

論文の内容の要旨

論文題目

EFFICIENT GENERATION AND EXPANSION OF TUMOR-SPECIFIC CYTOTOXIC

T-CELLS WITH CC-CHEMOKINE LIGAND 21 (CCL21)

和訳 CCL21 による、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導と増殖

指導教官 田原 秀晃教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 永井 成勲

はじめに

ケモカインは、分子量 8~10kD の比較的小さな分泌蛋白質で白血球の遊走において重要な役割を担うサイトカインの総称である。その種類は豊富で、現在までに 50 種類以上のケモカインが報告されている。このケモカインの作用により、リンパ球は生体内を巡回し炎症や免疫応答での必要に応じて集積する。一般的にケモカインのアミノ酸配列にはシステイン(C)が 4 個あり、N 末端側の 2 個のシステイン配列により CC-、CXC-、C-、CX3C-の 4 種類に分類される。1997 年に複数のグループによりクローニングされた CC-CHEMOKINE LIGAND 21 (CCL21) (別名 : SLC, Secondary Lymphoid tissue Chemokine) は CC ケモカインの 1 種で、生体内ではリンパ管内皮細胞、リンパ節などの T 細胞領域に存在するストローマ細胞、細静脈の高内皮細胞から分泌され二次リンパ組織への遊走に関与している。また、その受容体である CCR7 は naive T 細胞に加え、成熟樹状細胞にも発現している。この作用により炎症部位で抗原を取り込み活性化した成熟樹状細胞は CCL21 に誘導されて二次リンパ組織に遊走し、T 細胞に抗原を提示する。これまで、マウス皮下移植腫瘍への CCL21 の局所投与により抗腫瘍効果を得られたとする報告がされてきた。これらの報告では CCL21 により腫瘍局所へ樹状細胞、T 細胞が集積し腫瘍特異的細胞性免疫が惹起されるとしているが、いずれの報告例においても細胞性免疫応答の誘導に対する CCL21 に役割については明確にされていない。そこで、本研究におい

では腫瘍局所における CCL21 の細胞性免疫誘導における役割について明らかにすることを目的として、*in vitro* の混合培養系を構築しそのシステムを使って Th1/Th2 バランス、細胞傷害性 T 細胞の誘導およびリンパ球増殖に対する CCL21 の役割を検討した。

材料と方法

1) CCL21 発現線維芽肉腫細胞株のマウス皮下腫瘍モデルの検討

CCL21 遺伝子を導入したマウス線維芽肉腫株 MCA205/CCL21 及び Zeocin 耐性遺伝子を導入した MCA205/Zeo をマウス皮下に接種し、その腫瘍増殖および白血球遊走に及ぼす CCL21 の影響を調べた。

2) *in vitro* 混合培養系を用いた CCL21 の細胞性免疫誘導に関する役割の検討

CCR7 を発現する成熟樹状細胞、naive T 細胞及び放射線照射したマウス線維芽肉腫細胞株 MCA205 を含む腫瘍局所を想定した混合培養系で、CCL21 蛋白の添加により局所での Th1 系サイトカインである IFN- γ 産生、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導、リンパ球細胞内サイトカイン産生パターンに影響するかについて比較検討した。

3) T 細胞増殖に対する CCL21 の関与の検討

naive T 細胞の増殖に CCL21 が及ぼす影響について固相化 CD3 ϵ 抗体刺激時、非刺激時の条件下で培養 24 時間後のチミジンの取り込み能を用いて比較検討した。

結果と考察

1) CCL21 発現線維芽肉腫細胞株を用いたマウス皮下腫瘍モデルの結果について

MCA205/Zeo に比べ、MCA205/CCL21 の増殖は有意に抑制された。また、組織学的検討で MCA205/CCL21 では MCA205/Zeo に比べ、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、CD11c 陽性細胞の著名な浸潤を認めた。このことからこれまでの報告同様、腫瘍局所での CCL21 の発現によりリンパ球及び樹状細胞の浸潤を伴い腫瘍増殖が抑制されることを確認し得た。

