

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名：新規癌胎児性抗原 Glypican-3 遺伝子導入 ES 細胞由来の樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法モデルの研究
(Cancer immunotherapy using embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing an onco-fetal antigen glypican-3)

著者名： 本村 裕

Yutaka Motomura

指導教官名： 馬場 秀夫 教授

西村 泰治 教授

審査委員名：ウイルス制御分野担当教授

滝口 雅文

細胞病理学担当教授

竹屋 元裕

皮膚機能病態学分野担当教授

尹 浩信

2006年3月

目次

1	要旨	4
	Summary	5
2	発表論文リスト	6
3	謝辞	7
4	略語一覧	8
5	研究の背景と目的	8
5-1)	HLA分子によるT細胞への抗原提示	8
	図 1. MHCクラスI分子による抗原ペプチドのCD8 ⁺ 細胞傷害性T細胞(CTL)への提示	9
	図 2. MHCクラスII分子による抗原ペプチドのCD4 ⁺ ヘルパーT細胞への提示	11
5-2)	抗腫瘍免疫のあらまし	13
	図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化	14
5-3)	樹状細胞と抗腫瘍免疫応答	15
5-4)	ES細胞由来樹状細胞を用いた免疫制御療法の開発	15
	図 4. 遺伝子改変ES細胞から分化誘導させた樹状細胞を用いた腫瘍免疫の増強	16
5-5)	癌胎児性抗原glypican-3	17
	① GPC3 の機能	17
	② 腫瘍マーカーとしてのGPC3	17
	図 5. ELISA法による血清中のGPC3 蛋白の検出(ref. 31)	18
	③ 腫瘍拒絶抗原としてのGPC3	18
5-6)	本研究の目的	20
6	実験方法	21
6-1)	マウス	21
6-2)	使用した細胞	21
6-3)	GPC3 遺伝子導入マウスES細胞由来の樹状細胞(ES-DC-GPC3)の作製	21
6-4)	RT-PCRとNorthern blot	22
6-5)	ペプチド、リコンビナント蛋白、サイトカイン	22
	表 1. 本研究において使用したマウスGPC3 由来の合成ペプチド	23
6-6)	細胞表面マーカーの解析	24
6-7)	GPC3 蛋白の発現解析	24
6-8)	マウス骨髄細胞由来の樹状細胞(BM-DC)の作製	24
6-9)	GPC3 特異的CTLの誘導と細胞傷害活性の測定	25
6-10)	ELISPOTアッセイ	25

6-11) GPC3 特異的CTLエピトープの検討	25
6-12) 腫瘍増殖抑制実験	25
6-13) in vivoにおけるCD4 ⁺ T細胞とCD8 ⁺ T細胞の除去	26
6-14) 腫瘍組織の組織学的解析	26
6-15) 統計学的解析	26
7 実験結果	27
7-1) 遺伝子改変ES細胞由来の樹状細胞(ES-DC-GPC3)クローンの単離	27
図 7. ES-DC-GPC3 におけるGPC3 mRNAの発現	28
図 8. ES-DC-GPC3 の表面マーカーの解析	28
7-2) B16 メラノーマ細胞株由来のサブクローンF10 細胞におけるGPC3 の発現	29
図 9. 様々な癌細胞におけるGPC3 mRNAの発現解析	29
図 10. B16-F1, F10, MCA205, MCA-GPC3 におけるGPC3 蛋白の発現解析	30
7-3) ES-DC-GPC3 によるGPC3 特異的なCTLの活性化	31
図 11. ES-DC-GPC3 によるGPC3 特異的CTLの感作	32
7-4) ES-DC-TT2 とES-DC-GPC3 におけるGPC3 特異的なCTLの誘導能の比較	33
図 12. ES-DC-GPC3 とES-DC-TT2 におけるGPC3 特異的CTLの誘導能の比較	33
7-5) GPC3 特異的なCTLが認識するエピトープペプチドの同定	34
図 13. IFN- γ ELISPOTアッセイによるGPC3 特異的CTLエピトープの決定	34
7-6) ES-DC-GPC3 による腫瘍拒絶実験	35
図 14. ES-DC-GPC3 の予防的投与による抗腫瘍効果	36
7-7) 抗腫瘍効果におけるES-DC-GPC3 とBM-DCとの比較	36
図 15. ES-DC-GPC3 とGPC3 ペプチドパルスBM-DCあるいはGPC3 蛋白パルスBM-DCとの抗腫瘍効果の比較	36
7-8) 腫瘍細胞を静脈内投与したマウス癌転移モデルにおけるES-DC-GPC3 の治療効果	37
図 16. B16-F10 細胞を用いた転移モデルにおけるES-DC-GPC3 の効果	38
7-9) ES-DC-GPC3 による抗腫瘍効果に関連するエフェクター細胞の同定	38
図 17. ES-DC-GPC3 による抗腫瘍免疫の誘導におけるCD4 ⁺ T細胞とCD8 ⁺ T細胞の関与	39
図 18. 腫瘍周囲へのCD4 ⁺ T細胞ならびにCD8 ⁺ T細胞の浸潤	40
8 考察	41
9 結論	43
10 参考文献	44

1 要旨

【背景】 悪性腫瘍に対する効果的な免疫療法を確立するためには、抗腫瘍免疫の標的となる有用な腫瘍抗原を同定し、さらに腫瘍抗原に対する免疫応答を強力に賦活する技術を開発することが不可欠である。我々はマウス ES 細胞に腫瘍抗原の遺伝子を導入し、この遺伝子導入 ES 細胞から *in vitro* で樹状細胞(ES-DC)へ分化させることにより、腫瘍抗原発現樹状細胞を作製する技術を開発した。我々は、一方で癌胎児性抗原である glypican-3 (GPC3)が肝細胞癌およびメラノーマに特異的に高発現することを発見し、腫瘍マーカーとして有用であることを報告している。さらに、BALB/c マウスを GPC3 由来のペプチドで免疫することにより GPC3 を強制発現させた腫瘍細胞に対する拒絶効果が得られることを報告してきた。

【目的】 本研究は、GPC3 を遺伝子導入した ES-DC を用いて、GPC3 を自然発現するメラノーマに対して、抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導できるか否かを検討することを目的とする。

【方法と結果】 マウスES細胞にマウスGPC3 遺伝子を電気穿孔法にて導入し、これをDCに分化させES-DC-GPC3 を作製した。GPC3 の発現はRT-PCRにて確認した。このES-DC-GPC3 を腹腔内投与し、CTL誘導能や腫瘍増殖抑制効果を検討した。 ES-DC-GPC3 で免疫したマウスから採取した脾細胞を*in vitro*でES-DC-GPC3 で再刺激した後、⁵¹Cr放出試験およびELISPOTを行った結果、GPC3 特異的な細胞傷害性T細胞の誘導が確認された。ES-DC-GPC3 を投与したマウスは、GPC3 を発現しないMCA205 あるいはB16-F1 を皮下移植しても拒絶できなかったが、GPC3 陽性のMCA-GPC3 とB16-F10 に対しては拒絶能を獲得していた。自己免疫現象は観察されなかった。また、*in vivo*において抗体を用いてCD4⁺またはCD8⁺T細胞を除去すると、腫瘍拒絶効果が見られなかった。さらに、移植腫瘍の組織学的な解析を行なったところ、MCA-GPC3 およびB16-F10 の腫瘍組織の周囲に、CD8⁺T細胞ならびにCD4⁺T細胞の浸潤が認められた。さらに、B16-F10 細胞を用いた転移モデルにおいても、マウスの尾静脈から腫瘍細胞を注入した3日後と10日後にES-DC-GPC3 を腹腔内投与することにより、肺・肝転移を有意に抑制することができた。

【考察】 我々は、以前 ES 細胞にモデル抗原(卵白アルブミン: OVA)を遺伝子導入し、これを樹状細胞へ分化させ、OVA 発現 ES 細胞由来樹状細胞を用いて、抗腫瘍免疫応答を誘導することを示した。さらに本研究により、メラノーマや肝細胞癌において高発現する新規癌胎児性抗原である GPC3 を ES-DC に発現させることにより GPC3 特異的免疫応答を誘導できたことから、腫瘍抗原を発現する ES-DC による癌免疫療法の可能性を示すことができた。

【結論】 以上の結果より、癌胎児性抗原 GPC3 遺伝子を導入した ES-DC が、GPC3 を発現するマウスの腫瘍細胞株に対して、自己免疫現象を伴うことなく抗原特異的な抗腫瘍免疫を誘導できることが証明された。

Summary

We have recently established a method to generate dendritic cells (DC) from mouse embryonic stem (ES) cells. By introducing exogenous genes into ES cells and subsequently inducing differentiation to DC (ES-DC), we can now readily generate transfectant ES-DC expressing the transgenes. A previous study revealed that the transfer of genetically modified ES-DC expressing a model antigen, ovalbumin (OVA), protected the recipient mice from a challenge with an OVA-expressing tumor. In the present study, we examined the capacity of ES-DC expressing mouse homologue of human glypican-3 (GPC3), a recently identified oncofetal antigen expressed in human melanoma and hepatocellular carcinoma (HCC), to elicit protective immunity against GPC3-expressing mouse tumors. CTLs specific to multiple GPC3 epitopes were primed by the *in vivo* transfer of GPC-3-transfectant ES-DC (ES-DC-GPC3). The transfer of ES-DC-GPC3 protected the recipient mice from subsequent challenge with B16-F10 melanoma, naturally expressing GPC3, and also with GPC3-transfectant MCA205 sarcoma. The transfer with ES-DC-GPC3 was also highly effective against pre-intravenously injection model of B16-F10. No harmful side effects such as autoimmunity were observed for these treatments. The depletion experiments and immunohistochemical analyses suggest that both CD8⁺ and CD4⁺ T cells contributed to the observed anti-tumor effect. In conclusion, the usefulness of GPC3 as a target antigen for anti-melanoma immunotherapy was thus demonstrated in the mouse model using the ES-DC system. Human DC expressing GPC3 would be a promising means for therapy of melanoma and HCC.

