

## 論文の内容の要旨

論文題目 抗体—インターロイキン2キメラ受容体を用いた  
遺伝子導入T細胞の増殖制御

氏 名 十 河 孝 浩

### 【研究概要】

T細胞は、免疫系全体の活性制御機能をもつヘルパーT細胞や、標的となるがん細胞などを直接攻撃する機能を持つ細胞傷害性 T 細胞などから構成されており、免疫応答における中心的役割を担う重要な免疫細胞である。特に、細胞傷害性 T 細胞の持つ抗腫瘍活性を利用した免疫治療法がさかんに研究されており、近年では活性化 T 細胞を投与することで腫瘍に対する免疫応答を強化する治療法が注目されている。これはがん患者自身の T 細胞を腫瘍抗原特異的に、または治療遺伝子を導入して *ex vivo* で活性化させて増幅し、それを患者の体内に再投与することで標的腫瘍細胞を攻撃させるという治療法である。この治療において、投与した T 細胞を体内で大量に増殖させることが、治療効果に大きく影響する重要なポイントとなる。T 細胞の増殖には、インターロイキン 2 (IL-2) と呼ばれるサイトカインが、その受容体である IL-2 受容体 (IL-2R) と結合することによって伝達される増殖シグナルが必要であるため、治療時に T 細胞と同時に IL-2 を大量に投与することによって T 細胞を増殖させ、治療効果を上げようという治療法が試みられてきた。しかし、IL-2 は T 細胞以外にも NK 細胞、B 細胞、好中球といった免疫担当細胞の過剰な活性化をも誘導してしまうため、血液漏出、心肺不全といった炎症性の重篤な副作用を引き起こしてしまう例も報告されている[1,2]。このような問題点を解決して治療効果を改善するためには、治療に必要な T 細胞を *in vitro* および *in vivo* において、大量に選択的に増殖させることのできる増殖制御法の開発が必要である。

IL-2 は、活性化 T 細胞表面に発現した IL-2R $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖、 $\gamma$  鎖という 3 種類からなる複合体と結合することで増殖シグナルを伝達している。この 3 種類の IL-2R の中で、 $\alpha$  鎖は IL-2 との結合のみに関与しており、増殖シグナルの伝達に直接関与しているのは  $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖であると考えられている。実際にこの 2 種類の受容体の細胞内ドメインと、c-kit、あるいは GM-CSFR の細胞外ドメインとのキメラ受容体を導入してヘテロダイマーを形成させた結果、T 細胞を増殖させることができたという報告がある[3]。我々は、

この IL-2R $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖のヘテロダイマー形成によって T 細胞を増殖させることができるという現象を利用して、遺伝子導入 T 細胞の増殖制御を行う手法の開発を目指した。本論文では遺伝子導入 T 細胞の選択的増幅法の開発と、応用へ向けての機能解析を行った結果をまとめた。

IL-2R $\beta$ 、 $\gamma$  鎖のダイマー形成の誘導法としては、当研究室において開発された、抗原-抗体反応を利用して遺伝子導入細胞の増殖を制御する、antigen-mediated genetically modified cell amplification (AMEGA) と呼ばれるシステムを応用した[4]。これは、抗原分子依存的に抗体-受容体キメラのダイマー化を誘導して増殖シグナルを伝達させることにより、そのキメラ受容体遺伝子が導入された細胞の増殖を制御することができるという手法である。このシステムを IL-2R $\beta$ 、 $\gamma$  鎖に応用するため本研究では、IL-2R $\beta$ 、 $\gamma$  鎖の IL-2 結合ドメインを、別の抗原であるニワトリ卵白リゾチーム (HEL)、あるいはフルオレセイン (FL) を認識する抗体可変領域に置換することで、抗原-抗体反応によって IL-2 シグナルを模倣できるキメラ IL-2R を作製した (Fig. 1)。このキメラ IL-2R を、IL-3 依存性マウス pro-B 細胞株 Ba/F3、および IL-2 依存性マウス T 細胞株 CTLL-2 に導入して、抗原分子の用量依存的に遺伝子導入細胞を選択的に増幅できる系の構築に成功した。サイトカイン非依存的に遺伝子導入 T 細胞を増殖させることができるため、必要な T 細胞を選択する手法として応用が期待できる。また治療への応用を考えた場合に、抗原-抗体反応を利用しているため生体に存在しない低分子をリガンドとして用いて細胞の増殖を制御することができると考えられ、炎症などの副作用を抑えることが期待される。実際に、FL のような小分子のハプテン抗原を使用しても T 細胞の増殖制御に成功していることから、その他の様々な小分子抗原を用いても応用が可能と考えられる。

