

称号及び氏名	博士（獣医学）	牛草 貴博
学位授与の日付	平成30年3月31日	
論文名	結核菌遺伝子導入による腫瘍免疫治療の研究	
論文審査委員	主査	杉浦 喜久弥
	副査	渡来 仁
	副査	山手 丈至
	副査	鳩谷 晋吾

論文要旨

緒言

腫瘍に対する既存の治療法は、正常組織に対する侵襲や副作用などの深刻な問題を伴うことから、新しい治療概念として免疫療法が注目されている。これは生体に本来備わっている異物排除に関わる免疫反応を利用して腫瘍を治療するというものである。

免疫反応が起こるためには免疫系に刺激分子が異物として認識されることを必要とする。腫瘍細胞に現れる腫瘍関連抗原（TAA）は、抗腫瘍免疫の標的として期待される。TAAには、正常細胞と比べて腫瘍細胞で過剰発現する非突然変異自己抗原、および腫瘍特異的突然変異抗原であるネオ抗原の二種類がある。一般に非突然変異自己抗原は免疫原性が低いが、ネオ抗原は、胸腺の免疫寛容機構にさらされてなく、腫瘍免疫治療の標的として効果的である。しかし、ほとんどの腫瘍細胞は、ネオ抗原を発現しておらず、このため、従来の免疫療法では、高い治療効果をもたらすことができなかった。

この問題を解決するため、強い免疫原性を持つ微生物の抗原遺伝子を腫瘍細胞に導入し、人工的にネオ抗原として発現させることが考えられた。微生物の中でも結核菌は、細胞性免疫を非常に高めることが知られている。特に結核菌抗原6 kDa early secretory antigenic target（ESAT-6）は、抗原提示細胞である樹状細胞（DC）のToll-like receptor 2に結合して、その活性を高めることが報告され

ており、ESAT-6遺伝子を腫瘍細胞に導入し人工ネオ抗原として発現させれば、免疫系を有効に活性化すると期待される。

本研究では、小動物臨床における腫瘍免疫治療の向上を目的として、担癌マウスモデルを用いて、ESAT-6遺伝子を生体内の腫瘍細胞へ導入することの治療効果を検討し、その機序を免疫組織化学的に解析した。次に、治療効果のさらなる向上を目指して、細胞間相互の情報伝達に重要な役割を果たすとされる細胞外分泌小胞（エクソソーム）に焦点を当てて細胞生物学的な検討を行った。最後に、これらの研究によって得られた結果に基づき、ESAT-6遺伝子導入によるイヌ自然発症腫瘍の治療を試みた。

第1章 結核菌遺伝子の腫瘍細胞への導入による治療効果の免疫組織化学的解析

第1節 遺伝子発現効率の検討

本研究における遺伝子導入には、DNAにカチオン性ポリマーのポリエチレンイミン、およびアニオン性多糖であるヒアルロン酸またはコンドロイチン硫酸を結合させた三元複合体を用いた。これらの多糖は腫瘍細胞で高発現するCD44に親和性を持つ。C57BL/6 (B6) マウスの腰背部に同系のメラノーマ細胞株であるB16を増殖させた後、green fluorescent protein (GFP) の発現プラスミドDNA (GFP DNA) 100 μ gを含む三元複合体を腫瘍内 (IT) 投与して腫瘍細胞での遺伝子発現効率を調べたところ、12.3%であった。このGFPの発現は、腫瘍周囲の皮下組織や内臓組織には認められなかった。

第2節 ESAT-6 DNAの腫瘍細胞への導入による腫瘍治療効果の検討

上節と同様B6マウス腰背部にB16メラノーマ細胞の腫瘍（直径約5 mm）を形成させた後、ESAT-6 DNA (100 μ g) を含む三元複合体またはコントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を3日ごとに3回IT投与し、腫瘍体積を測定した。PBS投与群では、腫瘍は急速に成長して処置18日後にはエンドポイントである長径2 cmを越えた。一方、ESAT-6 DNA導入群では、処置開始数日後から腫瘍は縮小し始め、最終投与2日後 (day 8) には、肉眼でほとんど認められなくなり、この効果はその後15日間以上維持された。また、2回目の投与の2日後 (day 5) に末梢血細胞を採取してESAT-6に対する免疫応答を調べたところ、ESAT-6 DNA導入群では、PBS投与群に比べ有意に高い細胞性免疫反応がみられた。

