

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 十河 孝浩

T 細胞は、細胞性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ため、T 細胞の増殖を制御することは非常に重要な課題であるといえる。T 細胞増幅の方法としては、T 細胞の活性化、増殖に必須のサイトカインであるインターロイキン (IL) -2 により伝達されるシグナルの利用が考えられる。本論文は、通常 IL-2 と結合して増殖シグナルを伝達する IL-2 受容体 (IL-2R) の IL-2 結合ドメインを、抗原を認識する抗体可変領域 VH, VL あるいは ScFv 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、遺伝子導入 T 細胞の選択的な増殖制御法を確立することを目指したものである。本論文は以下の 5 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の目的と概要を述べ、本論文の構成を示している。

第 2 章では、本研究の背景について概観している。

第 3 章では、抗原であるニワトリ卵白リゾチーム (HEL) を認識して結合する抗体の VH あるいは VL と IL-2R の  $\beta$  鎖あるいは  $\gamma$  鎖の細胞内ドメインを融合したキメラ IL-2R 遺伝子を作製し、IL-3 依存性マウス pro-B 細胞株である Ba/F3 細胞、および IL-2 依存性マウス T 細胞株である CTLL-2 細胞に導入し、キメラ受容体の細胞増殖シグナル伝達機能に関する評価と解析を行った結果を報告している。すなわち、作製した 2 種類のキメラ IL-2R である、VH- $\beta$  鎖細胞内ドメイン/VL- $\gamma$  鎖細胞内ドメイン (H $\beta$ L $\gamma$ ) の組み合わせからなるキメラ受容体、および VH- $\gamma$  鎖細胞内ドメイン/VL- $\beta$  鎖細胞内ドメイン (H $\gamma$ L $\beta$ ) の組み合わせからなるキメラ受容体の遺伝子をそれぞれ Ba/F3 細胞、CTLL-2 細胞へ導入し、発現させた結果、いずれのキメラ受容体発現細胞においても HEL 依存的に細胞増殖シグナルが伝達され、キメラ受容体発現細胞を選択的に増殖させることに成功したことを報告している。さらに、シグナル伝達分子のリン酸化による活性化状態をウェスタンブロッティング解析し、キメラ IL-2R を介して IL-2 シグナルと同様の細胞増殖シグナルが伝達されていることも確認できたと述べている。特に H $\beta$ L $\gamma$  キメラ受容体については、CTLL-2 細胞に導入した場合に、細胞のリガンド非依存的なバックグラウンド増殖が全く見られず、HEL 濃度依存的に細胞増殖を厳密に制御することができるという優れた特徴を持つことを見出している。

第 4 章では、Ba/F3 細胞、CTLL-2 細胞を用いて、抗原であるフルオレセイン (FL) を認識して結合する抗体の ScFv と IL-2R の  $\beta$  鎖あるいは  $\gamma$  鎖の細胞内ドメインを融合したキメラ IL-2R について、細胞増殖シグナル伝達機能に関する評価と解析を行った結果を報告している。すなわち、作製した ScFv- $\beta$  鎖細胞内ドメイン/ScFv- $\gamma$  鎖細胞内ドメイン

(S8Sy) の組み合わせからなるキメラ受容体に、抗原である FL 修飾 BSA (BSA-FL) 依存的な細胞増殖促進シグナルを伝達させることにより、キメラ受容体発現細胞の選択的増殖と増幅に成功したことを報告している。この S8Sy キメラ受容体を用いることにより、Ba/F3 細胞、CTLL-2 細胞ともに、BSA-FL 濃度依存的に細胞増殖を厳密に制御することが可能であることを明らかにしている。また、FL-dimer を用いた解析により、S8Sy キメラ受容体のシグナル伝達に最適な FL 分子間距離は 40~45 Å 程度の非常に狭い範囲に限られることを明らかにしている。以上の結果から、本研究において作製したキメラ IL-2R を用いることで、抗原分子依存的に他の T 細胞の増殖も制御できる可能性が示唆されたと結論づけている。

第 5 章では、より汎用性の高いマウス初代培養 T 細胞を用いて、キメラ IL-2R の機能評価を行っている。その結果、S8Sy キメラ受容体が高発現していると予想される T 細胞において、リガンドである BSA-FL を加えることによって細胞のアポトーシスが抑制され、細胞の生存率が上昇することを見出している。その他の H8Ly キメラ、HyL8 キメラに関しては機能を確認することができなかったが、キメラ受容体遺伝子を高発現した細胞のみを分取した場合には、これらのキメラ IL-2R も機能している結果が得られる可能性があると考えられている。

以上、本研究では抗原依存的に遺伝子導入 T 細胞の増殖を制御することに成功し、必要な T 細胞を選択する新しい手法として利用できる可能性を示している。遺伝子治療においては、抗原-抗体反応を利用することで生体に存在しない低分子抗原をキメラ受容体のリガンドとして用いることができるため、サイトカインの投与に起因する炎症や、不必要な細胞の増殖などの副作用を抑えた治療への応用展開が期待される。また、本キメラ受容体のシグナル伝達機能の解析で得られた知見は、IL-2R 研究の発展にも大きく寄与するものである。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格であると認められる。