

学位論文題名

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene-Transduced Tumor Cells Combined with Tumor-Derived gp96 Inhibit Tumor Growth in Mice

(マウス腫瘍に対する GM-CSF 遺伝子導入細胞と腫瘍由来 gp96を用いた免疫療法の検討)

学位論文内容の要旨

【背景】

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)は免疫療法で期待されるサイトカインで、抗原提示細胞の成熟化に関与しているとされる。GM-CSF 遺伝子導入細胞を用いた免疫療法は、その腫瘍生着抑制効果(予防的効果)についてはマウスで有効性が報告されているが、生着後腫瘍に対する効果(治療的効果)については十分でないとの報告が多い。一方、腫瘍由来熱ショック蛋白質 gp96 は、その保持している腫瘍細胞特異的抗原ペプチドを抗原提示細胞の MHC class I 分子に受け渡すことで特異的抗腫瘍効果を発揮するとされ、また最近では gp96 が直接樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞を成熟化すると報告もある。しかしこの腫瘍由来 gp96 の抗腫瘍効果は治療的にはやはり不十分である。

【目的】

GM-CSF 遺伝子導入細胞と腫瘍由来 gp96 の併用療法による抗腫瘍効果とそのメカニズムをマウス肺癌モデルを用いて検討した。

【材料】

動物は C57BL6 マウスを、肺癌細胞は Lewis Lung Cancer (以下 LLC)を用い、GM-CSF 遺伝子導入細胞は LLC に遺伝子導入した LLC/GM を放射線照射して用いた。

【方法】

1. *In vivo* における抗腫瘍効果の検討: LLC 10^5 個をマウスの右側腹部皮下に移植後、day 3 より週 2 回 2 週間にわたり LLC 由来 gp96 単独、 10^6 個の LLC/GM (以下全ての実験で 10^6 個) 単独、或いはこの両方を左側腹部皮下に投与し、その後の腫瘍増大速度を検討した。また monoclonal 抗体で CD4, CD8, NK1.1 をそれぞれ除去したマウスに対しても同様の実験を行った。
2. *In vitro* における殺細胞効果: マウスの皮下に $1 \mu\text{g}$ の LLC 由来 gp96, LLC/GM, それら両方を day 0, 3 に投与し day 10 に脾細胞を採取し、*in vitro* で再刺激した後 day 15 に LLC, IFN- γ で前処置した LLC (LLC/IFN), マウス lymphoma cell line の RMA, NK target である YAC-1 の 4 種を target cell として ^{51}Cr -releasing assay を行った。更に同様の実験を CD4, CD8, NK1.1 をそれぞれ *in vitro* で除去して行った。
3. 治療後マウスの所属リンパ節の検討: LLC 由来 gp96, LLC/GM、その両方を皮下投与したマウスの所属リンパ節を摘出し、その総細胞数、構成細胞比率、CD11c 陽性細胞の CD86, MHC class II の発現を検討した。

【結果】

1. *In vivo* での治療効果の検討では LLC 由来 gp96 または LLC/GM 単独投与では、未治療に比べて移植された LLC の腫瘍増大速度を抑制したが、その効果は僅かなものであった。しかし LLC

由来 gp96 及び LLC/GM の併用投与においては、さらに有意に腫瘍増大抑制効果がみられた。これらの併用では、gp96 1 µg 併用時にのみ治療効果は有意に増強されたが、gp96 の併用量がそれ以上 (3 or 10 µg) でもそれ以下 (0.3 µg) でも治療効果の増強は認めなかった。なお正常肝由来 gp96 は抗腫瘍効果を示さなかった。さらに 1 µg の LLC 由来 gp96 と LLC/GM との併用でみられた抗腫瘍効果は CD8 を除去したマウスでは完全に消失し、CD4, NK1.1 を除去したマウスでは減弱した。

2. *In vitro* における殺細胞効果の検討では、LLC 由来 gp96 単独または LLC/GM 単独治療群で LLC/IFN に対し弱い殺細胞効果を認め、これは両者の併用で有意な増強を示した。一方、RMA、YAC-1 に対してはいずれの群も殺細胞効果を認めなかった。更にこの併用群でみられた殺細胞効果は *in vitro* の CD8 の除去により消失したが CD4, NK1.1 の除去では消失しなかった。

