

論文の内容の要旨

論文題目 成熟樹状細胞を用いた進行性腎細胞癌に対する免疫細胞療法の実践、
及び樹状細胞における Notch リガンド発現変化の意義に関する考察

指導教員 北村 唯一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

松本 明彦

背景

(第一部)進行性腎細胞癌は化学療法、放射線療法に対して治療抵抗性であり、サイトカイン療法においても約 20% の治療効果にとどまる。樹状細胞 (dendritic cell, 以下 DC) は腫瘍免疫応答の中心的役割を司る細胞であり、その強力な抗原提示作用により腫瘍抗原特異的リンパ球を効率的に誘導することが知られている。その DC を生体外で大量に作成し悪性腫瘍患者へ投与することで、抗腫瘍効果を得ることを目的とした臨床試験が進行性腎細胞癌に対する DC 療法として行われ、現在までに合計 174 症例中、完全治癒 3 例、部分応答 5 例が報告されている。しかしながら報告ごとに条件設定が異なるため方法、安全性や治療効果にいまだ一定の結論は出ていない。

(第二部)DC は自然免疫および獲得免疫において必須の細胞であり、成熟段階や活性化状態により発現するさまざまな分子がダイナミックな形態変化を起こすことで、T リンパ球に対しては主に Th1/Th2 誘導や腫瘍特異的 T リンパ球の誘導または免疫寛容の誘導などの末梢性免疫応答を制御することが知られている。また Notch 遺伝子は胚発生や幹細胞の分化において、細胞運命の決定に広くかかわり、ヒトでは 4 種類ある Notch 遺伝子に対して、Delta1、Delta4、Jagged1 および Jagged2 の 4 種類ある Notch リガンドが結合することにより、Notch シグナルがリガンド発現細胞から Notch 発現細胞の細胞内へと伝達される。近年になり DC が種々の刺激因子により Notch リガンドを発現することで、マウスやヒトの実験系で Th1/Th2 バランスの制御や、腫瘍特異的 T リンパ球の増幅に影響する知見が得られており、Notch シグナルによる DC やリンパ球での末梢性免疫応答の制御に関心が持たれている。

目的

(第一部)進行性腎細胞癌患者に対して、患者の腫瘍抽出蛋白を腫瘍抗原として、TNF- α 、IL-1 β および PGE2 で患者単球由来未熟 DC を成熟化させたうえで、鼠径リンパ節周囲へ皮内投与する方法を選択し DC 療法を行った。エンドポイントを安全性および免疫学的抗腫瘍効果の評価に設定した。

(第二部)DC の多岐にわたる形態変化において Notch リガンドの発現に注目し、その発現変化をフローサイトメトリー (flow cytometry, 以下 FCM) により蛋白レベルで解析することで、末梢性免疫応答における Notch シグナルの役割について検討した。

材料と方法

(第一部)腫瘍抽出蛋白は患者の腎摘除術直後の原発巣腫瘍組織から抽出した。アフェレーシスにて患者より末梢血単核球を回収し、段階的な比重遠心にて単球分画を精製し回収した。培養開始時に単球分画をフラスコに付着させることで単球の純度を高めたのち、GM-CSF および IL-4 を添加し、5 日間の培養で未熟 DC へ分化させた。6 日目に腫瘍抽出蛋白および KLH をパルスし、その後 TNF- α 、IL-1 β 、PGE2 を添加し、2 日間の培養で未熟 DC を成熟化させた。作成した DC は 2 週間おきに計 3 回投与する計画とし、患者の両鼠径リンパ節周囲に皮内投与をした。患者へ投与した DC の品質管理として、CD14、CD80、CD83、CD86、HLA-DR、CCR7 の発現を FCM により解析した。また細胞洗浄液の一部について、細菌、真菌培養およびエンドトキシン濃度の測定をした。有害事象の評価基準は NCI-CTC のアレルギー/免疫の項目に基づき行った。臨床評価は DC 投与後 4 カ月目に RECIST ガイドラインに基づき行った。免疫学的評価は DTH 法および ELISpot 法を行った。(上記の DC 療法の流れを図 1 に示す)

