

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 T細胞レセプター遺伝子の導入による抗原特異的  
免疫応答の制御

指導教官 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月1日入学

医学博士課程 内科学専攻

氏名 藤尾 圭志

T細胞は炎症局所に浸潤し炎症メディエーターを分泌し炎症細胞の遊走を誘導し、B細胞による抗体産生を促進するなど免疫反応を制御する役割を担っている。T細胞レセプターはそのT細胞の制御する抗原特異的免疫反応の鍵であり、これまで抗原特異的T細胞の養子移入により腫瘍・感染症・自己免疫のモデル系で様々な治療効果が報告されている。通常生体内では抗原特異的T細胞の数は限定されており、抗原特異的T細胞を大量に治療に応用するためにTCR遺伝子導入による抗原特異的T細胞の作製が可能となれば、今後の細胞療法に大きな可能性を開くことになる。これまでにTCRの二つのサブユニット $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖遺伝子を導入する試みがなされてきたが、細胞株に低い効率で発現させるのが限界で応用性の低いものであった。そこで我々は最近開発した高効率パッケージング細胞-PLAT-Eを用いたレトロウイルスベクター系を用いて、マウス末梢のCD4陽性またはCD8陽性T細胞にTCR $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の二つの遺伝子を導入することに成功した。

クラスII拘束性のTCRとしてはニワトリオボアルブミン (OVA) に特異的な DO11.10ハイブリドーマ由来のTCRを使用した。レトロウイルスベクター pMXに $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖をサブクローニングしたものをPLAT-Eにトランスフェクションし、 $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖由来のウイルス上清を独立して作製した。作製したウイルス上清を $\alpha$ 鎖由来のものと $\beta$ 鎖由来のものを1対1で混合し、TCR遺伝子の欠損しているT細胞株TG40に感染させたところ、導入したクローンタイプTCRの発現を抗体で確認できた。さらにレトロネクチンをコートした24穴プレート上で、 $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖由来のレトロウイルス上清を1対1で混合し、ConA及びIL-2で刺激した脾臓細胞を48時間培養することでTCRを脾臓細胞に感染させた。CD4陽性細胞の40-44%で導入したTCR複合体の発現を確認した。導入されたTCRの発現レベルをFACSでみると、DO11.10TCRのトランスジェニックマウス由来のCD4陽性細胞に匹敵するレベルであった。TCRを導入された細胞と導入されなかった細胞でのCD3の発現レベルは同等で、導入されたTCRは内因性のTCRを置換する形で発現していることが推測された。TCRを導入されたCD4陽性細胞はOVAペプチドに対して増殖反応を示し、生体内ではOVAに対する遅延型過敏反応を誘導したことから、レトロウイルスにより導入されたTCR複合体は機能的であると考えられた。

CD8陽性細胞にはクラスI拘束性TCRとして、マウスアロ抗原H-2K<sup>b</sup>に特異的なTCR $\alpha/\beta$ 鎖を導入した。CD8陽性細胞の約50%で導入した $\beta$ 鎖、V $\beta$ 2TCRの発現を確認した。TCRを導入されたCD8陽性細胞はH-2K<sup>b</sup>を発現したp815腫瘍-p815K<sup>b</sup>に対し、抗原特異的な細胞傷害活性及びIFN- $\gamma$ 産生を確認した。ヌードマウスに腫瘍とともにTCRを導入したCD8陽性細胞を接種すると、p815をmock-CD8陽性細胞またはaK<sup>b</sup> AB-CD8陽性細胞と混合して接種し

た場合、全てのマウスは接種後10-14日で腫瘍が出現した。一方p815Kbについてはmock-CD8陽性細胞と接種した場合には接種後10-14日で腫瘍が出現したが、aKb AB-CD8陽性細胞と接種した場合5匹中 1匹のみ腫瘍が出現し、他の4匹は以後腫瘍は出現しなかった。よって抗原特異的な腫瘍の拒絶が認められ、CD8陽性細胞に導入されたTCR複合体は機能的であると考えられた。

以上の結果よりレトロウイルスベクターを用いたTCR遺伝子のCD8またはCD4陽性T細胞への導入により、生体内のクラスI及びクラスII拘束性のT細胞機能を再構築し、抗原特異的免疫反応を制御出来ることを示した。今回我々が開発した手法により生体内の抗原特異的T細胞を飛躍的に増大させることが可能で、免疫反応をこれまでより強力に制御出来る可能性をもつと考えられる。この手法は今後腫瘍・感染症・自己免疫疾患の免疫療法において新たな道を開くものと考えられる。