

論文の内容の要旨

論文題目 ムチンをターゲットとした DNA ワクチンによる肺転移抑制の前臨床試験

氏 名 鎌田 実香

第一章 序章

癌の完治を目指して、免疫療法が注目され、既に臨床試験も開始されている。しかし、現状では十分な治療効果が得られているとは言えず、更なる開発研究が望まれており、その為には、改善すべき点がある。第一に、免疫療法による治療対象としては、微小転移の撲滅や転移の予防などが期待されており、このような状態を再現する適切なマウスモデルを用いた前臨床試験を行うことにより、臨床試験における治療対象を決定すべきである。第二に、癌の免疫療法の開発に際しては、ヒトの固形癌で実際に免疫応答があることを見だし、しかもこのことによって腫瘍増殖や転移が抑えられる抗原をターゲットとすべきである。第三に、抗原が特定でき、安全で、精製品を安価で大量に作製することができるワクチンを用いるべきである。第四に、CTL による傷害以外の免疫応答も考慮してワクチンを開発すべきである。

将来的に臨床の場で利用できるような効果的な免疫療法の新たなプロトコルを作製するために、マウスにおいて、ムチンを抗原とした DNA ワクチンにより転移を抑制すること、及び転移抑制に働くエフェクター機構を解析することを本研究の目的とした。ムチンは多くの腺癌で発現上昇が見られ、発現と悪性度とが相関している。一方で、ムチンに対する免疫応答がある場合には予後が良いという報告もあり、免疫応答を誘導できるかどうかを鍵と考えられる。本研究では、安全で強力な免疫原である DNA をワクチンとして用いた。プラスミド DNA に含まれる多数の CpG モチーフは、それ自体がアジュバント活性を持ち、樹状細胞 (DC) などの効果を最大限に引き出すことができると考えた。前臨床試験として最も重要なポイントとして、免疫寛容が成立していると考えられるヒトムチン抗原トランスジェニックマウスにおいてこの抗原を発現した癌細胞の転移抑制を行ったこと、及び自己の分子であるマウスムチン DNA を用いたワクチンの検討を行ったことがあげられる。

第二章 MUC1 トランスジェニックマウス (MUC1.Tg) における肺転移の抑制

MUC1 DNA ワクチンにより、野生型 (C57BL/6N) マウスにおいて MUC1 特異的な免疫応答と肺転移の抑制の誘導に成功し、主なエフェクター細胞が NK 細胞であることを既に示した。MUC1 に対して免疫寛容であるヒトにおいて効果のあるワクチンを開発するために、MUC1 をヒトと同様な組織に発現し、免疫寛容である MUC1.Tg において、ワクチンの効果を検証した。

MUC1 全長を含む発現プラスミド DNA を精製してワクチンとし、野生型マウス及び MUC1.Tg マウスに1週間ごとに3回皮内投与し、最終免疫の一週間後以降に免疫応答の種類及び強さを検討した(図1)。また、ワクチン効果の増強を目的として、共刺激分子 B7.1、B7.2、CD40L をそれぞれ発現するプラスミド DNA、あるいは同系マウスの骨髄細胞から GM-CSF を用いて誘導した未成熟 DC あるいは成熟 DC を、量または細胞数を変えて MUC1 DNA ワクチンに共投与し、それらの効果を検討した。

(1) DNA ワクチン投与による免疫応答とメラノーマ肺転移の抑制

MUC1 DNA ワクチン 25 µg を投与すると、どちらのマウスにおいてもクラススイッチを伴う抗 MUC1 抗体の産生が確認され、CD4⁺ T 細胞が免疫応答に関与していることが示唆された。共刺激分子 DNA や DC の共投与による、MUC1 特異的な抗体産生に与える大きな影響は認められなかった。DNA ワクチンによる肺転移抑制効果を、マウスメラノーマ細胞株 B16-F10 の MUC1 安定発現株 F10-MUC1-C8 細胞の尾静注肺転移により評価した。野生型マウスにおいては、MUC1 DNA ワクチン 25 µg を投与した群では、肺転移結節数が有意に減少していた。共刺激分子 DNA を併用した場合は転移抑制効果の増強は認められなかったが、DC を 1×10⁵ 個共投与した場合は肺転移が強力に抑制された。DC の成熟度による転移抑制効果の差は認められなかった。MUC1.Tg マウスにおいては、MUC1 DNA ワクチンの量をマウス一匹当たり 100 µg に増加して DC を共投与した場合に有意に肺転移が抑制された(図2)。

