

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 マウス線維肉腫 (CMS5) における CD4⁺及び CD8⁺腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL)のクローナリティから見た動態解析

指導教官：山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科 アレルギー・リウマチ内科

平成12年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 兪 戎 (Yu Rong)

【目的】

腫瘍に浸潤した T 細胞は腫瘍浸潤 T 細胞 (tumor infiltrating lymphocytes, TIL) と呼ばれる。これらの TIL は、腫瘍塊内で特定の機能を持たずに存在しているだけなのか、あるいは抗腫瘍性に働き得る細胞群であるのか、さらに抗腫瘍性機能を抑制されている細胞集団であるのかということは重要な問題である。これまでに Rosenberg ら、Itoh らにより、TIL がマウス及びヒトの組織中より分離培養され、TIL は主に CD8⁺、MHC クラス I 拘束性の自己腫瘍特異的 CTL であると報告されている。Rosenberg らはメラノーマ患者に対し、*ex vivo* で培養した自系 TIL を IL-2 と共に患者の体内にトランスファーした後、34%の患者に抗腫瘍効果が認められたと報告した。これらの結果より、TIL は機能的に腫瘍塊全体の拒絶を惹起し得ないまでも、少なくともその一部は腫瘍細胞に特異的に反応し、潜在的な抗腫瘍能力を有する細胞と考えられる。

しかし現時点では、特に腫瘍抗原特異的 T 細胞クローンの樹立による腫瘍の臨床治療は未だ実用に至っておらず、TIL のさらなる解析が必要と考えられる。以上の研究では多くの場合 *in vitro* で T 細胞をクローン化し、その構造、機能、腫瘍との特異性を調べている。*In vivo* と *in vitro* の環境が異なることを考えると、*in vitro* で増殖した TIL が *in vivo* あるいは *tumor in situ* の状態を反映しているとは限らないという点には注意が必要である。今後 TIL 及び TIL の T 細胞レセプ

ター (T cell receptor, TCR) の情報を用いて腫瘍治療を試みる上で, in vivo で TIL のレパトアの特徴や, TIL のクローナリティの形成が特異的な現象なのか, 相対的にランダムな現象なのか, また, 腫瘍進行と共にその CD4⁺ 及び CD8⁺ TIL の各々の経時的な動態がどのように変化するかを明らかにしておく必要があると考えられる.

これまでに病変局所に浸潤した T 細胞集団の TCR レパトアの解析について, 試験管内での抗原特異的 T 細胞株の樹立, サザンブロット法, PCR 法, モノクローナル抗体 (mAb) による免疫染色法などが用いられてきた. しかしこれらは主として TCR のうちのある特定のコンポーネント (V β 鎖) の使用頻度を計測するものといえ, 厳密な意味での T 細胞集団中のクローナリティの解析, 特に in vivo における検討にはなお不十分と考えられる. これを克服するために, 私は山本らが考案, 確立した高感度, 迅速にクローナリティの解析ができる RT-PCR/SSCP 法を用い, 腫瘍塊に集積している T 細胞クローンを検出し, CD4⁺ 及び CD8⁺ TIL の動態変化を追跡した.

今回私は CD4⁺ 及び CD8⁺ TIL のクローナリティの動態のみならず, 特にこれまでよく解明されていなかった一個体中の CD4⁺ 及び CD8⁺ TIL レパトアの経時的な動態変化を生体内で解析した. また, TIL レパトア免疫応答の本質的な特異性についても検討した.

【方法】

BALB/c マウスに CMS5 線維肉腫細胞を皮下接種し, 腫瘍を形成させた. 腫瘍接種後早期 (皮下注から 7 日目-10 日目) と腫瘍接種後中期 (皮下注から 14 日目-18 日目) 及び接種後晚期 (皮下注から 22 日目-35 日目) の腫瘍, 脾臓を摘出した. また, 同一個体における接種後早期の一部と接種後晚期の腫瘍を摘出し, 更に, 同一個体での同時期の異なる部位への接種または, 同一個体での異なる時期の異なる部位へ接種によって形成された二ヶ所の腫瘍を摘出した. これらの摘出した腫瘍について RT-PCR/SSCP 法で CD4⁺ 及び CD8⁺ TIL のクローナリティの動態を検討し, この二つのサブセットの TIL 全体との関係も検討した.

