

氏名・(本籍)	目片英治(滋賀県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士第230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8年3月22日		
学位論文題目	非免疫原性腫瘍に対するTNF α 遺伝子治療の検討		
	審査委員	主査 教授	瀬戸 昭
		副査 教授	服部 隆則
		副査 教授	小玉 正智

論文内容の要旨

[目的]

自然発生癌、特に消化器癌は、免疫原性が極めて低く、免疫誘導が困難であることが多い。そのため癌の免疫治療では、免疫原性の低い腫瘍を使った実験も考慮に入れる必要がある。免疫原性の低い腫瘍に対して特異的免疫を誘導する方法として、腫瘍側の因子として mutagen 処理によって誘導された高免疫原性腫瘍を用いたり、IFN γ などのサイトカイン処理による腫瘍の抗原性増強作用などが試みられてきた。最近、サイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入する事により腫瘍自体の免疫原性を増強させると同時に、持続的にサイトカインを産生させようという新しいサイトカイン療法が考察され、実用化されつつある。現在までに癌に対する遺伝子治療は動物モデルにおいてIL-2, IL-4, IL-6, IL-7, TNF α , IFN γ , MCSFなどを用いて実験されているが非免疫原性腫瘍に対しての検討は充分でない。そこで我々はTNF α の遺伝子を非免疫原性腫瘍に組み込み、この腫瘍に対する遺伝子治療を試みた。

[方法]

1. マウス

米国NCIより供与され、その後滋賀医科大学動物実験施設にて、継代飼育された生後8~10週齢、体重18~20gのC3H/HeN mammary tumor virus (MTV) (-)を使用した。

2. 腫瘍

腫瘍は、非免疫原性腫瘍としてC3H/HeN由来の線維肉腫である1767-3、高免疫原性腫瘍として1767-3を *in vitro* で N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) を用いて mutagen 処理の上、クローニングして得られたA7腫瘍の2種類の細胞株を用いた。

3. 遺伝子導入

レトロウイルス法を用いてTNF α を腫瘍細胞に導入した。huTNF α gene, NeoR gene が組み込まれたレトロウイルスを産生するA103細胞(札幌医大4内より供与)の培養上清液をウイルス液として用いた。遺伝子導入の確認はELISA法による培養上清のTNF α 濃度の測定にて行った。TNF α 産生株として1767TR2、A7TR3を得た。

4. 免疫誘導能に関する検討

A7、A7TR3、1767TR2それぞれについて、非免疫原性腫瘍の親株に対する免疫誘導能について検討した。*in vivo* においては、Winn assay、ワクチン効果、*in vitro* では ^{51}Cr release assayによって細胞障害活性について検討した。

[結果]

TNF遺伝子導入細胞は組織培養下においては親株同様に増殖するが、マウスの皮下投与においては、7日間前後までは3~5mmの腫瘍を形成したがその後自然消失した。

高免疫原性株A7にTNF α 遺伝子導入して得たA7TR3では、これを用いてマウスを免疫することによって、また *in vitro* でリンパ球を感作することによって親株に対してより強力な免疫

が誘導されることを Winn assay 及び細胞障害試験で確認した。ところが非免疫原性腫瘍である親株に TNF α 遺伝子導入して得た 1767TR2 においては非特異的な効果は認められるが、特異的 T リンパ球は誘導できなかった。

in vivo における親株に対するワクチン効果は TNF α 産生高免疫原性株の A7TR3 が高免疫原性株の A7 よりも強く、1767TR2 はワクチン効果が弱かった。

細胞障害性 T 細胞の誘導能について ^{51}Cr release assay を用いて検討したところ A7 を用いて誘導した群において 30% の細胞障害活性であったのに対して A7TR3 を用いて誘導した群においては 73% と有意に活性の増強が認められた。次に細胞障害活性の特異性について cold target inhibition を用いて検討したところ、1767-3 のみに抑制が認められ、特異的であると考えられた。

[考察]

癌に対する新しい治療として、サイトカインの遺伝子治療に注目した。サイトカインの遺伝子導入はサイトカインを少量持続的に産生するという意味から合理的であり、また腫瘍自体の免疫原性が増強されることにより、ワクチン療法への応用もできる。

我々は腫瘍細胞に TNF α 遺伝子を導入し in vivo における効果 (Winn assay)、ワクチン効果、及び CTL 誘導効果について検討を加えた。そこで、免疫原性の低い腫瘍株 (1767-3 腫瘍) においては、遺伝子導入を行っても著明な免疫誘導効果は認められないという結果を得た。この点については、Rosenberg らも very poorly immunogenic tumor (MCA102) に対して TNF α gene を導入して得た株で親株に対する特異的免疫を誘導しようとしたが、あらかじめ親株によるプライミングがないと免疫誘導は困難であったとしている。我々は mutagen 処理により免疫原性を高めた株が親株と共通抗原性があり免疫誘導に効果的である事を既に報告してきた。そこでこの高免疫原性株 A7 腫瘍に対して TNF α 遺伝子を導入してより効果的な遺伝子治療の可能性を検討したところ、非免疫原性腫瘍に対しても強力な免疫が誘導される事が証明された。同じ系統の腫瘍で、免疫原性の高低により遺伝子治療の効果の比較を行った論文は今までになく、これらの結果は免疫原性の低いとされる消化器癌においても免疫療法やワクチン療法の可能性を強く示唆する。

論文審査の結果の要旨

自然発生腫瘍では実験的誘発腫瘍と異なり腫瘍に対する特異的免疫応答が明かでないことが多く、現在行われている腫瘍の免疫療法のほとんどは非特異的免疫療法である。これは自然発生腫瘍特異抗原の免疫原性が低いためである。免疫原性の低い腫瘍細胞に対して特異的免疫応答を増強する方法としてはこれまで、不活化腫瘍細胞や抗原性を修飾した腫瘍細胞をワクチンとして用いる方法が試みられてきたが、最近、細胞工学的免疫増強法が開発されて注目を集めている。

本研究では、TNF α 遺伝子を導入した腫瘍細胞による免疫療法の有効性をマウスの実験モデルを用いて検討した。腫瘍細胞としては C3H / HeN マウス由来の線維肉腫 1767-3 株 (低免疫原性腫瘍) とこの肉腫株の変異原処理によって得られた A7 株 (高免疫原性腫瘍) を用いた。この両細胞株に huTNF α 遺伝子をレトロウイルス法で導入し、この TNF α 産生腫瘍細胞株の特異的免疫誘導能を検討した。その結果、(1) 低免疫原性腫瘍細胞株に TNF α 遺伝子を導入してもキラー T 細胞誘導能は認められなかったが、すでにこの活性を保有する高免疫原性株では遺伝子導入によって活性が著明に増強された。(2) 低免疫原性腫瘍の遺伝子導入株のワクチン活性は低かったが、高免疫原性腫瘍の遺伝子導入株には強いワクチン活性が認められた。(3) Winn assay において、低免疫原性株に高免疫原性腫瘍の遺伝子導入株を混合することにより、前者の造腫瘍活性を著明に抑制することができた。

以上の結果から、低免疫原性腫瘍に対して、TNF α 遺伝子治療を行う場合には、まず変異

原処理等によって腫瘍細胞の免疫原性を高めたのち遺伝子を導入してワクチンとする必要があると考えられた。この結果は免疫原性が低いとされるヒトの腫瘍においても細胞工学的免疫療法が可能であることを示唆する点で重要であり、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認められる。