

審査の結果の要旨

氏名 杉浦 大祐

「抗原特異的な抗腫瘍免疫応答における CD4 陽性 T 細胞の役割とワクチンへの応用」と題する本研究において、学位申請者は腫瘍抗原を標的とする癌の免疫療法における最大の障壁は、その抗原に対する免疫寛容であると考え、その機構の解明を目指して研究を行った。MUC1 トランスジェニックマウス (MUC1.Tg マウス) を用いた解析から、末梢において抗原特異的な T 細胞の抑制が見られる事を明らかにした。多くの腫瘍抗原は、正常組織にも発現する自己抗原であり、この免疫寛容を打破し、効率よく腫瘍増殖を抑制するが、正常組織を傷害しない免疫療法が理想的であるが、腫瘍抗原特異的な免疫寛容を打破する事を目指した免疫療法の開発はこれまで試みられていなかった。本研究は、腫瘍の増殖している微少環境下で、免疫応答を抗原特異的に誘導する免疫寛容が形成される機構を追求した。また、MUC1.Tg マウスの免疫寛容のメカニズムを明らかにし、従来実現されていなかった効果的な MUC1 を標的とする癌ワクチンを開発するための基礎とすることが目指された。

第一部では、MUC1.Tg マウスに移植された MUC1 発現大腸癌細胞は増殖性が高かった大腸癌の同所移植モデルにおいて、MUC1.Tg マウスは MUC1 発現癌細胞に対して免疫寛容を示すかどうかを明らかにするために、マウス大腸癌高肝転移性細胞株 SL4 にヒト MUC1 を強制発現させた SL4-MUC1、または MUC1 を含まないベクターを導入した SL4-mock をマウスの盲腸漿膜下に移植した。2 週間後に犠牲死させ、腫瘍の増殖を臓器重量を指標として評価した。MUC1 発現大腸癌細胞は C57BL/6 野生型マウス (B6 マウス) では、非発現細胞と同程度の増殖性を示したが、MUC1.Tg マウスでは非発現細胞より増殖しており、腫瘍増殖は同細胞の B6 マウスにおけるそれより高かった。この結果から、腫瘍増殖を抑制する応答がいずれの細胞に対しても起るが、MUC1.Tg マウスでは免疫寛容のために、MUC1 発現細胞による腫瘍増殖が亢進した可能性が考えられた。

第二部では、MUC1.Tg マウスでは SL4-MUC1 に対する免疫応答が抑制されていることを示した。MUC1.Tg マウスに SL4-MUC1 細胞を移植したときの、腫瘍内 T 細胞の活性化状態を、活性化エフェクター T 細胞 (Teff) と、末梢での免疫寛容に重要であることが知られている制御性 T 細胞 (Treg) の数の比率に注目して B6 マウスと MUC1.Tg マウスを比較した。SL4-MUC1 細胞を盲腸に移植後 5、10 日後に腫瘍移植部位を摘出し、コラゲナーゼで消化して細胞を調製後に、フローサイトメリー法により、 $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ Treg 細胞と $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ Teff 細胞の $CD4^+$ 細胞集団内における割合を調べた。また、Treg 細胞と Teff 細胞の比を算出することで、個々の動物における免疫応答が、活性化または抑制のどちらに傾いているのかを明らかにした (図 2C)。腫瘍移植 10 日後には B6 マウスでは Treg 細胞の割合は減少し、Teff 細胞の占める割合が多くなり、腫瘍に対して免疫応答が起こっていることが示唆された。一方、MUC1.Tg マウスでは Teff 細胞の増加が有意に抑制され、結果として B6 マウスと比べて高い Treg/Teff 比が保たれていた。このことから、MUC1.Tg マウスでは SL4-MUC1 に対する免疫応答が抑制されていることが、腫瘍内 T 細胞亜集団の性質として示された。

第三部では、3. MUC1.Tg マウスには MUC1 に対する末梢免疫寛容が存在する事が示された。上記の示した実験結果から、MUC1.Tg マウスでは腫瘍内で Teff 細胞の増加が抑制されていることが明らかになった。しかし、MUC1.Tg マウスでは中枢性免疫寛容によって MUC1 に反応することのできる T 細胞の数が減少している可能性があるため、MUC1 に対する免疫応答を末梢で抑制する末梢性免疫寛容が存在するかどうか、また Treg 細胞がそれに関わっているかどうかは不明だった。そこで MUC1.Tg マウスに MUC1 特異的な末梢性免疫寛容が存在するのかどうかを明らかにするために、MUC1.Tg マウスをレシピエントとして、抗原特異的に活性化した T 細胞と腫瘍細胞を混合して移植を行うことによって腫瘍特異的な T 細胞の活性化を測定できる Winn assay を行った。B6 マウスを MUC1 DNA ワクチンで免疫することにより、MUC1 特異的な T 細胞を活性化させこれらの細胞を脾臓から調製