2 発表論文リスト

1. Y. Motomura, S. Senju, T. Nakatsura, H. Matsuyoshi, S. Hirata, M. Monji, H. Komori, D. Fukuma, H. Baba and Y. Nishimura Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* in press
2. H. Matsuyoshi, S. Hirata, Y. Yoshitake, Y. Motomura, D. Fukuma, A. Kurisaki, T. Nakatsura, Y. Nishimura, and S. Senju Therapeutic effect of α -galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Sci.* 96:889-96 2005.
3. D. Fukuma, H. Matsuyoshi, S. Hirata, A. Kurisaki, Y. Motomura, Y. Yoshitake, M. Shinohara, Y. Nishimura, and S. Senju Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 335: 5-13, 2005
4. M. Miyazaki*, T. Nakatsura*(*Equal contribution), K. Yokomine, S. Senju, M. Monji, S. Hosaka, H. Komori, Y. Yoshitake, Y. Motomura, M. Minohara, T. Kubo, K. Ishihara, T. Hatayama, M. Ogawa, and Y. Nishimura DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Cancer Sci.* 96: 695-705, 2005.
5. Nakatsura T., Yoshitake Y., Senju S., Monji M., Komori H., Motomura Y., Hosaka S., Beppu T., Ishiko T., Kamohara H., Ashihara H., Katagiri T., Furukawa Y., Fujiyama S., Ogawa M., Nakamura Y., and Nishimura Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 306: 16-25, 2003.
6. Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Beppu, T., Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H., and Nishimura, Y.: Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* in press

3 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部感染・免疫学講座免疫識別学分野の西村泰治教授ならびに消化器外科分野の馬場秀夫教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導を頂いた千住覚助教授ならびに中面哲也助手に深く感謝いたします。また、当教室での研究の機会を与えて頂いた小川道雄前教授に深く感謝いたします。

4 略語一覽

BM-DC; bone marrow cell-derived dendritic cell
cDNA; complementary DNA
CTL; cytotoxic T lymphocyte
DC; dendritic cell
DNA; deoxyribonucleic acid
ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT; enzyme-linked Immunospot
ES cell; embryonic stem cell
ES-DC; embryonic stem cell-derived dendritic cell
GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor
H&E; hematoxilin and eosin
HCC; hepatocellular carcinoma
HLA; human histocompatibility leukocyte antigens
IFN; interferon
Ig; immunoglobulin
IL; interleukin
i. p. ; intraperitoneal injection
i. v. ; intravenous injection
IRES; internal ribosomal entry site
LN; lymph node
MHC; major histocompatibility complex
MLR; mixed lymphocyte reaction
mAb; monoclonal antibody
mRNA; messenger ribonucleic acid
neo-R; neomycin resistant
NK ; natural killer
OVA; ovoalbumin
PEF; primary embryonic fibroblast
rm; recombinant mouse
RT-PCR; reverse transcription-PCR
TCR; T cell receptor
TNF; tumor necrosis factor

5 研究の背景と目的

5-1) HLA 分子による T 細胞への抗原提示

主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) によりコードされる MHC 分子は、細胞内で抗原が分解されてできたペプチドを分子の先端に結合して細胞表面に発現する。T 細胞は抗原を直接認識することはできず、細胞表面に発現する抗原ペプチドと MHC 分子を複合体として認識する。MHC 分子にはクラス I とクラス II の 2 種類があり、それぞれ細胞内での局在が異なる抗原に由来するペプチドを機能の異なる T 細胞に提示して活性化を促す(1)。ヒトの MHC は白血球の血液型として発見されたために、ヒト組織適合性白血球抗原 (human histocompatibility leukocyte antigen; HLA) 系と呼ばれる。

$\alpha\beta$ 型 T 細胞レセプター (TCR) を発現する T 細胞のうち、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、HLA クラス I 分子に結合する性質を持つ CD8 分子を発現する。HLA クラス I 分子は主に核や細胞質の蛋白質に由来するペプチドを結合して、すべての有核細胞と血小板の表面に発現する。CTL は TCR を介して自己の HLA クラス I 分子に結合した、ウイルスあるいは細菌などの非自己蛋白質に由来するペプチドを認識して感染細胞を破壊する。さらに、腫瘍細胞の表面に発現する HLA クラス I 分子に結合した自己あるいは非自己ペプチドを認識した CTL は腫瘍細胞を破壊する(2)。また HLA クラス I 分子は、特定のウイルスあるいは細菌に感染した細胞、あるいは腫瘍細胞を破壊する性質をもつ ナチュラルキラー (NK) 細胞のレセプター (killer-cell inhibitory receptor; KIR) に結合し、NK 細胞の細胞傷害活性を抑制する(図 1C) (3)。

HLA クラス I 分子に結合するペプチドは、細胞質蛋白質にユビキチンが複数結合した後に、プロテアソーム (proteasome) あるいは LMP (large multifunctional protease) と呼ばれる蛋白分解酵素の複合体によりエネルギー (ATP) 依存性に分解されてできたものである(4, 5)。最近、細胞質内で mRNA が翻訳されてきたばかりの蛋白質のうち 30%にも及ぶものが直ちにこの経路に入ることが示されている。さらにペプチドは、HSP70 などのシャペロンにより小胞体に運搬され、TAP (transporter associated with antigen processing) 分子により、エネルギー (ATP) 依存性に小胞体の内腔へと導かれ、そこで HLA クラス I 分子のペプチド収容溝に結合する(図 1) (6)。このペプチド収容溝には、A-F ポケットと呼ばれる 6 個のポケットが存在する。MHC クラス I 結合ペプチドは 9 個のアミノ酸 (N 末端側より position-1(P1)~P9 と呼ばれる。) により構成されていることが多く、ペプチドは溝の両端からはみ出すことなく納まっている(図 1A, B) (7-9)。MHC クラス I 分子で多型を示すアミノ酸残基の多くは、分子の先端にあるペプチドを収容する溝を構成する $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメインに集中している。このような多型によりペプ

図 1

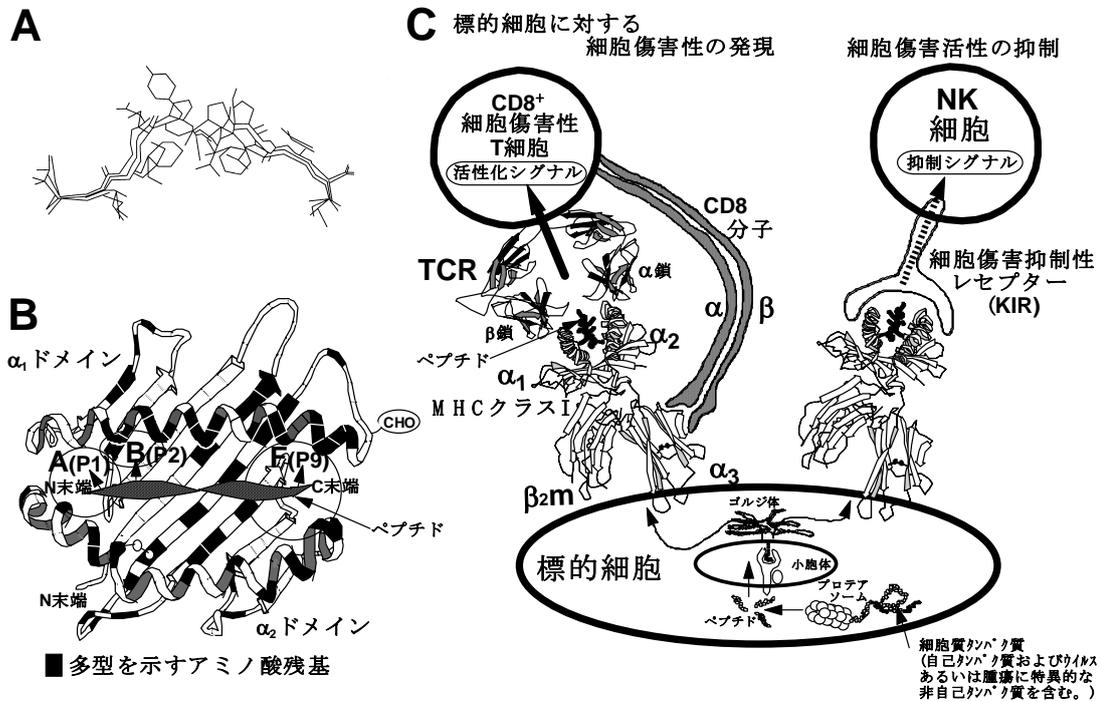


図 1. MHCクラスI分子による抗原ペプチドのCD8⁺細胞傷害性T細胞 (CTL) への提示

A. MHCクラスI (ヒトのHLA-A2分子) に結合性を示す、ウイルス由来の5種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドはP1~P9で示した9個のアミノ酸からなり、両端 (NおよびC末端) のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖がMHCクラスIのペプチド収容溝にある3つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基(P3~P7)の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がり TCRにより認識される。

B. MHCクラスI (HLA-A2分子) のペプチド収容溝を、TCR側より見た図。溝は相対する2つの α ヘリックス(右巻きらせん)構造に囲まれている。丸はA, B およびFポケットの位置を示し、() 内の数字に対応するペプチド上のアンカーアミノ酸残基の側鎖がここに収容される。黒塗りの部分はMHCクラスI (ヒトのHLAクラスI) で多型を示すアミノ酸残基を示す。CHOは糖鎖を示す。

C. MHCクラスIにより提示された抗原ペプチドの認識によるCTLの活性化およびNK細胞の細胞傷害活性の抑制。 α_1 , α_2 , α_3 および β_2m は、それぞれMHCクラスIの細胞外ドメインおよび β_2 ミクログロブリンを表し、KIRは細胞傷害抑制性レセプター(killer-cell inhibitory receptor)を表す。

チド収容溝の形状が変化するため、MHCクラス I 分子に結合可能なペプチドの構造もMHCクラス I 分子ごとに、ペプチドのNあるいはC末端寄りのアミノ酸には一定の傾向（MHCクラス I 結合モチーフ）が認められる(10, 11)。これらのポケットとカッコ内に示した抗原ペプチド上の特定の位置に存在するアンカーアミノ酸の側鎖の大きさ、極性（親水性あるいは疎水性）および荷電などの性質が適合した場合に、ペプチドはMHCクラス I に結合する。MHCクラス I 結合性ペプチドは中央部で折れ曲がりペプチド収容溝からせり上がっており、この部分のアミノ酸の側鎖がTCRにより認識される。この状況は特にアミノ酸の数が10個以上のペプチドで顕著である。

一方、HLA クラス II 分子に結合する性質を持つ CD4 分子を発現する T 細胞は、主に樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、単球、B 細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞（antigen presenting cell; APC）に限定して発現する HLA クラス II 分子に結合した非自己抗原ペプチドを認識して種々のサイトカインを分泌する。サイトカインは B 細胞に増殖と形質細胞への分化を誘導して抗体産生を促進したり、T 細胞の分化と増殖および抗原提示細胞の活性化を促したりして、細胞内の微生物の排除を促進する。抗原提示細胞は HLA クラス I 結合性ペプチドの提示のみならず、HLA クラス II 分子により提示される抗原のプロセッシングと提示という重要な機能を担っている。

図 2C に示すように、抗原提示細胞は細胞外から抗原を取り込み、これをエンドソーム内の種々の酵素により還元および分解してペプチドを作る。さらにペプチドは MHC (MHC class II compartments) や CIIV (class II vesicles) と呼ばれる別の細胞内コンパートメントで、HLA クラス II 分子に結合して細胞表面に発現する。MHC クラス II 分子のペプチド収容溝には、MHC クラス I 結合ペプチドと比較して長い 10~30 数個（多くは 15 個前後）のアミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している(12, 13)。MHC クラス I ではペプチドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、MHC クラス II では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している。ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、MHC クラス I と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、1 アミノ酸残基進むごとに側鎖の方向が回転するため、ペプチド上で MHC クラス II に向かう複数の（通常 4~5 個）アミノ酸残基の側鎖がアンカーとなる。これらが MHC クラス II 上のペプチド収容溝に存在する 4~5 個のポケットに、うまく収容される形をしたアミノ酸の組み合わせ（MHC クラス II 結合モチーフ）になっている場合に、ペプチドは MHC クラス II に結合する(13)。ペプチド上の最も N 末端側のアンカー残基の位置を position 1 (P1) として C 末端方向に各アミノ酸残基に番号を付けると、通常 P1, P4, P6 (P7) および P9 の各アミノ酸残基の側鎖が MHC クラス II 分子の溝に向かいアンカー残基となっていることが多い（図 2A, B）。さらに、これらのアンカー残基の間に介在している残基の側鎖が TCR により認識される。

