

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	井内 康之
<h2>学位論文題目</h2> <p>同系骨髄移植後白血病マウスに白血病細胞由来熱ショック蛋白と樹状細胞を併用した免疫療法</p>			
<p>掲載学会雑誌名 未公表</p>			
<h2>研究目的</h2> <p>熱ショック蛋白 (heat shock protein : HSP) は、細胞内の種々の蛋白合成過程で前駆体物質と結合し、その合成を助ける分子シャペロンである。腫瘍細胞由来 HSP は腫瘍特異的抗原ペプチドと結合していると考えられ、この複合体を抗腫瘍細胞ワクチンとして利用できる。現在、白血病においては、移植片対白血病効果が期待できる同種造血幹細胞移植が最も有効な治療法であるが、施行できる症例は限られている。それに対し、自家移植は多くの患者に施行可能だが、微小残存病変(minimal residual disease: MRD)による移植後再発が最大の問題となる。そこで我々は、マウス MRD モデルを作製し、移植後早期に白血病細胞由来の HSP を接種することで、白血病細胞特異免疫を誘導し、生存期間の延長をもたらすことを報告してきた。しかしながら、臨床の場における造血幹細胞移植後の白血病患者は、高度の免疫抑制状態で、HSP 単独の接種では、抗白血病細胞免疫の誘導が不十分で何らかの工夫が必要である。最近、抗原提示細胞のなかで最も強い抗原提示能を持つ樹状細胞 (dendritic cells: DCs) 上に HSP に特異的な受容体分子が発現し、また、HSP が DCs の分化・成熟を直接促進すると報告されており、DCs を併用することで抗腫瘍免疫の増強が期待される。本研究では、HSP を用いた同系骨髄移植後の白血病細胞に対する免疫療法モデルにおいて、DCs を併用することで、抗白血病細胞効果が増強されるかどうか、また、この免疫療法の宿主に対する安全性についても検討した。</p>			
<h2>材料・方法</h2> <ol style="list-style-type: none">1. 実験動物および細胞株: 実験には5~6週齢雌 BALB/c マウスを用いた。細胞株として BALB/c マウス由来 B 細胞白血病細胞株 A20 および YAC-1 を用いた。2. HSP70 の精製: A20 細胞のペレットをホモジナイズし、遠心した上清を PD10 カラムと、adenosine 5'-diphosphate-agarose カラムにアプライし、Mono Q システムを用いて HSP70 を抽出した。SDS-PAGE 後			

に銀染色および抗 HSP70 抗体を用いたウエスタンブロットを施行し精製物の純度を確認した。

3. 骨髄細胞由来樹状細胞の誘導: 骨髄細胞を溶血後、単クローン抗体(抗 CD8 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD45R/B220 抗体、抗 Gr-1 抗体、抗 MHC class II 抗体)と補体で処理し、10 ng/ml GM-CSF を含む 10% ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 培地で培養 2 日目と 4 日目に非付着細胞を除去し、6 日目に残存した細胞を DCs として使用した。
4. フローサイトメトリー: 誘導された DCs 関連抗原の発現を EPICS ELITE を用いたフローサイトメトリーにて解析した。一次抗体として抗 CD11c 抗体、抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体、抗 MHC class I 抗体、抗 MHC class II 抗体を、二次抗体として FITC 結合抗マウス Ig を用いた。
5. 同系骨髄移植と微小残存白血病モデルの作製: マウス同系骨髄移植(BMT)は、レシピエントマウスに 7.5 Gy 単回全身放射線照射(total body irradiation: TBI)を前処置とし、同系健常ドナーマウスの大腿骨と脛骨より骨髄細胞を採取し、TBI の 2 時間後レシピエントマウスへ輸注した。BMT の 10 日後、A20 細胞を輸注し MRD モデルを作製した。
6. HSP、DCs を用いた免疫療法: A20 接種日を day 0 とし、A20 細胞由来の HSP70、DCs あるいは HSP70 をパルスした DCs (HSP70-pulsed DCs)を day 4、11、18、25 に皮下注した。HSP70-pulsed DCs は DCs と HSP70 を接種前に 2 時間混合し用いた。コントロールマウスには、燐酸緩衝液 (PBS) を皮下注した。A20 細胞接種後の生存日数を Kaplan and Meier 法を用いて比較検討した。
7. HSP、DCs 免疫マウス脾細胞を用いた in vitro 細胞障害活性の測定: TBI と BMT 後に HSP70、DCs あるいは HSP70-pulsed DCs を day 11、18、25 に皮下注し、day 32 の脾細胞を用いてリンパ球腫瘍細胞混合培養(mixed lymphocyte-tumor cell-culture: MLTC)を施行した。マウス脾細胞と放射線照射した A20 細胞を 5 日間培養しエフェクター細胞とした。⁵¹Cr で標識した標的細胞と 6 時間培養し、培養上清中の放射活性を γ カウンターで測定した。エフェクター細胞のサブセットを決定するため、エフェクター細胞を抗 CD4 抗体、あるいは抗 CD8 抗体と標的細胞との培養前に反応させた。また、MHC 拘束性を検討するために抗 MHC class I 抗体をエフェクター細胞と培養する前に標的細胞に反応させた。
8. 長期免疫マウスの血清生化学的、肝・関節の組織学的検討: TBI と BMT 後に、HSP70、DCs あるいは HSP70-pulsed DCs を day 4、11、18、25 に皮下注し、day 120 にマウス血清を採取し ALP、AST、ALT、LDH、CRE、BUN 値を測定した。また、同日のマウス肝組織、膝関節をホルマリン固定、パラフィン包埋後、薄切、染色し顕微鏡下に観察した。

