

博士(医学) 加藤真人

論文題目

Enhanced anti-tumor immunity by superantigen pulsed dendritic cells
(スーパー抗原パルス樹状細胞による癌免疫誘導の増強)

論文の内容の要旨

[はじめに]

スーパー抗原 (SAg) は、通常の抗原と異なり、抗原提示細胞である樹状細胞 (以下 DC) の MHC クラス II 分子と T 細胞受容体を側面から直接結合させることによって作用し、少量で多数の T 細胞群を活性化させ、インターフェロン γ (IFN- γ) 等の抗腫瘍サイトカインを大量に分泌させることができる。一方 DC は、生体内で最も強力な抗原提示細胞であり、他の抗原提示細胞と比べて SAg との結合親和性が高いため、少数の SAg/MHC クラス II 分子複合体でより多量の T 細胞を活性化することが報告されている。従来、SAg を介して CD4 陽性 T 細胞が活性化されると考えられていたが、近年 CD8 陽性 T 細胞は SAg を介して逆に DC を活性化し、抗腫瘍免疫の軸となるインターフェロン γ の産生を促すことがわかってきた。

DC を用いた抗腫瘍ワクチンは有効な免疫誘導方法ではあるが、未だ効果の面で克服すべき課題は多い。我々は、SAg を投与した DC ワクチンの効果についてマウス皮下腫瘍モデルを用いて臨床的、及び免疫学的効果について検討した。

[材料ならびに方法]

6-8 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨及び脛骨骨髓から IL-4 及び GM-CSF を用いて誘導した DC を Lipopolysaccharide(LPS) で 16 時間刺激した。再回収して、腫瘍抗原として OVA₂₅₇₋₂₆₄、また SAg としてブドウ球菌性毒素 A(SEA) および B(SEB) をパルスし、最終的に 1×10^6 cells/0.2 ml PBS に調整した。(SAg パルス DC ワクチン)

C57BL/6 wild マウスに DC ワクチンを皮下投与し、4 週間後に脾臓細胞を回収した。tetrameric H2-Kb/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complex を用いて抗原特異的な CTL の有無を評価し、さらに IFN- γ の産生能及び J774 細胞を用いた細胞傷害能の評価を行った。また、DC 免疫 4 週間後のマウスに EG7 腫瘍細胞 (OVA₂₅₇₋₂₆₄ 産生 EL4 腫瘍細胞) を皮下注射し、腫瘍拒絶能について評価した。また、IL12p40 ノックアウトマウス骨髓由来の DC ワクチンを作成し、腫瘍拒絶能および CTL 活性について検討した。

次に、EG7 腫瘍細胞を皮下注射したマウスに低用量シクロフォスファミド (CY) を前投与し、SAg パルス DC を皮下注射してその後の腫瘍径の変化を観察した。また DC 注射 2 週間後に脾臓を採取し、J774 細胞を用いて細胞傷害能を評価した。同様の実験を Lewis Lung carcinoma(2LL)、B16F10 腫瘍細胞を用いて検討した。いずれの検討も SAg パルス DC ワクチンと SAg をパルスしない DC ワクチンの比較で評価した。

[結果]

SAg パルス DC ワクチンは、有意に OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特異的 CD8 陽性 T 細胞を増加させ、OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特異的な細胞傷害作用、IFN- γ 産生能を示した。腫瘍拒絶試験では、EG7 腫瘍に対する有意な防御免疫を誘導し、他の DC ワクチンを受けたマウスが 30 日以内に全例 (n=6) 死亡したのに対し、SAg パルス DC ワクチン群では約 80% のマウスが生存していた。SAg パルス DC ワクチンによる腫瘍拒絶能や CTL 活性化は、IL12p40 ノックアウトマウス骨髄由来 DC ワクチンでは明らかに減弱していた。

さらに、低用量 CY を併用した治療ワクチンとしての検討では、SAg パルス DC ワクチン群は有意な腫瘍増殖抑制効果を示し、また、脾細胞の細胞傷害作用は他の DC ワクチン群よりも高かった。

