

称号及び氏名	博士(獣医学)	渡邊 駿一
学位授与の日付	2024年3月31日	
論文名	抗腫瘍免疫を特異的に増強する効果的治療法の研究	
論文審査委員	主査	杉浦 喜久弥
	副査	森山 光章
	副査	鳩谷 晋吾

論文要旨

緒言

腫瘍免疫療法は、生体に本来備わっている腫瘍排除に関わる免疫を利用する治療法で、副作用の少ない治療法として注目されている。免疫による腫瘍排除は、樹状細胞 (DC) が①腫瘍関連抗原を取り込んでそれらを提示し、②抗原に特異的なナイーブ T 細胞をタイプ 1 ヘルパー T 細胞 (Th1) および細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に分化させ、③それらを活性化させて腫瘍を攻撃させる過程から成っており、DC はその中心的役割を果たしている。また、これら一連の反応は、Th1 免疫系の反応と呼ばれており、免疫療法の治療効果は Th1 免疫系をいかに活性化させるかにかかっている。

腫瘍に対する DC 療法は、*in vitro* において、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) などのサイトカインを用いて、腫瘍罹患患者の末梢血単球や骨髄細胞から DC を分化誘導し、腫瘍抗原を提示させて、再び患者に投与して抗腫瘍免疫を賦活する治療法である。しかし、引き起こされる免疫反応は弱く、これまでに高い治療効果を得られていない。Akazawa らが開発した h11c は DC を活性化する Toll 様受容体 (TLR) 2 のリガンド (L) と DC に特異的に発現する CD11c を結合させた分子で、DC を特異的に活性化できる。また、Yuba らが開発した pH 感受性ポリマーである ChexPG-PE (Chex) を組み込んだリポソームは、内包した抗原を効率的に DC の細胞質内へ移動させることができ、DC の抗原提示能を高めることができる。そこで本研究では、Chex リポソームに h11c を組み込んだ高効率免疫アジュバント ([h11c-Chex]) による DC の活性および機能への影響を調べ、腫瘍治療効果について検討した。一方、腫瘍微小環境、特に腫瘍内の免疫環境が腫瘍の成長に大きく関与していることが近年

明らかになった。すなわち、腫瘍組織内では、Th1 免疫系と比較して、免疫反応を抑制する制御性 T 細胞や M2 マクロファージなどが優位な状態にある。よって、これら抑制細胞の出現を抑え、DC および Th1 免疫系を育てて活性化する免疫状態を腫瘍組織内に構築できれば、非常に高い治療効果が期待できる。本環境の構築には、DC を分化誘導する GM-CSF、DC を活性化し、マクロファージを M2 から免疫亢進性の M1 に変換する CD40L、Th1 免疫系およびナチュラルキラー (NK) 細胞を活性化するインターフェロンガンマ (IFN γ) などのサイトカインを用いることが最も効果的であるが、液性因子として投与すれば、すぐに全身に拡散して腫瘍内の濃度を保つことができない。遺伝子を生体内の腫瘍細胞に導入できる人工担体が Kono/Yuba らによって開発されており、本担体によって上記サイトカインの遺伝子を腫瘍細胞に導入して発現させることができれば、効果的に腫瘍内で DC および Th1 免疫系を育てて活性化することができる。そこで、本研究では、本担体による腫瘍細胞特異的な遺伝子導入を確認し、GM-CSF、CD40L および IFN γ 遺伝子を導入することによる腫瘍治療効果および腫瘍組織内の免疫環境に及ぼす影響を検討した。

第 1 章 樹状細胞の活性と機能を特異的に増強する高効率免疫アジュバント

第 1 節 高効率免疫アジュバントの樹状細胞への影響

高効率免疫アジュバントによる DC 活性化への影響を調べるため、GM-CSF によってマウス骨髄細胞から分化誘導した DC に h11c を様々な割合で組み込んだ Chex リポソームを様々な濃度で作用させ、DC の活性をインターロイキン 12 の産生を指標に調べたところ、含有 h11c 濃度が 5nM 以上でプラトーとなり、5 mol%以上の含有率で free の h11c (fh11c) と同程度の活性が見られた。よって、h11c の含有率 5 mol%、濃度 5nM の[h11c-Chex]を以降の *in vitro* 実験に用いた。[h11c-Chex] による DC の抗原取り込み能への影響を調べるため、FITC で標識した OVA を内包して上記と同様に分化誘導したマウス DC に作用させ、フローサイトメトリーで評価したところ、h11c を含まない Chex リポソーム ([Chex]) や free の OVA (fOVA) に比べて有意に多くの OVA を取り込んでいた。また、抗原提示分子である MHC Class I 上に提示された OVA 抗原と結合する抗体を用いて OVA 抗原を提示した DC の割合を測定したところ、[h11c-Chex]を作用させた DC は、[Chex]や fOVA に比べて有意に多くの割合で OVA 抗原を提示していた。以上から高効率免疫アジュバントである[h11c-Chex]は、DC の活性と機能を有意に亢進させることが明らかとなった。