### 【キメラ IL-2R の構造と、用いた細胞】

導入するキメラ IL-2R は、IL-2R の  $\beta$  鎖または  $\gamma$  鎖の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを、EpoR の細胞外 D2 ドメインおよび抗体可変領域と連結して作製した (Fig. 1, 2A)。HEL をリガンドとする系では抗 HEL 抗体 HyHEL-10 の可変領域 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> を用いて、V<sub>H</sub> を  $\beta$  鎖の N 末端に、V<sub>L</sub> を  $\gamma$  鎖の N 末端に結合させた H $\beta$ L $\gamma$  と、その反対に V<sub>L</sub> を  $\beta$  鎖の N 末端に、V<sub>H</sub> を  $\gamma$  鎖の N 末端に結合させた H $\gamma$ L $\beta$  という 2 種類のベクターを作製した。また FL をリガンドとする系では、抗 FL 抗体の一本鎖可変領域 (ScFv) をキメラ受容体の N 末端に連結した、S $\beta$ S $\gamma$  を作製した。S $\beta$ S $\gamma$  は 2 分子の FL と結合することでダイマー化が誘導されるため、使用するリガンドとしては、表面を FL で修飾した BSA (BSA-FL)、または FL を 13mer の DNA リンカーで連結した FL ダイマー (Fig. 2B) の 2 種類を用意した。

これらのキメラ受容体の機能解析のため、Ba/F3、CTLL-2 細胞を用いて実験を行った。Ba/F3 は 10% FBS 含有 RPMI1640 培地に 1 ng/ml IL-3 を添加して培養し、CTLL-2

は 10%FBS 含有 RPMI1640 培地に、1 mM sodium pyruvate、50  $\mu$ M monothioglycerol、20 nM bathocuproine disulfonate と、2 ng/ml IL-2 を添加して培養した [5]。遺伝子導入後に選択培養を行う場合は、サイトカインの代わりに 1~2  $\mu$ g/ml の HEL、または 5  $\mu$ g/ml の BSA-FL を加えて培養を行った。

### 【結果と考察】

作製した H $\beta$ L $\gamma$ 、H $\gamma$ L $\beta$ 、S $\beta$ S $\gamma$  のキメラ IL-2R 遺伝子をそれぞれ Ba/F3、および CTLL-2 に導入し、リガンドである HEL または BSA-FL を添加して選択した。EGFP 蛍光を指標として、選択後の細胞のフローサイトメトリーによる解析を行った結果、いずれの細胞においても EGFP 陽性率がほぼ 100% となり、キメラ IL-2R が導入された細胞が選択的に増幅されたことが示唆された (Fig. 3, 4)。選択された細胞を、対応するそれぞれのキメラ IL-2R の名前を取って、Ba/F3 細胞の場合は Ba/H $\beta$ L $\gamma$ 、Ba/H $\gamma$ L $\beta$ 、Ba/S $\beta$ S $\gamma$ 、CTLL-2 細胞の場合は CT/H $\beta$ L $\gamma$ 、CT/H $\gamma$ L $\beta$ 、CT/S $\beta$ S $\gamma$  と呼ぶ。また、選択されたそれぞれの細胞におけるキメラ IL-2R の発現が Western blotting により確認できたことから、遺伝子導入細胞はキメラ IL-2R 依存的に増殖したと考えられる (Fig. 5)。

次に、それぞれの遺伝子導入細胞におけるリガンド濃度依存的な細胞増殖を確認した。Ba/H $\beta$ L $\gamma$ 、Ba/H $\gamma$ L $\beta$ 、CT/H $\beta$ L $\gamma$ 、CT/H $\gamma$ L $\beta$  に対しては、HEL を 0~10  $\mu$ g/ml (Fig. 6)、Ba/S $\beta$ S $\gamma$ 、CT/S $\beta$ S $\gamma$  に対しては、13 mer の FL ダイマーを 0~5  $\mu$ M の濃度で加えて培養した (Fig. 7)。H $\beta$ L $\gamma$ 、S $\beta$ S $\gamma$  キメラでは、特に CTLL-2 において非常に強い濃度依存的な増殖促進効果を示したのに対し、H $\gamma$ L $\beta$  キメラでは特に Ba/F3 ではリガンド非依存的な細胞増殖が見られた (Fig. 6B)。H $\beta$ L $\gamma$  キメラと H $\gamma$ L $\beta$  キメラを比較した場合に、発現量の差が目立った相関は見られないことから (Fig. 5A)、それぞれのコンフォメーションの違いが、リガンド非依存的なレセプターの活性化状態の差に関与していると考えられる (Fig. 1)。