3. 治療後マウスの所属リンパ節の検討では、総細胞数は LLC/GM, 正常肝及び LLC 由来 gp96 群では対照群に比べ有意な増加がみられ、更にこれは LLC/GM と LLC 由来 gp96 の併用により更に有意に増加した。所属リンパ節の構成細胞比率の検討では LLC/GM, 正常肝及び LLC 由来 gp96 群では対照群に比べ有意に CD11c 陽性細胞比率が上昇し、LLC/GM と LLC 由来 gp96 1 µg の併用で各単独投与に比べ更に有意な上昇を認めた。更にこれらの CD11c 陽性細胞の CD86, MHC class II の発現レベルは LLC 由来 gp96 及び LLC/GM 単独群で対照群に比べて増強し、両者の併用にて更なる増強を示した。

【考察】

本研究では GM-CSF 遺伝子導入細胞および腫瘍由来 gp96 の抗腫瘍効果について検討した。いずれも単独では不十分な効果であったが、併用することで治療効果の増強を認めた。更にこの抗腫瘍効果は、*in vitro* における殺細胞効果の結果から CD8 陽性 T 細胞が主なエフェクター細胞と考えられ、また *in vivo* で各サブセットを除去したマウスの結果からはこの抗腫瘍免疫応答の経路に CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞や NK 細胞も少なからず関与していることが示唆された。

腫瘍由来 gp96 の抗腫瘍効果は、その保持する腫瘍特異的抗原ペプチドを供給することによると考えられており、本研究でも正常肝由来 gp96 (tumor antigen-negative) は抗腫瘍効果を示さなかった。また最近では gp96 が直接抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cell, DC) を成熟化するとの報告もある。一方、LLC/GM の抗腫瘍効果については、その細胞自体からの LLC 特異的抗原の供給に加え、過去の報告にある GM-CSF の DC 成熟化作用との複合的なものと考えた。以上から今回の併用効果はそれぞれの治療に共通する 2 つのメカニズム (腫瘍特異的抗原ペプチドの供給と成熟化 DC の誘導) によるものと考えられた。

本研究では後者のメカニズムである成熟化 DC の誘導の関与を検証するため、治療後マウスの所属リンパ節の解析を行った。その結果、各単独治療群で所属リンパ節内の成熟化 CD11c 陽性細胞 (DC) の増加を認め、併用群では更なる増加を認めた。この結果は併用治療効果に成熟化 DC の誘導が関与していることを示唆するものであった。正常肝由来 gp96 も腫瘍由来 gp96 と同程度の CD11c 陽性細胞を誘導したが、*in vivo* では抗腫瘍効果を認めなかったことから、抗腫瘍効果には腫瘍特異的抗原ペプチドの十分な供給が必須と考えられた。

【結語】

GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞と腫瘍由来 gp96 の併用療法は、肺癌に対する免疫遺伝子治療において新たな戦略となる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulationg Factor Gene-Transduced Tumor Cells Combined with Tumor-Derived gp96 Inhibit Tumor Growth in Mice

(マウス腫瘍に対する GM-CSF 遺伝子導入細胞と
腫瘍由来 gp96を用いた免疫療法の検討)

