

審査の結果の要旨

氏 名 鎌田 実香

「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」と題する本研究は、がんの特異的な免疫療法の新しい試みである DNA ワクチンによる治療を、転移がんに対象に行なうことを目標に、マウスモデルの作製、抗原の選定、ワクチンのデザインなどを行ない、有効性を実証したものである。体内に投与された DNA が容易に転写翻訳され、これに対する免疫応答をもたらすことは良く知られていた。にもかかわらず DNA ワクチンが、がんの免疫療法の中で重要な研究対象とされてこなかったのは、DNA を投与することが遺伝子治療とみなされ、臨床試験を行なうことが困難であると考えられて来たためであった。今日では、多様な遺伝子治療が臨床の場で使用されはじめており、DNA ワクチンのがん治療としての有効性を検証することは時代の要請であると言ってよい。学位申請者鎌田実香はかねてよりこの点に気付き、がん転移の治療を対象としたワクチンの研究として極めて先駆的な「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」と題する本研究を完成させた。

本論文は、MUC1（ムチン 1）をターゲットとする肺転移の治療に関する研究と、マウスにおける同種抗原によるがん転移の治療法開発を目指した、新規ムチンの遺伝子クローニングとこれに対する免疫応答の解析に関する研究の 2 つの部分から成る。ムチンは多くの腺癌で発現上昇が見られ、発現と悪性度とが関連している。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は鍵と考えられた。DNA ワクチンはプラスミド DNA に含まれる多数の CpG モチーフ自体がアジュバント活性を持ち、樹状細胞などの抗原提示細胞の効果を最大限に引き出すことができる点に注目した。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なったこと、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なった事の二点において、極めてオリジナリティーの高い研究成果である。

「第一章：序章」では、マウスモデルを用いて研究を行なった理由、ムチンを癌免疫療法のターゲットとして選んだ理由、樹状細胞（DC）を用いた理由、DNA ワクチンを選んだ理由、癌細胞障害メカニズムを詳細に検討した理由などが説得力を持って述べられている。

「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」では、

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、MUC1DNA ワクチンの肺転移の抑制効果を検証した。具体的には、投与量、投与スケジュール、共刺激分子や DC の共投与などを野生型マウスと MUC1.Tg において行ない、免疫応答とメラノーマ細胞 B16-F10 の MUC1 安定発現細胞による肺転移が抑制されるかどうか効果を検証した。何れの場合も抗体産生クラススイッチが起こっていることから T 細胞レベルで免疫応答が起きていることを示し、DNA ワクチンによって MUC1 に対する免疫寛容状態が失われたことが示された。しかし、自己免疫によると考えられる病態は観察されなかった。肺転移の抑制効果は野生型マウスに比して MUC1.Tg では弱く、DC の共投与が必須であった。次に *in vivo* で肺転移抑制に働くエフェクター細胞の同定が行われた。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いう方法が用いられた。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。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。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 アッセイによってもエフェクターが解析された。いずれ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。

「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」では、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、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から、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 の性質と類似の構造を持つマウスムチンに注目し、その遺伝子クローニングと、これに対する免疫応答の解析を行なった。このムチン遺伝子は、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。PCR スクリーニング及びブラン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プロット法により、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、種々の癌細胞株における発現を確認し、乳癌細胞の多くに発現していることを明らかにした。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、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。次に、このムチンの cDNA を含むプラスミドをワクチンとした場合の免疫応答が解析された。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髄細胞から誘導した 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 及び IL-4 が産生された。しかしこの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。この新規ムチンの配列に基づいて、ヒトカウンターパートと思われる新規分子が検索され、組織における発現が確認された。癌の治療におけるターゲット分子としての利用ばかりでなく、ユニークな分布パターンを持つムチンとして非常に重要な分子の発見と考えられた。

「第四章：終章」は、以上のまとめである。本研究の癌治療法としての重要性が的確に述べられている。

本研究は、新しい癌の免疫療法の基礎的な側面と前臨床研究としての側面をあわせ持ち、免疫学的にも、癌治療法の開発という意味でも極めて意義の深いものである。よって、本研究を行なった鎌田実香は 博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。