SAg パルス DC ワクチン接種後のマウス脾細胞における抑制性 T 細胞数 (CD4+CD25+Foxp3 + T 細胞 ; Treg) の変動を検討した結果、低用量 CY は Treg の増加を抑えることによりワクチンの治療的効果を支持していることが示唆された。

[考察]

SAg パルス DC ワクチンの皮下注射により脾臓 T 細胞における IFN- γ 産生の亢進を認めた。IFN- γ は、CD8 陽性 T 細胞やマクロファージ、NK 細胞に作用し、細胞傷害能をもつよう促す作用があり、また腫瘍抑制遺伝子産物である p21 や p27 の産生を増加させることで腫瘍の成長を抑制するとの報告がある。

これまでの報告と同様に本研究でも CD8 陽性細胞は SAg とともに DC を活性化し、IL12p70 の産生を亢進させた。また、この CD8 陽性 T 細胞の作用は、IL12/IL23 を knockout したマウス骨髄由来の DC 投与では、特異的 CTL 及び、腫瘍抑制能の明らかな減弱を認め、SAg パルス DC ワクチンの効果が部分的に IL-12 依存性であることが確認された。

SAg による T 細胞への刺激は、anergy を起こすとされており、また腫瘍細胞への anergy は、担癌者において早期から見られる現象である。また担癌者では局所及び全身で Treg が増加し、ワクチン投与による免疫誘導を抑制することが報告されている。本研究では、最近免疫抑制剤として報告されている少量シクロファスファミドを事前に投与することで担癌マウスの Treg 増加を抑制し、SAg パルス DC ワクチンの治療的効果を引き出すことに成功した。

SAg は大量投与により毒性の原因となることで知られている。動物実験でも免疫アジュバントとしての使用の報告は限られているが、SAg を DC にパルスして洗浄し必要量のみ投与される本研究での方法は、治療効果と副作用軽減の両面から有効な治療戦略である。

[結論]

SAg パルス DC ワクチンの投与により、CTL 活性、IFN- γ 産生によって示される全身性免疫応答の有意な増強を認めた。タイプ 1 反応に関連した高い細胞傷害作用が、*in vivo* で観察された著名な抗腫瘍効果に寄与していたと考えられる。これらの結果から、低用量シクロファスファミドを併用した SAg パルス DC ワクチンによる治療は、癌や慢性感染症の患者に対するワクチン療法において有効な治療戦略であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、抗腫瘍ワクチンの有用性が注目されている。樹状細胞(DC)を用いた抗腫瘍ワクチンは有用な免疫誘導方法であるが、未だ解決すべき問題点も少なくない。申請者はDCワクチン療法の抗腫瘍効果増強を目的として、ス - パー抗原(sAg)を用いた検討を行った。sAgは抗原提示細胞上に存在するMHC classII分子との複合体を形成することによって強いT細胞刺激活性を誘導する。申請者らは腫瘍抗原としてOVA₂₅₇₋₂₆₄、sAgとしてブドウ球菌性毒素を用い、マウス皮下腫瘍モデルに対するsAgパルスDCワクチンの抗腫瘍効果について実験的検討を行った。

その結果、sAgパルスDCワクチンは有意に腫瘍抗原特異的CD8陽性T細胞を増加させ、腫瘍抗原特異的細胞傷害活性、インターフェロン γ (INF- γ)産生能を示した。腫瘍拒絶試験では、有意な防御免疫を示し対照群が全て腫瘍死したのに対してワクチン投与群では80%のマウスが生存した。sAgパルスDCワクチンの抗腫瘍効果は部分的にIL12依存性であった。担癌マウスを用いた治療実験ではcyclophosphamide(CY)の少量投与によりTreg増加が抑制され、sAgパルスDCワクチンの治療効果が増強した。

以上より低用量CY併用sAgパルスDCワクチンは治療効果と副作用軽減の両面から有効な治療戦略であるとの結論を得た。審査委員会では、特に低用量CY併用によりsAgパルスDCワクチンの有用性に明らかにし、臨床応用の可能性を示したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 今野 弘之
副査 梶村 春彦 副査 辻村 邦夫