さらに、それぞれのキメラ IL-2R を介したシグナル伝達活性化を分子レベルで確認するために、IL-2 シグナル下流の主なシグナル伝達分子である、STAT3、STAT5、ERK、Akt のリン酸化を確認した (Fig. 8, 9)。細胞をそれぞれのリガンドで刺激した場合に、天然の IL-2 シグナルと比較して多少の差異は見られたものの、全ての分子のリン酸化が観察された。以上の結果から、作製したキメラ IL-2R を細胞に導入することで、遺伝子導入細胞のみをリガンド依存的に増殖させることができることが示された。T 細胞の増殖を誘導することのできる有効なツールを開発することに成功した。

### 【参考文献】

[1] Rosenberg, S.A., et al. (1985) *The New England Journal of Medicine*

313, 1485-1492

[2] Kragel, A.H., et al. (1990) *Human Pathology* 21, 493-502.

[3] Nelson, B.H., et al. (1994) *Nature* 369, 333-336.

[4] Kawahara, M., et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31, e32.

[5] Brielmeier, M., et al. (1998) *Nucleic Acids Research* 26, 2082-2085.

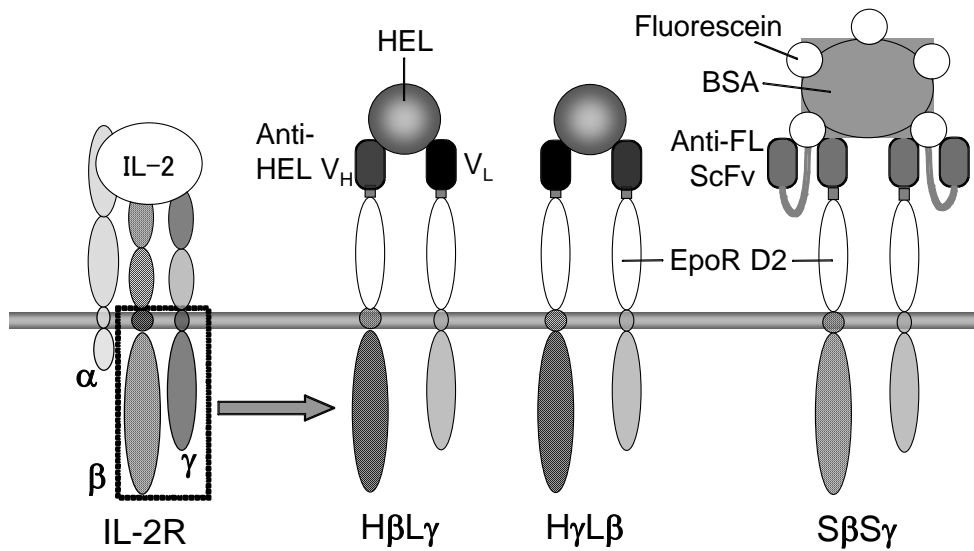
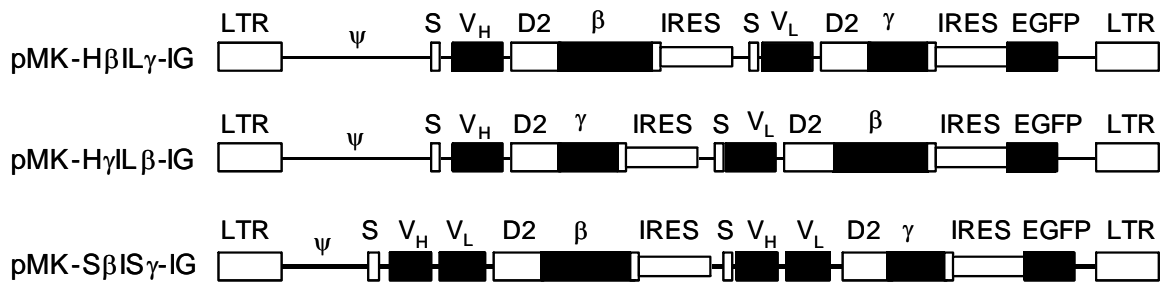