第3節 ESAT-6 DNA導入による治療効果の免疫組織化学的解析

近年、腫瘍の退縮には、腫瘍組織内で起きている免疫反応が重要であることがわかってきた。そこで本節ではESAT-6が人工ネオ抗原として発現することにより誘導される免疫反応を検討するため、免疫組織化学的染色により腫瘍内に浸潤した免疫細胞を調べた。B16メラノーマ細胞の腫瘍に上節と同様にESAT-6 DNAを投与し、治療効果がまだ現れない1回目の投与の翌日 (day 1) と腫瘍の明らかな退縮がみられた2回目の投与の2日後 (day 5) に腫瘍を採取し、活性化マクロファージ/DCのマーカーであるionized calcium-binding adapter molecule 1

(Iba-1)、T細胞のマーカーであるCD3、B細胞のマーカーであるCD20および活性化したCTLまたはNK細胞のマーカーであるgranzyme Bを染色した。ESAT-6 DNA投与群の腫瘍内では、Iba-1およびCD3陽性細胞がday 1に比べday 5で有意に増加した。さらにday 5においては、PBS投与群に比べて有意に多くのIba-1陽性細胞が見られた。CD20陽性細胞は、腫瘍内に多く認められたが、ESAT-6 DNA投与群とPBS投与群に差はなかった。granzyme B陽性細胞の数はどのケースでも非常に少なく、処置間での差は見られなかった。さらに、腫瘍内の腫瘍壊死因子 (TNF α)、Interleukin-12、Interleukin-6およびinterferon- γ (IFN γ) の濃度を調べたところ、ESAT-6 DNA投与群ではアポトーシスを誘導するTNF α のレベルが非常に高く、また、day 1に比べday 5で高値を示した。

以上の結果から、ESAT-6 DNAの導入による腫瘍抑制効果は、投与初期にはESAT-6によって活性化されたマクロファージ/DCによる間接的な自然免疫反応が大きく寄与し、その後、ネオ抗原であるESAT-6に対する獲得免疫反応が誘導されたためと考えられる。

第2章 結核菌遺伝子の腫瘍細胞への導入による治療効果の向上を目指した細胞生物学的検討

近年、腫瘍細胞が腫瘍抗原を含むエクソソームを分泌し、これをDCが取り込むことによって腫瘍抗原が提示され、高い免疫応答を誘発する可能性が報告されている。そこで、本章ではESAT-6 DNA治療の向上を目指し、治療効果へのエクソソームの関与について検討した。

in vitro においてESAT-6 DNAを導入した培養B16細胞が分泌したエクソソーム (ESAT-6 Ex)、非導入B16の培地から回収したエクソソーム (Naïve Ex) を調製し、前章と同様にB6マウスに形成させたB16の腫瘍に3日ごとに3回IT投与し、腫瘍体積および生存期間を比較した。Naïve Exの投与は抗腫瘍効果を示さなかったのに対し、ESAT-6 ExはコントロールのPBS投与群と比較して有意な腫瘍の成長抑制を誘導し、生存期間を延長させた。

次に、ESAT-6 Exの獲得免疫誘導効果を調べるために、上記の各エクソソームをB6マウスのfootpadに接種した後、所属リンパ節である膝窩リンパ節からリンパ球を回収し、ESAT-6、およびB16細胞に対する応答を調べた。ESAT-6 Exを投与したマウスのリンパ球はESAT-6タンパクに対してだけでなくB16細胞に対しても有意に高い応答を示した。

さらに、ESAT-6 Exによる腫瘍抑制効果におけるDCの関与を調べるため、B6マウスの骨髄細胞から分化させたDCをESAT-6 ExまたはNaïve Exと*in vitro*で反応させた後、B6マウスに成長させたB16に同様にIT投与し、腫瘍体積および生存期間を比較検討した。ESAT-6 Exで処理したDCは、他の群と比較して有意に高い腫瘍抑制効果を示した。

