

[別紙1]

論文内容の要旨

論文題目: Bリンパ球系悪性腫瘍に対する新規免疫遺伝子治療法の開発

氏名: 高橋 聡

【研究の背景・目的】

慢性リンパ性白血病 (CLL) および非ホジキン悪性リンパ腫 (NHL) は、成人に認められる造血器悪性疾患として頻度が高く、特に進行期に到ると有効な治療法がないのが現状である。CLL の 95%以上、および NHL の 80%以上は、Bリンパ球の表現形質を有している。これらの Bリンパ球系悪性細胞は、MHC クラス I およびクラス II 分子を高レベルに発現しており、悪性細胞特異的かつクローン性の免疫グロブリン由来ペプチドが、MHC 拘束性に CTL によって認識され得ることが報告されている。細胞上での腫瘍抗原および MHC 分子の発現にもかかわらず、これらの悪性細胞が宿主の免疫監視機構から逃れられる理由としては、CLL・NHL 細胞上での B7 などの共刺激分子発現の低下・欠如、TGF β や IL10 などの免疫抑制物質の腫瘍細胞からの産生、患者 Tリンパ球の機能不全などが考えられている。

CD40 分子は、正常 Bリンパ球の各分化段階で発現しているのみならず、多くの Bリンパ球系悪性細胞上にも発現していることが知られている。そのリガンドである CD40L (CD154)分子は、主に活性化された CD4 陽性 Tリンパ球に発現している。Bリンパ球系悪性細胞上の CD40 分子が CD40L によって刺激されると、悪性細胞上の共刺激分子および接着分子の発現が誘導されて、悪性細胞自体の抗原提示機能が高まり、抗腫瘍免疫反応が惹起される可能性について、濾胞性リンパ腫や CLL において既に報告されている。

一方で、IL2 遺伝子導入悪性細胞を皮内接種すると、IL2 の局所発現によりエフェクターTリンパ球が増幅されその結果、悪性細胞の免疫原性が高まることが知られている。さらに、最近の我々のグループによる in vivo 系における研究結果から、CD40L 分子と IL2 の局所発現が、それぞれ単独の遺伝子導入に比べてマウス Bリンパ球系悪性細胞株 (A20) の免疫原性をより増強する事が明らかになった。

本研究において私は、大量化学療法など既存の治療に抵抗性の Bリンパ球系悪性疾患に対する新規療法としての遺伝子導入腫瘍ワクチン療法の開発を目的に、先ず Bリンパ球系 CLL 患者末梢血由来の白血病細胞、および悪性リンパ腫患者の病的リンパ節から採取した Bリンパ球系 NHL 細胞に対する Ad ベクターを用いた遺伝子導入法について検討をおこなった。さらに、ヒト CD40L 遺伝子およびヒト IL2 遺伝子を導入した腫瘍細胞の免疫原性の変化について、特に患者自己 Tリンパ球による腫瘍免疫応答に焦点をあてて検討した。

【方法と結果】

(1) Ad5 型レセプターを介した Bリンパ球系悪性細胞への高効率遺伝子導入法の開発

Ad5 型の感染には、ウイルスの接着に必要なレセプター CAR と、ウイルスの細胞内への侵入に必須なレセプターとして働く α_v インテグリンの標的細胞上での発現が必要である。患者から採取した B-CLL 細胞および B-NHL 細胞表面上でのこれらの発現をフローサイトメトリー法で確認したところ、いずれも極めて低値であり、大量のウイルスベクターを用いても、通常の方法では遺伝子導入は困難であった。しかし、これらの腫瘍細胞を、ヒト胎児肺線維芽細胞株である MRC-5 細胞と共培養すると、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 分子の発現が有意に上昇し、この発現量が増加すると共に細胞への Ad ベクターによる GFP 遺伝子導入効率は増加した。さらに、MRC-5 細胞との共培養刺激により、Ad ベクターによるヒト IL2 遺伝子並びにヒト CD40L 遺伝子の Bリンパ球系悪性細胞への導入が可能となった。本法で遺伝子導入された IL2 および CD40L の発現は、少なくとも6-7日間、腫瘍細胞上で高レベルに維持された。なお、ヒト CD40L 遺伝子を

