



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on induction of effective anti-tumor immunity and regulatory mechanisms by novel long peptide vaccination [an abstract of entire text]
Author(s)	増子, 和尚
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2107 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11235号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55779
Type	doctoral thesis
File Information	Kazutaka_Masuko_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

**Studies on induction of effective anti-tumor immunity and
regulatory mechanisms by novel long peptide vaccination**

(新規人工合成ロングペプチドによる

効率的な抗腫瘍免疫誘導と作用機序に関する研究)

2014 年 3 月

北 海 道 大 学

増 子 和 尚

従来の癌標準治療法には放射線、抗癌剤または外科的切除がある。近年、癌免疫治療が第 4 の癌治療法として注目されている。Boon らによって癌抗原が発見されて以来、多くの研究者によって癌ワクチン治療の研究が行われてきた。その中で、癌細胞特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)が癌細胞に直接接触し、パーフォリンやグランザイムによってカスパーゼ系を活性化することで、アポトーシスを誘発し、癌細胞を破壊することが証明された。これまでの癌ワクチン治療ではclass I 結合性癌抗原ペプチドを用いて抗原特異的 CTL を誘導する方法が主流だったが、延命効果はあるものの、癌の退縮といった画期的な抗腫瘍効果は限られており、より効果的な次世代癌ワクチン治療法を確立する必要がある。免疫機構の調整を司る CD4 陽性ヘルパー T 細胞サブセットの一つである Type1 helper T (Th1) 細胞は細胞傷害活性のある CTL を強く誘導する機能があることが報告されている。従って、免疫バランスを人為的に Th1 側に傾けることにより、抗腫瘍免疫を活性化させることが癌の治療に有効であると考えられる。これまでの研究で、癌免疫制御を担う Th1 細胞が最終エフェクターであるキラー T 細胞を誘導するのに効果的であり、抗原特異的 Th1 細胞存在下で抗原を接種すると非常に強い抗腫瘍効果が得られることも証明されている。従って、より効果的な癌ワクチン治療を行うには、生体内において抗原特異的 Th1 細胞が誘導される必要があると考えられる。そこで、抗原特異的 CTL および Th1 細胞を同時に活性化させるために、ヘルパーおよびキラーエпитープをリンカーを介して結合させた新規人工合成ロングペプチドである Helper/Killer-Hybrid Epitope Long Peptide (H/K-HELP)を作成した。既にヒト癌抗原である MAGE-A4 や survivin の H/K-HELP を用いた癌ワクチン臨床試験を行っており、CT 画像上で転移性乳がんが消失した症例を確認している。本論文では、マウス実験系を用いて H/K-HELP の生体内における抗腫瘍効果とその作用機序解明を目的とし、仮想癌抗原である OVA の H/K-HELP を作製した。Type1 免疫を強く惹起する CpG をアジュバントにして C57BL/6 マウスに免疫してから 10 日後の所属リンパ節細胞中の抗原特異的 CTL および Th1 細胞の誘導効率を検証したところ、short peptides-Mix (class I short peptide と class II short peptide を混ぜたもの) 接種群に比べて H/K-HELP 接種群で抗原特異的 CTL が強く誘導されていた。また、short peptides-Mix で再刺激後に細胞内染色を行ったところ、H/K-HELP 接種群で抗原特異的 Th1 細胞が強く誘導されていた。さらに、抗原特異的な IFN- γ 産生能を ELISA で検証した結果、class I peptide 刺激でも class II peptide 刺激でも short peptides-Mix 接種群に比べて H/K-HELP 接種群で IFN- γ 産生が高いことから、H/K-HELP 接種により IFN- γ を産生する抗原特異的 CTL と Th1 細胞が誘導されることが分かった。次に、誘導された抗原特異的 CTL の機能を検証するために、OVA を発現する癌細胞株である EG7 と共培養を行った。Tetramer 解析の結果、H/K-HELP 接種群で抗原特異的 CTL の数と割合が有意に高いことが分かった。また、クロムリリースアッセイ

