

氏 名	植 木 智 之
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 9 7 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 9 月 9 日
学 位 論 文 題 目	Pre-treatment with cyclophosphamide or OX40 (CD134) costimulation targeting regulatory T cell function enhances the anti-tumor immune effect of adoptively transferred CD8 ⁺ T cells from wild-type mice (レシピエントマウスに対して、制御性T細胞の機能を標的にしたシクロホスファミド投与、もしくはOX40による補助刺激の、前処置を行うと、野生型マウス由来の養子移入CD8 ⁺ T細胞の抗腫瘍効果が増強する)
審 査 委 員	主 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 岡 部 英 俊 副 査 教 授 岡 田 裕 作

論文内容要旨

※整理番号	602	氏名	植木 智之
学位論文題目	Pre-treatment with cyclophosphamide or OX40 (CD134) costimulation targeting regulatory T cell function enhances the anti-tumor immune effect of adoptively transferred CD8 ⁺ T cells from wild-type mice (レシピエントマウスに対して、制御性 T 細胞の機能を標的にしたシクロホスファミド投与、もしくは OX40 による補助刺激の前処置を行うと、野生型マウス由来の養子移入 CD8 ⁺ T 細胞の抗腫瘍効果が増強する。)		
<p>〈目的〉</p> <p>癌患者に対するいくつかの免疫治療が行われているが、十分な効果を挙げられていない。その原因の一つに、自己抗原に対する免疫反応を抑制する制御性 T 細胞 (以下、Treg) の存在がある。実際、Treg の除去による抗腫瘍効果の増強の報告がある。今回、我々は、より強力な細胞療法を開発すべく、マウスを用いた養子免疫療法モデルにおいて、レシピエントマウスの Treg 抑制目的に化学療法剤のシクロホスファミド (以下、Cy) 及び、シグナルが入ることにより Treg の機能を抑制するとされる抗 OX40 抗体を用いて、野生型のドナーマウスより分離した CD8⁺ T 細胞の抗腫瘍効果の増強について検討した。</p> <p>〈方法〉</p> <p>6~8 週のメスの FVB マウスに同系乳癌細胞及びワクチン細胞を接種した後、脾臓とリンパ節からナイロンウールカラムを用いて T 細胞を分離し、さらに磁性抗体を用いて CD8⁺ T 細胞を分離した。分離された CD8⁺ T 細胞は腫瘍特異抗原である HER2/neu の immunodominant peptide をパルスした抗原提示細胞と 2 日間接触させて活性化し、その後レシピエントの尾静脈より養子移入した (7×10⁶ 個)。レシピエントには予め、同系乳癌細胞を接種して担癌状態にした上、Treg の抑制目的に Cy (100mg/kg)、抗 OX40 抗体 (300 µg)、もしくはコントロールとして Ig G 抗体 (300 µg) をそれぞれ腹腔内投与した。レシピエントは養子移入 6 日後に犠死し、細胞内サイトカイン染色を行って腫瘍抗原特異的 IFN-γ 産生 CD8⁺ T 細胞の割合を解析した。また、腫瘍径を経時的に測定した。一方、Cy と抗 OX40 抗体の Treg 数に対する影響を検討すべく、FVB マウスに腫瘍細胞を接種した後、Cy、抗 OX40 抗体、もしくは Ig G 抗体を投与し、0・2・4・6 日後の Treg 数の変化を調べた。</p> <p>〈結果〉</p> <p>養子移入した CD8⁺ T 細胞は、レシピエント内においても腫瘍抗原特異的免疫反応を維持することができた。さらに、レシピエントに対して Cy、もしくは抗 OX40 抗体投与の前処置を行った群では、より多くの腫瘍抗原特異的 CD8⁺ T 細胞が維持されていた。これらの結果より、Treg の抑制目的にレシピエントに対して前処置を行うことは、養子移入された腫瘍抗原特異</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

的 CD8+ T 細胞の機能維持に効果的であると考えられた。また、養子移入単独治療群では、無治療群に比べて腫瘍径の増大は緩やかであったものの、腫瘍を根絶することはできなかった。一方、Cy 単独治療群は無治療群に比べて明らかに腫瘍増大を抑制したが、抗 OX40 抗体単独治療群ではこのような傾向は認められなかった。このように単独治療群、無治療群の腫瘍径増大にある程度の傾向の差は見受けられたものの、腫瘍を根絶できた群はなかった。ところが、Cy、もしくは抗 OX40 抗体投与に養子移入を行った併用治療群では、いずれも腫瘍径増大を抑制し、最終的には腫瘍を根絶することができた。次に、担癌状態マウスに Cy、もしくは抗 OX40 抗体を投与したところ、Cy 投与群は投与 2 日後に著明な Treg 数の低下を認めたが、抗 OX40 抗体投与群では、観察期間を通して Treg 数に大きな変化を認めなかった。

