



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	免疫原性の高いマウス乳がん細胞株4T1-Sの同定 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	阿部, 紘丈
Description	配架番号 : 2261
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12387号
Issue Date	2016-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63284
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hirotake_Abe_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 阿部 紘丈

学 位 論 文 題 名

免疫原性の高いマウス乳がん細胞株 4T1-S の同定
(Identification of a Highly Immunogenic
Mouse Breast Cancer Sub Cell Line, 4T1-S)

【背景と目的】

乳癌は若年女性においてもっとも高頻度に認められる癌の一つであり、早期診断、手術、全身化学療法といった治療が主体である。近年、治療戦略の発展は著しいが、いまだに女性の乳癌による死亡率は高く、日本においては増加し続けており、新規治療戦略の開発が求められている。

近年、癌に対する代替的な治療法の一つとして免疫療法の有効性が認められてきている。その内の一つ、癌ワクチン療法は従来の化学療法に比べ、より癌に対し特異的で副作用の少ない治療法として注目されている。実際、DNA ワクチンや、ペプチドワクチン、全細胞ワクチンなどを用いた免疫療法によって、腫瘍細胞に選択的に発現している抗原に対し特異的な免疫反応を引き起こすことができている。特に、全細胞ワクチンにおいては様々な腫瘍抗原を同時に標的とできるという点において、その他の手法よりも優れていると言われている。その一方で、いくつかの臨床研究では全細胞ワクチンを用いた治療でも抗腫瘍効果を示せなかった。その一因として腫瘍細胞そのものの免疫原性が低いことや、癌の免疫修飾ということが挙げられる。

癌の免疫修飾という過程において、免疫原性の高い腫瘍細胞は最初の段階（Elimination phase）において免疫細胞の攻撃を受け排除される。その一方で免疫細胞からの攻撃から生き延びるために自らの免疫原性を低下させるような変化が起きる（Equilibrium phase）。そして最後には免疫原性の乏しい細胞集団が優勢となり、転移や浸潤といった能力を獲得していく（Escape phase）とされている。臨床的に診断できる癌は大半がこの Equilibrium ～ Escape phase にいると考えられており、免疫原性が低い状態であるとされている。つまり、癌ワクチン療法の効果を増強するためには腫瘍の免疫原性を変化させる必要があると考えられた。

放射線照射により免疫学的細胞死が誘導されることを利用した、放射線免疫療法といった治療法も報告されている。免疫原性の乏しいマウスの乳がん細胞株 4T1 が、放射線照射後に免疫原性が変化したという報告もある。今回、私は 4T1 細胞株の中にも、予防ワクチンとしての効果を示すような免疫原性を有する細胞集団（4T1-S）が存在することを見いだした。つまり、放射線照射した 4T1-S をワクチンとして接種すると、その後の 4T1-S の生着を予防することができた。そこで、4T1-S の免疫学的制御機構を明らかにすることにより、癌の免疫修飾機構の解明や、癌ワクチン療法の効果改善を目的とし、免疫原性の乏しい 4T1 (4T1-A) と、4T1-S とを比較検討することとした。

【材料と方法】

先行研究で確認された乳がん細胞株 4T1-S と、新たに ATCC より購入した 4T1-A を、免疫原性の違いから確認した。放射線照射した 4T1 細胞でワクチンした 2 週間後に、増殖期にある腫瘍細胞を乳腺に接種し、腫瘍の生着、生存期間を評価した。また、治療ワクチンとしての効果を見るべく、腫瘍接種した後に放射線照射した 4T1 細胞を接種し、腫瘍増殖、生存期間を評価した。次に、4T1-S と 4T1-A の腫瘍形態や増殖率・放射線感受性を比較した。宿主免疫の関与を確認するために免疫不全マウス（BALB/c-*nu/nu*）を用いても予防ワクチンの検討を行った。宿主免疫の

