

氏名・(本籍)	澤井 聡 (滋賀県)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第314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11年3月26日
学位論文題目	合成ペプチドを用いたMUC-1特異的細胞障害Tリンパ球 (CTL) の誘導
	審査委員 主査 教授 上原 正 巳
	副査 教授 瀬戸 昭
	副査 教授 小玉 正 智

## 論文内容の要旨

### 【目的】

MUC-1分子は重要な腫瘍抗原の1つであり、胆癌個体に強い特異的抗腫瘍免疫応答を誘導しうることが知られている。今回、ヒト末梢血単核球 (PBMC) からMUC-1合成ペプチドを用いてCTLの誘導を試みた。CTL誘導に関与する抗原提示細胞 (APC) のMUC-1提示能とCTLの抗原特異性を解析し臨床応用の可能性について検討した。

### 【方法】

MUC-1コア蛋白上の繰り返し配列に従った30アミノ酸 (GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSPDTR) およびMAGE-3のHLA-A2結合ペプチド (FLWGPRLV) を合成した。

PBMCからGM-CSFおよびIL-4により樹状細胞 (DC) を誘導し同細胞のMUC-1抗原提示能を検討した。合成ペプチドまたはMUC-1高発現株T-47D cell lysate刺激DCの表面結合ペプチドを酸溶出し、MUC-1コアペプチドの存在をSpot Testを用いて抗MUC-1抗体SM3に対する反応性により解析した。

肺癌患者PBMCをMUC-1ペプチド刺激後、IL-7存在下に培養した。その後、7日毎にペプチド刺激自己PBMCとIL-7、IL-2存在下に共培養しCTLを誘導した。CTLのphenotype はFACScanにて解析した。また、CTLの抗原特異性はMUC-1発現株T-47D、MUC-1欠損株SBC-2およびそのMUC-1遺伝子導入株SBC-Mを標的細胞とした<sup>51</sup>Cr release assayにて評価した。2群間の統計処理はt検定で行い、危険率 $p < 0.05$ をもって統計的有意とした。

### 【結果】

#### 1. APCのMUC-1抗原提示能

3個体のPBMCから誘導したDC-1-3 (すべてに共通するHLAハプロタイプなし) に対するSpot Testの結果、他のペプチド (MAGE-3) 刺激DC-2からの溶出ペプチドはSM3に対して無反応であったのに対して、MUC-1ペプチド刺激DCからの溶出ペプチドはDC-1-3いずれも陽性反応を示した。また、T-47D cell lysate刺激でも同様の結果が認められた。

#### 2. CTLの抗原特異性の解析

2個体の進行肺癌患者よりそれぞれCTL-1、CTL-2を誘導した。5回刺激CTL-1は、大部分がCD3陽性細胞でCD8優位であった。さらに8回まで刺激を繰り返してもそのpopulationに変化はみられなかった。CTL-2も同様にCD8優位なCTLであった。

5回刺激CTL-1は、T-47Dに対して強い細胞傷害活性を示したが、SBC-2とそのSBC-Mに対しては両者間に有意差を認めなかった。8回刺激CTL-1は、SBC-2に対して全く傷害活性を示さなくなったが、SBC-Mに対しては強い傷害活性を示した。また、CTL-2は5回刺激で有意なMUC-1特異性を示した。8回まで刺激を繰り返すとMUC-1特異性はさらに向上した。

### 【考察】

誘導されたCTLは、MUC-1欠損親株に比してそのMUC-1遺伝子導入株に対してより強い細胞傷害活性を示したことからMUC-1特異的CTLであることが証明された。しかも、刺激を繰り返すことでさらに高い特異性を持ったCTLが誘導された。また、このCTLが免疫系の機能低下が予想される進

行肺癌患者のPBMCから誘導されたことは本法の臨床応用を考慮する上で意義があると考えられる。

Spot Test においてMUC-1ペプチド刺激DCからの溶出ペプチドのみが陽性反応を示した。このことはMUC-1エピトープ部分を認識するSM3に反応するペプチドが同細胞の表面上に存在することを意味しており、CTL誘導においてDCがAPCとして機能し得ることが示唆された。さらに同ペプチドはHLAハプロタイプに無関係に抗原提示されることも明らかになった。この事実はMUC-1コア上のエピトープ部分がCTLによりMHC非拘束性に認識されるというこれまでの報告と一致する。今回は抗原提示能の強いDCを用いてAPCのMUC-1提示能を証明したが、PBMCでCTL誘導が可能であったことからPBMC内にもMUC-1ペプチドを抗原提示できるAPCが存在すると考えられた。また、MUC-1高発現株のcell lysate刺激でもDCが合成ペプチド刺激と同じエピトープを抗原提示していたことは、MUC-1発現腫瘍組織から抽出したcell lysate刺激でもMUC-1特異的CTLの誘導が可能であると考えられた。

#### 【結論】

PBMCからMUC-1ペプチドを用いた簡便な方法でMUC-1特異的CTLの誘導が可能であった。その抗原提示は、HLAハプロタイプに関係なくDCを含むAPCによってなされていると考えられた。本法によるCTLの誘導は自己の細胞を用いたものであり、腫瘍に対する養子免疫療法の臨床応用に適している。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト末梢血単核球を用いて、重要な腫瘍抗原MUC-1に対する特異的細胞傷害Tリンパ球（CTL）の誘導を試みている。CTL誘導に関与する抗原提示細胞のMUC-1提示能とCTLの抗原特異性を解析し、以下の結果を得た。

1. MUC-1ペプチドパルス樹状細胞の細胞表面上にMUC-1エピトープの存在が証明された。
2. その抗原提示はHLAハプロタイプに関係なく認められた。
3. 誘導されたCTLはMUC-1特異的細胞傷害活性を示した。しかも、刺激培養を繰り返すことでその抗原特異性はさらに向上した。

これらの成果は本法によるCTLを用いた養子免疫療法の臨床応用の可能性を示すものであり、今後の癌免疫療法の発展に貢献するものと考えられる。よって、博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

なお、本学位申請者は、平成11年2月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。