

[別 紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト樹状細胞による癌特異的細胞性免疫の誘導

指導教官 橋都 浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程
生殖・発達・加齢医学専攻

平成 10 年 4 月入学

氏名 中原 さおり

樹状細胞(dendritic cell ; DC)は、外来抗原、ウイルス感染細胞および死細胞などを認識し、それらに対する免疫反応を開始させる強力な抗原提示細胞である。近年、DC の抗原提示機能を利用して抗腫瘍免疫応答を増強させる研究が盛んに行われ、大腸癌、胃癌、B リンパ腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、および黒色腫などに対する臨床研究も始まっている。DC に抗原を提示させる方法としては、DC に本来備わっている貪食能を利用して腫瘍細胞そのものや特定のタンパク質を DC 内に取り込ませる方法、抗原ペプチドを作成して DC の MHC-クラス I 上に直接パルスする方法、抗原をコードする核酸を DC の細胞質内に導入する方法などがある。一方、成熟度の違いや分布域、誘導法の違いなどによる DC の機能的多様性が明らかになってきているが、実際に、どのような DC にどのような方法でどのような抗原をパルスするのが最も効果的であるか、という点については不明な点が多い。そこで我々は、DC を用いた癌免疫療法の中でも、最も代表的な抗原である癌特異的ペプチドを用いる場合に好適な DC とはどのようなものか、また、どのようにして得られるか、ということを明らかにすることを目的とした基礎的研究を行った。検討に用いるペプチドは、ヒト胎児由来性腫瘍抗原(caricinoembryonic antigen : CEA)由来で、9mer のペ

チドである CE3 (CEA652-660, TYACFVSNL) とした。このペプチドは腫瘍特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を誘導することが既に証明されており、日本人の約 60% が保有している HLA-A*2402 に拘束性のものである。

ペプチドを用いた DC ワクチン療法で用いる DC としては、これまでの知見から未熟 DC よりも成熟 DC の方がより好適と考えられる。その理由として、成熟 DC は、抗原捕捉と抗原処理の能力に関しては未熟 DC のそれに劣るものの、抗原提示に必要な CD80 や CD86 などの免疫副刺激分子や、MHC クラス I および II 分子の発現が強く、IL-12 に代表される Th1 タイプのサイトカインをも産生することにより、効率よく T 細胞を活性化する能力を持つと考えられるからである。またそればかりではなく、未熟 DC にペプチドをパルスしてヒトに投与した場合、その抗原に対して特異的に T レンズが誘導される、ということも最近報告され、ある合成ペプチドを DC 上の MHC クラス I 上に直接提示させたい場合には、DC に何らかの刺激を加えて成熟させた上で、濃度勾配および binding affinity 依存的に内因性ペプチドと置換することで、より効果的な結果が期待されると考えられる。

DC の成熟因子としては lipopolysaccharide (LPS)、Interleukin-1 (IL-1)、Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、バクテリア全菌体などが知られている。我々は、わが国で 20 年来癌の免疫療法に臨床応用されてきた OK-432 がグラム陽性菌である溶連菌の全菌体成分であることに着目し、今回の検討を始めた。溶連菌感染症が悪性腫瘍の退縮をもたらす現象は古くから知られ、Okamoto、Koshimura らは、*Streptococcus Pyogenes* type A3 の菌体をペニシリンで不活化し、凍結乾燥したもの (OK-432) を精製し、溶連菌の抗腫瘍効果を示した。その後の研究で、OK-432 がマクロファージ、T 細胞、NK 細胞、LAK 細胞、CTL などの各種免疫担当細胞の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を増強することが報告され、これらの宿主抗腫瘍免疫能の増強は、各種免疫担当細胞による IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18 など多種類のサイトカイン産生の促進によることが明らかになってきた。このように、OK-432 が免疫系に強く関与していることは明らかであるが、OK-432 の DC に対する作用はいまだ明らかにされていな