図 2

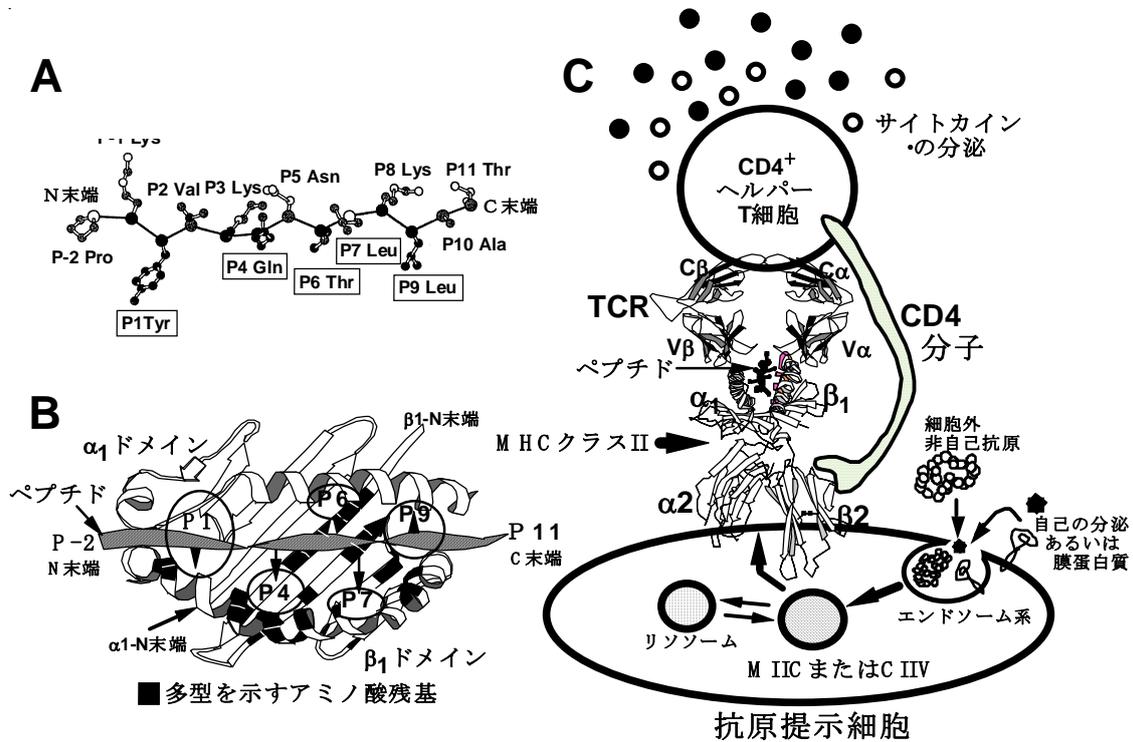


図 2. MHCクラスII分子による抗原ペプチドのCD4⁺ヘルパーT細胞への提示

A. MHCクラスII分子 (HLA-DR1) により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド (HA306-318)の構造を示す。MHCクラスII分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最もN末端側のTyrの位置をposition 1 (P1)としてC末端方向に番号を付けた場合の、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。またアミノ酸の側鎖が、MHCクラスII分子のペプチド収容溝の5個のポケットに収容されるアミノ酸残基を四角で囲んで示した。ペプチド結合で結ばれたペプチドの主鎖を黒の実線で示す。各アミノ酸上の黒く塗りつぶした原子はMHCクラスII分子に接している原子を、白い原子はMHCクラスII分子とは接触していない原子を示す。B. HA306-318を結合したMHCクラスII分子を真上 (TCR側)より見た立体構造を示す。円は、HA306-318ペプチド上でMHCクラスII分子との結合に重要な5個のアンカーアミノ酸残基 (P1, P4, P6, P7およびP9)の側鎖を収容すべく、MHCクラスII分子のペプチド収容溝に存在するポケットの位置を示す。黒塗りの部分は、ヒトの代表的なMHCクラスIIであるHLA-DR分子において多型性を示すアミノ酸残基を示す。C. 細胞外から抗原提示細胞に取り込まれた抗原がペプチドへと分解され、MHCクラスII分子と結合してCD4⁺T細胞に提示される様子を示す。α₁, α₂, β₁およびβ₂は、MHCクラスII分子の細胞外ドメインを示す。TCR部分のα, βはTCRのα鎖とβ鎖を、またCとVは定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

HLA 分子は、たとえ非自己抗原が存在しても、その大多数は正常な自己蛋白に由来するペプチドを結合して細胞表面に発現しており、これを認識する T 細胞は胸腺における T 細胞の分化過程で消滅(クローン欠失)しているか、末梢で不活性化されアナジーの状態になるなどして免疫寛容(トレランス)の状態にあり、応答を示すことはない。しかし、細胞表面に数千~数万個発現している HLA クラス I 分子のうちの数個~数十個が非自己抗原ペプチドを結合していると、CTL はこれを認識して細胞傷害活性を発現する。一方、抗原提示細胞表面の HLA クラス II 分子のうち数十~数百個が非自己抗原をペプチドを結合すると、CD4 陽性ヘルパー T 細胞がこれを認識して免疫応答を開始する。

5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし

「悪性腫瘍に対して免疫系の応答は有効か」という疑問に対する、現時点での答えは以下のとおりであろう。腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)中に腫瘍に反応性の T 細胞が多いこと、癌患者の末梢血に腫瘍抗原に対する免疫応答が検出されることなどから、免疫系は腫瘍と戦ってはいるが、腫瘍を排除するには至っていない。

従来の免疫強化療法は、非特異的に活性化された免疫応答のなかに抗腫瘍効果を期待したものであった。これに対し近年は、腫瘍に特異的な免疫応答をいかに増強するかが研究の焦点となっている。この分野では 1) HLA により提示される腫瘍拒絶抗原ならびにペプチドの同定、および 2) これを認識する T 細胞の活性化方法の開発、が重要な問題となっている。近年の基礎免疫学の進歩により多くの腫瘍拒絶抗原が発見され、T 細胞活性化のメカニズムも次第に明らかとなり、腫瘍免疫学は新しい局面を迎えつつある。

前述したように腫瘍拒絶抗原が細胞内でペプチドへと分解され HLA クラス I 分子により腫瘍細胞の表面に発現されると、主に CTL がこれを認識し腫瘍細胞を傷害する。ただし、多くの腫瘍細胞は抗原を一度も認識したことのないナイーブ T 細胞の活性化に不可欠な CD80(B7-1)/CD86(B7-2)などの共刺激分子を発現しておらず、直接 CTL を活性化することは出来ない。図 3 に示したように CD80/86 分子を発現する最もすぐれた抗原提示細胞である樹状細胞は腫瘍抗原を貪食し、腫瘍拒絶抗原ペプチドを HLA 分子に結合して、ナイーブ CD4 陽性ヘルパー T 細胞および CD8 陽性 CTL に提示できる。ナイーブ T 細胞が活性化されてエフェクター T 細胞になると、腫瘍細胞のように共刺激分子を発現していなくても T 細胞レセプター (TCR) が認識可能な HLA・ペプチド複合体を発現していれば、T 細胞はこれを認識して免疫応答を示す(14)。この際に CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞は IL-2, IFN- γ , TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T 細胞、B 細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する (図 3)。活性化された B 細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

図 3

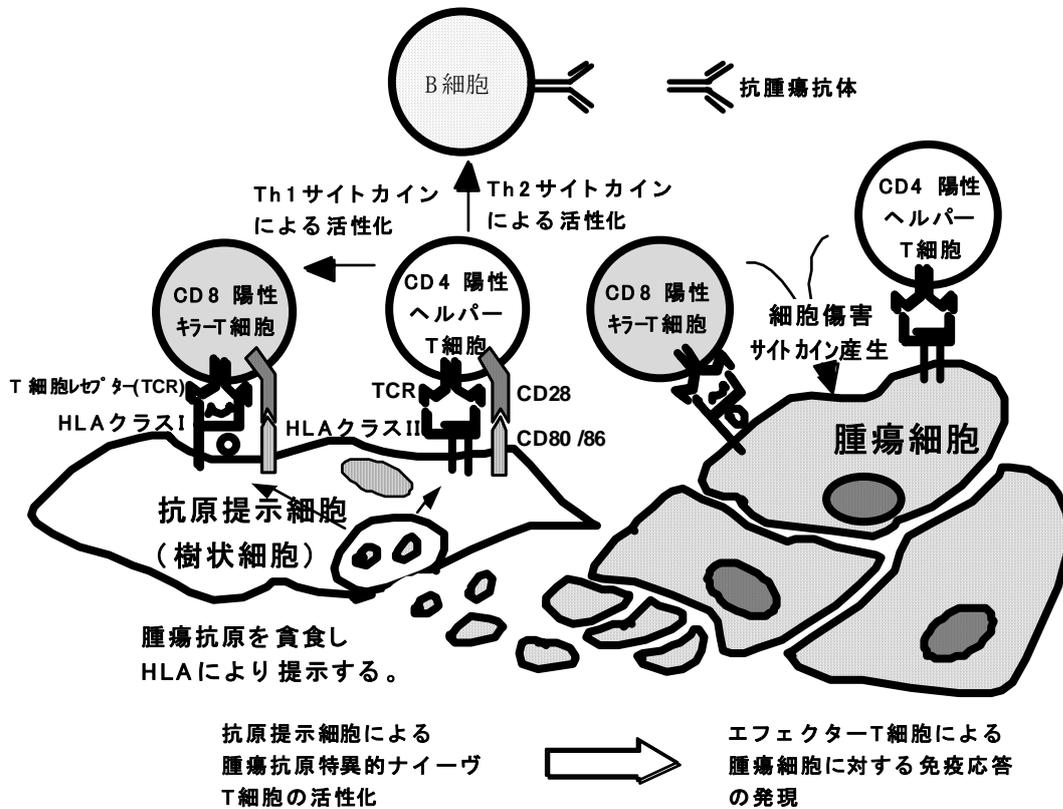


図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

腫瘍細胞それ自体は、ナイーブ T 細胞の活性化に不可欠な CD80/86 などの分子を発現していないことが多い。腫瘍抗原を貪食した樹状細胞は、これらをペプチドに分解し、HLA クラス I あるいは HLA クラス II 分子と結合した形で細胞表面に提示する。この HLA とペプチドの複合体を CD8 陽性ナイーブキラー T 細胞あるいは CD4 陽性ナイーブヘルパー T 細胞が T 細胞レセプターを介して認識するとともに、T 細胞上の CD28 分子が抗原提示細胞上の CD80/86 分子と結合して活性化される。一旦活性化されたエフェクター T 細胞は CD80/86 を発現していない腫瘍細胞に対しても免疫応答を示すことができる。CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞は IL-2, IFN- γ , TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T 細胞、B 細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する。活性化された B 細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

5-3) 樹状細胞と抗腫瘍免疫応答

樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示細胞であり、ナイーブな T 細胞を活性化できる唯一の細胞である。一方、DC は T 細胞を活性化するのみならず、状況に応じて積極的に免疫寛容を誘導することも報告されている (15, 16)。抗原を発現させた DC を生体内に投与することにより、当該抗原に特異的な T 細胞を効率良く誘導することが可能である。このため DC を用いた細胞療法は免疫療法、特に癌治療において有望な方法と考えられている。現在、癌抗原ペプチドをパルスした DC や癌抗原蛋白を発現させた DC を用いて、癌治療を行う臨床試験が多くの施設で行われている (17-20)。

Inaba らがマウス骨髄細胞から DC を誘導できることを報告 (21) して以来、ヒトでは、臍帯血、骨髄 CD34 陽性細胞および末梢血 CD14 陽性細胞などを *in vitro* で DC に誘導されている。現在このようにして誘導された DC が癌免疫療法に利用されている。しかしながら、ウイルスベクターなどによる DC への遺伝子導入の効率の不安定性や安全性などの問題がある。さらに有限であり、患者へ投与する際、その都度抗原などを付加し培養しなければならないという手間を強いられる。そこで、我々は無限増殖能を有し、かつ複数の遺伝子の導入が可能である ES 細胞を DC の供給源として利用することを考えた。