次に, 担癌状態において TIL を構築した主なサブセット CD4⁺ と CD8⁺ T 細胞の活性化/記憶表現型と担癌状態の脾臓 CD4⁺ と CD8⁺ T 細胞の活性化/記憶表現型をフローサイトメトリー (Coulter EPICS XL) で比較した. 活性化された CD69⁺ CD8⁺ TIL のクローナリティと CD8 全体のクローナリティの関係については

フローサイトメトリー(FACS Vantage)と RT-PCR/SSCP 法を用いて調べた。特定の CD4⁺及び CD8⁺TIL のクローナリティの集積性及び経時的変化の特徴は TIL クローンの TCR TCR Vβ鎖 CDR3 フラグメントの塩基配列解析と RT-PCR/SSCP 法を用いて検討した。

【結果】

生体内の CMS5 腫瘍には接種後早期 (Day-7) からほぼ同数の CD4⁺及び CD8⁺T 細胞の浸潤がみられ、いずれも活性化/記憶 T 細胞の表現型 (CD62L^{low},CD69,ICOS) であった、特に CD8⁺TIL 全体の 60%以上が CD62L^{low} リンパ球であることが示された。腫瘍細胞の総数は経時的に増加し続けたのにも関わらず、TIL の総数は接種後中期 (Day-12) 以降増加が抑制されていた。

オリゴクローナルな集積現象は脾臓では見られず、TIL だけに認められた。生体中の TIL は腫瘍局所で広範な Vβサブファミリーにわたる免疫応答を示した。腫瘍接種後早期、中期と晩期 (Day-25) で局所に集積している TIL の各 Vβのドミナントバンドの数を比較したところ、各 Vβには差が見られたが、各時期には顕著な差が認められなかった。また、一つ腫瘍塊の中から任意の離れた二ヶ所 (T1,T2) の腫瘍組織のクロノタイプを比較した。その結果、ほとんどの Vβサブファミリーにおいて、T1 と T2 オリゴクローナルバンドの移動度は一致していることが確認された。よって、任意の腫瘍内の TIL による免疫応答は均一性を持つことが考えられた。

TIL のクローナリティは腫瘍接種後早期には CD4⁺及び CD8⁺細胞ともにオリゴクローナルであり、特に CD8⁺TIL で特定のクローンの集積性が高かった (TIL 全体の 72.4%)。早期にみられた CD8⁺TIL の優位クローンは晩期まで維持されたが、TIL 全体に占める割合は低下し、新しいクローンの集積も見られた。CD4⁺TIL では優位クローンは CD8⁺TIL の優位クローンと比較して集積性が小さく (TIL 全体の 26%)、早期にみられた優位クローンの多くは晩期には消退しており、晩期の CD4⁺T 細胞の免疫応答は早期とは異なることが示唆された。

また、異なる場所に同時に接種した腫瘍における TIL のクローナリティは共通していた。さらに、異なる時期に接種した腫瘍では最初に接種した腫瘍に優位に反応する CD8⁺TIL クローンが後に接種した腫瘍にも集積しており、クローナリティからみた場合に異なる時期に出現する複数の CMS5 腫瘍腫瘍により誘導された TIL の免疫応答はランダムではなく均一性のみられる、特異性の高い免疫応

答であることが示唆された。

【結論】

CMS5 腫瘍接種後早期には特定の CD8⁺TIL クローンが優位となる免疫応答を示した，一個体内での TIL の優位クローンは，異なる部位や異なる時期に接種した腫瘍においても保存される特異性の高い免疫応答により生ずると考えられた。しかし，中期以降では腫瘍細胞の増加にも関わらず CD8⁺TIL の増加は抑制され，早期に生じた優位クローンの反応も CD4⁺,CD8⁺とも抑制されており，これらの抑制は生体の免疫応答存在下での腫瘍の増殖に関与すると考えられた。

【展望】

クローナリティ検出システムとして RT-PCR/SSCP 法を用いることで，腫瘍病巣部に浸潤した T 細胞レパトアの新たな特徴の検討が可能と考えられた。今後 CD8⁺TIL 応答の数量における抑制，CD4⁺TIL 応答のクローン形成における抑制のメカニズムについてはさらなる研究が必要と考えられる。

TIL のクローナリティの動態のさらなる解析が TIL のレパトアを利用して腫瘍抗原特異性 T 細胞を再構築し，能動的に腫瘍免疫を操作することによる効果的な抗腫瘍免疫治療法の開発のために重要であると考えられる。