い。我々は、DCに対するOK-432の免疫学的反応について、TNF- α やLPSとの比較検討を行った。

まず、健常成人の末梢血単核球からGM-CSFとIL-4存在下に7日間培養して誘導した浮遊細胞の膜表面抗原をフローサイトメトリーで解析したところ、90%以上の細胞が未熟DCに典型的な phenotype を持っていた。この未熟DCから無刺激のDC、TNF- α で刺激したDC、LPSで刺激したDC、OK-432で刺激したDCの4群を用意し、再度、膜表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。成熟度のマーカーとされるCD83の発現率はTNF- α やLPS、あるいはOK-432を加えた群では、無刺激群と比較すると著明に上昇しており、OK-432を加えることでTNF- α やLPSと同様にDCの成熟が促されることがわかった。また、この間に産生されるサイトカインのタンパク量をELISAにより測定したところ、Th1タイプの免疫反応を誘導するといわれるIL-12およびIFN- γ の産生が、OK-432刺激群で著明に上がっており、TNF- α またはLPSで刺激したDCからの産生と比較しても有意に高かった。次に我々は、実際に目的とする癌抗原特異的CTLを誘導する場合に、OK-432が有用であるか否かを検証した。その結果、OK-432で刺激したDCに前述のCE3をパルスした場合に、最も強いCE3特異的細胞傷害活性をもつことが ^{51}Cr releasing assayで確認された。また、HLA-A*2402上に呈示されたCE3と結合可能な特異的受容体を持つT細胞を直接染色可能であるCE3-HLA-A*2402/CE3 tetramerを用いて検索したところ、CE3特異的CTL frequencyも、最も高値を示すことが確かめられた。以上をまとめると、OK-432はDCを成熟させ、その過程で大量のTh1タイプのサイトカイン産生を促すこと、さらに、得られたDCに抗原ペプチドをパルスして、T細胞に抗原提示を行うことにより、目的とする抗原に特異的なCTLを効率よく誘導できることが明らかとなった。

さらに、OK-432のDCへの作用機構におけるToll-like receptorの関与を調べた。現在までの報告によるとグラム陰性菌のcell wall componentであるLPSに対してはTLR4を介して免疫応答が開始されるが、グラム陽性菌由来のペプチドグリカン(PGN)、リポタイコ酸、およびグラム陽性の全菌体はTLR2を介して免疫反応を起こ

すこと、しかし、一部のグラム陽性菌は必ずしも TLR2 を介さないことなどが示されている。そこで我々は、OK-432 作用における TLR2 および TLR4 の関与の有無をそれぞれの遺伝子を導入した細胞を用いて検討した。その結果、PGN は TLR2 を、LPS は TLR4 を介してシグナルを伝達するが、OK-432 のシグナル伝達における TLR2 も TLR4 の関与の可能性は低いことが明らかになった。そこで、TLR 以外にバクテリアのシグナル伝達に関与していると思われる β 2 インテグリンの関与を、抗 CD11b 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 CD18 抗体によるサイトカイン産生抑制試験により検討した。この結果、OK-432 刺激後の DC からの IL-12 産生は抗 CD18 抗体で、約 40% 抑制されることが明らかとなり、OK-432 のシグナル伝達に β 2 インテグリンが関与している、という新しい知見を得ることができた。この結果は、OK-432 のもつ DC の成熟効果、ひいては抗腫瘍効果の機序解明の手がかりとなるものと考えられる。また、本研究で LPS のシグナル伝達と OK-432 のシグナル伝達経路には明らかな違いがあることが判明し、この違いが IL-12 や IFN- γ 産生量の大きな差に関係していることが考えられ、この両者の違いを認識することが重要なことであると指摘できた意義は大きいと考える。

OK-432 は、20 年以上の間、わが国の臨床の場で使用されて来た薬剤で、その皮下注射や腹腔内投与、胸腔内投与による抗腫瘍効果が報告されてきた。すでに安全性の確立されたこの薬剤が、DC を用いた癌免疫療法の効果向上に寄与する可能性のあることとその作用機構が、本研究により示された。また、DC の成熟過程における菌体成分の役割とその作用機構が明らかになったことより、がんや感染症に対する免疫療法において種々の microbial reagent が様々なタイプの adjuvant として利用できる可能性が示唆された。