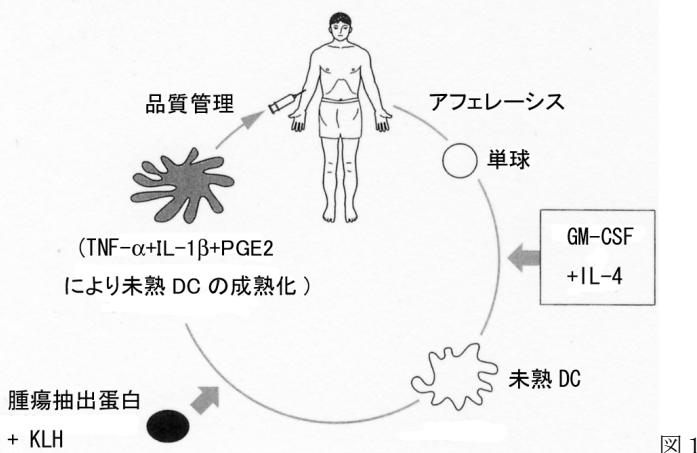


図 1

(第二部)ヒト Notch リガンドの遺伝子導入を CHO(r)細胞に対してリポフェクション法およびゼオシンによる薬剤選択性によりモノクローナルな細胞株を樹立した。ヒト Delta1 および Delta4 導入 CHO(r)細胞はヒト Notch2-Fc をプローブとし、ヒト Jagged1 および Jagged2 導入 CHO(r)細胞は GFP 発現により、それぞれ FCM でその発現量を確認した。それらの細胞を用いてその後共同開発されたヒト Notch リガンド抗体による染色を行い FCM で解析した。ヒト末梢血由来白血球濃縮液より段階的な比重遠心法にて単球分画を精製し回収した。ヒト CD14 マイクロビーズによる磁気ソーティングにより CD14 陽性単球分画を回収した。さらに GM-CSF および IL-4 を添加し、5 日間培養を行い未熟 DC へ分化させた。DC の成熟化には TNF- α 、IL-1 β 、PGE2 を添加し 2 日間培養を行った。上記により作成したヒト単球、未熟 DC および成熟 DC についてヒト Notch リガンド抗体を用いて FCM により解析した。ヒト成熟 DC に可溶性ヒト CD40 リガンドを添加し 24 時間培養を行い、Delta4 の発現変化を FCM により解析する系と、ヒト成熟 DC にヒト CD40 リガンド発現 U251 細胞を培養したプレートで 24 時間共培養を行い、回収した DC の Delta4 の発現変化を FCM により解析する系の 2 種類を行った。ヒト未熟 DC に CD40 リガンド導入能を有する AxCAhCD40L ウイルスベクターを感染させ 48 時間培養し、CD83、CD40 リガンド、Delta4 および Jagged1 の発現変化を FCM により解析した。ヒト未熟 DC をヒト Delta4-Fc をコーティングしたウェルで 48 時間培養し、CD83、CD86 および Delta4 の発現変化について FCM により解析した。ヒト末梢血

由来白血球濃縮液よりヒト CD8 マイクロビーズを用いた磁気ソーティングで回収したヒト CD8T リンパ球を、CD3 抗体コーティングしたウェルで 48 時間培養し、刺激前後の CD8T リンパ球について CD8、CD69 およびヒト Notch2 の発現変化を FCM により解析した。ゲノム転写因子配列解析用のオンラインデータベースである MAPPER を用いて、ヒト Delta4 配列の上流 500bp からエクソン 1 までの配列に NF-κB との結合部位が保存されているかについて予測的解析を行った。ヒト成熟 DC を DMSO または NF-κB 阻害剤である SC-514 を 3, 10μM の濃度で 1 時間培養後、mock ベクターの Ax3 または AxCAhCD40L をさらに添加し 48 時間後 CD40 リガンド、CD83 および Delta4 および Jagged1 の発現量を FCM により解析した。