し、MUC1 を強制発現させた B16-F10 メラノーマ細胞と混合し、ナイーブな B6 マウスまたは MUC1.Tg マウスの皮下に移植した。B6 マウスをレシピエントにした場合、MUC1 特異的な T 細胞の効果によって腫瘍は完全に拒絶されたが、MUC1.Tg マウスをレシピエントにした場合には、MUC1 特異的な T 細胞が存在するにも関わらず、腫瘍の増殖が認められ、全てのマウスは最終的に死亡した。このことから、MUC1.Tg マウスには MUC1 特異的な T 細胞による腫瘍細胞の増殖を抑制する効果を、末梢で抑制する機構が存在することが示された。

第四部では、MUC1.Tg マウス由来の Treg 細胞は MUC1 特異的に T 細胞応答を抑制する事を明らかにした。MUC1.Tg マウスにおける、MUC1 に対する末梢性免疫寛容による腫瘍細胞の増殖において、Treg 細胞が重要な役割を果たしている可能性が考えられたので、MUC1.Tg マウスの Treg 細胞が MUC1 特異的に免疫応答を抑制するかどうかを以下の方法で調べた。T 細胞ハイブリドーマである VF5 細胞は抗原提示細胞によって提示される MUC1 ペプチドに反応して IL-2 を産生するので、MUC1 特異的 T 細胞活性化の指標となる。そこで、B6 マウスまたは MUC1.Tg マウスから分離した CD4⁺CD25⁺ Treg 細胞を加え、IL-2 産生の低下から免疫抑制能を評価した。コントロールとして加えた CD4⁺CD25⁻ のナイーブ T 細胞は IL-2 の産生を抑制しないのに対して、CD4⁺CD25⁺ の Treg 細胞を加えると VF5 細胞による IL-2 産生は Treg 細胞の細胞数依存的に抑制された。さらに、B6 マウス由来の Treg 細胞と比較して MUC1.Tg マウス由来の Treg 細胞は、より強力に VF5 細胞による IL-2 産生を抑制した。一方、MUC1 と関係の無い卵白アルブミン (OVA) を感作させた B6 マウスより単離した、OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞 (Tova) により OVA 特異的に産される IL-2 に対する抑制能は、B6 マウスと MUC1.Tg マウス由来の Treg 細胞の間で差が無かった。これらの結果から、MUC1.Tg マウスの Treg 細胞には MUC1 特異的な T 細胞応答を MUC1 特異的に抑制する細胞集団が含まれることが示された。

以上述べたように、学位申請者杉浦大祐は MUC1.Tg マウスの MUC1 に対する免疫寛容による抗腫瘍免疫抑制のメカニズムとして、末梢での免疫寛容が存在することを明らかにした。また、その機構に関与すると考えられる Treg 細胞には MUC1 特異的に免疫応答を抑制する細胞集団が存在することを示した。T 細胞レセプタートランスジェニックマウスを用いずに、抗原特異的な Treg 細胞がナイーブなマウスで存在することを示した報告、またその Treg 細胞が抗原特異的に免疫応答を抑制するという報告は今までになかったので、免疫抑制の機構を理解する上で全く新しい知見が得られたと言える。この MUC1 特異的 Treg 細胞は MUC1 のどのようなペプチド配列を認識しているのか、また MUC1 上の糖鎖構造が変化することによって、認識が変化するのかを明らかにすることが今後の課題である。本研究によって示された MUC1 特異的 Treg 細胞を減少させ、あるいは効果を減弱させることにより、MUC1.Tg マウスで特異的な免疫寛容を打破し MUC1 を発現する癌細胞に対する免疫治療の効果を上昇させることが可能になると考えられる。従来から、Treg 細胞は癌の免疫治療の効果を上昇させるための障壁であり、ターゲットであると考えられてきたが、Treg 細胞を全身的に除去するような方法によって、過剰な免疫応答を抑制することができずに、自己免疫疾患が誘導されるといった、副作用が懸念されている。本研究で示されたような、抗原特異的な Treg 細胞をターゲットにすることにより、このような副作用が軽減できる可能性があり、癌の免疫治療の新たな可能性を提示することができたと考えられる。以上の成果は免疫学及び腫瘍学に資するところが大きく、本研究を行った杉浦大祐は、博士(薬学)の学位を取得するにふさわしいと判断した。