成 績

1. A20 細胞から精製した HSP は、鍍銀染色で分子量 70 kD の単一バンドを示し、このバンドがウエスタンブロットにて抗 HSP70 抗体と反応することから、HSP70 であることを確認した。
2. マウス骨髄細胞から GM-CSF により誘導した細胞は、形態学的に樹枝状の細胞突起を有する DCs で、細胞表面抗原の検討では、CD11c の発現は 19%と、今回 DCs として用いた細胞の約 20%がミエロイド DCs と考えられた。また成熟 DCs のマーカーである CD86 の発現はほとんどなく、幼弱 DCs が主体であった。

3. BMT 後 A20 細胞 MRD モデルにおける免疫療法の有効性を検討した。MRD モデルに、PBS のみ、DCs のみを皮下に接種したマウスは移植後 90 日以内に全マウス白血病死した。それに対し HSP70 のみ、または HSP70-pulsed DCs を接種したマウスは、PBS、DCs 接種マウスに比べ有意に生存日数が延長した。さらに、HSP70 接種マウスでは 120 日以内に約 40%死亡したが、HSP70-pulsed DCs マウスでは全例生存し、DCs を併用することで生存期間が延長した。また生存マウスでは残存白血病細胞を認めなかった。
4. A20 細胞に対する *in vitro* での細胞障害活性の増強効果を検討した。免疫マウスの脾細胞をエフェクター細胞とし、A20細胞あるいはNK細胞に感受性を持つ YAC-1細胞を標的細胞として細胞障害活性を⁵¹Cr レリースアッセイにて検討した。PBS あるいは DCs のみ接種した脾細胞は A20 細胞に対してほとんど細胞障害活性がなく、HSP70 のみ接種した脾細胞は有意な細胞障害活性を示したが、その活性は低かった。それに対して、HSP70-pulsed DCs を接種した脾細胞では、すべての E/T 比において A20 細胞に対する著しい細胞障害活性を認めた。一方、いずれのマウス脾細胞も YAC-1 細胞に細胞障害活性を示さず、YAC-1 細胞に対する NK 活性の誘導は認められなかった。
5. A20 細胞に対するエフェクター細胞を明らかにするため抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体にて処理した後、A20 細胞に対する細胞障害活性を測定した。HSP70-pulsed DCs を接種したマウス脾細胞による A20 細胞に対する細胞障害活性は、抗 CD8 抗体によって有意に阻害されたが抗 CD4 抗体では影響されなかった。さらに、MHC 拘束性を検討するために抗マウス MHC class I 抗体を標的細胞に反応させたところ A20 に対する細胞障害活性は有意に阻害されたが、その阻害の程度は 50%程で、MHC class I に拘束されない CD8 陽性 NK 細胞などの関与も考えられた。
6. HSP70-pulsed DCs 接種による自己免疫疾患発症の可能性を検討した。各免疫マウスは、PBS のみ接種したマウスと比べ体重減少、脱毛、食事量の減少など認めず外観上著変なかった。また検討した血清 ALP、AST、ALT、LDH、BUN、CRE 値も各グループ間で差を認めず、組織学的にも肝、関節組織に炎症所見はなく検討しえた組織において、自己免疫異常を示唆するような異常所見を認めなかった。