2) 腫瘍局所を想定した *in vitro* 混合培養系での結果について

CCL21 の腫瘍局所での発現がもたらす環境を、上記 1) の組織像を踏まえて *in vitro* で混合培養系を構築した。この系では、CCL21 蛋白の濃度依存的な細胞培養上清中 (7 2 時間後) の IFN- γ 濃度上昇を認めた。この系における IFN- γ の産生細胞を明らかにするため混合培養系の T 細胞、樹状細胞のいずれかひとつを、IFN- γ 遺伝子ノックアウト (IFN- γ GKO) マウスより調整し用いた。IFN- γ GKO マウス由来 T 細胞を用いた混合培養系では CCL21 蛋白存在下でも培養液中の IFN- γ の産生は認めなかった。更に、混合培養系中に 0.4 μ m ポアサイズのトランスウェルを挿入して T 細胞、樹状細胞のいずれか一方を上層のウェルに分離して培養すると、CCL21 蛋白存在下でも IFN- γ の産生は認めなかった。これらの結果から、CCL21 蛋白による濃度依存的 IFN- γ 産生の上昇は、樹状細胞との接触を伴う相互作用を介した T 細胞に由来することが判明した。この結果を踏まえて、混合培養 4 日後のリンパ球細胞内のサイトカイン産生パターンについて

(IL-4, IFN- γ) フローサイトメーターで解析した。CCL21 蛋白の存在下では、IFN- γ 産生性の CD4 陽性 T 細胞 (Th 1 細胞) 及び CD8 陽性 T 細胞 (Tc 1 細胞) の割合が増加することが明らかになった(図 1)。更に、このリンパ球を用いた細胞傷害活性試験で CCL21 蛋白の存在下では、混合培養系に用いたマウス繊維芽肉腫細胞株 MCA205 に特異的な細胞傷害性 T 細胞の誘導が示唆された(図 2)。このことから、腫瘍局所における CCL21 は naive T 細胞及び成熟樹状細胞の遊走にとどまらず、その後の腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導にも直接的に関与していることが示唆された。

これまでの CCL21 のマウス皮下腫瘍局所投与による腫瘍増殖抑制の報告では、腫瘍局所へのリンパ球および樹状細胞の集積が見られるとともに、抗体の腹腔内投与による CD8 陽性 T 細胞の depletion model でその抗腫瘍効果が消失することから、CCL21 による腫瘍特異的細胞性免疫の誘導が示唆されていた。しかし、この腫瘍特異的細胞性免疫誘導への CCL21 の直接的な関与を解析した報告はなく、CCL21 の作用により遊走した naive T 細胞及び成熟樹状細胞が腫瘍局所で高頻度に遭遇することで腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されると考えられていた。

今回本研究の結果により、腫瘍局所において CCL21 は Th1 優位な免疫応答を惹起し、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導することが新たに証明された。

3) T 細胞増殖に対する CCL21 の関与についての結果

固相化 CD3 ϵ 抗体による刺激時、非刺激時での naive T 細胞の増殖に対する CCL21 の関与を調べた。CCL21 単独では T 細胞の増殖に影響を与えなかったが、固相化 CD3 ϵ 抗体による刺激下では CCL21 蛋白の濃度依存的に T 細胞の増殖が促進していた(図 3)。更に、この CCL21 による T 細胞増殖は固相化 CD3 ϵ 抗体刺激 6 時間後の T 細胞では全く認めなかった。このことから、naive T 細胞の TCR (T 細胞レセプター) /CD3 ϵ 複合体への刺激時に CCL21 が局在することで、T 細胞の著しい分裂増殖が惹起されることが示された。

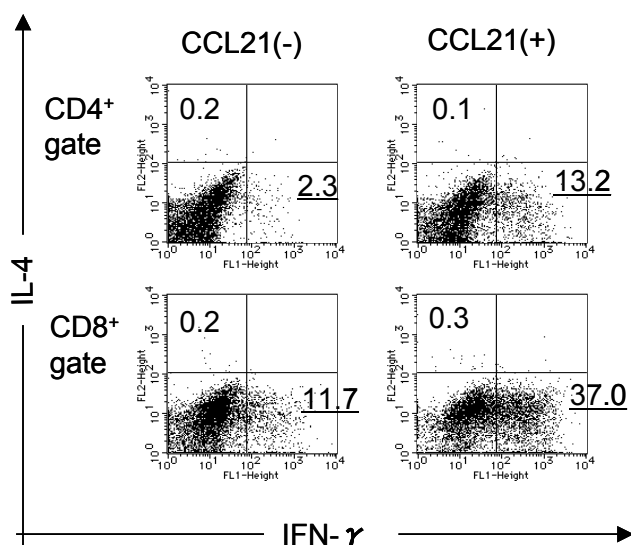


図 1 : CCL21 の存在下では IFN- γ 産生性の CD4 陽性 T 細胞 (Th 1 細胞) 及び CD8 陽性 T 細胞 (Tc 1 細胞) への偏向を認める。