5-4) ES 細胞由来樹状細胞を用いた免疫制御療法の開発

近年、生体内において、主要な抗原提示細胞である DC が、免疫応答を正または負の両方向へ制御する機能を有していることがわかっている。我々は、免疫応答の制御において中心的な働きを担っている DC の機能を遺伝子修飾することにより、個体の免疫応答を制御することができるのではないかと考えた。すなわち、遺伝子導入により特定の抗原と免疫応答を正または負へ制御する分子を同時に発現する樹状細胞を作製し、これを生体に移入することにより、免疫応答を抗原特異的に制御できるのではないかと考えた。また、近年、ES 細胞から血液細胞を含む種々の細胞系譜へ分化誘導を行う方法が報告されていることから、ES 細胞から DC への分化を誘導する方法が開発できないかと考えた。この結果、生理的に存在する DC と同等の機能を有する DC を ES 細胞から作成する培養法を開発した。前項でも述べたように、DC に遺伝子を導入する方法として電気穿孔法、リポフェクション、ウイルスベクターなどが使用されている。骨髄細胞由来 DC や単球由来 DC に遺伝子を導入するためには、ウイルスベクターが利用されるが、ウイルスの危険性や抗原性が問題となる。一方、ES 細胞の場合には電気穿孔法で容易にかつ効率よく、さらに複数の遺伝子を導入できる利点がある。このように遺伝子改変が容易な ES 細胞の特色を生かして、マウス遺伝子改変 ES-DC を樹立して、抗腫瘍免疫の誘導に応用できるのではないかと考え (図 4)、その第一歩として、モデル抗原(OVA)を発現する ES-DC をマウスに投与することにより、*in vivo* において OVA 特異的な CTL を活性化し、OVA を発現する腫瘍細胞に対する拒

絶効果が得られることを確認している(22)。

図 4

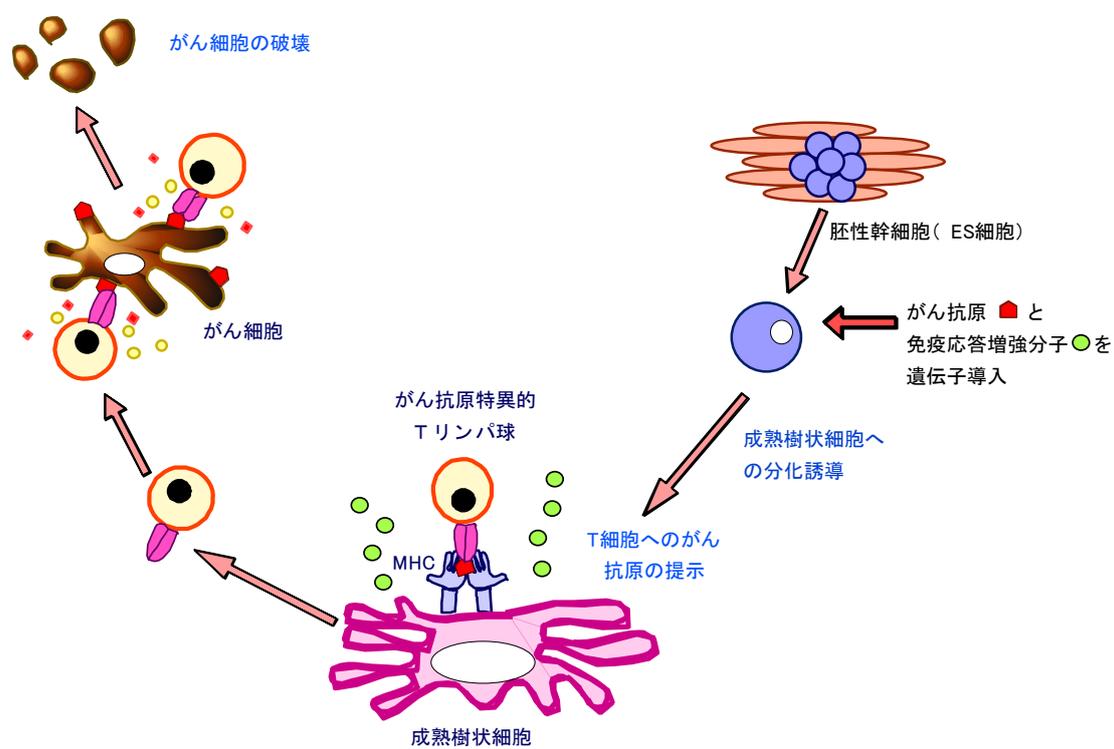


図 4. 遺伝子改変 ES 細胞から分化誘導させた樹状細胞を用いた腫瘍免疫の増強

5-5) 癌胎児性抗原 glypican-3

Glypican-3(GPC3)は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPGs)ファミリーに属する糖鎖修飾が強いGPIアンカー蛋白質である。GPC3の機能としては、ある種の腫瘍細胞の増殖を抑制したり、あるいはアポトーシスに関連があると言われている(23)。我々は、以前東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔博士との共同研究により cDNA マイクロアレイ解析を用いて肝細胞がん(HCC) 特異的に高発現する遺伝子として同定した。

① GPC3 の機能

細胞表面上にあるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) には、膜貫通型のシンデカン (Syndecan) ファミリーと膜結合型のグリピカン (Glypican) ファミリーがあり、現在までのところそれぞれ4種類のSyndecanと6種類のGlypicanが存在することが報告されている(24-27)。GPC3は、580アミノ酸からなる60kDのコア蛋白に糖鎖修飾を受けた膜蛋白質で、C末端をGPIアンカーで細胞膜に結合している。1996年に、PiliaらはX染色体(Xq26)連鎖疾患であるSimpson-Golabi-Behmel症候群(SGBs)において、GPC3の遺伝子変異を認めると報告している(28)。これらの患者では、巨人症、嚢胞腎、口蓋裂などの症状を呈することが知られている。また、GPC3ノックアウトマウスでも、SGBsと同様に巨大化などの表現型を示すことがわかっている(29)。また、GPC3は、そのコア蛋白が直接Wntと結合することによって、Wnt signalを活性化し肝細胞癌の増殖に関与していると考えられている(30)。

② 腫瘍マーカーとしてのGPC3

中面らは、cDNA マイクロアレイ解析を用いて、GPC3が肝細胞癌(HCC)に特異的に高発現する遺伝子であることを同定した(31)。GPC3遺伝子および蛋白質は、ほとんどのHCC組織ならびに細胞株で高発現するが、正常組織においては、胎生期の肝臓あるいは免疫学的に隔離された胎盤でしか発現が見られないことを確認した。GPC3が分泌蛋白であることから、ELISA法を用いてHCC患者の血清中のGPC3蛋白について検討したところ、約40%の患者でGPC3蛋白が検出された(図5)。しかしながら、健常人、慢性肝炎、その他の肝疾患では全く検出されなかった。GPC3がHCC患者の血清中にのみ検出されることから、GPC3がHCCの腫瘍マーカーとして有用であることが示唆された(31)。さらに、その後の研究において、我々は、メラノーマでもGPC3が高発現することを発見し、メラノーマ患者の血清からも、約40%にGPC3蛋白が検出された(32)。従来のメラノーマの腫瘍マーカーと比較し、比較的早期のメラノーマ患者からも検出されることから、早期診断や治療効果の判定など臨床への応用が期待される。

図 5

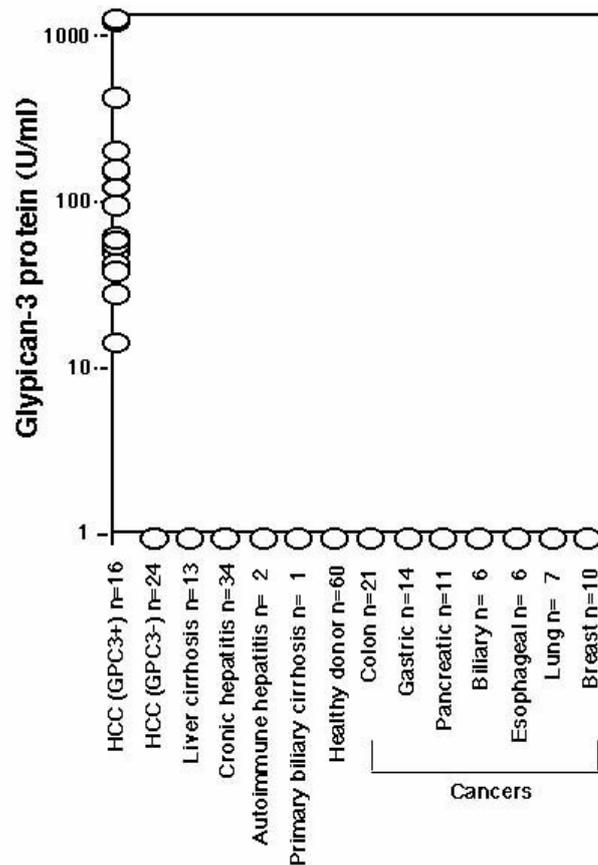


図 5. ELISA 法による血清中の GPC3 蛋白の検出 (ref. 31)

HCC 患者 40 人のうち 16 人で、血清中の GPC3 蛋白が検出された。しかし、健康人、その他の肝疾患、その他の癌患者では検出されなかった。

③ 腫瘍拒絶抗原としての GPC3

発現の組織特異性が優れていることから、中面らは、この新規癌胎児性抗原 GPC3 が、理想的な腫瘍拒絶抗原になりえるかどうかを検討した。日本人の約 60% が陽性である HLA-A24 と、BALB/c マウスのクラス I 分子の K^d に結合するペプチドの構造モチーフは非常に一致していることがわかっている。さらに、ヒトとマウスの GPC3 では、95% 以上のホモロジーを認めることから、ヒトとマウスの GPC3 でアミノ酸配列が完全に一致し、HLA-A24、K^d のいずれにも結合する GPC3 由来のペプチドを合成した。これらを BALB/c マウスに免疫して解析し、K^d 拘束性の CTL エピトープペプチドを同定した (33)。

さらに、このペプチドを用いて、ヒトの HLA-A24 陽性の HCC 患者の末梢血リンパ球を刺激することにより、約半数から GPC3 特異的 CTL を誘導することができている。また、日本人の

40%が陽性で、欧米白人においても頻度が高いである HLA-A2 に拘束性を示す CTL エピトープペプチドを同定するために、HLA-A2 に結合親和性を示す構造モチーフを有するペプチドを合成し、これらを HLA-A2 transgenic mouse (Tgm)に免疫して解析した。同定した CTL エピトープペプチドを用いてヒトの HLA-A2 陽性の HCC 患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数から GPC3 特異的 CTL を誘導することができた(小森ら)。

また、非常に重要なことに、以上の実験において、GPC3 抗原の免疫によって、抗腫瘍効果は誘導されるが、自己免疫現象は決して誘導されなかった。現在、この HLA-A24 および HLA-A2 拘束性の CTL エピトープペプチドを用いて、肝細胞癌の根治治療症例を対象にした補助療法としてのペプチドワクチンの安全性と有効性をみる臨床試験が計画されている。

5-6) 本研究の目的

新規癌胎児性抗原であり、ヒトの HCC あるいはメラノーマの腫瘍マーカーとしてだけでなく、免疫療法の標的腫瘍抗原としても有用と考えられる GPC3 について、マウス GPC3 遺伝子をマウス ES 細胞に導入し、これを樹状細胞へ分化誘導させ、GPC3 発現 ES 細胞由来樹状細胞 (ES-DC-GPC3) を樹立する。この ES-DC-GPC3 の免疫により、GPC3 を自然発現するマウス腫瘍に対して、抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導できるか否かを検討することを目的とした。