Fig. 1. IL-2RとキメラIL-2Rの模式図

A



B

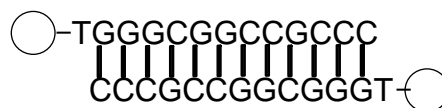
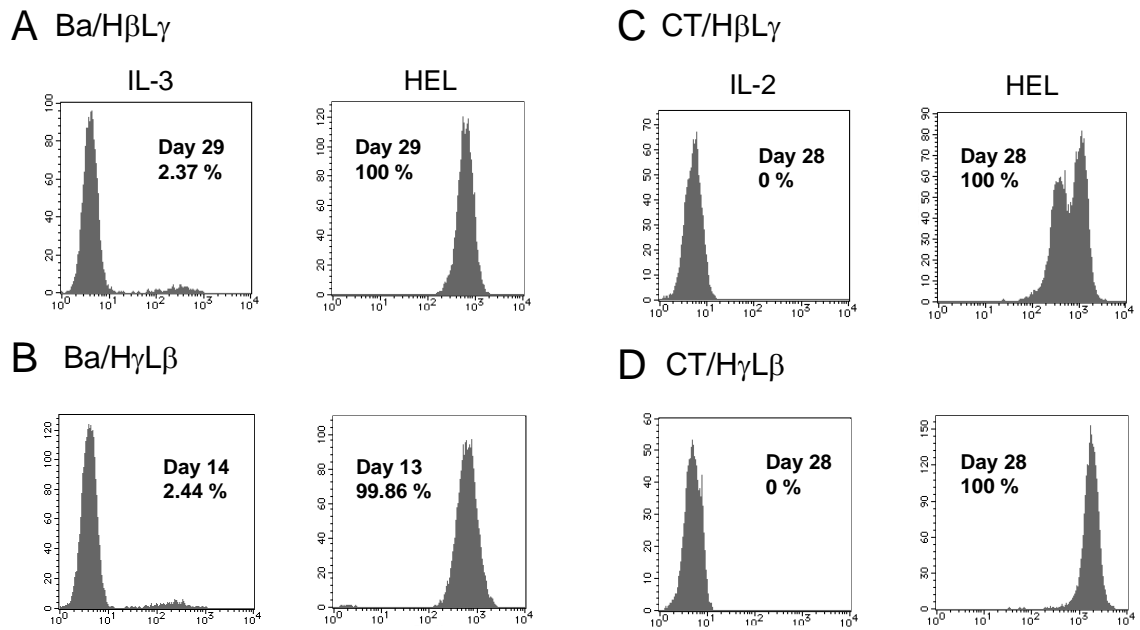
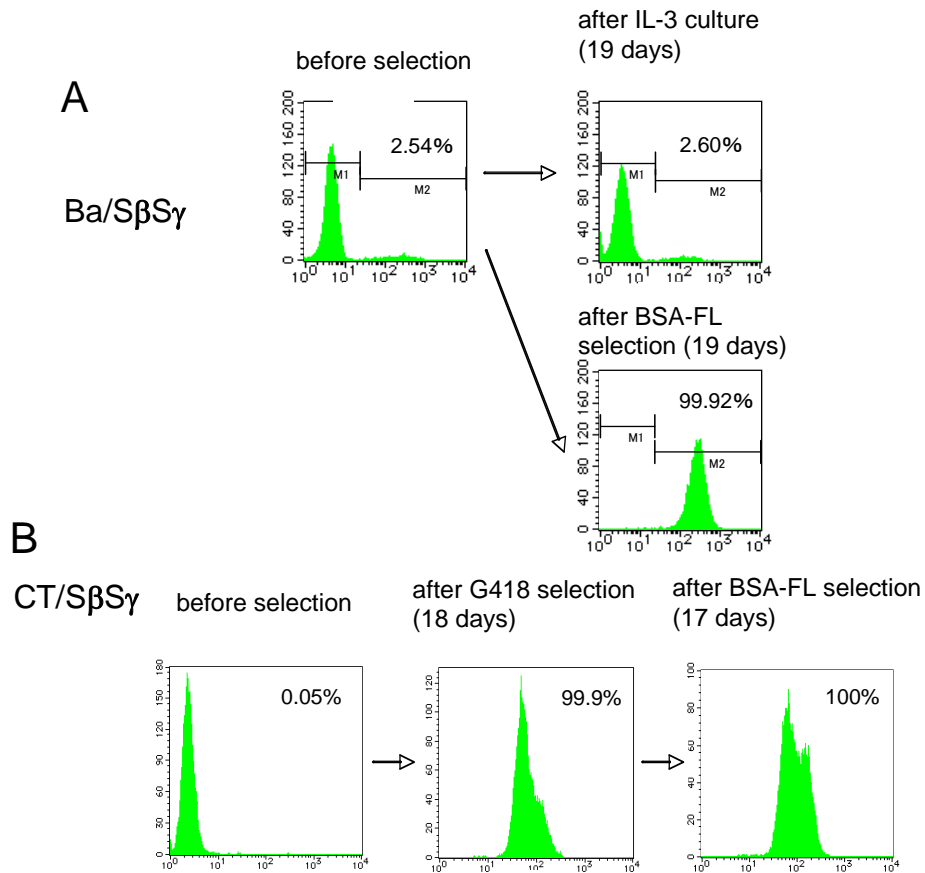