導入された腫瘍細胞上では共刺激分子である B7-1、-2 および、ICAM-1 などの接着分子の発現が上昇していた。

(2) ヒト CD40L 遺伝子およびヒト IL2 遺伝子導入 Bリンパ球系悪性細胞の免疫原性の変化

CD40L もしくは IL2 遺伝子をそれぞれ単独で導入した初代リンパ球系悪性細胞を自己 Tリンパ球と共培養したところ、Tリンパ球の DNA 合成能および IFN γ 産生能を上昇させた。さらに、これらの遺伝子導入細胞を併用した場合には Tリンパ球に対する刺激効果は増強された。この結果は、in vitro における Tリンパ球の増幅にも反映され、刺激細胞として CD40L と IL2 遺伝子導入細胞を併用した場合の細胞数は、それぞれ単独細胞による刺激に比べ有意に増加した。この時に、CD40L 単独刺激では CD4 陽性 Tリンパ球数のみの増加であったが、IL2 と組み合わせた場合は CD4 陽性リンパ球数のみならず CD8 陽性細胞数も増加した。さらに、これらの遺伝子導入腫瘍細胞による刺激を4週間続けて誘導された自己 Tリンパ球が、遺伝子未導入の腫瘍細胞を認識する可能性について検討したところ、CD40L と IL2 併用刺激によって誘導された Tリンパ球のみが腫瘍細胞に反応して、DNA 合成および IFN γ 産生を増加させた。NHL の場合では、CD40L+IL2 の刺激によって誘導された Tリンパ球のみが、自己 NHL 細胞に対する明らかな HLA 拘束性の CTL 活性を示した。

【考案と結語】

HLA 分子が高発現し、かつイディオタイプ免疫グロブリンなどの有力な腫瘍抗原候補分子が強く発現している B-CLL 細胞や B-NHL 細胞が免疫監視機構から逃れる機序を考慮した場合、これらの Bリンパ系造血器腫瘍細胞上の共刺激分子と接着因子の発現増加を誘導する CD40L 刺激と、Tリンパ球の活性化および増幅効果を有する IL2 刺激を併用した腫瘍ワクチン療法は極めて有力な治療戦略となり得る。特に、これら免疫増強分子遺伝子導入リンパ球系悪性細胞を用いた新しい免疫遺伝子療法の臨床開発は重要と考えられる。しかし、これまでの癌遺伝子治療研究では様々なウイルスベクターを用いて腫瘍細胞への遺伝子導入が試みられてきたが、標的細胞への遺伝子導入効率は各ウイルスの細胞・組織親和性に依存している。そのため、特に造血器

悪性腫瘍に対しては、現在使用可能な臨床グレードの遺伝子導入ベクターシステムを用いた場合、効果的な遺伝子導入は困難であった。本研究において、ヒト線維芽細胞株(MRC-5)と共培養することにより、腫瘍細胞上の Ad5 レセプターのひとつであるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 分子の発現が上昇し、効率の良い Ad5 ベクターを用いた遺伝子導入が可能となり、患者由来の B リンパ球系 CLL 細胞および悪性リンパ腫細胞上で CD40L 分子と IL2 分子を発現させることが可能となった。

さらに、CD40L または IL2 遺伝子をそれぞれ単独で導入した B リンパ球系腫瘍細胞の刺激によって誘導された T リンパ球は腫瘍細胞に対する反応を示さなかったが、両細胞を併用することで患者 T リンパ球による抗腫瘍免疫の誘導が確認された。すなわち、患者からの腫瘍細胞を用いた場合でもマウスモデルでの結果と同様に、個々の刺激に比べ CD40L+IL2 刺激が、より強力な抗腫瘍免疫反応を誘導することが明らかとなった。これら遺伝子導入腫瘍細胞による宿主の抗腫瘍効果獲得機序に関しては、以下の可能性が考えられる。①腫瘍抗原特異的 T リンパ球の T 細胞リセプターが、腫瘍細胞と会合し第 1 のシグナルが伝達されると同時に、腫瘍細胞上に強制発現された CD40L によって T リンパ球上の CD40 が刺激を受ける。②CD40L 遺伝子導入による直接効果、もしくはバイスタンダー効果によって腫瘍細胞上に発現した B7 (CD80,86) 分子や接着分子が T リンパ球に第 2 のシグナルを送る。③遺伝子導入により腫瘍細胞から産生された IL2 の作用により、T リンパ球は分裂・増殖し効果的なエフェクター細胞となる。言いかえると CD40L の遺伝子導入なしでは腫瘍細胞上の共刺激分子の発現は弱く、T リンパ球は第 2 のシグナルを受けることができにくいため、IL2 の存在の有無にかかわらず抗腫瘍エフェクター細胞の誘導は不可能である。また、IL2 による刺激がない場合では、CD40L の効果により第 2 のシグナルを受け活性化された T リンパ球も増殖することができない等の可能性が考えられる。

以上の結果により、安全性の確認および臨床効果の検討を目的とした新規免疫遺伝子治療臨床研究を計画することの妥当性が示されたと思われる。今後、緻密にデザインされた臨床研究を通じて、B リンパ系悪性疾患に対する CD40L と IL2 遺伝子の臨床上的役割を明確にしていくことが重要であると考えられた。