によって、細胞傷害活性を評価したところ H/K-HELP 接種群で有意に高いことが明らかとなった。以上の結果より、H/K-HELP は short peptides-Mix に比べて抗原特異的 CTL および Th1 細胞を生体内でより効率的に誘導し、誘導された抗原特異的 CTL は機能的であることが証明された。続いて、H/K-HELP による抗腫瘍免疫誘導のメカニズムを解明するための検証を行った。抗原特異的な抗腫瘍免疫が誘導されるためには抗原提示細胞からの抗原提示が必要である。そこで、抗原提示細胞に着目し、どの細胞群によって抗原提示が行われているかを検討した。CpG をアジュバントにして short peptides-Mix、または H/K-HELP を接種した際の抗原提示細胞を解析したところ、short peptides-Mix 接種群では樹状細胞だけでなく B 細胞や T 細胞でも抗原提示が行われていた。これらの細胞群は共刺激分子を持たないため、完全な CTL を誘導できないことが報告されている。また、非所属リンパ節の細胞群でも抗原提示されていたことから、ペプチドが拡散しており局所における抗原量が減っていることが示唆される。一方、H/K-HELP 接種群では所属リンパ節の樹状細胞特異的に抗原提示が行われていた。抗腫瘍免疫を誘導するためには所属リンパ節が重要であることは既に報告がある。従って、short peptides-Mix に比べて H/K-HELP は活性化 CTL を効率的に誘導し得ることが示唆された。H/K-HELP は接種局所の樹状細胞特異的に抗原提示され、効率的に抗腫瘍免疫を誘導することが示されたので、その効果がどれだけ続くかに着目した。そこで、生体内に接種した時の抗原提示能の持続性を検討した。short peptides-Mix または H/K-HELP を接種してから 36 時間、10 日、20 日、60 日後の生体内における抗原提示能を評価した。その結果、H/K-HELP 接種群では接種後 60 日経っても抗原特異的 CTL および Th1 細胞への抗原提示が確認されたことから、short peptides-Mix 接種群に比べて、抗原提示が長期に維持されていることが明らかとなった。従って、H/K-HELP は生体内において長期にわたる効率的な抗原提示が行われるので、抗原特異的 Th1 細胞および CTL の誘導に効果的であることが示唆された。さらに、H/K-HELP デザインのリンカー部分アミノ酸に着目し、リンカー配列をグリシンからプロリンまたはアラニンに置換した H/K-HELP を作成した。CTL 誘導能の変化を検討した結果、プロリン配列およびアラニン配列の H/K-HELP ではグリシン配列の H/K-HELP 程の抗原特異的 CTL 誘導が見られなかった。次に、生体内で H/K-HELP によって誘導された抗腫瘍免疫の癌細胞に対する有効性を検討するために、疾患モデルを用いて検討した。免疫後に EG7 を担癌する予防モデルで検証したところ、H/K-HELP 接種群で抗原特異的 CTL が有意に誘導されており、細胞傷害活性も高く、腫瘍の拒絶が見られたことより、抗原特異的なメモリー細胞が誘導されていると考えられる。また、H/K-HELP による抗腫瘍免疫誘導における CD4 陽性 T 細胞の関与を検討するために、予防モデルの免疫前日と当日に抗 CD4 depletion 抗体を腹腔内投与したところ、抗原特異的 CTL の誘導率および細胞傷害活性が減少した。従って、抗腫瘍免疫を誘導するため

には誘導初期の段階で CD4 陽性 T 細胞からのヘルプ作用が必要であることが分かった。次に、H/K-HELP の抗腫瘍治療効果を検討するため、担癌マウスモデルを用いて検討を行った。担癌した EG7 が 6-7mm まで増殖した後、所属リンパ節近傍に CpG をアジュバントとして short peptides-Mix または H/K-HELP で治療を行った結果、short peptides-Mix 治療群に比べて H/K-HELP 治療群で腫瘍増殖が著しく抑制され、約 8 割の個体で癌の完全退縮が認められた。近年、short peptide よりも short peptide を前後に引き伸ばした long peptide の方が抗腫瘍免疫誘導に効果的であるという報告があるので、long peptide と H/K-HELP の比較検討を行った。比較検討を行うために、キラーおよびヘルパー領域を前後に伸ばして H/K-HELP と同じ 30mer の長さにした class I long peptide および class II long peptide を作製し、先程と同じように、抗原特異的 CTL 誘導能の検討を行った。ここで、long peptides-Mix とは class I long peptide と class II long peptide を混ぜたものです。CpG をアジュバントにして免疫 10 日後の所属リンパ節細胞を EG7 で再刺激してから解析した結果、short class I peptide よりも long peptide や H/K-HELP 接種群で抗原特異的 CTL が効率的に誘導され、細胞傷害活性も上昇することが示された。また、ヘルパーエпитープを有する H/K-HELP 接種群や long peptides-Mix (class I long peptide と class II long peptide を混ぜたもの) 接種群において、Total エフェクター数の増加が見られた。さらに、抗腫瘍効果を担癌マウスモデルを用いて検討した結果、class I short peptide および class I long peptide 治療群に比べて H/K-HELP および long peptides-Mix 治療群で非常に強い抗腫瘍効果が見られた。以上の結果より、H/K-HELP は樹状細胞特異的に長期にわたる効果的な抗原提示が行われ、従来のペプチドに比べてより効率的に抗原特異的 CTL および Th1 細胞を誘導し、非常に強い抗腫瘍免疫を示すことが明らかとなった。また、抗腫瘍免疫増強には長いペプチド鎖の中に、ヘルパーとキラーの両エピトープが存在することが重要であると考えられる。従って、H/K-HELP ワクチンデザインの概念は感染症予防や癌免疫治療の発展に大きく貢献できると考えられる。