Fig. 2 (A) キメラ IL-2R 発現ベクターの構造

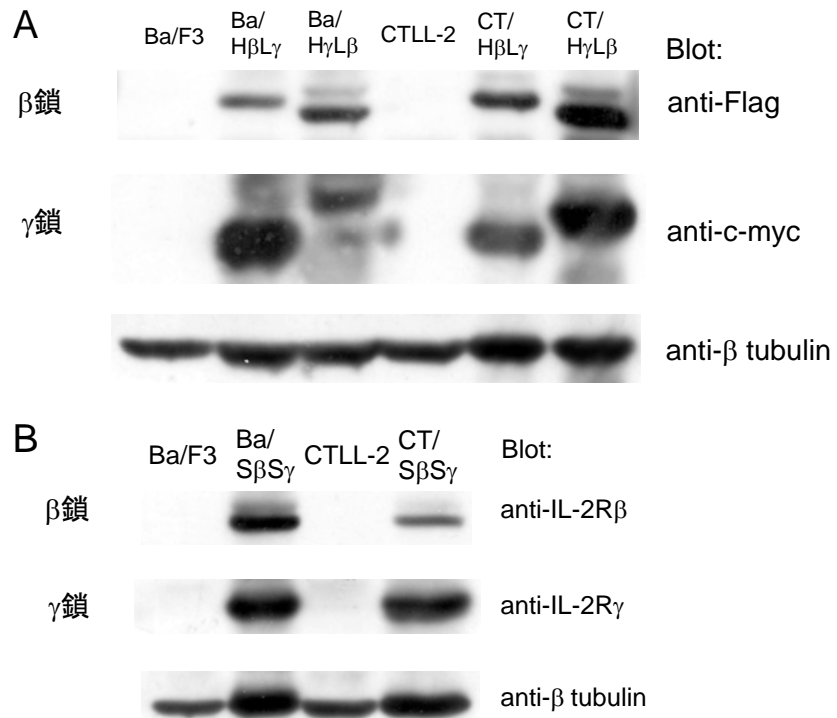
(B) FL ダイマー(13 mer)の模式図



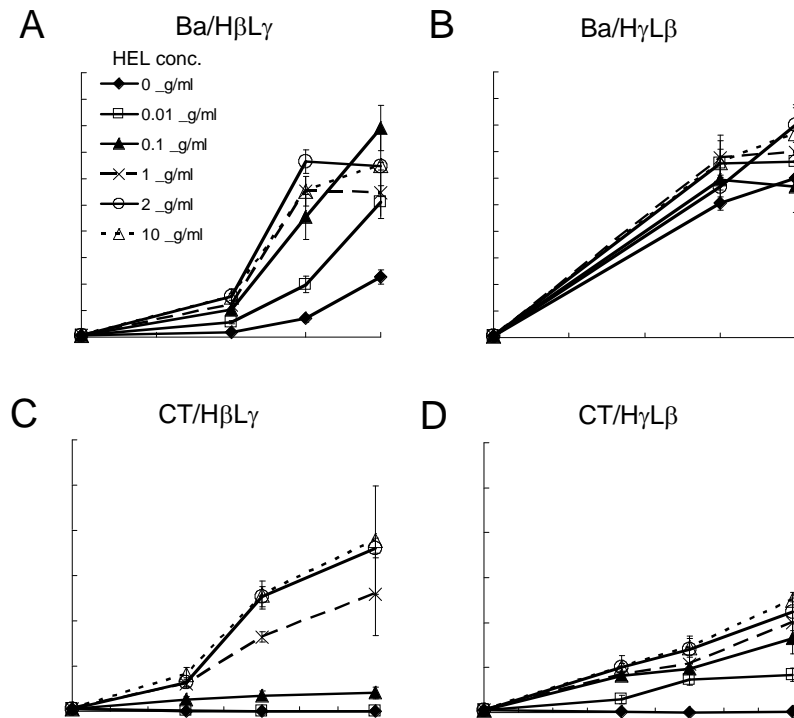
**Fig. 3** HEL 応答性キメラ導入細胞の EGFP 陽性率の選択前後における変化（培養日数と、EGFP 陽性細胞率を示す。）