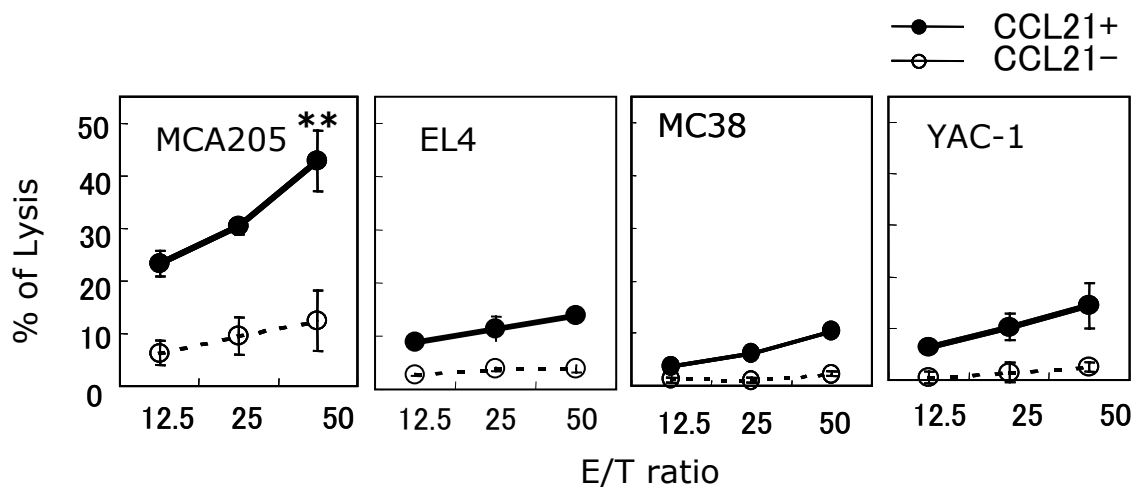


図 2 : CCL21 は腫瘍局所環境下で、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導する。

**p < 0.01

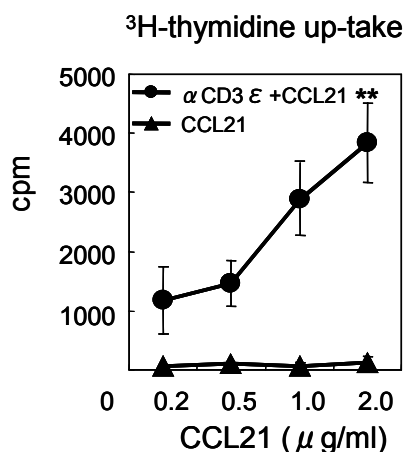


図 3 : CCL21 単独では naive T 細胞の増殖に影響を与えないが、固相化 CD3 ε 抗体による刺激下では CCL21 の濃度依存的に T 細胞の増殖能が上昇する。

● 固相化 CD3 ε 抗体刺激 + CCL21

▲ CCL21 単独

**p < 0.01

結論

in vitro の混合培養系を用いた解析により、腫瘍局所において CCL21 が細胞性免疫応答の誘導に直接的に関与し抗腫瘍効果につながることを証明した。すなわち、腫瘍局所の環境を反映した混合培養系において CCL21 は腫瘍局所で Th1 優位な免疫応答を惹起し、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導を促進した。更に、naive T 細胞の TCR (T 細胞レセプター) 刺激時に CCL21 が T 細胞の分裂増殖を著しく促したことから、腫瘍局所においては CCL21 が腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導に加えその分裂増殖を惹起することが示唆された。本研究により CCL21 は成熟樹状細胞、naive T 細胞の遊走のみならず、これらの細胞間相互作用による細胞性免疫応答の誘導にも関与するケモカインであることが新たに証明された。