

氏名(本籍)	なべ くら つかさ 鍋 倉 幸 (北海道)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第4765号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	An immunotherapy approach with dendritic cells genetically modified to express the tumor-associated antigen, HER2 (腫瘍関連抗原 HER2 を発現するよう遺伝子改変された樹状細胞を用いた免疫療法の確立)
主査	筑波大学教授 医学博士 住田孝之
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 島野仁
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 楊景堯
副査	筑波大学講師 博士(医学) 後藤大輔

論文の内容の要旨

(目的)

これまでに我々は、マウス造血前駆細胞から、遺伝子サイレンシング抵抗性レトロウイルスベクター GCDNsap にて卵白アルブミン (OVA) を遺伝子導入した樹状細胞 (DC) を調整し、これをワクチンとして用いるがん免疫療法のモデルについて報告してきた (Nabekura T, *et al. Mol. Ther.*, 13: 301-309, 2006)。この研究において、OVA 導入 DC が従来型 DC ワクチンである OVA ペプチド添加 DC よりも優れたがんワクチン効果を発揮したこと、OVA 特異的細胞性免疫のみならず体液性免疫も惹起したこと、治療モデルにおいて抗腫瘍効果を発揮したことを報告した。以上から、この DC 療法は有用ながん免疫療法のモデルを提唱したと考えられた。

従って、臨床応用への次のステップとして、乳がんで過剰発現する腫瘍関連抗原 (TAA) であるヒト表皮成長因子受容体 2 (HER2) を用いてこの DC 療法の有効性を評価するのが本研究の目的である。

(対象と方法)

1) マウスから造血前駆細胞として c-KIT 陽性 lineage 陰性細胞を単離し、レトロウイルスベクター GCDNsap にて HER2 を導入し、細胞を増殖させて DC を誘導した。これら HER2 導入 DC の抗腫瘍効果を検証するために以下の実験を施行した。2) HER2 導入 DC をマウスに投与し、その後 HER2 を発現するリンパ腫 EL4 を移植して経過を観察した。3) HER2 陽性乳がんを自然発症するラット HER2 ホモログトランスジェニックマウスに対し、HER2 導入 DC を投与して経過を観察した。この際、より強い抗腫瘍効果が得られる DC の投与経路を決定するため、側腹部への皮下注射に加え、所属リンパ節へ効率よく DC を移入できる足裏注射を試み、各投与経路で得られる抗腫瘍効果を比較した。4) これらマウスにおける HER2 特異的細胞性・体液性免疫応答を種々の免疫学的アッセイにて評価した。5) 免疫したマウスから脾細胞を単離して CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を除去した後、未免疫マウスに養子免疫移入をおこない、抗腫瘍効果における各 T 細胞サブセットの貢献度を評価した。6) 治療モデルにおける治療効果を検証するため、担がんトランスジェニック

クマウスに対して HER2 導入 DC を投与し、経過を観察した。

(結果)

1) 誘導した DC は形態学的に成熟 DC であり、HER2 の遺伝子導入効率は 90% 以上であることが確認された。また、1 匹のマウスから $5 \sim 10 \times 10^6$ 個の DC が誘導できた。以上から、HER2 導入 DC の大量調整法が確立された。2) 予防的ワクチンモデルとして HER2 導入 DC を投与されたマウスでは、その半数が HER2 陽性 EL4 を拒絶した。一方、従来型 DC ワクチンのモデルである腫瘍溶解液添加 DC を投与されたマウスは腫瘍を拒絶できなかった。これら免疫されたマウスの HER2 特異的免疫応答を比較した結果、HER2 導入 DC で免疫されたマウスでは、腫瘍溶解液添加 DC で免疫されたマウスと比較し、より多くの HER2 特異的 CTL が誘導され、HER2 特異的 Th1 細胞が樹立され、抗 HER2 抗体が産生されていることが明らかになった。更に、この抗 HER2 抗体は ADCC 活性とオプソニン効果があることが確認された。以上から、HER2 陽性腫瘍細胞株を用いた実験において HER2 導入 DC は抗腫瘍効果があることが免疫学的な根拠を持って証明された。3) 予防的ワクチンモデルとして HER2 陽性乳がんを自然発症するラット HER2 ホモログトランスジェニックマウスに対し、HER2 導入 DC を投与した結果、処置群では未処置群に比べ無がん期間が延長したことが確認された。この際、所属リンパ節へ効率よく DC を移入できる足裏注射群では、側腹注射群よりも無がん期間が延長していることが確認され、より強い抗腫瘍効果を発揮したことが証明された。また、この傾向は腫瘍増殖速度・がん塊数・肺転移数についても同様であった。

4) これら各投与経路により免疫されたマウスにおける HER2 特異的免疫応答を比較した結果、HER2 特異的 CTL・Th1 細胞により担われる細胞性免疫応答には差が見られなかったが、一方で抗 HER2 抗体価は足裏注射群で高いことが証明された。以上から、投与経路による抗腫瘍効果の相違は HER2 特異的体液性免疫応答の違いによることが示された。従って、より強い抗腫瘍効果を得るためには、細胞性免疫のみならず、体液性免疫の効率的な活性化が重要であることが証明された。5) この結果は、免疫したマウス由来の CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を除去した脾細胞を養子免疫移入したマウスにおいて、抗腫瘍効果が減少したことから支持された。なお、良好な予後と HER2 特異的 IgG2a 価が相関していることが示された。6) 乳がんを発症したトランスジェニックマウスに対して HER2 導入 DC を投与し、治療モデルにおける HER2 導入 DC の治療効果を検証した結果、治療群では未処置群に比べ腫瘍の増殖が遅くなり、がん塊数が少なく、次の腫瘍が発症するまでの期間が倍以上に延長していることが明らかになった。以上から HER2 導入 DC は治療モデルにおいても治療効果があることが証明された。