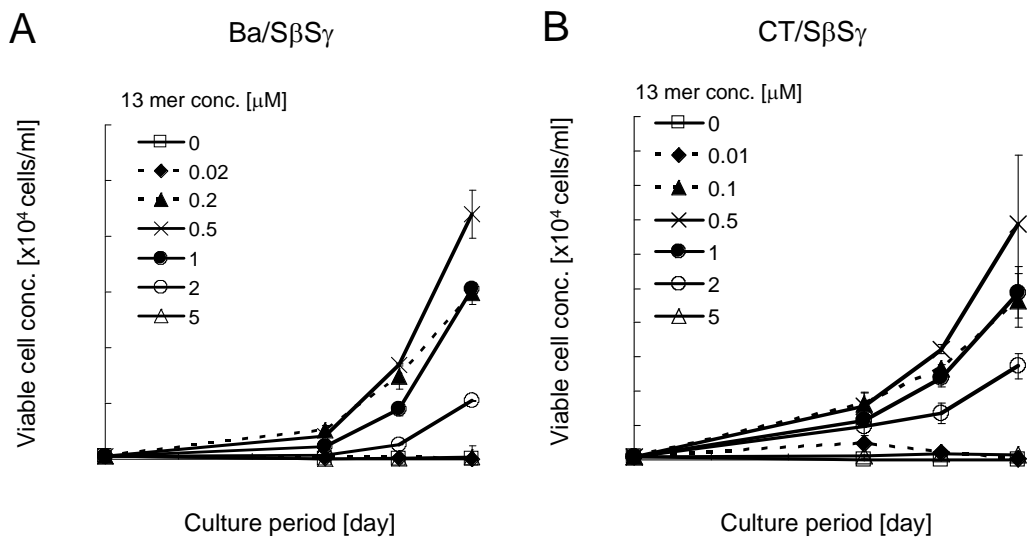
**Fig. 4** FL 応答性キメラ導入細胞の EGFP 陽性率の選択前後における変化（培養日数と、EGFP 陽性細胞率を示す。）



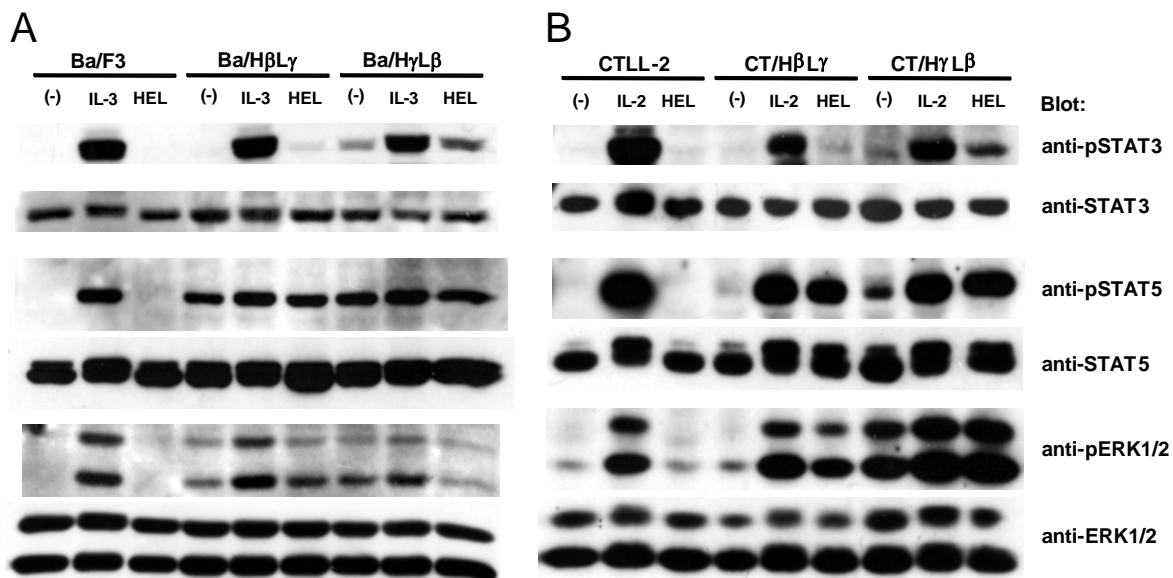
**Fig. 5 (A)** HEL 応答性キメラの発現確認  
**(B)** FL 応答性キメラの発現確認



