

氏名(本籍)	寺本 晃治(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第497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17年3月25日
学位論文題目	Deoxyribonucleic Acid (DNA) Encoding a Pan-Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Analogue Augmented Antigen-specific Cellular Immunity and Suppressive Effects on Tumor Growth Elicited by DNA Vaccine Immunotherapy (Pan-MHC クラスII ペプチドアナログDNAによる腫瘍抗原DNAワクチン増強効果)
審査委員	主査 教授 藤山 佳秀 副査 教授 田中 俊宏 副査 教授 服部 隆則

論文内容要旨

※整理番号	501	(ふりがな) 氏 名	てらもと こうじ 寺本 晃治
学位論文題目	Deoxyribonucleic Acid (DNA) Encoding a Pan-Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Analogue Augmented Antigen-specific Cellular Immunity and Suppressive Effects on Tumor Growth Elicited by DNA Vaccine Immunotherapy (Pan-MHC クラスII ペプチドアナログ DNA による腫瘍抗原 DNA ワクチン増強効果)		
【目的】	<p>悪性腫瘍に対する治療には手術療法、放射線療法、化学療法などがあるが、近年、第四の治療法として癌免疫療法が注目され精力的に研究が行われている。その中で、我々は腫瘍抗原 DNA ワクチン療法に注目した。DNA ワクチンは腫瘍抗原 DNA を含むプラスミド DNA を直接、生体に接種して抗腫瘍免疫応答を賦活させるものである。DNA ワクチンは数々の利点を有するが、一方で DNA ワクチンによって誘導される抗腫瘍免疫応答は弱く、担癌個体の治療モデルでは腫瘍抑制効果は不十分である。抗原特異的な細胞性或いは液性免疫応答を誘導する際にヘルパーT細胞は重要な役割を果たすが、我々は腫瘍抗原 DNA ワクチンにおいてもヘルパーT細胞を活性化することで抗原特異的免疫応答が活性化され抗腫瘍効果が増強されないかと考えた。そこで注目したのが Pan-IA ペプチド(50V54A)で、これは鳩のチトクロームc由来の16個のアミノ酸からなるペプチドを改変した合成ペプチドである。本ペプチドはマウスにおいて広範囲のMHCクラスII分子に結合し、ヘルパーT細胞の機能を活性化させると報告されている。本研究において我々は Pan-IA ペプチドをコードするDNAを腫瘍抗原DNAにワクチンに併用することでヘルパーT細胞機能が活性化され抗腫瘍効果が増強するかマウスモデルで検討した。</p>		
【方法】	<p>(1) DNA ワクチンによって誘導される抗原特異的免疫応答の解析 仮想癌抗原として鶏卵白アルブミン・オブアルブミン(Ovalbumin, OVA)を用いた。OVA cDNA また Pan-IA ペプチドをコードするDNAを pcDNA3.1 のマルチプルクローニングサイトに組み込んだものをDNA ワクチンとした。6~8週齢の雌 C57BL/6 マウスの大腿部に OVA DNA と Pan-IA DNA 各々100μg を筋肉内投与した。対象として OVA DNA100μg のみ、コントロール DNA+Pan-IA DNA 各々100μg、コントロール DNA100μg のみ接種した群などを置いた。DNA ワクチン接種は2週おきに2回行い、最終免疫から2週後に血清中のOVAに対する抗体価をELISA法で測定した。免疫マウス脾細胞のOVA抗原に対する反応性は³Hチミジンを用いた細胞増殖試験で、OVA発現腫瘍細胞に対する細胞傷害性は⁵¹Cr遊離試験で評価した。</p> <p>(2) 担癌マウスに対する腫瘍縮小効果の検討 6~8週齢の雌 C57BL/6 マウスの側腹部にOVA発現腫瘍細胞(E.G7)を2×10^5個、皮下移植し7日後、腫瘍径が5~6mmに達したのを確認し、OVA DNA と Pan-IA DNA 各々100μg を同側大腿部に筋肉内接種した。ワクチン接種は2週おきに2回行い、この間、腫瘍径を測定した。</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。
 2. ※印の欄には記入しないこと。