以上、ESAT-6 DNAの導入は、腫瘍細胞から産生されるESAT-6 ExがDCに作用することで腫瘍抑制効果を誘導していることが分かった。

第3章 結核菌遺伝子の導入によるイヌ自然発生腫瘍に対する治療効果の検討

前章においてESAT-6 DNAの導入による腫瘍抑制効果にはDCが大きく関わることが分かった。そのため、ESAT-6 DNA 投与時に、同時にDCを外部から補って増やすことによって治療効果がより増強することが期待された。そこで、イヌ自然発症腫瘍に対して、ESAT-6 DNA (500 µg) と末梢血単球から分化誘導したDCとともに腫瘍内に注入する治療 (ESAT-6 DNA+DC治療) を行い、その効果を検討した。

症例1は、左大腿部表皮に血管外膜細胞腫を発症したもので、ESAT-6 DNA治療のみを5日間隔で5回腫瘍内に注入したが、腫瘍の縮小は認められなかった。症例2は、鼻腔内腺癌が右頸部皮下リンパ節に転移したもので、直径約2.5 cmの大きさであった。はじめにDCのみの治療を行ったが、大きさが増加したため、ESAT-6 DNA+DC治療を7日間隔で9回行ったところ、病変はほとんど認められなくなった。症例3は、乳腺癌を発症したもので、初めにDCのみの治療を7日間隔で5回行ったが、腫瘍の成長は抑えられなかった。そこでESAT-6 DNA+DC治療を同間隔で5回行ったところ、腫瘍体積は減少した。しかし、多量の組織壊死が原因と思われる全身衰弱のため、治療を中止した。症例4は、腹部に軟部組織肉腫と診断された腫瘍の形成がみられたもので、ESAT-6 DNA+DC治療を同様に3回行ったところ、腫瘍の縮小が認められた。しかし、呼吸の促拍と元気消失が治療回数とともに重症化したため、DCのみの治療に変えたが、腫瘍は再び増大した。

総括

以上結核菌遺伝子導入による腫瘍免疫治療の研究を行い以下の結果を得た。

1. 三元複合体を用いた遺伝子導入は腫瘍細胞特異的に、約12%の細胞で発現を示した。
2. ESAT-6 DNAを腫瘍細胞に導入しESAT-6をネオ抗原として発現させるにより、腫瘍を非常に効率的に退縮させることが示唆された。
3. ESAT-6 DNA導入によって発現したESAT-6抗原は、マクロファージ/DCを活性化し、アポトーシスの誘導因子であるTNF α を産生させるなどの自然免疫により、早期の腫瘍退縮をおこさせることが示唆された。
4. ESAT-6 DNAの導入によって腫瘍細胞で発現したESAT-6ネオ抗原は、ESAT-6 提示エクソソーム (ESAT-6 Ex) の形態をとることによって最も効果的に抗腫瘍免疫を誘導した。また、ESAT-6 DNA導入腫瘍細胞から産生されたESAT-6 Exは、ESAT-6を発現しない非導入腫瘍のTAAに対する獲得免疫も効率的に誘導した。
5. ESAT-6 ExによるDCの免疫活性化能の亢進がESAT-6 DNA導入による腫瘍治療効果に大きく関与することが示唆された。
6. ESAT-6 DNAの腫瘍細胞への導入とDCの腫瘍内投与による治療によってイヌに自然発症した腫瘍を縮小させることができたが、安全面において問題点も認められた。

審査結果の要旨

免疫反応が起こるためには免疫系に刺激分子が異物として認識されることを必要とする。腫瘍細胞に現れる腫瘍関連抗原 (TAA) は、抗腫瘍免疫の標的として期待される。TAA には、正常細胞と比べて腫瘍細胞で過剰発現する非突然変異自己抗原、および腫瘍特異的突然変異抗原であるネオ抗原がある。このうちネオ抗原は、非常に高い免疫原性を示し、腫瘍免疫治療の標的として効果的である。しかし、ほとんどの腫瘍細胞は、ネオ抗原を発現しておらず、このため、従来の免疫療法では、高い治療効果をもたらすことができなかった。この問題を解決するため、強い免疫原性を持つ微生物の抗原遺伝子を腫瘍細胞に導入し、人工的にネオ抗原として発現させることが考えられた。特に結核菌抗原 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) は、抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) の Toll-like receptor 2 に結合して活性を高めることが報告されており、*ESAT-6 DNA* を腫瘍細胞に導入して人工ネオ抗原として発現させれば、免疫系を有効に活性化すると期待される。