考 察

近年、抗腫瘍免疫療法を増強する手段として、抗原提示細胞のなかで最も強い抗原提示能を有する DCs を用いた方法が期待されている。幼弱 DCs は、外来抗原を盛んに取り込み MHC class I あるいは II に提示するとともに、二次リンパ組織へ移動しながら成熟・分化し、リンパ球に対する共刺激分子である CD83、CD86 などを発現し、リンパ球を刺激して強い免疫応答を誘導できるうえ、DCs のみがナイーブ T 細胞を活性化し、抗原特異的なエフェクター細胞へ分化させることができる。DCs を用いた免疫療法には、合成ペプチドや、抗原分子の cDNA、mRNA、あるいは自家腫瘍 lysate を用いた方法が報告されているが、それらでは、腫瘍抗原の特定や遺伝子配列の決定が必要であったり、ベクターの安全性や自己蛋白に対する免疫応答の誘導といった問題がある。それらに比べ、HSP を用いた免疫療法は、自己腫瘍細胞内の多くの内因性抗原ペプチドを利用できるため、腫瘍抗原が特定されていない白血病症例においても、各症例に対応した T 細胞を活性化できるという点で優れている。また、最近、HSP が、腫瘍細胞の免疫原性に重要な役割を果たしていることや、HSP が従来からの細胞内分子シャペロンとしての

役割に加えて、DCs 上の受容体分子を介して DCs を活性化するサイトカイン作用を有することが明らかとなり、HSP のもつ腫瘍細胞に対する免疫原性に DCs が強く関与していることが推測されている。本研究では、DCs と HSP を免疫前に反応させ、効率的に HSP を取り込ませたことが、HSP の単独免疫よりも、強い抗白血病細胞免疫の誘導につながったものと考えられる。

免疫療法に用いる DCs の種類とその分化段階の検討も重要である。我々の用いた骨髓細胞由来のミエロイド DCs の他にも、末梢血単球、CD34 陽性細胞や白血病細胞に由来する DCs などが試されている。また DCs の誘導方法も種々のサイトカインを用いて行われているが、誘導される DCs の種類には違いがあることが報告されている。一般に、幼弱 DCs は貪食能に優れているが、成熟 DCs に比べて抗原提示能は少ないうえ、T 細胞を活性化する共刺激分子の発現が弱く、逆に抗原特異的な免疫応答を抑制するとされている。我々は今回、幼弱なミエロイド DCs を用いているが、結果的に強い抗白血病細胞免疫を誘導できており、*in vivo* で T 細胞を刺激する際、HSP の持つ DCs に対する分化刺激により成熟 DCs へ分化したものと考えられる。有効な免疫療法を導くために、今後 DCs への抗原分子をパルスする方法に応じた DCs の選択が重要であろう。

種々の悪性腫瘍に対し DCs を利用した臨床試験がなされ、その有効性と安全性が検討されてきた。HSP を用いたヒトに対しての臨床試験において、重篤な副作用や自己免疫反応は生じていないが、悪性黒色腫を対象にしたヒトの臨床試験の中には、少数例ではあるが進行性の白斑を生じたり、またマウスにおいて、移植片対宿主病類似の重篤な自己免疫反応を起こした報告があり、今回の研究では目立った副作用が認められなかったものの、臨床への導入の際には慎重な経過観察が必要と考えられる。




結 論

DCs と白血病細胞由来 HSP を併用した免疫療法は、動物実験レベルで、造血幹細胞移植後の免疫不全時期においても、移植後の白血病細胞に対して CD8 陽性細胞障害性 T 細胞を主体とした特異的抗白血病細胞免疫を誘導し、生存期間を延長させると共に、安全な治療法であることが示された。今後、ヒト自家造血幹細胞移植後の MRD に対して有効な抗白血病免疫を誘導する方法として DCs と HSP を併用した本免疫療法は期待が持たれるものと考えられた。