6 実験方法

6-1) マウス

CBA と C57BL/6 マウスは CLEA または Charles River Breeding Laboratories より購入し、SPF (specific pathogen free condition)環境にて飼育した。本研究に用いた ES 細胞 TT2 が CBA マウスと C57BL6 マウスの F1 胚に由来するため、オスの CBA マウスとメスの C57BL/6 マウスを交配し、CBA×C57BL6 F1 マウス(CBF1)を作製した。全ての実験に 6-8 週齢の CBF1 マウスを使用した。

6-2) 使用した細胞

ES 細胞株である TT2 は CBA×C57BL6 F1 マウス(CBF1)由来の blastocyst (34)に由来し、ES 細胞からの樹状細胞への分化誘導は、すでに報告(35)した方法により施行した。GM-CSF 存在下で細菌培養用デッシュにて 14 日間培養して得られた ES-DC 細胞を本研究にて用いた。OP9 は M-CSF の欠損した骨髄ストロマ細胞である(36)。C57BL/6 由来の細胞株 B16-F1、B16-F10、MCA205、Lewis lung cell (3LL)、EL4、ヒト肝細胞癌株 HepG2 は、いずれも東北大学加齢研究所より購入した。また、これらの細胞は、10% FCS 添加 RPMI 1640 を用いて培養した。MCA-GPC3 は、繊維肉腫細胞 MCA205 に pCAGGS-GPC3-IRES-puro-R ベクターを LipofectAMINE 2000 を用いて遺伝子導入した細胞であり、puromycin にて選別し、限界希釈法にてクローニングを行った(37, 38)。

6-3) GPC3 遺伝子導入マウス ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC-GPC3) の作製

GPC3 蛋白をコードした cDNA 断片を、CAG プロモーターと IRES-puromycin N-acetyltransferase (39, 40)を含む pCAGGS-IRES-puro-R ベクターに組み込み、pCAGGS-GPC3-IRES-puro-R ベクターを作製した。マウス ES 細胞(TT2 細胞株、CBA×C57BL/6 (CBF1)マウス由来)に、電気穿孔法を用いて、pCAGGS-GPC3-IRES-puro-R ベクターを導入し、puromycin にて選別した(35)。GPC3 遺伝子導入 ES 細胞クローンから、以下のようにして樹状細胞(ES-DC)へ誘導した(22, 35, 41)。まず、ES 細胞を骨髄ストロマ細胞(OP9)とともに 5 日間培養した。次に、分化した ES 細胞由来の細胞を回収し、さらに 5 日間 GM-CSF の存在下で OP9 とともに培養した。その後、細胞を GM-CSF の存在下にストロマ細胞非存在下の細菌培養用デッシュ中でさらに 7-10 日間培養を続けると、DC 様の形態を有し、生理的な DC と同様の細胞表面分子を発現する細胞が出現する。以後の実験には細菌培養用デッシュ中で、14 日間培養して得られた ES-DC を使用した。また、

ES-DC には LPS や TNF- α などの成熟刺激は加えなかった。遺伝子導入した ES-DC の GPC3 発現の確認は、reverse transcription (RT) -PCR にて行った。

6-4) RT-PCR と Northern blot

RT-PCRは、以下のように行った(22, 41)。まず、各1 μ gのtotal RNAからランダムヘキサマープライマーを用いてSuperscript reverse transcriptase (インビトロジェン社)により各cDNAを合成した。RT-PCRの各遺伝子特異的プライマーを作成し、GPC3のPCR反応は94°C1分間、58°C1分間、72°C1分間で33サイクル行い、GAPDHのPCR反応は94°C1分間、58°C1分間、72°C1.5分間で30サイクル行った。PCR産物を1%アガロースゲルで分離してエチジウムブロマイドで染色し特異的バンドを検出した。比較対照のためGAPDH特異的なプライマーも同時に用いた。GPC3のプライマーは、CTGACTGACCGCGTTACTCCCACA (forward)とTAGCAGCATC- GCCACCAGCAAGCA (reverse)。また、GAPDHのプライマーは、GGAAAG- CTGTGGCGTGATG (forward)とCTGTTGCTGTAGCCGTATTC (reverse)。Northern blot解析では、20 μ gの各種total RNAをナイロンメンブレン (Hybond N⁺, アマシャム社) に転写したものに、GPC3特異的な約500 bpの³²Pで標識したプローブをハイブリダイズさせ、GPC3遺伝子の発現を検出した(42)。ヒトとマウスのGPC3遺伝子は、ヌクレオチド配列に95%以上の相同性がみられるため、ヒトGPC3cDNAプローブをヒトとマウス両方のmRNAにハイブリダイズさせた。

6-5) ペプチド、リコンビナント蛋白、サイトカイン

HLA結合性ペプチドの構造モチーフ探索データベース(<http://bimas.dcrt.nih.gov/>)を利用して、H2-D^bあるいはK^bに結合すると推定されるマウスGPC3由来の9~10個のアミノ酸からなるペプチドを11種類選択(表1)し、自動ペプチド合成機(島津社製)を用いてF-MOC法により合成し、HPLCにて精製した。組み換えマウスGM-CSFとIFN- γ はPeproTech社より購入した。組み換えマウスGPC3蛋白はR&D社より購入した。

表 1

Profile of murine GPC3 derived peptides				
No.	MHC molecule type	Sequence	Peptide start position	Binding score
mGPC3-1	D ^b	AMFK _n NYPSL	127	1990
mGPC3-2	D ^b	LGSDiNVDDM	156	368
mGPC3-3	D ^b	LTARINMEQL	82	229
mGPC3-4	D ^b	SVLDINECL	189	227
mGPC3-5	D ^b	TLCWNGQEL	419	220
mGPC3-6	D ^b	YVQKNGGKL	332	206
mGPC3-7	D ^b	GMVKVKNQL	511	152
mGPC3-8	D ^b	RNGM _n QFNL	437	92
mGPC3-9	D ^b	AMLLGLGCL	13	71
mGPC3-10	D ^b	ASMELKFLI	95	69
mGPC3-11	K ^b	LFPVIYTQM	173	66

表 1. 本研究において使用したマウス GPC3 由来の合成ペプチド

BIMASソフトウェアによって推定されたペプチドのD^bあるいはK^b分子へのbinding scoreの高い順にマウスGPC3 (mGPC3) 1~11 ペプチドと命名した。拘束分子は、mGPC3-1~10 がD^b、mGPC3-11 がK^bであった。

6-6) 細胞表面マーカーの解析

細菌培養用デッシュ中で、14日間培養して得られた ES-DC を回収し、フローサイトメトリー (FACScan, Becton Dickinson) を用いて、細胞表面マーカーの解析を行った。本研究に用いた抗マウスモノクローナル抗体は以下の通りである。

FITC-H2-D^b (Caltag), FITC-H2-K^b (Caltag), I-A^b (Chemicon), PE-CD86 (Caltag), PE-CD11c (Chemicon)。また、蛍光標識一次抗体を用いる場合は直接法、未標識精製一次抗体を用いる場合は、各々のイムノグロブリンイソタイプを認識する蛍光標識二次抗体を反応させる間接法にて染色を行った。ネガティブコントロール染色として、各々の特異抗体とイムノグロブリンイソタイプが一致する精製血清免疫グロブリンを一次抗体として用いた (35, 41)。

6-7) GPC3 蛋白の発現解析

B16-F1、B16-F10、MCA205、MCA-GPC3 細胞を 35mm ペトリディッシュにまき、PBS 溶液で 2 回洗浄したあと、4%パラホルムアルデヒド溶液で 20 分間固定し、PBS 溶液で 3 回洗浄、その後 0.4% Triton-X/PBS にて 10 分間処理後、PBS 溶液で 3 回洗浄した。続いて細胞に 3% ウシ血清アルブミンにて 1 時間ブロッキングし、200 倍希釈した一次抗体 (ラビット抗ヒト GPC3 ポリクローナル抗体 (サンタクルズ社)) を 4°C で、12 時間反応させた。細胞を PBS で 3 回洗浄後、FITC 標識抗ヤギ IgG 抗体 (ジャクソンイムノリサーチラボラトリー社) を 1 時間反応させた。さらに、PBS で 3 回洗浄し PBS で 10000 倍希釈した RNase を 20 分間反応させ RNA を分解した。PBS で細胞を 3 回洗浄し 0.25µg/ml の propidium iodide を 10 分間反応させ、DNA を染色した。その後、PBS で 3 回洗浄しグリセロールを数滴落とし、カバーガラスをのせ、共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV300 オリンパス社) で観察した (43)。

6-8) マウス骨髄細胞由来の樹状細胞 (BM-DC) の作製

CBA×C57BL/6 (CBF1) マウス由来の骨髄細胞の DC (BM-DC) は、以前に報告した方法により誘導した (21, 33, 44)。3 種類の GPC3 由来の合成ペプチド (mGPC3-2,-8,-11) を BM-DC と 37°C、2 時間培養することにより、合成ペプチドを BM-DC に負荷した。また、同様に BM-DC に GPC3 蛋白を負荷するために、2 µg/ml の GPC3 蛋白の存在下に 37°C で、12 時間培養した。マウス個体への投与に際しては、これらの BM-DC には成熟刺激を与えなかった。

6-9) GPC3 特異的 CTL の誘導と細胞傷害活性の測定

遺伝子改変を行ったES-DC-GPC3 (1×10^5 個)を7日毎に2回、マウスの腹腔内に投与した。2回目の投与から7日後に、マウスより脾臓を摘出した。脾臓細胞は*in vitro*にてES-DC-GPC3 (1×10^5 /well)存在下に24wellプレートにて5日間培養した。得られた細胞を回収しエフェクター細胞とし、MCA205細胞、MCA-GPC3細胞、B16-F1細胞、B16-F10細胞を標的細胞として、クロミウム放出試験により細胞傷害活性を測定した(35)。B16細胞は、1000 U/mlのIFN- γ にて48時間前処理したものを用いた(46)。また、エフェクター細胞の解析のために、MACSによる細胞分離システムを用いて、CD8⁺T細胞とNK細胞に分離した後、同様に細胞傷害活性を測定した。

6-10) ELISPOT アッセイ

前日からIFN- γ 抗体をコーティングしたELISPOTプレート(BD Bioscience社)を培養液にて洗浄後、エフェクター細胞($100 \mu\text{L}$ /well)と標的細胞($100 \mu\text{L}$ /well)を混合し、37°Cで22時間培養した。その後、プレートを滅菌水で洗浄し、ビオチン化抗体と2時間、さらにストレプトアビジン-HRPと1時間反応させ、基質溶液にてIFN- γ 陽性のスポットを検出した(45)。スポットのカウントは、MINERVA TECH社の自動解析装置にて行った。

6-11) GPC3 特異的 CTL エピトープの検討

ES-DC-GPC3 (1×10^5 個)を7日毎に2回、マウスの腹腔内に投与した。2回目の投与から7日後に、マウスより脾臓を摘出した。脾臓細胞を、*in vitro*にて11種類のGPC3ペプチドのそれぞれの存在下($10 \mu\text{M}$)に24wellプレートにて5日間培養した。得られた細胞を回収しエフェクター細胞とし、EL4あるいは11種類のペプチドのそれぞれをパルスしたEL4、MCA205あるいはMCA-GPC3を標的細胞として、GPC3特異的にIFN- γ を産生するT細胞の数をELISPOTアッセイにて測定した。