第 2 節 高効率アジュバントの腫瘍治療効果への影響

遺伝子導入によって OVA 抗原を提示するマウスリンパ腫株である E.G7-OVA (E.G7) を同系の B6 マウスの皮下に移植した担癌マウスを作製し、OVA を内包した各種リポソーム ([h11c-Chex]、[Chex]、h11c のみを含有したりポソーム、無含有のリポソーム) および fOVA と fh11c の混合物を週に 3 回、2 週間腫瘍付近の皮下に投与して治療効果を評価した。15 μ g の OVA を内包した[h11c-Chex]を投与したマウスの 6/10 が投与後 60 日のエンドポイントまで生存し、同量の ONA を内包した他のリポソームおよび fOVA と fh11c の混合物を投与したマウスと比べて生存期間が有意に延長した。

また生存したマウスの腫瘍は完全寛解していた。さらに、治療処置終了後に腋窩リンパ節のリンパ球を採取して腫瘍に対する CTL 活性を調べたところ、[h11c-Chex]を投与したマウスのリンパ球は、E.G7 だけでなく、OVA 抗原を提示しない本株の EL4 に対しても他のリポソームを投与したマウスのリンパ球と比べて有意に強い細胞傷害性を示した。以上より、[h11c-Chex]は腫瘍免疫治療効果を有意に向上させ、また、その効果は抗原変異にも対応できる可能性が示唆された。

第 2 章 サイトカイン遺伝子の腫瘍細胞への導入による腫瘍免疫環境の改変

第 1 節 サイトカイン遺伝子の腫瘍細胞への特異的導入と腫瘍治療効果

人工担体による遺伝子導入を評価するため、マウス大腸癌株 CT26.WT 株を同系の BALB/c マウスに静注して肺腫瘍を形成させた後、GFP cDNA 含有プラスミド (GFP 遺伝子) を内包した人工担体を投与し、2 日後に肺を採取して、免疫細胞化学により GFP 発現を調べた。GFP は腫瘍細胞にのみ特異的に発現し、発現効率は 14.2%であった。

サイトカイン遺伝子の導入による治療効果を評価するため、CT26.WT 株を静注した BALB/c マウスに、GM-CSF 遺伝子を内包した人工担体 ([GM-CSF])、[CD40L]、[IFN γ]、[GM-CSF] と [CD40L] の組み合わせ ([GM-CSF+CD40L])、[IFN γ +CD40L] および [GM-CSF+CD40L] と [IFN γ +CD40L] を交互に投与する [GM-CSF+IFN γ +CD40L] 群を設けた。これらの処置を 7 日ごとに静脈内投与し、マウスの生存期間によって治療効果を評価した。腫瘍細胞の静注 8 日後から上記処置を 4 回行ったところ、すべての治療群が 35 日以内死亡した。しかし、腫瘍細胞の静注翌日から上記処置を 5 回行ったところ、[GM-CSF+IFN γ +CD40L] 群の 8/12、[IFN γ +CD40L] の 6/11、[GM-CSF+CD40L] の 5/11 が処置後 60 日のエンドポイントまで生存し、完全寛解を示した。また、プラスミドのみを投与したコントロールと比較して有意に生存期間が延長した。以上、サイトカイン遺伝子の腫瘍特異的な導入は、内臓腫瘍に対して有意に高い治療効果を引き出すことが分かった。

第 2 節 サイトカイン遺伝子導入の腫瘍免疫への影響

サイトカイン遺伝子導入による腫瘍内免疫環境の変化を評価するため、腫瘍細胞投与翌日および 7 日後に [GM-CSF+CD40L]、[IFN γ +CD40L] および [GM-CSF+IFN γ +CD40L] を投与し、その 7 日後に肺を採取して免疫組織化学によって免疫細胞を解析した。上記のサイトカイン遺伝子投与群では、コントロールと比較して腫瘍が著明に減少し、腫瘍内において、CD11c⁺ DC、Granzyme B⁺キラー細胞および CD80⁺ M1 マクロファージが有意に増加し、FoxP3⁺制御性 T 細胞や CD168⁺ M2 マクロファージが有意に減少していた。また PDL-1 陽性腫瘍細胞も著明に減少していた。さらに、脾細胞を用いて細胞障害アッセイを行ったところ、サイトカイン遺伝子投与群で NK 活性および CTL 活性の有意な増加が認められた。以上の結果により、GM-CSF、CD40L および IFN γ 遺伝子の腫瘍細胞への導入により、腫瘍内免疫環境を Th1 免疫系が活性化する状態へ改変できることが明らかになった。

総括

1. DC を標的とした TLR2 リガンドと DC に抗原を効率的に提示させる pH 感受性リポソームを組み合わせた高効率免疫アジュバントは DC の活性と機能を有意に増強した。
2. 本高効率免疫アジュバントは、腫瘍に対する DC 療法効果を有意に向上した。
3. 人工遺伝子導入担体により腫瘍細胞特異的に遺伝子を導入および発現できることを確認した。本担体を用いて GM-CSF、CD40L および IFN γ の遺伝子を導入することにより、内臓腫瘍に対して有意に高い治療効果が得られた。
4. この治療効果増強の機序として、上記サイトカインの遺伝子導入により腫瘍内免疫環境を免疫抑制状態から Th1 免疫系を活性化させる状態へと改変したためであることが明らかとなった。