GM-CSF は抗原提示細胞の成熟化に関与するとされるサイトカインで、近年 GM-CSF 遺伝子導入細胞を用いた腫瘍免疫療法の報告がされている。一方、腫瘍由来熱ショック蛋白質 gp96 も腫瘍細胞特異的抗原ペプチドを保持していることにより抗腫瘍効果を発揮するとされている。これらはいずれもその腫瘍生着抑制効果(予防的効果)については有効とされているが、生着後腫瘍に対する効果(治療的効果)について単独投与では不十分との報告が多い。そこで GM-CSF 遺伝子導入細胞と腫瘍由来 gp96 の併用療法による抗腫瘍効果とそのメカニズムをマウス肺癌(LLC)モデルを用いて検討した。*In vivo* での生着後腫瘍に対する治療効果の検討では LLC 由来 gp96 または LLC/GM (GM-CSF 遺伝子導入した LLC)単独投与では、未治療に比べて生着後 LLC の腫瘍増大速度を抑制したが、その効果は僅かであった。しかしこれらを併用したところ、gp96 1 μ g 併用時でのみ、更に有意な腫瘍増大抑制効果を認めた。健常マウス肝組織由来 gp96 を用いた治療では LLC に対する抗腫瘍効果は全く認めなかった。更にこれらの併用治療でみられた抗腫瘍効果は *in vivo* で CD8 を除去したマウスでは完全に消失し、CD4, NK1.1 を除去したマウスでは減弱した。次に治療後マウス脾細胞を用いて行った CTL assay では LLC 由来 gp96 単独または LLC/GM 単独治療群では LLC に対し弱い特異的殺細胞効果を認め、これは両者の併用治療群で有意な増強を示した。更にこの併用治療群で認められた LLC に対する殺細胞効果は *in vitro* の CD8 の除去により消失したが CD4, NK1.1 の除去では変化はみられなかった。最後に治療後マウスの所属リンパ節の検討を行った。まずその総細胞数は LLC/GM、正常肝組織及び LLC 由来 gp96 単独群では対照群に比べ有意な増加をみとめ、更にこれは LLC/GM と LLC 由来 gp96 の併用により更に有意に増加した。次に構成細胞比率の

検討では LLC/GM, 正常肝組織及び LLC 由来 gp96 単独群では対照群に比べ有意に CD11c 陽性細胞(主に樹状細胞)比率が上昇し, これは LLC/GM と LLC 由来 gp96 1 µg の併用で各単独投与に比べ更に有意な上昇を認めた. 更にこれらの CD11c 陽性細胞の成熟度マーカー (CD86, MHC class II) 発現レベルの検討では LLC 由来 gp96 及び LLC/GM 単独群で対照群に比べてその発現レベルは増強し, これは両者の併用にて更なる増強を示した. 本研究では GM-CSF 遺伝子導入細胞と腫瘍由来 gp96 を併用することで, 単独では不十分であった治療的抗腫瘍効果の増強を認めた. 更に *in vivo* 及び *in vitro* の depletion study の結果から, この併用治療効果に於いては, priming phase では CD8 陽性 T 細胞, CD4 陽性 T 細胞, NK 細胞が複合的に, また effector phase では CD8 陽性 T 細胞が主な責任細胞として関与していると考えられた. これらの結果及び過去の報告から, 本研究の併用治療による抗腫瘍効果は, 両治療に共通する 2 つのメカニズムである腫瘍特異的抗原ペプチドの供給と所属リンパ節における成熟化樹状細胞の誘導によるものと考えられた. 以上より GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞と腫瘍由来 gp96 の併用療法は, 肺癌免疫遺伝子治療において新たな戦略となる可能性が示唆された.

審査にあたり, 副査今村雅寛教授より, 1) 肺癌免疫療法的手段として腫瘍由来 gp96, GM-CSF 遺伝子導入細胞を選択した理由について, 2) LLC 由来 gp96 と LLC/GM の併用治療効果の容量拘束性について, 3) *In vivo* と *in vitro* における LLC の MHC class I 発現レベルについて, 副査西村正治教授より, 1) 実際の臨床応用に向けての問題点, 2) 臨床応用の際の gp96 の推奨投与量の設定について, 副査秋田弘俊教授より, 1) gp96 に結合している腫瘍抗原についての質問があった. 主査西村孝司教授より, 1) 腫瘍由来 gp96 と GM-CSF 遺伝子導入細胞の併用治療の効果を拡大する方法について, 2) LLC 由来 gp96 に結合するペプチドの肺癌共通抗原としての可能性についての質問があった. 申請者はこれらの質問に対して的確かつ明確に回答した.

本研究の成果は, 肺癌治療における免疫療法の新たな可能性を示した点で高く評価され, 今後広く臨床応用されることが期待される.

審査員一同は, 本研究の成果を高く評価し, 申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した.