗原の放出を促進することで、生体内で十分な免疫複合体を形成することができれば、抗腫瘍免疫が誘導される可能性を示唆するものである。

そこで、本研究において、細胞内発現腫瘍抗原のモデル抗原として、NY-ESO-1 を用い、細胞内腫瘍抗原に対する抗体療法を確立するとともに、免疫複合体からの免疫系を介した腫瘍縮小効果についての検討を行った。

【材料と方法】マウスは BALB/c、BALB/c^{nu/nu}、C.B-17 SCID、Fc 受容体 γ 鎖欠損 BALB/c を用いた。細胞株はトランスフェクション法により樹立された NY-ESO-1 発現マウス大腸癌細胞株 CT26 (CT26-NY-ESO-1)、肉腫細胞株 CMS5a (CMS5a-NY-ESO-1)、MAGE-A4 発現 CT26 (CT26-MAGE-A4) を用いた。NY-ESO-1 および MAGE-A4 に対する抗体を各ハイブリドーマより精製した。細胞株の NY-ESO-1 の発現をウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーによる細胞内染色法により確認した。上記細胞株を動物内に皮下接種し、NY-ESO-1 もしくは MAGE-A4 に対する抗体療法の腫瘍縮小効果を、細胞破壊を目的とした抗癌剤と併用し観察した。併用する抗癌剤として、5-FU とドキシソルビシンを用いた。経時的に、所属リンパ節と腫瘍浸潤リンパ球を回収し、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生応答およびメモリーフェノタ

イブを、また、樹状細胞の活性化マーカーの発現状況を、それぞれフローサイトメトリーにて検討した。抗体 Fc 領域の関連性を、Fab 化抗 NY-ESO-1 抗体と Fc 受容体 γ 鎖欠損 BALB/c を用いて検討した。CT26-NY-ESO-1 に対する 5-FU 治療後に投与したヒト抗 NY-ESO-1 抗体のマウス生体内での腫瘍局所への集積を病理学的に評価した。

【結果】CT26-NY-ESO-1、CMS5a-NY-ESO-1 の NY-ESO-1 の発現を細胞表面に認めず、細胞内に認めた。In vitro で 5-FU 処理された CT26-NY-ESO-1 より、NY-ESO-1 が培養上清中より放出されることを ELISA にて確認した。また、in vivo で CT26-NY-ESO-1 への抗 NY-ESO-1 抗体の腫瘍局所への集積は 5-FU との併用により著明に増加していた。CT26-NY-ESO-1 担癌 BALB/c マウスに対し、5-FU と抗 NY-ESO-1 抗体の併用療法を行ったところ、5-FU 単独投与群に比し、有意な腫瘍縮小効果の増強を認め、抗体単独投与群では無治療群と効果に差を認めなかった。併用療法の増強効果は、抗原と抗体の特異性に依存していた。CMS5a-NY-ESO-1 担癌 BALB/c マウスに対しても、ドキシソルピシンと抗 NY-ESO-1 抗体の併用により、抗腫瘍効果の増強を認めた。BALB/c^{nu/nu} と CD8 陽性細胞除去抗体を用いた実験より、併用療法の増強効果が CD8 陽性 T 細胞依存性であることが明らかとなった。併用療法群においては、5-FU 単独治療群に比し、NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞における IFN γ および TNF α 産生の上昇とエフェクター／メモリーフェノタイプの増加を認めた。そして、NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導に相関して、樹状細胞活性化マーカーの上昇を認めた。併用療法の腫瘍縮小増強効果は、Fab 化抗 NY-ESO-1 抗体または Fc 受容体 γ 鎖欠損 BALB/c を用いた場合には消失した。

【考察】CT26-NY-ESO-1 に対する 5-FU と抗 NY-ESO-1 抗体の併用療法により、腫瘍縮小効果の増強を認めた機序は、生体内で形成された免疫複合体の Fc 領域と Fc 受容体を介して樹状細胞に取り込まれ、効率的なクロスプレゼンテーションを経て、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導されているものと推測された。トランスレーショナルリサーチの位置づけから、本研究では、現在臨床現場で抗体療法と併用して広く用いられている抗癌剤を、細胞内抗原の放出を目的とする治療法として採用したが、今後、放射線療法、局所凍結療法といった腫瘍細胞死を直接的に誘導する他の治療法と細胞内腫瘍抗原特異的抗体との併用療法の効果の検討も期待される。今回、他のサブクラスに比べ抑制型 Fc γ 受容体への結合親和性の高いマウス IgG1 で抗腫瘍効果免疫応答観察されたのは、興味深い結果となった。5-FU 投与の有無で樹状細胞における活性化型／抑制型 Fc γ 受容体比は変化しなかったが、他の造血細胞における同比や Fc γ 受容体以下のシグナルが変化した可能性を検討することと、各 Fc γ 受容体欠損マウスを用いた動物実験や既存の IgG1 から他のサブクラスへクラススイッチした抗体を用いた比較検討実験を行うことにより、細胞内抗原に対する抗体療法の最適化が図られることが期待された。本モデルでは、NY-ESO-1 に対し、ヒト同様に内因性液性免疫の誘導を認めたが、その濃度は外因性に投与した場合に比べると、はるかに低い濃度であり、治療効果を得るためには、早期に高い抗体 NY-ESO-1 血中濃度を維持することが肝要と推測された。