(考察)

本研究において我々は、HER2 導入 DC が HER2 陽性腫瘍に対して HER2 特異的細胞性・体液性免疫の双方を惹起し、強力な抗腫瘍効果を発揮したことを証明した。重要なのは、この抗腫瘍効果が乳がん自然発症トランスジェニックマウスにおいても観察されたことである。また、所属リンパ節へ効率よく DC を移入できる投与法にて、効率的に HER2 特異的体液性免疫が惹起され、その結果、より強い抗腫瘍効果が発揮されたことも確認された。特筆すべきは、HER2 導入 DC の投与が担がんトランスジェニックマウスに対して治療効果を発揮したことである。

レトロウイルスベクターにより TAA を遺伝子導入した DC の有用性については、これまでに多くの研究グループが報告しているが、これら DC の臨床応用例は現在まで皆無である。その理由として、従来型レトロウイルスベクターの低い遺伝子導入効率や遺伝子サイレンシング感受性が挙げられる。我々は、当研究室で開発された遺伝子サイレンシング抵抗性レトロウイルスベクター GCDNsap の使用によってこれらの欠点を克服し (Nabekura, T, *et al. Mol. Ther.*, 13: 501-509, 2006), 本研究によって HER2 を用いた TAA 導入 DC ワクチンの有用性を証明した。GCDNsap はそのオリジナルベクターが既に遺伝子治療に使用されていることから、本研究で紹介した TAA 導入 DC 療法は十分に臨床応用可能であると考えられる。

我々は、より強い抗腫瘍効果を得るためには、効率的な抗 HER2 体液免疫の惹起が必要であることを証明した。これは側腹注射群と足裏注射群の抗 HER2 抗体価の相違により示された。一方、HER2 特異的 CTL 活性と Th1 細胞数は両者で大差がなかった。これは *in vivo* において HER2 特異的細胞性免疫が極大に達したためであると考えられる。HER2 特異的体液性免疫を十分に惹起するのに不適切な投与経路であっても、細胞性免疫が効果的に活性化された理由はこの研究で言及されていないが、同一抗原に対して細胞性・体液性免疫応答が異なる閾値や動力学を示すことは十分考えられる。

また、本研究では足裏注射という局所的な DC 投与にて全身的な抗腫瘍効果が得られた。これを踏まえ、臨床応用において足裏注射は不適切であることを鑑みると、リンパ節へ効率的に TAA 導入 DC を移入するための代替投与経路として、リンパ節近傍への皮下あるいは皮内注射や、エコーガイド下でのリンパ節内注射などが考えられる。

本研究の重要性の一つとして、ラット HER2 ホモログを発現するトランスジェニックマウスにおけるラット HER2 ホモログの免疫寛容を、ヒト HER2 を用いて破り、交差反応による強力な抗腫瘍免疫応答を誘導した点が挙げられる。本研究と同様、過去の報告においても異種のオルソログタンパク質を用いた免疫が自己免疫寛容を破るのに有効であることが示されている。従って、臨床応用の際に異種のオルソログ抗原遺伝子を導入した DC を使用する戦略が有効である可能性が考えられる。

最も重要なのは、HER2 導入 DC が治療モデルにおいて治療効果を発揮した点である。現在まで乳がんに対して HER2 ペプチドやペプチド添加 DC を用いた症例に有効性が確認されていないことから、本研究で述べられた HER2 導入 DC は、乳がんに対する有望な治療法を提示したと考えられる。

(結論)

レトロウイルスベクター GCDNsap にて HER2 を遺伝子導入した DC は

1. 従来型 DC ワクチンである腫瘍溶解液添加 DC よりも優れたがんワクチン効果を発揮した。
2. *In vivo* において HER2 特異的 CTL・Th1 細胞・抗体を誘導した。また、抗 HER2 抗体は ADCC 活性・オプソニン効果があることが確認された。
3. 乳がん自然発症マウスに対してがんワクチン効果を発揮した。
4. リンパ節へ効率よく DC を移入できる投与方法にて、より優れた抗腫瘍効果を発揮した。この時、HER2 特異的細胞性免疫の活性化のみならず、体液性免疫の効率的な活性化が強い抗腫瘍効果を得るために重要であることが確認された。また、高い HER2 特異的 IgG2a 価が良好な予後と相関していることが示された。
5. 治療モデルにおいて治療効果を発揮した。

従って、本研究で紹介した遺伝子導入 DC ワクチンの戦略は、HER2 を発現する乳がんに対する優れた DC ワクチン療法モデルを提唱したと考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、腫瘍関連抗原 HER2 を発現した樹状細胞による乳がんの免疫療法を目的とした研究である。申請者らが新規開発したレトロウイルスベクターを用いて腫瘍関連抗原 HER2 を樹状細胞に遺伝子導入し、自然発症乳がんトランスジェニックマウスに HER2 発現細胞を移入し、その予防、治療効果に成功した。その免疫療法のメカニズムには、細胞性免疫ばかりでなく抗 HER2 抗体の存在も重要であることを明らかにした。本研究成果は癌の免疫療法に直結する臨床治験の基盤研究であり、そのアプローチはユニークであり、国際的にも高く評価されている。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。