(2) 肺転移抑制に働くエフェクターの検討

次に *in vivo* で肺転移抑制に働くエフェクター細胞の同定を行った。ワクチン最終投与の1週間後から、抗 CD4、抗 CD8、抗 NK 抗体を3日ごとに3回マウスに投与してこれらの細胞を枯渇させた状態で転移実験を行うと、どちらのマウスにおいても、MUC1+DC ワクチンを投与した場合は、NK 細胞、CD4⁺ 細胞及び CD8⁺ 細胞全てがエフェクター細胞であることが示された。

また、ワクチン投与マウス由来免疫細胞と F10-MUC1-C8 細胞を混合してナイーブな同系マウスの皮下に移植し、腫瘍増殖を検定する Winn assay によってもエフェクターを解析した。どちらのマウスにおいても、MUC1+DC ワクチンを投与したマウスの脾細胞を混合した場合は、メラノーマ細胞の生着や増殖がコントロールと比べて抑制され、ワクチンを投与したマウスから分離した T 細胞がエフェクターとして働くことが直接的に示された。更に、野生型マウスについては CD4⁺ T 細胞及び CD8⁺ T 細胞を分離してアッセイを行ったところ、

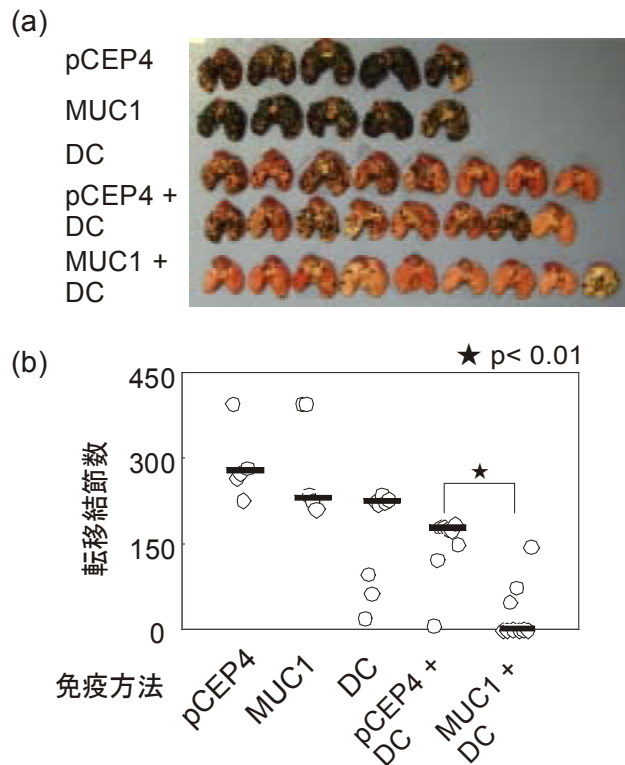


図2. MUC1.TgにおけるワクチンによるF10-MUC1-C8細胞の肺転移抑制 (b)は(a)の肺転移結節数を計数したグラフである。

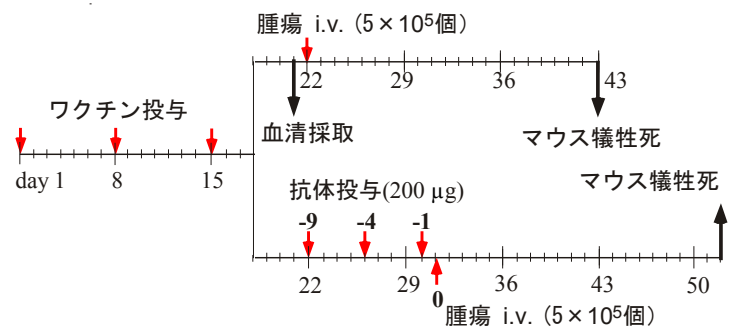


図1. ワクチン投与実験プロトコール

MUC1 DNA ワクチン単独投与の場合は、CD8⁺T 細胞単独ではメラノーマ細胞の増殖を抑制できなかったが、MUC1+DC ワクチンを投与した場合は、CD8⁺T 単独でも抑制することができた。このことから、DC 共投与により特に CD8⁺T 細胞のエフェクター機能が向上することが示唆された。