応答性の差を評価するために、腫瘍生着後の所属リンパ節と遠隔リンパ節を摘出し、その大きさ、細胞数を比較した。また、そのリンパ節内の細胞構成をフローサイトメトリーを用いて比較した。ワクチン接種により誘導されたリンパ球に細胞障害性がみられるか、また、ワクチン接種後は免疫記憶を有しているかの検討を行った。最後に網羅的解析としてマイクロアレイ解析を行い、各細胞株における遺伝子発現の差を検討し、フローサイトメトリーを用いた比較も行った。それぞれの手法により 4T1-S において発現が高いことが示された遺伝子群を同定し、その遺伝子の強制発現株を作成後、それを用いた予防ワクチン実験を行った。

【結果】

放射線照射した 4T1-S を予防ワクチンとして接種した場合、4T1-S に対してのみ強い抗腫瘍効果を示し、腫瘍の生着阻害、生存期間の延長が認められた。亜株である 4T1-A にはその効果は認めなかった。治療ワクチンとしての効果は 4T1-S, A ともに認めなかった。培養時の形態には差は認められなかったが、*In vitro* での増殖率は優位に 4T1-S において高かった。一方で、免疫応答性の宿主 (BALB/c) に腫瘍を接種したところ 4T1-A において優位にその増殖率は高く、それに一致して生存期間も短かった。免疫不全マウスを用いた実験ではワクチン効果は認められず、生存期間も 4T1-S において短くなる傾向にあった。4T1-A/S の間に放射線感受性の違いは認められなかった。生体内での免疫応答反応では 4T1-S を接種された群で有意に所属リンパ節の腫大、細胞数の増加が認められ、活性化型 CD8 陽性 T 細胞の割合も増加していた。また、CD11b, Ly6G というミエロイドマーカーを発現している細胞集団の増加も認められた。細胞障害性の検証では今回設定した実験条件において細胞障害性を示すことはできなかったが、ワクチン接種により免疫記憶が誘導されていることは確認された。

マイクロアレイを用いた網羅的解析では 2 つの細胞株において大半の遺伝子発現レベルが同等であった一方で、大きく発現の異なる遺伝子も認められた。その内のいくつかはフローサイトメトリーを用いた解析でも確認された。それらの遺伝子の内、4T1-S で有意に発現の高かった遺伝子を候補として 4T1-A にそれぞれの遺伝子を導入した強制発現株を作成し、同様のワクチン実験を施行したが、ワクチン効果を誘導できたものはなかった。

【考察】

免疫原性の低い乳がん細胞株の中にも免疫原性の高い亜株が存在していることが確認された。この亜株に対しては人工的な遺伝子改変を行っておらず、マイコプラズマの感染も認めなかったことから自発的な変異によりその免疫原性が変化したものと考えられた。このような現象は実験動物の領域では過去にも報告されており、様々な発見を生んでいる。

本研究の結果から、4T1-S の免疫原性は T 細胞依存性であることが示された。また、同時に増加していたミエロイド系細胞も関係していると思われるが、現時点でこの細胞集団が免疫反応の亢進に働いているのか抑制に働いているのかの結論は出せず、追加実験によりその機能を明らかにする必要がある。

また、4T1-S のワクチン効果は同一細胞亜株に対してのみ発現していた。これは 4T1-S 細胞が変異遺伝子由来の癌特異抗原を有しており、それに対する免疫反応がワクチン効果を誘導している可能性を示唆している。今回、マイクロアレイにより候補として挙げられた 5 種類の遺伝子については強制発現株を作成し、ワクチン実験を試みたものの、4T1-S のようなワクチン効果は認められなかった。ワクチン効果が癌特異抗原に由来するものであった場合は、その発現量によらずにワクチン効果が誘導されることもある。その点を解明するために、次世代シーケンサーなどの手法を用い、Point mutation の有無などについても詳細に検討する必要があると思われる。また、4T1-A が宿主免疫を抑制している可能性についても考慮しなくてはならず、この点については CRISPR/cas9 システムなどを用いた Knock out 実験を施行する必要がある。

【結論】

本研究を通して同一細胞株でも免疫原性の違う細胞集団があり、T 細胞依存性の反応が関与していることが明らかとなった。今後さらなる解析を加え、癌の免疫修飾機構を明らかにすることにより、現在行われている免疫療法の効果を増強したり、新しい免疫療法の開発に寄与したりすることができると考える。