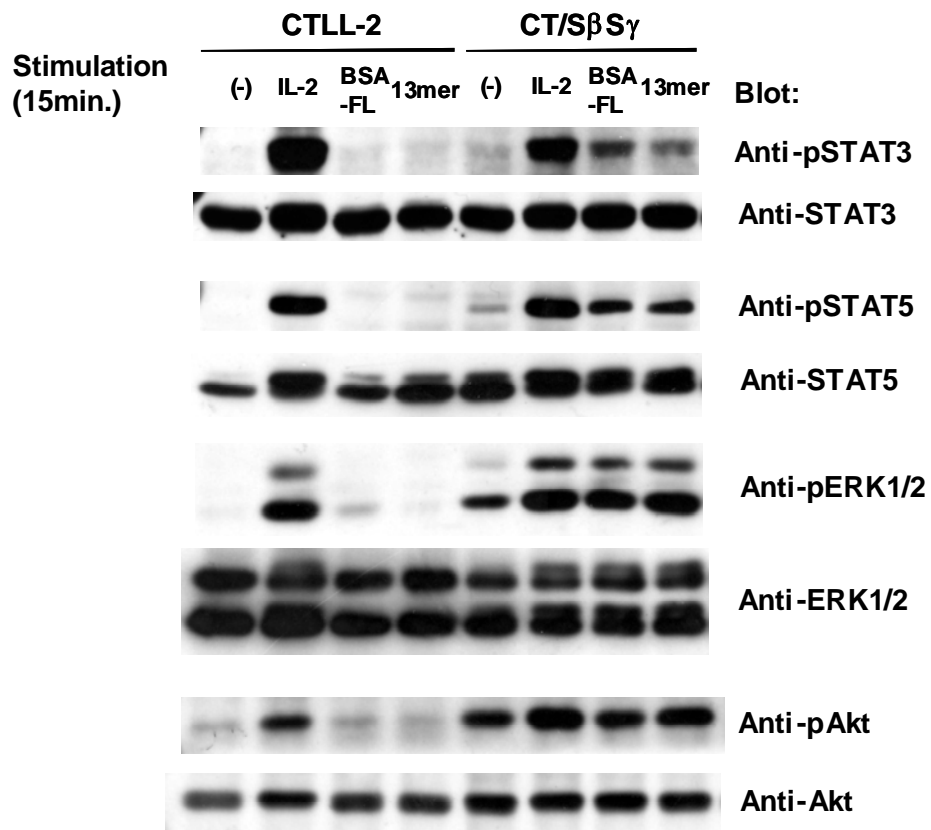
**Fig. 6** Ba/HbLg (A)、 Ba/HgLb (B)、 CT/HbLg (C)、  
 CT/HgLb (D)の HEL 濃度依存的な増殖曲線



**Fig. 7** Ba/SbSg (A)、 CT/SbSg (B) の FL ダイマー濃度依存的な増殖曲線



**Fig. 8** Ba/F3、 Ba/HbLg、 Ba/HgLb (A)、 および CTLL-2、 CT/HbLg、 CT/HgLb (B) のシグナル伝達分子のリン酸化の解析



**Fig. 9** CTLL-2、および CT/SbSg のシグナル伝達分子のリン酸化の解析