引 用 文 献

1. Srivastava PK, menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity*.1998; 8: 657-665.
2. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp Med*. 1992; 176: 1693-1702.
3. Sato K, Torimoto Y, Tamura Y, Shindo M, Shinzaki H, Kohgo Y. Immunotherapy using heat-shock protein preparations of leukemia cells after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood* 2001; 98: 1852-1857

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏名	井内 康之
<p>審査委員長 高後 裕 </p> <p>審査委員 片桐 一 </p> <p>審査委員 立野 正敏 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p>			
<p>同系骨髄移植後白血病マウスに白血病細胞由来熱ショック蛋白と樹状細胞を併用した免疫療法</p>			
<p>現在、白血病においては、移植片体白血病効果を期待できる同種造血幹細胞移植が最も期待できる方法であるが、施行できる症例は限られている。それに対し、自家移植は多くの患者に施行可能だが、微小残存病変 (minimal residual disease、MRD) による再発が問題になり、MRD の制御が問題となる。そのために、腫瘍細胞由来熱ショック蛋白 (heat shock protein, HSP) が腫瘍特異的抗原ペプチドと結合し、その複合体が抗腫瘍細胞ワクチンとして使用できることから、同時に抗原提示能の強力な樹状細胞 (dendritic cell, DC) を併用した白血病細胞に対する免疫療法が可能と考えられる。本論文は、マウス・モデルを用いて、HSP に DC を併用することで、化学療法後の免疫抑制状態でも HSP を用いた特異的免疫療法が有効になるか否かを検討したものである。</p> <p>実験には5～6週齢雌 BALB/c マウスを用い、細胞株として BALB/c マウス由来 B 細胞白血病細胞株 A20 および YAC-1 を用いた。A20 由来 HSP として、A20 細胞をホモジナイズした後、遠心分離上清を ADP アガロースカラム、MonoQ カラムで精製した。DC はマウス骨髄から GM-CSF で誘導して得た。マウス同系骨髄移植系を放射線</p>			

照射で全処置した後、同系骨髄細胞を輸注して作成、さらに移植 10 日後に A20 細胞を輸注して微小残存病変モデル (MRD) を作成した。このマウスに A20 由来の HSP, DC, あるいは DC と HSP70 を皮下に接種し免疫した。生存日数は Kaplan and Meyer 法で比較検討し、同時に脾細胞を用いた細胞障害活性と MHC 拘束性、長期免疫マウスの副作用出現の有無を検討した。

その結果以下の成績が得られた。

- ① A20 細胞から精製した HSP70 は SDS/PAGE 後の銀染色で単一バンドを、Western blot で抗 HSP70 抗体と反応し、純度・特異性とも満足のものであった。
- ② 誘導した DC は、細胞表面マーカーの検討で幼弱 DC が主体であった。
- ③ BMT 後 A20 細胞接種 MRD モデルに、PBS のみ、DC のみを接種したマウスは移植後 90 日以内に全マウスが白血病死した。HSP70 のみ、または HSP70-pulsed DC を接種したマウスは有意な生存日数の延長が得られた。HSP70 のみ接種群では 120 日以内に約 40% が死亡したが、HSP70 と DC を併用した群では全例生存し、DC の併用効果が明らかであった。生存マウスでは残存白血病細胞を認めなかった。
- ④ A-20 細胞に対する細胞障害活性は、A-20 細胞に特異的で、YAC-1 を標的として調べた NK 活性の誘導によるものでなかった。
- ⑤ A20 細胞に対する細胞障害活性は抗 CD8 抗体で阻害されたが、CD4 抗体では阻害されず、CD8 陽性細胞が特異的細胞障害の主体であった。MHC class I 抗体により、活性の約 50% が阻害された。
- ⑥ 長期観察マウスでの血液学的検査、肝臓・関節組織の病理学的検査では、異常を認めなかった。

本研究は、DC と白血病由来 HSP を併用した免疫療法が、動物実験のレベルで、同系造血幹細胞移植後の免疫不全時期においても、移植後の白血病細胞に対して CD8 陽性細胞障害性 T 細胞を主体とした特異的免疫を誘導し、生存期間を延長させるとともに、安全な治療法であることを示したものである。得られた成績は今後、ヒト白血病に対する自家造血幹細胞移植後の免疫療法を開発する上で示唆に富む所見を与えている。また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。