【結論】今回の研究で、細胞内腫瘍抗原に対する抗体療法が、抗癌剤との併用により腫瘍縮小効果の増強と予後の改善に寄与することが示された。その作用機序は、生体内で形成された免疫複合体を介した抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導であった。今後、本研究の概念に基づいた、臨床応用が進むことを期待する。

学位論文審査の要旨

主査	教授	志田	壽利
副査	教授	趙	松吉
副査	教授	西村	孝司
副査	教授	平野	聡

学位論文題名

細胞内腫瘍抗原に対する新規抗体療法の開発

本研究は、がん免疫療法における細胞内腫瘍抗原に対する抗体療法の新規概念を提唱したものである。学位審査は4名の審査員により非公開で行われ、申請者の発表後、質疑応答が行われた。

西村教授より、CD4除去環境下でも抗腫瘍効果が維持された背景と、免疫複合体が補完すると予想される樹状細胞からの産生されるサイトカインについて質問があった。申請者は、活性化マーカーの上昇に相関してIL-12産生が、またCD4陽性T細胞の補完という観点では、I型IFN産生などが、より促進している可能性を挙げた。続いて、用いている抗体が、MHC class I上のNY-ESO-1 epitopeと、TCRとのinteractionを阻害する可能性について質問があった。申請者は、用いた抗体はNY-ESO-171-90を認識し、またNY-ESO-1 MHC class I epitopeはNY-ESO-181-88であり、in vitroの機序としては、質問の可能性を否定できないが、MHC class Iと複合体を形成したNY-ESO-1 class I epitopeを抗体が認識しうる可能性と、実際に得られている腫瘍増殖観察結果から、否定的である旨回答した。

副査 趙教授より実験群のn数の設定について質問があった。申請者は、一つの動物実験の全体数が40-50匹程度、腫瘍径観察群をn=5、腫瘍増殖経過観察中の免疫解析としてn=3-4、対照群設定を5-6群とし、初期設定した後、実際に担癌後、治療開始時に腫瘍が確立されていないマウスを除外し、実験を試行した旨回答した。そのため、各実験でn数に若干の差があることを説明した。次に、今後、PETなどを含めたimagingへの応用について質問を受けた。申請者は、腫瘍径の差が出る前に、腫瘍細胞における代謝レベルですでに各治療間で差が出ている可能性は考慮すべきであり、本研究においても内部で議論が行われたことを回答した。結果的に、扱う腫瘍のサイズが非常に小さいことによって信号強度の解析が困難になることを懸念して、本研究では検討が保留とされた経緯を説明した。

副査 平野教授より5-FU投与方法 (bolusか持続か) と治療効果の関連性について質問があった。申請者は、本研究においては、免疫複合体を経た抗腫瘍免疫増強作用の観点から、持続投与による骨髄抑制の遷延を懸念し、持続投与の検討を行わなかったこと、抗癌剤使用目的の位置づけを細胞内抗原の放出としていたことにより、一定間隔による単回bolus投与を基軸として、本研究のプロトコールに至った旨回答した。次に、CT26-NY-ESO-1モデルにおける、2サイクルで終了している治療をさらに増やすことで、期待される抗腫瘍効果の増強についての質問があった。申請者は2サイクル終了後には、併用治療群においては抗腫瘍免疫の優位性はNY-ESO-1特異的免疫から別の腫瘍抗原であるAH-1に移行しており (antigen-spreading)、さらにNY-ESO-1を標的とした治療法を行う意義は乏しく、AH-1などの別の抗原を標的とした抗腫瘍免疫を増強することが肝要である旨回答した。

最後に、志田よりNY-ESO-1発現腫瘍担癌患者において、NY-ESO-1に対する自然発生的な免疫応答、特にCD8陽性T細胞応答の程度について質問をした。申請者は、患者サンプルを用いた解析において、内因性の抗NY-ESO-1液性免疫応答とまた、内因性抗NY-ESO-1CD8陽性T細胞応答が相関していることを回答した。次に、今後の臨床応用の展望についての質問があった。申請者は、共同研究者が既にGMPグレードヒト抗NY-ESO-1抗体の開発に着手しており、本概念に基づいた臨床試験を早期に始める予定であることを回答した。

今回の研究により、細胞内腫瘍抗原に対する抗体療法は、抗原の放出を目的とした抗癌剤と併用することにより抗腫瘍効果を増強することが示された。多くの細胞内局在腫瘍抗原に対する特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導する受動的免疫療法として、本研究の概念が臨床的に応用されることが期待された。

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) の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。