6-12) 腫瘍増殖抑制実験

1×10^5 個のES-DC-GPC3をマウスに腹腔内に7日毎に2回投与した。2回目の投与から7日後に、剃毛したマウス背部左側に 1×10^5 個のMCA-GPC3細胞あるいは 5×10^3 個のB16-F10細胞を皮下移植した。腫瘍の大きさを1週間に2回測定し、同時にマウスの生存率を観察した。腫瘍の大きさは、Tumor index (mm^2)=腫瘍長径 \times 腫瘍短径として示した。また、B16-F10細胞の静注実験では、day 0に 1×10^5 個のB16-B10細胞をマウス尾静脈より静注し、day 3とday 10に 1×10^5 のES-DC-GPC3を腹腔内投与して、肺や肝転移について評価した(47)。

6-13) in vivoにおけるCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の除去

マウスに 1×10^5 個のES-DC-GPC3を7日毎に2回、腹腔内投与した。2回目の投与から7日後に 5×10^3 個のB16-F10を皮下移植した(Day0)。マウスは合計6回(Day -18, -15, -11, -8, -4, -1)、ハイブリドーマを腹腔内にて増殖させたヌードマウス由来の腹水(0.1ml/回)を腹腔内に投与した(22)。ここで使用したモノクローナル抗体はラット抗マウスCD4(clone GK1.5)とラット抗マウスCD8(clone 2.43)。また、NK細胞の除去には、ウサギ抗アジアロGM1ポリクローナル抗体(Wako、200 μ L/マウス)を用いた。ラットIgG(Sigma-Aldrich社製、200 μ g/回)をコントロールとして使用した。モノクローナル抗体によるT細胞サブセットの除去は脾臓細胞のフローサイトメトリーにより評価したところ、各モノクローナル抗体に反応する細胞の90%以上が除去されていた。腫瘍サイズの測定は腫瘍皮下移植から10日目から行った。腫瘍の大きさは、Tumor index (mm^2)=腫瘍長径 \times 腫瘍短径として示した。

6-14) 腫瘍組織の組織学的解析

腫瘍塊は摘出後、Miles社製のTissue-Tek OCTコンパウンドに浸し、凍結させた。Cryostatを用いて5mmの凍結切片を作製し、CD4またはCD8特異的モノクローナル抗体(PharMingen社製)とNichirei社製のN-histofine Simple Stain Mouse MAX POを用いて免疫組織染色を行った(22, 31)。

6-15) 統計学的解析

細胞傷害活性および腫瘍の増殖、各治療群間の有意差検定については、Two-tailed Student's *t* testを用いて行った。 $P < 0.05$ の場合に、有意差ありと判定した。Kaplan-Meierの生存曲線は、Breslow-Gehan-Wilcoxon試験を用いて有意差を判定した。統計解析はStatView 5.0(Abacus Concept社製)を用いて行った。

7 実験結果

7-1) 遺伝子改変 ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC-GPC3) クローンの単離

我々は、マウスTT2 ES細胞にGPC3 遺伝子導入(図 6)を行い、 puromycin耐性のクローンを 4 種類選択し、これらを樹状細胞へ分化誘導させた。4 種類のクローンについて、RT-PCR法にてGPC3 mRNAの発現を確認した(図 7)。その結果、クローン 12 が最もその発現が強かったので、このクローンを以下の実験に用いた。樹状細胞の表面におけるH2-D^b, K^b, CD11c, CD86 の発現はES-DC-TT2(親株のTT2 ES細胞由来のDC)と同程度であった(図 8)。このことから、遺伝子導入によって、本来ES-DCが示す特徴について、大きな変化が生じていないことが明らかとなった。

図6

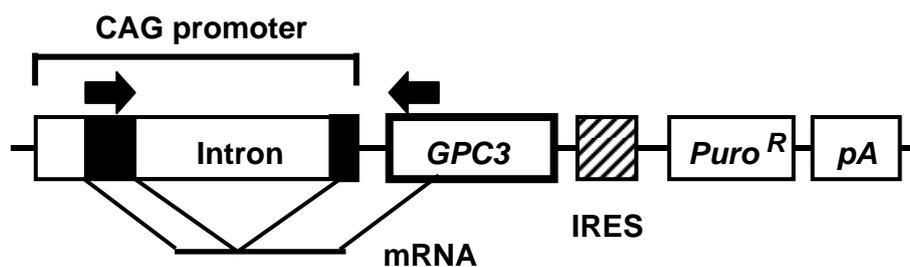


図 6 . pCAGGS-GPC3-IRES-Puro-R ベクターの構造

全長のマウスGPC3遺伝子をコードするcDNAをCAGプロモーターとIRES-puromycin N-acetyltransferase遺伝子カセットをもつpCAGGS-IRES-Puro-Rベクターに導入した。PCRに用いたプライマーを黒矢印で示す。これらは、DNA自身のPCR産物とmRNAのPCR産物とを区別するために、CAGプロモーター内のイントロンを挟んで設計された。また、■は、ラビットβ-actin遺伝子の5'側の非翻訳領域を示す。

図 7

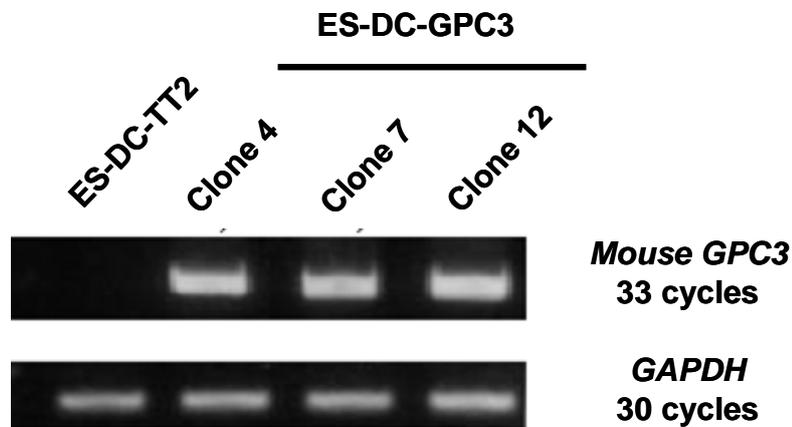


図 7. ES-DC-GPC3 における GPC3 mRNA の発現

RT-PCR 法により、GPC3 mRNA と GAPDH mRNA の検出を行った。PCR のサイクル数を図中に示す。遺伝子導入していない親株由来の ES-DC-TT2 では、GPC3 mRNA の発現は認めなかった。3つの ES-DC-GPC3 のうち、最も GPC3 遺伝子の発現が高い clone 12 を以後の実験に用いた。

図 8

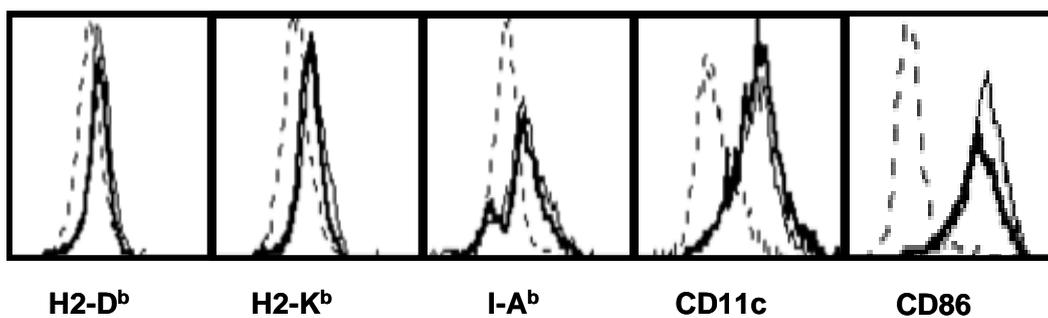


図 8. ES-DC-GPC3 の表面マーカーの解析

細胞表面上の H-2D^b、K^b、I-A^b、CD11c と CD86 について、フローサイトメトリーにより解析した。太い黒線は ES-DC-GPC3、細い黒線は ES-DC-TT2 を示し、点線はアイソタイプマッチコントロールによる染色を示す。ES-DC-GPC3 と ES-DC-TT2 において、それぞれの分子の発現は同程度で、遺伝子導入による影響はないと考えられた。

7-2) B16 メラノーマ細胞株由来のサブクローン F10 細胞における GPC3 の発現

我々は、近年肝細胞癌とメラノーマで特異的に発現する新規癌胎児性抗原 GPC3 を同定した。この GPC3 を免疫療法の標的としたマウスモデルを構築するため、マウスの腫瘍細胞の中で GPC3 を自然発現する細胞を Northern blot を用いて探索したところ、B16 メラノーマのサブクローンのうち強い転移傾向を有する F10 細胞が GPC3 を発現することを発見した(図 9)。一方、別のサブクローン B16-F1 では、発現は認めなかった。HepG2 は GPC3 を発現するヒト肝細胞癌細胞株で、MCA-GPC3 は繊維肉腫 MCA205 細胞に pCAGGS-GPC3-IRES-puro-R ベクターを導入し、GPC3 を強制発現させた細胞である。さらに、MCA205、MCA-GPC3、B16-F1、B16-F10 細胞における GPC3 蛋白の発現について、蛍光免疫染色により検討した。その結果、Northern Blot の結果に一致して、B16-F10、MCA-GPC3 で GPC3 の蛋白が検出された(図 10)。

図 9

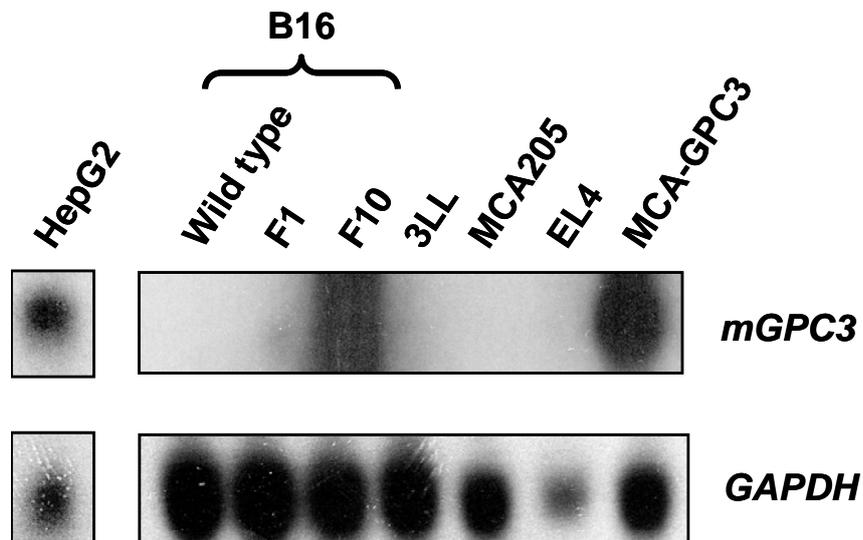


図 9. 様々な癌細胞における GPC3 mRNA の発現解析

C57BL/6 マウス由来の癌細胞株について、GPC3 mRNA の発現を Northern blot にて解析した。ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 を positive control とした。B16 細胞の転移巣から分離されたサブクローン F1、F10 のうち、F1 細胞株では発現が見られなかったが、F10 細胞株で GPC3 の発現を認めた。また、MCA205 は GPC3 を発現しないが、GPC3 を遺伝子導入した MCA-GPC3 では、確かに発現が認められた。