第三章 新規マウスムチンのクローニングとこれを用いた DNA ワクチン

ヒトにおいて免疫寛容を打破できるワクチンを開発するためには、ヒト分子の Tg マウスを用いた研究の他に、動物モデルにおける自己由来の癌細胞を用いた研究を行う必要がある。マウス Muc1 ムチンは、腺癌において発現が上昇するという報告はこれまでにほとんどなかった。そこで、マウスのある乳癌細胞株において高発現し、悪性度と相関すると報告されている、ヒト MUC1 の性質と非常に似ているマウスムチンに注目した。

(1) クローニング

このムチン遺伝子をクローニングしたところ、タンデムリピートの数十回の繰り返しと膜貫通領域及び細胞内領域と思われるアミノ酸に転写される部分を含んでいた。(図3)。PCR スクリーニング及びプラークハイブリダイゼーション法により、マウスゲノムライブラリーからこの新規ムチンを含むゲノムクローンを得た。クローニングした配列をプローブとしたノザンブロッティング法により、この新規ムチンの mRNA の大きさを明らかにした。また、マウス各正常組織及び、様々な癌細胞株における発現を確認したところ、乳癌細胞の多くにこの分子が発現していることが明らかになった。また、予想されるアミノ酸配列をもとに、タンデムリピート内ペプチド及び、細胞外領域でタンデムリピート以外の部分であると考えられるペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。これらのポリクローナル抗体を用い、乳癌細胞株をフローサイトメトリー法により解析し、この新規ムチン遺伝子産物が細胞外に発現していることを確認した。更に、ウェスタンブロッティング法により、ムチンと考えられる高分子量のタンパク質が、作製したポリクローナル抗体により検出された。

(2) DNA ワクチンとした場合の免疫応答

この新規ムチンのタンデムリピート部分以下全配列を含む部分配列を用い、シグナル配列を上流に付加して発現するプラスミド DNA を作製し、DNA ワクチンとした。これを同系マウスの骨髓細胞から誘導した DC と同時に、C57BL/6N マウス及び乳癌細胞と同系のマウスに皮内投与し、免疫応答を検討した。DNA ワクチン投与後のマウス血清中にクラススイッチした特異的抗体の産生が確認され、CD4⁺T 細胞が活性化されたことが示唆された。またワクチン投与により、脾細胞から抗原特異的に IFN γ や IL-4 が産生されたが、この新規ムチンを発現する癌細胞の増殖、転移を抑制することはできなかった。

(3) ヒトカウンターパート

この新規ムチンの配列を元に、ヒトカウンターパートと思われる新規分子を検索し、正常組織における発現を確認した。今後、ヒト癌組織及び癌細胞株などにおける発現を調べ、実際に癌の治療におけるターゲット分子として利用できる可能性があるかどうかについて検討する必要がある。

第四章 終章

ヒトムチンを発現し、これに対して免疫寛容を生じている MUC1.Tg において、MUC1 DNA+DC ワクチンにより、転移抑制に成功した。正常組織の傷害などは今のところ観察されていない。ヒト抗原 Tg マウスにおける免疫療法による転移抑制は今まで報告がなかった。DC を用いることが特徴であるが、共投与した DC による効率的な T 細胞の活性化機構についても検討している。体内に存在する DC だけでなく、投与した DC 自身による MUC1 の発現あるいは提示も考えられる。また、抗原取り込み能の低い成熟 DC を投与した場合も転移抑制効果が高かったことから、DC による総合的なサイトカイン産生も、免疫細胞の活性化に重要なのではないかと考えている。



図3. 新規マウスムチンの構造 (cDNA)

新たな免疫療法モデルの作製をめざし、マウス新規ムチンのクローニングを行い、ヒトカウンターパートの存在を明らかにした。これに対して効率的に免疫応答を誘導できるようなワクチンを開発できれば、ヒトにおける免疫療法にこのムチンが利用される可能性も考えられる。