

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	田中 知宏
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 800 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Transfer of in vitro-expanded naïve T cells after lymphodepletion enhances antitumor immunity through the induction of polyclonal antitumor effector T cells (In vitro で増殖したナイーブ T 細胞をリンパ球減少状態の担癌宿主に移入して分化させたポリクローナルな抗腫瘍エフェクターT 細胞による免疫療法の研究)
論文審査委員	主査 教授 土田 正則 副査 教授 若井 俊文 副査 教授 菊地 利明

博士論文の要旨

【背景・目的】

申請者らはナイーブT細胞をリンパ球減少状態の担癌マウスに移入されると、腫瘍特異的なエフェクターT細胞に分化し得ることをこれまで明らかにしてきた。しかし、T細胞を必要量採取することは困難である。本研究は1) ex-vivo で培養した大量のポリクローナルなT細胞の in vivo での抗腫瘍効果を検証すること、さらに 2) 抗腫瘍効果を増強し得る併用治療を探索することを目的とした。

【方法】

マウス : 生後 8~12 週の雌 C57BL/6N (B6) マウスは全ての実験で使用した。その他, Ly5.1 系統の B6 マウス, OVA₃₂₃₋₃₃₉ のみを特異的に認識する TCR を有する OT-II マウス, T 細胞および B 細胞をノックアウトされた Rag2⁺マウスを用いた。**腫瘍細胞** : MCA205 または MCA207 マウス線維肉腫の cell line。**細胞培養** : マウスから採取した脾細胞を磁気ビーズで CD8⁺T 細胞を分離した CD8⁺T 細胞と CD4⁺T 細胞はともに抗 CD3 抗体で 2 日間刺激した後に前者は IL-7, 23, 後者は IL-2, 7 を添加した培養液で 7 日間培養した。**治療モデル** : マウスに 500cGy の非致死的全身照射によりリンパ減少状態にした後, ex-vivo で増殖させた T 細胞を尾静脈より移入し, さらに MCA205 腫瘍細胞 1×10⁵ を皮下接種して生着させ担癌マウスとした。腫瘍径は 2, 3 日おきに計測。**腫瘍所属リンパ節 (TDLN)** : マウスの両膝に MCA205 腫瘍細胞を皮下接種して 12 日後に鼠径に形成した TDLN を採取し, ex-vivo で抗 CD3 抗体と IL-2 による刺激で増殖させた。**分裂細胞の染色** : マウス脾細胞または T 細胞を蛍光色素 CFSE で染色。**IFN-γ 染色** : ex-vivo で培養した T 細胞を腫瘍細胞と共培養し, Brefeldin A で分泌顆粒の細胞内輸送を固定し, saponin で細胞膜の透過処理後に細胞内の IFN-γ 染色をした。**樹状細胞 (DC)** : B6 マウス骨髄細胞を GM-CSF 添加培養液で増殖後に抗 CD40 抗体で活性化させた。**解析** : FACS により分析。**統計処理** : 群間差は Student の t 検定あるいは Wilcoxon 検定で比較。両側検定で有意水準 5%。解析は SAS 社の JMP version 9.

【結果】

磁気ビーズ処理後に回収した CD8⁺T 細胞および CD4⁺T 細胞を ex-vivo で培養した結果、細胞数は著明に増加した (Fig 1B). 培養後に回収した細胞を FACS により分析した結果、CD8⁺T 細胞の 82.4%が CD4⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞の 95.3%が CD8⁺T 細胞であった (Fig 1A). 以下、CD8⁺T 細胞を CD4⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞を CD8⁺T 細胞と各々記載する. これらの ex-vivo で培養した T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) V β のレパトワ解析をして、TCR の多様性の維持を示した (Fig 1C). 次いで ex-vivo で増殖した Ly5.1 マウス由来の CD4⁺T または CD8⁺T 細胞を CSFE で標識後にリンパ球減少状態の Ly5.2 の担癌マウスに移入した. 形成した TDLN を解析した結果、ドナー由来の CD4⁺T 細胞の 83.2%と著明に分裂していたが、CD8⁺T 細胞の分裂は 57.5%程度であった (Fig 1D).

次にリンパ球減少状態の担癌マウスに対して 1) 照射単独群, 2) フレッシュ脾細胞移入群, 3) IL-2, 7 で培養した脾細胞移入群, 4) ex-vivo で増殖させた CD4⁺T 細胞+CD8⁺T 細胞移入群の 4 つの治療群で比較した. その結果、腫瘍の発育は 4)の群が他の群と比較して最も抑制された (Fig 2A). 次にエフェクターであるサブタイプを解明するため、CD4⁺T 単独あるいは CD8⁺T 細胞単独でリンパ球減少状態の担癌マウスに移入した結果、CD4⁺T 細胞の抗腫瘍効果は高く、CD8⁺T 細胞は低かった (Fig 2B). さらに制御性 T 細胞 (Treg) の除去による併用効果を検証するため、抗 CD25 モノクローナル抗体 (PC61) をリンパ球減少状態の担癌マウスに腹腔内注入した結果、CD4⁺T 細胞の移入による抗腫瘍効果は著明に増強したが (Fig 2C), CD8⁺T 細胞の移入療法に対する併用効果は CD4⁺T 細胞と比較して軽度であった (Fig 2D).