図 10

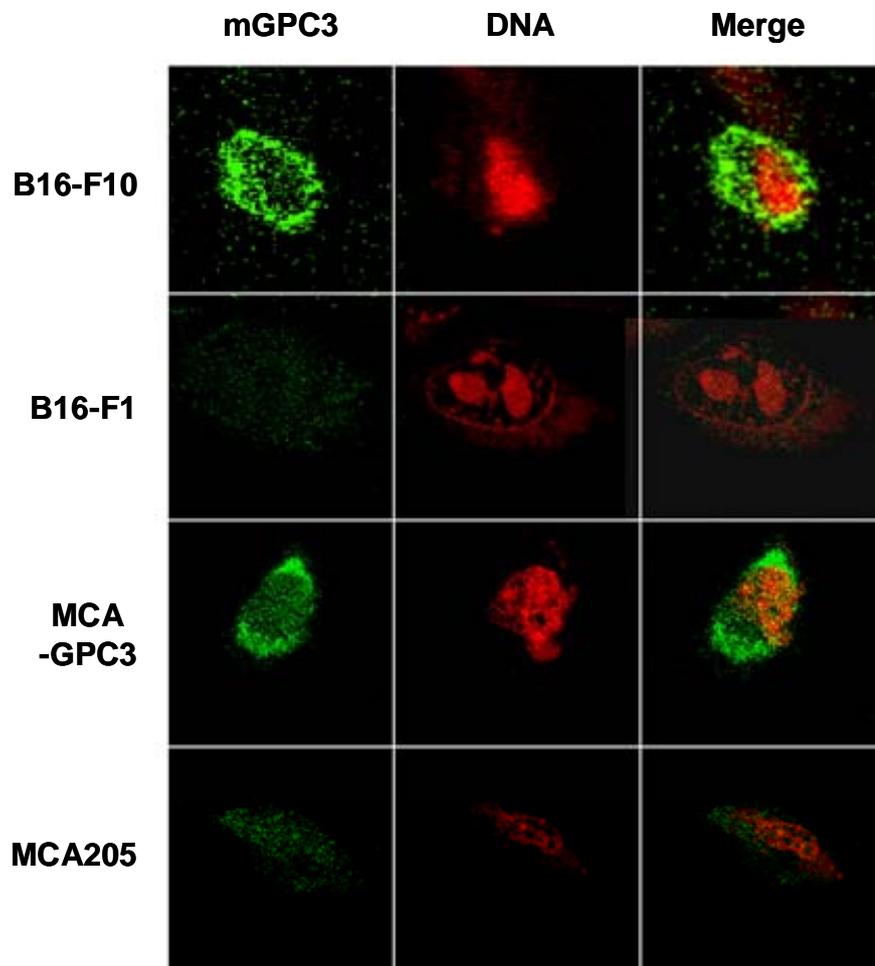


図 10. B16-F1, F10, MCA205, MCA-GPC3 における GPC3 蛋白の発現解析

マウス GPC3 に交差反応性を示す、ヒト GPC3 に対する rabbit polyclonal 抗体を用いて GPC3(緑)を検出した。DNA を PI(赤)により染色した。GPC3 蛋白の発現は、図 9 の mRNA 発現の結果と一致している。GPC3 は膜蛋白であるが、B16-F10 と MCA-GPC3 における GPC3 の発現パターンには、若干の相違が認められた。

7-3) ES-DC-GPC3 による GPC3 特異的な CTL の活性化

我々は、ES-DC-GPC3 によって、GPC3 特異的な CTL の誘導が可能かどうか検討した。1×10⁵ 個の ES-DC-GPC3 を 7 日毎に 2 回、マウスの腹腔内に投与した。2 回目の投与から 7 日後に、マウスより脾臓を摘出した。脾臓細胞を IL-2 100 U/mL 存在下、ES-DC-GPC3 (1×10⁵/well) と 24 well プレートにて 5 日間共培養した。得られた細胞を回収しエフェクター細胞とし、MCA205 細胞、MCA-GPC3 細胞、B16-F1 細胞、B16-F10 細胞を標的細胞として、クロミウム放出試験により細胞傷害活性測定を測定した。その結果、ES-DC-GPC3 によって感作されたエフェクター細胞は、B16-F1 や MCA205 よりも B16-F10 や MCA-GPC3 に対して有意に強い細胞傷害活性が認められた (図 11-上段、中段)。このことから、エフェクター細胞の中には、GPC3 を認識する T 細胞が含まれると考えられた。さらに、エフェクター細胞を CD8⁺T 細胞と NK 細胞に分離して、同様に細胞傷害活性を定量した。NK 細胞は、GPC3 の発現に関係なく MCA205、MCA-GPC3 あるいは B16-F1、B16-F10 に対して同程度の傷害活性を示したが、CD8⁺T 細胞では、GPC3 陽性の腫瘍細胞に対してのみ、有意に強い細胞障害活性が観察された (図 11-下段)。以上より、ES-DC-GPC3 によって、GPC3 特異的な CTL が誘導されることを明らかにした。

図 11

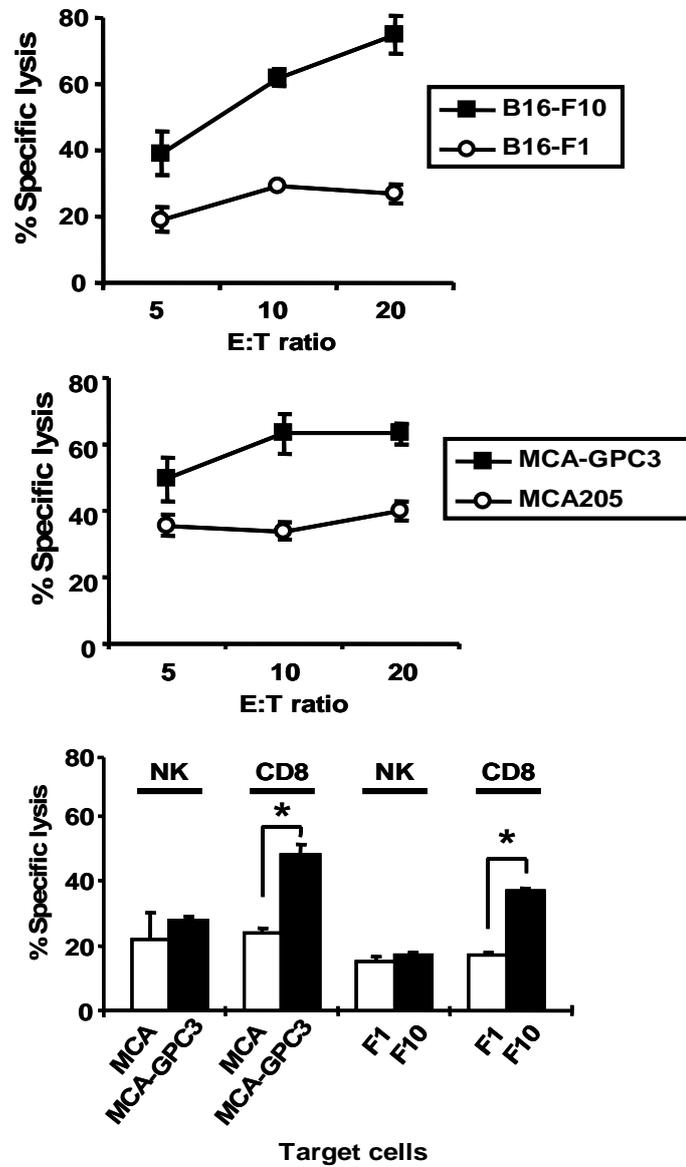


図 11. ES-DC-GPC3 による GPC3 特異的 CTL の感作

1×10^5 個のES-DC-GPC3 を、1 週間毎に 2 回腹腔内に免疫したマウスの脾臓を採取し、 2.5×10^6 個の脾細胞を *in vitro* で 5 日間 1×10^5 個のES-DC-GPC3 と培養した。そこで得られた細胞を用いて、クロミウム放出試験を行った。GPC3 陰性のF1 細胞あるいはMCA205 に比べ、GPC3 陽性のF10 細胞(上段)あるいはMCA-GPC3(中段)に対して、有意に強い細胞障害活性が観察された。さらに、*in vitro*で培養した細胞を磁気ビーズを用いて、NK細胞とCD8⁺細胞に分離して、同様にクロミウム放出試験を行った。その結果、CD8⁺細胞でのみGPC3 陽性の腫瘍細胞に対して、有意に強い細胞傷害活性が観察された(下段)。なお、B16 細胞は 1000U/mLのIFN- γ で 48 時間前処理することによりMHCクラスIの発現を増強したものをを用いた。*は、2 群間での有意差を示す($p < 0.05$)。

7-4) ES-DC-TT2 と ES-DC-GPC3 における GPC3 特異的な CTL の誘導能の比較

マウスの体内における GPC3 特異的な T 細胞の誘導能について、ES-DC-TT2 あるいは ES-DC-GPC3 で免疫した場合を比較検討した。ES-DC-TT2 あるいは ES-DC-GPC3 で 7 日間毎に 2 回免疫し、得られた脾細胞をそれぞれ別々に *in vitro* で 5 日間 ES-DC-GPC3 と共培養した。得られた細胞を MCA205、MCA-GPC3、B16-F1 あるいは B16-F10 で刺激した際に、IFN- γ を産生する T 細胞の頻度を ELISPOT アッセイを用いて評価した。それぞれ *in vitro* で培養後に得られたエフェクター細胞を GPC3 陰性の MCA205 や B16-F1 で刺激した場合には、IFN- γ の産生には有意差は認められなかったが、ES-DC-GPC3 で免疫した場合には、GPC3 陽性の MCA-GPC3 や B16-F10 の刺激によって IFN- γ を産生する T 細胞が多く出現することがわかった(図 12)。以上より、ES-DC-GPC3 で免疫した場合にのみ、マウスの体内で GPC3 特異的な T 細胞が誘導されることが証明された。

図 12

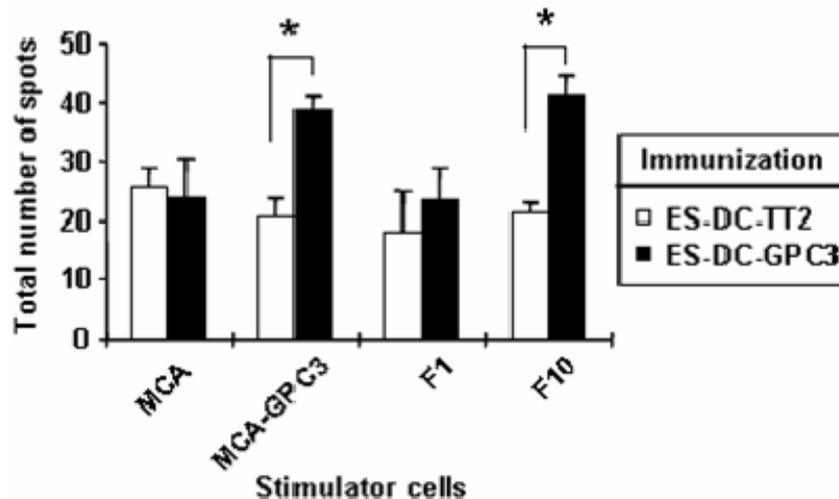


図 12. ES-DC-GPC3 と ES-DC-TT2 における GPC3 特異的 CTL の誘導能の比較

1×10^5 個のES-DC-GPC3 あるいはES-DC-TT2 (親株)で、それぞれ別のマウスを1週間毎に2回腹腔内に免疫し、マウスの脾細胞を採取し、別々に*in vitro*で5日間 1×10^5 個のES-DC-GPC3 と培養した。そこで得られた細胞をMCA、MCA-GPC3、B16-F1、B16-F10 と共培養し、IFN- γ 産生細胞をELISPOTにて測定した。Dataは IFN- γ 陽性のスポット数の平均値を示す。ES-DC-GPC3 で免疫した場合にのみ、GPC3 陽性のMCA-GPC3 あるいはB16-F10 に対して有意に強いIFN- γ 産生が観察された。なお、B16 細胞はIFN- γ 1000 U/mLで48時間前処理したものをを用いた。*は、2群間での有意差を示す($p < 0.05$)。