結 果

(第一部)進行性腎細胞癌患者に対して試験を行い、患者 1~3 とも FCM による解析で 95%以上の細胞は CD80、CD83、CD86、CCR7 が強度陽性となり、成熟 DC への分化を確認した。なお投与時の細胞液の細菌および真菌培養検査はすべて陰性であり、エンドトキシン濃度は測定限界以下であった。有害事象は皮内投与部位の軽度発赤のみで、NCI-CTC の grade 3~5 に該当する所見はなかった。臨床評価では、患者 1 は癌性リンパ管症による腫瘍関連死となり PD と判定した。患者 2 は肺転移が増大傾向となり、新たに腰椎への骨転移を認め PD と判定した。患者 3 は評価対象部位の肺転移に変化なく SD と判定した。免疫学的評価では、DTH 法は患者 2 においては KLH のみで 4~16 週間後まで陽性所見を認めた。患者 3 においては KLH および腫瘍抽出蛋白で 4~16 週間後まで陽性所見を認めた。さらに同上の患者で ELISpot 法を施行したが、2 症例とも末梢血単核球中の IFN-γ 産生細胞数の有意な増加を認めなかった。

(第二部)ヒト Notch リガンド導入 CHO(r)細胞のそれぞれの発現量を FCM で解析し、いずれも発現良好なクローン細胞を樹立した。それらの細胞に対してヒト Notch リガンド抗体が特異的な抗体反応を示すことを確認した。Notch リガンド抗体による FCM 解析により、ヒト単球では Delta1、Jagged1 および Jagged2 が発現していた。未熟 DC では Jagged1 のみが発現し、Delta1 および Jagged2 の発現は消失した。成熟 DC では Jagged1 の発現が未熟 DC の発現より減弱した。成熟 DC に可溶性ヒト CD40 リガンドまたはヒト CD40 リガンド発現 U251 細胞を用いる 2 種類の系とも、DC における Delta4 発現の上昇を認めた。また未熟 DC に AxCAhCD40L を感染させた場合、CD40 リガンド、CD83 および Delta4 発現の上昇が確認され、Jagged1 発現の変化は認められなかった(上記のヒト単球および DC における Notch リガンド発現を図 2 に示す)。ヒト未熟 DC に対してヒト Delta4 の刺激を行うことで DC の成熟化マーカーである CD83 発現の上昇や、共刺激分子である CD86 発現の増強を確認した。またヒト未熟 DC をサイトカインにより成熟化させる際に、ヒト Delta4 の刺激を行うことで、DC の Delta4 発現が上昇することを確認した。ヒト CD8T リンパ球を CD3 抗体で刺激することでその 90%以上で活性化マーカーの CD69 発現が陽性となり、さらに Notch2 発現の増強が確認された。MAPPER による解析により Delta4 の上流 500bp からエクソン 1 までの配列において、NF-κB ファミリーである p50 と 4 ヶ所、p65 と 3 ヶ所、c-Rel と 2 ヶ所での結合が予測された。ヒト未熟 DC に対して AxCAhCD40L の感染により発現した Delta4 が、SC-514 を添加した場合では濃度依存性にその発現が抑制されたが、CD40L、CD83 および Jagged1 の発現には変化はなかった。