本研究では、小動物臨床における腫瘍免疫治療の向上を目的として、第 1 章および 2 章で、担癌マウスモデルを用いて、*ESAT-6 DNA* を生体内の腫瘍細胞への導入することによる治療効果を検討して、その機序を解析し、さらに効果増強のための方法を検討している。最後に第 3 章で、これら研究で得られた結果に基づき、*ESAT-6 DNA* の導入によるイヌ自然発生腫瘍の治療を試みている。

第 1 章では、*ESAT-6 DNA* の腫瘍細胞への導入による治療効果を検討し、その機序を免疫組織化学的に解析している。遺伝子導入担体として、DNA にカチオン性ポリマーおよびアニオン性多糖を結合させた三元複合体を用い、*GFP cDNA* の発現プラスミドを担癌マウスモデルの腫瘍内に注入したところ、発現は腫瘍細胞特異的で、その効率は約 12%であった。遺伝子を *ESAT-6 DNA* に代えて同様に投与したところ、腫瘍の急速な縮小および長期間の消失維持など非常に高い治療効果が認められ、*ESAT-6* に対する特異的な細胞性免疫の増強も確認された。免疫組織化学染色によって浸潤細胞を調べたところ、縮小時の腫瘍では、マクロファージ (MΦ) /DC および T 細胞の有意な増加が認められ、浸潤した MΦ /DC 周囲の腫瘍細胞がアポトーシスに陥っていた。さらに、腫瘍組織内のサイトカインを調べたところ、アポトーシス誘導因子である腫瘍壊死因子 (TNFα) の有意な増加が認められた。以上の結果により、*ESAT-6 DNA* の導入によって発現した *ESAT-6* ネオ抗原が MΦ /DC へ作用することによって強力な自然免疫の活性化がおり、それが非常に効率的かつ効果的な治療効果をもたらすことを明らかにした。

第 2 章では、治療効果のさらなる向上を目指し、細胞間相互の情報伝達に重要な役割を果たすエクソソーム (Ex) に焦点を当てた細胞生物学的な検討を行っている。*in vitro* において *ESAT-6 DNA* を導入した腫瘍細胞が分泌した *ESAT-6 Ex* は、非導入腫瘍細胞から回収した Naïve Ex と比較して腫瘍の成長を有意に抑

制し、さらに、ESAT-6 だけでなくその他の腫瘍抗原に対するリンパ球の反応を有意に高めた。また、ESAT-6 Ex を作用させた DC は、Naïve Ex や ESAT-6 タンパクを作用させた DC と比較して有意に高い腫瘍抑制効果を示した。以上の結果から、ESAT-6 DNA の導入によって腫瘍細胞で発現した ESAT-6 ネオ抗原は、ESAT-6 を提示した Ex の形態で DC に作用することによって、最も効果的に腫瘍抑制効果を発揮することを明らかにした。このことから、ESAT-6 Ex の作用を受ける DC を外部から補うことにより、ESAT-6 DNA 治療の効果が向上することが期待された。

第 3 章では、前章の結果に基づき、イヌ自然発生腫瘍に対して、ESAT-6 DNA の導入と DC の投与によって治療を行い、その効果を検討している。3 種類の異なる腫瘍の罹患症例に対して本治療を行ったところ、腫瘍の縮小がみられたが、多量の組織壊死やアレルギー様反応など安全面で解決すべき問題も明らかになった。

以上、本研究は、ネオ抗原が関与した腫瘍免疫反応の機序を解明するとともに、新たな腫瘍免疫治療の手段を提唱しており、臨床獣医学の新たな展開に資することが期待される。よって、本論文の審査ならびに最終試験と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。