審査結果の要旨

腫瘍免疫療法は、生体に本来備わっている腫瘍排除に関わる免疫反応を利用する治療法で、副作用の少ない治療法として注目されているが、化学療法や放射線療法と比較して腫瘍排除効果が低いという問題がある。本療法の効果を向上させるには、腫瘍細胞特異的な免疫反応をいかに強く惹起させ、それを維持、増強できるかにかかっている。樹状細胞 (DC) は、種々の抗原を取り込んで提示し、その抗原に反応する免疫細胞を活性化する細胞で、抗腫瘍免疫の開始に必須である。よって、DC の抗原提示能および活性を高めることにより、抗腫瘍免疫をより強力に惹起することができる。近年、内容物を効率的に細胞質内に送り込む特殊なポリマーを結合したリポソームが開発され、それを DC に作用させることによって抗原提示能を有意に向上させることが可能となった。また、DC に高発現する CD11c への結合部位を持つ Toll 様受容体 (TLR) 2 リガンドも開発され、それによって、DC のみを活性化できるようになった。よって、リポソーム膜に特殊ポリマーと DC 標的 TLR2 リガンドを組み込んだ新規アジュバントを DC に作用させれば、非常に強力な免疫反応を惹起できると思われる。一方、腫瘍細胞を取り巻く環境は、通常免疫抑制状態となっているため、惹起された抗腫瘍免疫を維持するには、この状態を改変する必要がある。免疫活性因子の一つである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、単球などを DC へ分化させる。また、CD40 リガンドは、DC を活性化するとともに、抑制型マクロファージを攻撃型マクロファージに変換する。さらに、インターフェロン (IFN) γ は、キラー細胞を活性化する。よって、これら 3 因子を腫瘍内に投与すれば抗腫瘍免疫の活性を維持、増強できると思われるが、すぐに全身に拡散してしまうために繰り返し投与が必要であり、効果の低減や副作用の発現が課題となる。そこで、先述の特殊ポリマー付リポソームを成分とする人工遺伝子運搬体を用いて 3 因子の遺伝子を生体内で腫瘍細胞に導入し、腫瘍細胞から分泌させることができれば、作用の持続と消費効率を高められ、抗腫瘍免疫を維持、増強できることが期待される。

本研究では、担癌マウスモデルを用いて、以上 2 種類の方法による免疫治療効果の向上を検討している。

第 1 章では、新規アジュバントを用いた治療効果を調べている。*in vitro* において、新規アジュバントを作用させた DC は、非常に活性化するとともに、特殊ポリマー、DC 標的 TLR2 リガンド、または両方を持たないリポソームをコントロールとして作用させた DC と比較して有意に高い抗原取り込み能と抗原提示能を有していた。さらに、腫瘍を皮下に移植したマウスに同腫瘍の抗原を含んだ新規アジュバントを接種したところ、最適プロトコールにおいて、10 匹中 6 匹で腫瘍体積が減少し、接種後 60 日のエンドポイントまでに腫瘍が認められなくなった。それに対して、コントロールリポソームを接種したマウスでは、腫瘍体積が増加し続け、エンドポイントまでにすべてのマウスが死亡した。以上により、新規アジュバントを用いて強力に抗腫瘍免疫を惹起することによって治療効果を向上させることを見出している。

第 2 章では、免疫活性因子の遺伝子を腫瘍細胞に導入することによる治療効果を調べている。初めに GFP の遺伝子を用いて人工遺伝子運搬体によって生体内で腫瘍細胞特異的に遺伝子が導入され発現することを確認した。マウスの肺腫瘍モデルに、GM-CSF と CD40 リガンドの遺伝子、IFN γ と CD40 リガンドの遺伝子およびそれら 3 因子遺伝子の組み合わせを腫瘍細胞の移植翌日から 7 日毎に 5 回投与したところ、投与後 60 日のエンドポイントまでに 50%以上が生存し、生存マウスの肺には腫瘍が認められなかった。それに対してプラスミドのみを投与したコントロールは、エンドポイントまでに全てが死亡した。同じ遺伝子の組み合わせを腫瘍細胞の移植翌日から 7 日毎に 2 回投与し、その 7 日後に肺を調べたところ、遺伝子投与マウスでは、コントロールと比較して腫瘍が著明に減少し、腫瘍内において、DC、キラー細胞および攻撃型マクロファージが有意に増加し、制御性 T 細胞や抑制型マクロファージが有意に減少していた。また、免疫回避分子を発現する腫瘍細胞も著明に減少していた。さらに、腫瘍細胞に対するキラー細胞活性が脾臓の細胞にも認められ、抗腫瘍免疫が全身に波及していた。以上より、免疫活性因子の遺伝子を生体内で腫瘍細胞に導入することによって抗腫瘍免疫を維持、増強できることを見出している。

以上、本研究の成果は、腫瘍免疫療法の効果を上昇させるのみでなく、獣医学における研究に新たな展開をもたらすものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。