ex-vivo による培養後の CD4⁺T 細胞の phenotype は CD25 と CD44 が高発現で CD62L が低発現であった (Fig 3A). 次に CD4⁺T 細胞が担癌マウスに移入された後、エフェクターとして TDLN 内に浸潤している細胞を採取して phenotype を調べた. その結果、移入後の CD4⁺T 細胞は CD69 や CD62L が高発現で CD25 や CD44 は低発現であり、移入前と異なっていた (Fig 3B). また TDLN を IFN- γ 染色した結果、3.4%に MCA205 由来の抗原を特異的に認識して IFN- γ を産生していたが (Fig 3C), このうちの 94.9%はドナー由来であった (Fig 3C-D). また TCR V β レパトワ解析を追加して TCR の多様性を確認した (Fig 3E).

次に OT-II マウス由来の CD4⁺T 細胞の移入をしても抗腫瘍効果は確認できなかった (Fig 4A). また培養した CD4⁺T 細胞の移入により長期生存した担癌マウスに対し、治療 90 日後に再接種した MCA205 細胞はすべて拒絶した (Fig 4B). さらに長期生存した担癌マウスの脾細胞を FACS により分析した結果、CD4⁺と CD8⁺T 細胞ともに腫瘍抗原に特異的な IFN- γ の分泌を確認した (Fig 4C). FACS による分析の結果、CD4⁺T 細胞の 85.7%がドナー由来、CD8⁺T 細胞は 99%レシピアメント由来と判明した. なお Rag2 knockout マウスを担癌宿主とした場合、移入した CD4⁺T 細胞の抗腫瘍効果は著明に低下した (Supplement Fig1).

次いでリンパ球減少状態の担癌マウスに ex-vivo で増殖した CD4⁺T 細胞の移入療法に DC ワクチンの併用した結果、DC ワクチン併用により抗腫瘍効果は増強した (Fig 5B-C). 一方、ex-vivo で培養した CD8⁺T 細胞は DC ワクチンを併用しても抗腫瘍効果は殆ど示さなかった (Fig 5C). 申請者らは上記の実験系で腫瘍接種の 3 日後にリンパ球移入、Treg の除去と DC ワクチン接種を実施する治療モデルを検証した結果、腫瘍発育を抑制しえた (Fig 5D).

【考察】

本研究では大量の腫瘍特異的なエフェクター T 細胞を獲得しうる培養条件を確立した. この方法で培養した CD4⁺T 細胞が腫瘍発育の抑制に関わっており CD8⁺T 細胞は抗腫瘍効果を示さないことを確認した. また ex-vivo で培養された CD4⁺T 細胞はナイーブ T 細胞と同様に TCR の多様

性を維持しており、TCRは腫瘍抗原に特異的であることを明らかにした。また本研究ではT細胞移入療法により長期生存し得た担癌マウスの脾細胞の分析の結果、腫瘍抗原特異的なエフェクターCD4⁺T細胞の殆どはドナー由来であり、CD8⁺T細胞の殆どは担癌宿主由来であった。併せて本研究では抗CD25抗体やDCワクチンの併用療法が抗腫瘍効果の増強を確認した。

審査結果の要旨

本研究はex-vivoで培養したnaïve T細胞をlymphodepletionされた担癌mouseに移入することで腫瘍特異的なeffector T細胞を誘導し得るかを検証した。併せて腫瘍免疫応答の解明を目的とした。

B6, Ly5.1系統B6, OT-II, Rag2 KO mouseを用いた。cell lineはMCA205 mouse fibrosarcomaを使用した。磁気beadsを用いてseparationしたCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞は各々IL-7, 23およびIL-2, 7, 15を添加して培養した。回収後の細胞は照射後に腫瘍細胞を接種した担癌mouseに移入した。

上記の条件で培養した結果、CD4, 8⁺T細胞共に著明に増殖すること、TCRの多様性が維持されることを確認した。次いでlymphopenicな担癌mouseに種々の条件の免疫細胞の移入を施行した。結果、CD4⁺T細胞移入群で最も高い抗腫瘍効果を認めたが、CD8⁺T細胞移入ではnegative control群と有意差が無かった。このCD4⁺T細胞による抗腫瘍効果はanti-CD25mAbやDendritic cell Vaccineの追加投与により増強された。TDLNの解析では、IFN- γ を産生するCD4⁺T細胞の85.7%がDonor由来、CD8⁺T細胞は99% Host由来であり、Host内のeffector cellはDonor由来であると示された。一方、HostをRag2 KO mouseに変更すると、CD4⁺T細胞の腫瘍発育の抑制効果は著減しており、Host側の免疫細胞の役割が示唆された。

本論文はex-vivoで培養したnaïve CD4⁺T細胞をlymphopenicな担癌mouseへの移入により、腫瘍特異的なeffector能を獲得することを示した初めての前臨床研究である。同時にCD4⁺T細胞のeffectorとしての機能を評価し、腫瘍免疫応答におけるDonorとHostの双方のリンパ球の重要性を明らかにした腫瘍免疫学的に重要な研究であり、博士論文としての価値を認める。