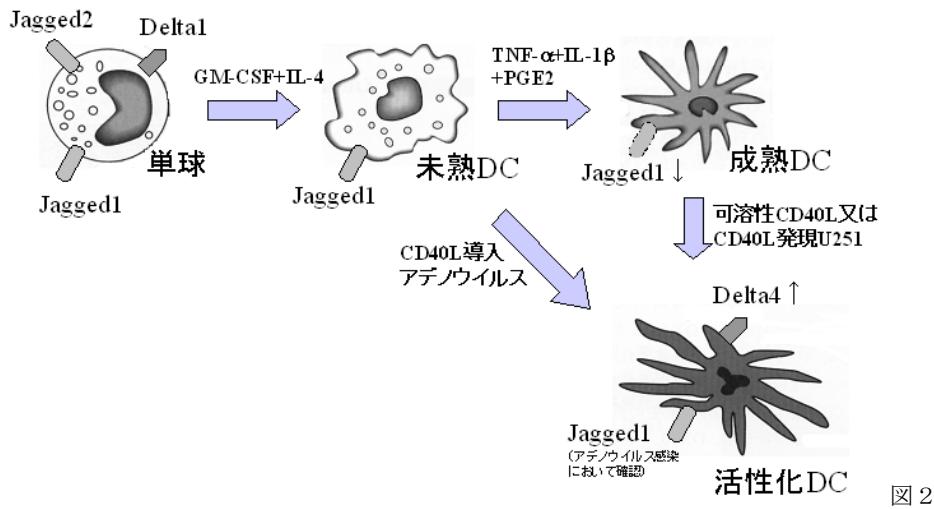


図 2

考 察

(第一部)進行性腎癌の治療に対してどのような DC を投与すべきかについてはいまだ議論の続いているところであるが、過去の報告例より成熟 DC で得られた結果が有望と考えられる。そのため本試験では TNF- α 、IL-1 β および PGE2 を用いて成熟 DC を作成し、また投与方法として DC がすみやかにリンパ節内で腫瘍抗原提示を行うことができ、リンパ節へのアプローチも容易である両側鼠径部リンパ節近傍への皮内投与を選択した。有害事象については皮内投与部位の軽度発赤があったのみで、治療中止となる重篤な副作用はなかったことから、本試験の安全性を確認することが出来た。免疫学的評価での特記すべき点としては DTH 法の腫瘍抽出蛋白において 1 名で 4~16 週目まで明らかな陽性所見が続いたことである。しかしながら臨床評価では原疾患の進行を抑制するには不十分な結果であり、今後は早期症例を対象とすることでの臨床効果を期待できると思われる。

(第二部)まずヒト単球、単球由来未熟 DC、単球由来成熟 DC についての Notch リガンド発現の変化において注目すべき点は、ヒト未熟 DC に発現していた Jagged1 が成熟 DC で減弱することである。これは Jagged1 が T 細胞を免疫寛容へ誘導することや未熟 DC が T 細胞を免疫寛容へ誘導するが成熟 DC では誘導しない報告と矛盾しない所見と考えられる。さらにヒト成熟 DC に対して、可溶性ヒト CD40 リガンドを用いた系とヒト CD40 リガンド発現 U251 細胞を用いた系により CD40 リガンド刺激で活性化させたところ、両者で Delta4 の発現が上昇し、ヒト未熟 DC に対してアデノウイルスによる CD40 リガンド遺伝子導入を行った系では、CD40 リガンドが DC に発現することで DC 同士の接触により CD40 シグナルが入り、DC が成熟化し、かつ Delta4 の発現の上昇が認められた。これらの結果より、主に活性化 CD4T リンパ球に発現する CD40 リガンドの刺激で活性化された DC、いわば活性化 DC が Delta4 を発現することで、たとえば T リンパ球の活性化に関与する分子になりうると考えられる。そのため活性化 DC における Delta4 発現の検討が今後の課題になると思われる。その他、未熟 DC に対して Delta4 刺激等を行うことで、成熟化や Delta4 発現を確認したことや、CD8T リンパ球に対して CD3 抗体刺激することで Notch2 発現の増強を確認する結果を得たことで、Notch シグナルが末梢性免疫応答の活性化や免疫寛容の制御などに関与することが示唆された。将来的にはこれらの Notch シグナルによる制御機構を解明することで、悪性腫瘍や自己免疫疾患に対する免疫療法の臨床応用に活性化 DC の導入が期待される。