〈考察〉

今回の研究では、養子免疫療法において 2 つの重要な知見を得ることができた。1 つは、レシピエントに対する Treg を標的とした Cy と抗 OX40 抗体投与が、移入された腫瘍抗原特異的 CD8+ T 細胞の機能維持に有効であり、抗腫瘍効果を高めることができた、ということ。2 つ目は、T 細胞受容体遺伝子導入マウスではなく、野生型マウスより誘導した腫瘍抗原特異的 CD8+ T 細胞を用いて、レシピエントに生着した腫瘍を根絶することができた、ということである。Cy を用いた養子免疫療法は、有効であると同時に、その細胞抑制作用によって腫瘍から抑制系サイトカインの分泌が亢進し、ナイーブな T 細胞を Treg に分化させることが報告されている。つまり、細胞抑制作用により、一時的に Treg をコントロールしても、結果的に自己抗原も含めた様々な抗原に反応し得る Treg の増殖につながることになる。よって、Treg 数を減らさずに、その機能をコントロールすることが理想的な治療法の開発にとって重要である。近年、OX40 の補助刺激は、転写因子 Foxp3 の発現を低下させ、Treg の機能を抑制するという報告があり、今回の実験でも、抗 OX40 抗体投与により、Treg 数に変化を認めないものの、移入細胞の抗腫瘍効果を増強することができた。また、一般的な養子免疫療法の実験モデルでは、効率よく腫瘍抗原特異的 CD8+ T 細胞を回収するため、T 細胞受容体遺伝子導入マウスを用いて行われるが、実際の臨床においてはそのように大量の腫瘍抗原特異的 CD8+ T 細胞を誘導することは困難で、限られた細胞数の中で治療効果を挙げることが、より臨床に即した実験モデルであるといえる。今回の実験では、Treg の抑制目的に Cy と抗 OX40 抗体を使用することで、少数の腫瘍抗原特異的 CD8+ T 細胞の移入でも抗腫瘍効果を認めることができた。以上のような結果から、Treg を抑制した後に養子移入を行うことは、抗腫瘍効果をより高めるうえで、非常に有効であると考えられた。

〈結論〉

レシピエントに対する Treg を標的とした前処置は、養子免疫療法の抗腫瘍効果を高めるために有効であり、野生型マウスより分離した少数の腫瘍抗原特異的 CD8+ T 細胞の移入でも、治療効果を認めることができた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	602	氏名	植木 智之
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>現在行われている癌免疫療法では、腫瘍抗原特異的な免疫細胞が誘導後にすぐにアポトーシスやアナジーとなり、十分な効果を挙げられていない。そこで、T細胞の補助刺激因子である OX40 を用いて、より強力な腫瘍抗原特異的 CTL を誘導し、また制御性 T 細胞の機能を抑制して、効果的な癌免疫療法が開発できないかということを検討した。レシピエントマウスに抗 OX40 抗体投与を行い、腫瘍抗原特異的 CTL を移入したマウスでは、他の単独治療群に比べて腫瘍抗原特異的 CTL の反応が有意に高く維持されて、腫瘍径も他の単独治療群に比べて有意に抑制されていた。一方、シクロホスファミドは、制御性 T 細胞を含めた T 細胞の骨髄抑制を引き起こすことで、移入 T 細胞の抗腫瘍効果の増強をもたらすが、これらの細胞減少はいずれ制御性 T 細胞のリバウンドをもたらす可能性がある。すなわち、制御性 T 細胞の細胞数減少ではなく、その機能抑制に的を射ぼった抗 OX40 抗体は、癌免疫療法において理想的な抗体となり得る可能性が示唆された。</p> <p>以上より、少数の腫瘍抗原特異的 CTL の移入でも、抗 OX40 抗体を用いて制御性 T 細胞の機能を抑制することで治療効果をあげることができた本研究は臨床上有意義であるといえる。</p> <p>本論文は、より効果的な癌免疫療法の開発について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(平成 21 年 8 月 26 日)			