(3) エフェクター細胞、腫瘍浸潤リンパ球の機能解析

DNA ワクチンにより腫瘍が縮小したマウスでは脾臓を摘出し、脾細胞中の CD4 陽性または CD8 陽性細胞を *in vitro* で除去した後、細胞増殖試験、細胞傷害試験を行いエフェクター細胞の解析をした。6~8 週齢の雌 C57BL/6 マウスの側腹部に OVA 発現腫瘍細胞(E.G7)を 5×10^5 個、皮下移植し 10 日後、腫瘍の生着を確認し OVA DNA と Pan-IA DNA 各々 $100 \mu\text{g}$ を同側大腿部に筋肉内接種した。7 日後、腫瘍を摘出し、組織中のインターフェロン γ 陽性 CD4 陽性または CD8 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察した。また腫瘍浸潤リンパ球の内、OVA 特異的細胞傷害性 T リンパ球の割合をテトラマーを用いたフローサイトメトリーで解析した。

【結果】

(1) OVA DNA で免疫したマウスの血清中には OVA に対する抗体価の上昇を認めたが Pan-IA DNA 共接種による抗体産生の増強効果は認めなかった。免疫マウス脾細胞の標的抗原に対する反応増殖性及び標的細胞に対する細胞傷害性は OVA DNA + Pan-IA DNA 群で他群に比べて有意に増強していた。

(2) 担癌マウスに対する腫瘍縮小効果は OVA DNA + Pan-IA DNA 共接種群でのみ認めた。同群では 9 匹中 6 匹のマウス (66.7%) で腫瘍は完全に消失し生存期間は他群に比べ有意に延長した。

(3) OVA DNA + Pan-IA DNA 共接種群で腫瘍が完全に消失したマウスでは標的細胞に対する反応性及び細胞傷害性には CD8 陽性細胞が関与していた。OVA DNA + Pan-IA DNA 共接種群では腫瘍組織内にはインターフェロン γ を産生する CD4 陽性または CD8 陽性細胞が他群に比べ著明に増加していた。また腫瘍浸潤リンパ球のうち OVA 特異的細胞傷害性 T リンパ球の割合は OVA DNA + Pan-IA DNA 共接種群で他群に比べ有意に増加していた。

【考察】

OVA DNA に Pan-IA DNA を共接種することで 1 型ヘルパー T 細胞機能が活性化され抗原特異的な細胞性免疫応答が誘導された。誘導された抗腫瘍免疫応答は担癌マウスの腫瘍を消失させるほど強力なものであり、エフェクター細胞は CD8 陽性細胞であった。この背景には 1) OVA DNA + Pan-IA DNA の共接種で CD4 陽性細胞が活性化されインターフェロン γ の産生が亢進し、これによって OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導が増強した。2) 腫瘍組織内の CD4 陽性または CD8 陽性細胞の産生するインターフェロン γ が増加し、これにより抗腫瘍効果はさらに増強した、の 2 点が考えられた。

【結論】

腫瘍抗原 DNA ワクチンに Pan-IA DNA を共接種することでヘルパー T 細胞機能が活性化され抗腫瘍効果が増強した。本マウスモデルは今後の DNA ワクチンを用いた癌免疫療法の開発に有用であると思われる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	501	氏名	寺本 晃治
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>腫瘍抗原 DNA ワクチンを用いた癌免疫療法において、いかにその抗腫瘍効果を高めるかが課題となっている。本研究は、Pan-IA ペプチド (50V54A) がマウスで広範囲の MHC class II 分子に結合しヘルパーT 細胞機能を活性化することに着目し、Pan-IA ペプチドをコードする DNA を腫瘍抗原 DNA ワクチンに併用することによる抗腫瘍効果の増強作用を、Ovalbumin (OVA) を仮想癌抗原とした実験モデルで検討したものである。</p> <p>その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) OVA-DNA + Pan-IA DNA 共接種により、脾細胞の OVA に対する反応増殖性及び OVA 発現腫瘍細胞 (E.G7) に対する細胞傷害性が増強すること 2) E.G7 を皮下移植した担癌マウスへの抗腫瘍効果が共接種で得られ (66.7%で腫瘍が完全に消失)、生存期間が有意に延長すること 3) 共接種によって腫瘍が消失したマウスにおいて、脾細胞の標的細胞反応性と細胞傷害性に CD8 陽性細胞が関与し、腫瘍組織内にインターフェロンγ 産生 CD4 陽性細胞・CD8 陽性細胞が増加し、腫瘍浸潤リンパ球中の OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞の割合が増加することを明らかにした。 <p>本研究は、DNA ワクチンに Pan-IA DNA を共接種することで 1 型ヘルパーT 細胞機能が活性化され抗原特異的な細胞性免疫応答が誘導されることを示したものであり、今後の DNA ワクチンによる癌免疫療法の開発に大きく寄与するものと考えられ、博士 (医学) の学位を授与するに値すると認める。</p>			
(平成17年 2 月 25 日)			