

放射線治療と Th1 細胞治療との併用治療による マウス肺癌治療効果の増強

学位論文内容の要旨

【背景】ヒト肺癌の標準治療の一つである放射線治療は、腫瘍のアポトーシスを誘導してこれを貪食した抗原提示細胞 (APC) による効率的な腫瘍抗原の提示を促進させ、抗腫瘍免疫を誘導することが報告されている。

一方 Th1 ヘルパー T 細胞に代表されるタイプ I 免疫応答では IL-12 や IFN- γ が重要な役割を果たしており、これらのサイトカインがアポトーシス細胞などを介した細胞傷害性 T 細胞 (CTL) と APC との効率的な相互作用や、CTL 活性の維持と腫瘍局所への遊走、腫瘍内への浸潤を増加させる結果、強力な抗腫瘍効果を発揮する。したがって放射線治療と Th1 細胞治療との併用によって、より効果的な抗腫瘍免疫を誘導することが可能であると仮説を立てた。

【目的】局所放射線治療と抗原特異的な Th1 細胞の腫瘍内投与を併用する新たな治療方法が、マウス肺癌モデルにおいて有効であることを明らかにする。

【方法】C57BL/6 マウスに仮想癌抗原として OVA 遺伝子を導入したマウス肺癌細胞 (LLC-OVA) を右側腹部に 2×10^6 個移植し、移植後 5 日目に腫瘍径が 8-10mm に達した段階で ^{60}Co による 20Gy の局所照射を行った。次に、OVA クラス II ペプチド特異的 CD4 陽性 T 細胞を発現する OT-II トランスジェニックマウスより誘導した Th1 細胞 (2×10^7 個/匹) を、OVA 抗原 ($50 \mu\text{g}/\text{匹}$) と共に腫瘍移植後 10, 13, 16 日目に腫瘍内に投与して、各治療群間で腫瘍増殖と予後の比較検討を行った。また抗原及び Th1 細胞を各々 Alexa 及び CFSE 蛍光標識物にて標識した後、腫瘍局所に投与して、それぞれの腫瘍内あるいは所属リンパ節内における集積や活性増殖の程度をフローサイトメトリー (FCM) を用いて検討した。さらに腫瘍内及び所属リンパ節内における癌特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導の有無を FCM にて検討し、所属リンパ節内リンパ球の細胞傷害活性と抗原特異性を 4 時間 ^{51}Cr 遊離試験にて検討した。最後に両側腹部に腫瘍を移植した二重担癌モデルを作成し、単独癌に対する治療スケジュールに従い右側腹部の腫瘍のみに同様の治療を施行後、双方の腫瘍径を測定した。

【結果】移植した LLC-OVA 腫瘍は Th1 細胞及び抗原投与のみの群では全く縮小しなかった。Th1+抗原群、放射線単独群、放射線+Th1 細胞群、放射線+抗原群で腫瘍の増殖抑制が一部認められたが、いずれも完治には至らなかった。一方、放射線+Th1 細胞+抗原 3 者併用治療群では 5 匹中 4 匹が完治し、同治療を行ったマウスの予後は著明に延長した。所属リンパ節における CD11b 陽性もしくは CD11c 陽性 APC の割合は放射線照射により増加し、OVA 抗原を貪食した APC は Th1 細胞との共投与により増加した。CFSE ラベル

した Th1 細胞を投与し所属リンパ節を解析したところ、Th1 単独群、放射線+Th1 群では投与 24 時間後に Th1 細胞が所属リンパ節に到達していたのに対し、Th1+抗原群、放射線+Th1+抗原群では、Th1 細胞が所属リンパ節に到達するのに 48 時間を要した。Th1 細胞は腫瘍組織よりも所属リンパ節内において、より強い増殖・活性化を起こしており、本現象は特に放射線+Th1+抗原群で著明であった。また各治療群の腫瘍組織及び所属リンパ節双方で OVA クラス I ペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞の増加が認められ、放射線+Th1+抗原群でその割合は最も高かった。⁵¹Cr 遊離試験では、放射線+Th1+抗原治療マウスの所属リンパ節内リンパ球が LLC-OVA に対し最も高い抗腫瘍活性を有しており、その活性は主に OVA 抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞によるものであった。さらに二重担癌モデルの系では、放射線+Th1+抗原治療を行った場合にのみ、未治療反対側の腫瘍縮小も認められた。

【考察】本研究では、マウス肺癌モデルの系において、局所放射線治療と抗原特異的 Th1 細胞及び腫瘍抗原を腫瘍内投与する併用治療が、8-10mm の大きさに達した腫瘍を高い確率で完治しうることを示した。また、二重担癌モデルの系で未治療反対側の腫瘍縮小を認めたことから、本治療が全身性の抗腫瘍免疫を強力に誘導することが示唆された。

最近我々は、抗原特異的な Th1 細胞の静脈内投与と抗原の腫瘍局所への投与によって腫瘍が完治することを報告した。しかし Th1 細胞治療が抗腫瘍効果を発揮する上で重要な IL-2 や IFN- γ などのタイプ I サイトカインは、ヒト生体に全身投与すると著明な副作用を生じることと、強い抗腫瘍効果が得られないことが問題である。今回我々は局所放射線治療を加え、Th1 細胞の投与方法を局所に変更した結果、共投与する抗原量を減量することが可能となり、腫瘍局所に効率的かつ有効な抗腫瘍免疫を誘導することが可能であった。

腫瘍退縮効果を強力に誘導した 3 者併用治療では、所属リンパ節内において抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の割合が最も高く、*in vitro* の結果でその抗原特異的抗腫瘍活性が確認された。効率的な CTL の誘導には、先行する Th1/APC の相互作用が重要である。本治療が腫瘍内や非所属リンパ節よりもむしろ所属リンパ節内において、効率的に APC の活性化や Th1 細胞の増殖・活性化を誘導することから、本治療の抗腫瘍メカニズムには所属リンパ節の存在が重要であり、同部位内で誘導された CTL が腫瘍組織へと供給される結果、腫瘍が退縮すると考えられる。また反対側未治療の腫瘍退縮は、この所属リンパ節で誘導された CTL が全身循環を利用して遊走した結果である可能性が考えられ、転移巣を有する腫瘍への応用も期待される結果であると考えられる。

【結語】放射線及び Th1 細胞治療による併用治療は、進行肺癌治療の新たな戦略になりえると考えられる。本治療は将来的な臨床応用に向けての理論的根拠となりうる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司
副 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

放射線治療と Th 1 細胞治療との併用治療による マウス肺癌治療効果の増強

ヒト肺癌の標準治療の一つである放射線治療は、担癌患者の免疫低下を誘導する報告がある一方、腫瘍のアポトーシスを誘導してこれを貪食した抗原提示細胞 (APC) による効率的な腫瘍抗原の提示を促進させ、抗腫瘍免疫を誘導することも報告されている。また Th1 ヘルパーT 細胞に代表されるタイプ I 免疫応答では IL-12 や IFN- γ が重要な役割を果たしており、これらのサイトカインがアポトーシス細胞などを介した細胞傷害性 T 細胞 (CTL) と APC との効率的な相互作用や、CTL 活性の維持と腫瘍局所への遊走、腫瘍内への浸潤を増加させる結果、強力な抗腫瘍効果を発揮する。そこで放射線治療と Th1 細胞治療との併用が、放射線が有する免疫抑制性を打ち消し、より効果的な抗腫瘍免疫を誘導する結果、マウス肺癌モデル (LLC) において有効であるかを検討した。C57BL/6 マウスに仮想癌抗原として ovalbumin (OVA) を遺伝子導入した LLC-OVA を接種し、⁶⁰Co による 20Gy の局所照射を行った。次に癌抗原特異的 Th1 細胞を癌抗原と共に腫瘍内に投与して、腫瘍増殖と予後の検討を行った。その結果、Th1 細胞単独群、抗原単独群では腫瘍の増殖抑制は全く認められず、放射線単独群、放射線+Th1 細胞群、放射線+抗原群で腫瘍の増殖抑制が一部認められたが、いずれも完治には至らなかった。一方、放射線+Th1 細胞+抗原による 3 者併用治療群では、5 匹中 1 匹で腫瘍移植後 33 日目に再発を認めたものの残り 4 匹は完治した。またこの強力な腫瘍増殖抑制に伴い、3 者併用治療マウスの予後は対照群と比較して著明に延長した。また抗腫瘍メカニズムを癌抗原テトラマーによるフローサイトメトリー解析にて検討した結果、3 者併用治療マウスの腫瘍内及び所属リンパ節双方で最も高い癌抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の集積が認められ、その集積程度は非所属リンパ節よりも所属リンパ節で高値であった。また各治療マウスの所属リンパ節内全リンパ球をエフェクター細胞とし、移植していた LLC-OVA をターゲット細胞として 4 時間 ⁵¹Cr 遊離試験を行った結果、3 者併用治療群で最も高い細胞傷害活性が認められ、同治療マウスの所属リンパ節から CD8 陽性 T 細胞を分取して検討した結果、この CD8 陽性 T 細胞は MHC 拘束性かつ OVA 抗原特異的なエフェクター集団であることが示された。次に Alexa 蛍光標識

OVA 抗原を腫瘍内投与した結果、3 者併用治療マウスの所属リンパ節で抗原を貪食した APC の割合が著明であり、同時刻において非所属リンパ節では抗原を貪食した APC はほとんど認められなかった。さらに CFSE 蛍光標識した Th1 細胞を腫瘍内投与した結果、3 者併用治療マウスの所属リンパ節では最も強い細胞分裂と増殖活性を示し、その程度は腫瘍内よりもむしろ著明であった。免疫治療の最大の利点は手術治療と異なり、その全身的な効果を誘導しうる点と考える。そこで最後に本治療が全身性の抗腫瘍免疫を誘導するかを検討する目的で LLC-OVA の二重担瘤マウスを作成して片側のみに治療を施行したところ、3 者併用治療群のみ反対側未治療の腫瘍縮小が認められた。この結果から、本治療法は原発巣のみならず、転移巣にも効果が期待できると考えられた。以上から放射線及び Th1 細胞治療による併用治療は、肺癌治療の新たな戦略になりえると考えられた。また本治療の抗腫瘍メカニズムには所属リンパ節が一定の役割を果たすことが示唆された。

審査にあたり、副査西村正治教授より、1) 臨床への応用の可能性と課題、2) 未治療反対側腫瘍の縮小メカニズムについての質問があり、副査秋田教授より、1) 放射線照射量と抗腫瘍免疫との相関関係、2) 放射線が樹状細胞に与える影響、3) 臨床応用に向けての具体的なプロトコル内容についての質問があった。次いで主査瀬谷教授より、1) 放射線照射後に樹状細胞が成熟するメカニズム、2) 反対側腫瘍縮小に関して CTL 以外の抗腫瘍メカニズムの可能性、3) Th1 細胞による記憶 CD8 陽性 T 細胞の誘導性の本研究における有無についての質問があり、副査西村孝司教授より、Th1 細胞と抗原との 2 者併用治療において誘導された抗腫瘍免疫と抗腫瘍効果の乖離の理由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。

この論文は、放射線と Th1 細胞とを併用する治療方法が有効であることを初めて明らかにしたとして高く評価され、今後ヒト肺癌への臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。