7-5) GPC3 特異的な CTL が認識するエピトープペプチドの同定

GPC3 由来のH-2^b拘束性に認識されるCTLエピトープを同定するために、K^bあるいはD^b分子に結合親和性が高いと推定されるGPC3 由来の 11 種類のペプチドを合成した。ES-DC-GPC3 で免疫した脾細胞を、作成したペプチドを用いてin vitroで 5 日間刺激した。回収した細胞中のGPC3 特異的なCTLを、IFN- γ ELISPOTアッセイにより検出した。図 13 に示すように、mGPC3-2、mGPC3-8、mGPC3-11 のペプチドで刺激した細胞が、同じペプチドを負荷したEL4 あるいはMCA-GPC3 に反応して、有意に多くのIFN- γ を産生した。このことから、ES-DC-GPC3 によってマウスの体内で感作されたGPC3 特異的なCTLの中に、これら3つのペプチドを認識するCTLが含まれていると考えられた (図 13)。

図13

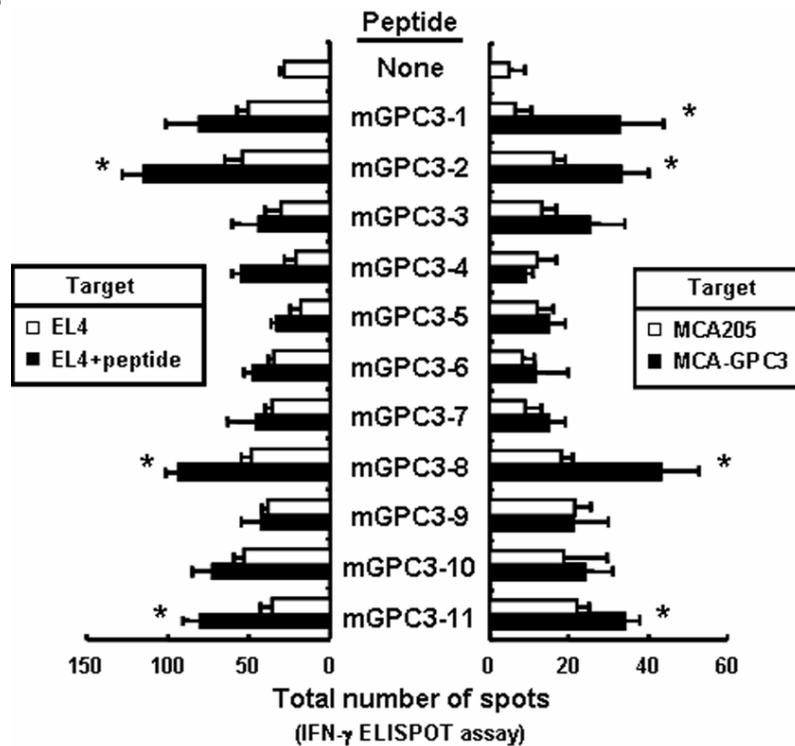


図 13. IFN- γ ELISPOT アッセイによる GPC3 特異的 CTL エピトープの決定

マウスを 1×10^5 個のES-DC-GPC3 で1週間毎に2回腹腔内に免疫し、マウスの脾臓を採取し、 2.5×10^6 個の脾細胞を11種類のペプチド($10 \mu\text{M}$)のそれぞれを用いて、in vitroで5日間刺激した。そこで得られた細胞を当該ペプチドをパルスしたEL4、パルスしないEL4あるいはMCA、MCA-GPC3と共培養した際に観察されるIFN- γ 産生をELISPOTにて測定した。データはIFN- γ 陽性のスポット数の平均値を示す。*は、2群間での有意差を示す($p < 0.05$)。

7-6) ES-DC-GPC3 による腫瘍拒絶実験

ES-DC-GPC3 がマウスの体内で、GPC3 を発現する腫瘍細胞に対して抗腫瘍免疫応答を誘導できるか否か検討した。7 日間毎に 2 回ES-DC-GPC3 を腹腔内に免疫した後、 5×10^3 個のB16-F10 細胞あるいは 1×10^5 個のMCA-GPC3 をマウスの背部に皮下移植した。皮下移植した腫瘍の増殖ならびにマウスの生存について観察したところ、ES-DC-GPC3 投与群では、無処置群やES-DC-TT2 投与群と比較し、有意にB16-F10 およびMCA-GPC3 の増殖が抑制され、さらにマウスの生存期間を延長していた(図 14)。一方で、ES-DC-GPC3 で免疫したマウスに、GPC3 陰性のMCA205 あるいはB16-F1 細胞を皮下移植しても、腫瘍拒絶は認められなかった。以上のことから、ES-DC-GPC3 を免疫することにより、GPC3 を発現する腫瘍細胞に対して抗腫瘍効果が誘導されると考えられた。

図14

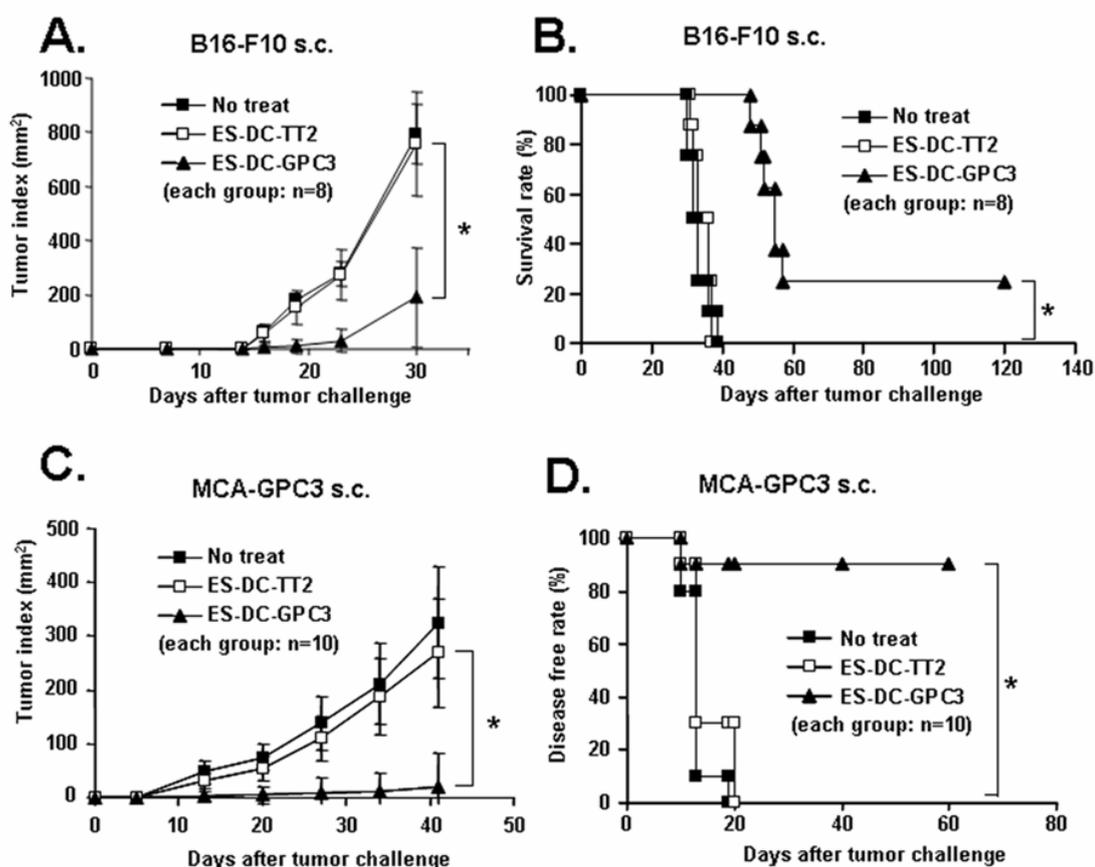


図 14. ES-DC-GPC3 の予防的投与による抗腫瘍効果

1×10⁵個のES-DCを1週間毎に2回腹腔内に免疫し、2回目の免疫後7日目にマウスの背部に5×10³個のB16-F10細胞(AとB)あるいは1×10⁵個のMCA-GPC3細胞(CとD)(いずれもGPC3陽性)を皮下移植し、腫瘍の増殖ならびにマウスの生存について観察した。ES-DC-GPC3投与群で有意に腫瘍の増殖が抑制され、生存期間の延長が認められた。*は、2群間での有意差を示す(p<0.05)。

7-7) 抗腫瘍効果におけるES-DC-GPC3とBM-DCとの比較

GPC3のペプチドあるいはGPC3蛋白をパルスしたBM-DCと、ES-DC-GPC3の抗腫瘍効果について比較検討した。B16-F10細胞を用いた皮下移植実験において、ES-DC-GPC3により誘導される抗腫瘍効果は、前述のmGPC3-2、mGPC3-8、mGPC3-11のペプチドの混合物をパルスしたBM-DCや、GPC3のリコンビナント蛋白をパルスしたBM-DCのそれらと同程度であった(図15)。

図 15

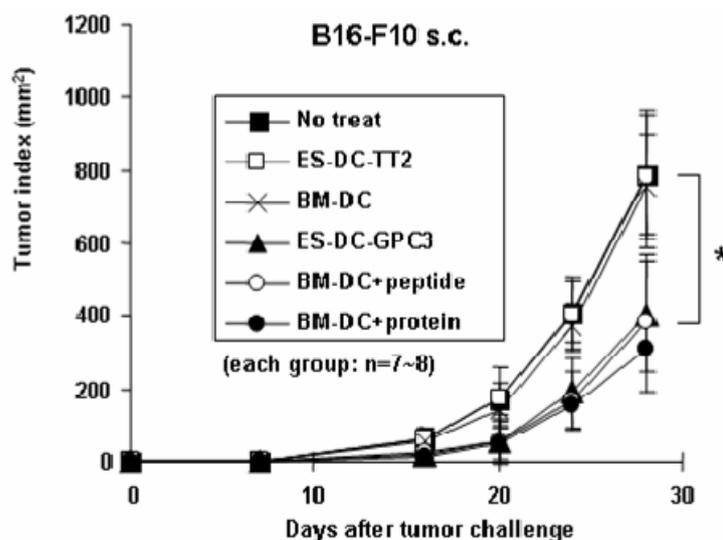


図 15. ES-DC-GPC3 と GPC3 ペプチドパルス BM-DC あるいは GPC3 蛋白パルス BM-DC との抗腫瘍効果の比較

前述の図14と同様なプロトコルを用いて、ES-DCとBM-DCの抗腫瘍効果について比較検討した。1×10⁵個のES-DCあるいはBM-DCで1週間毎に2回腹腔内に免疫し、2回目の免疫後7日目にマウスの背部に5×10³個のB16-F10細胞を移植した。ES-DC-GPC3の抗腫瘍効果は、GPC3ペプチドあるいはGPC3蛋白をパルスしたBM-DCのそれらと同等であった。*は、2群間での有意差を示す(p<0.05)。

7-8) 腫瘍細胞を静脈内投与したマウス癌転移モデルにおける ES-DC-GPC3 の治療効果

B16-F10 細胞をマウスの尾静脈より静注し、3 日後と 10 日後に ES-DC とを投与し、30 日目にマウスを解剖し癌転移巣を肉眼的に解析した。ES-DC-TT2 投与群と比較して、ES-DC-GPC3 投与群では、有意に肺転移や肝転移が抑制された(図 16)。また、ES-DC-TT2 で治療したマウスの中には、30 日以前に死亡したものもいたことから、ES-DC-GPC3 で治療することにより、生存期間も延長できると考えられた。

図 16

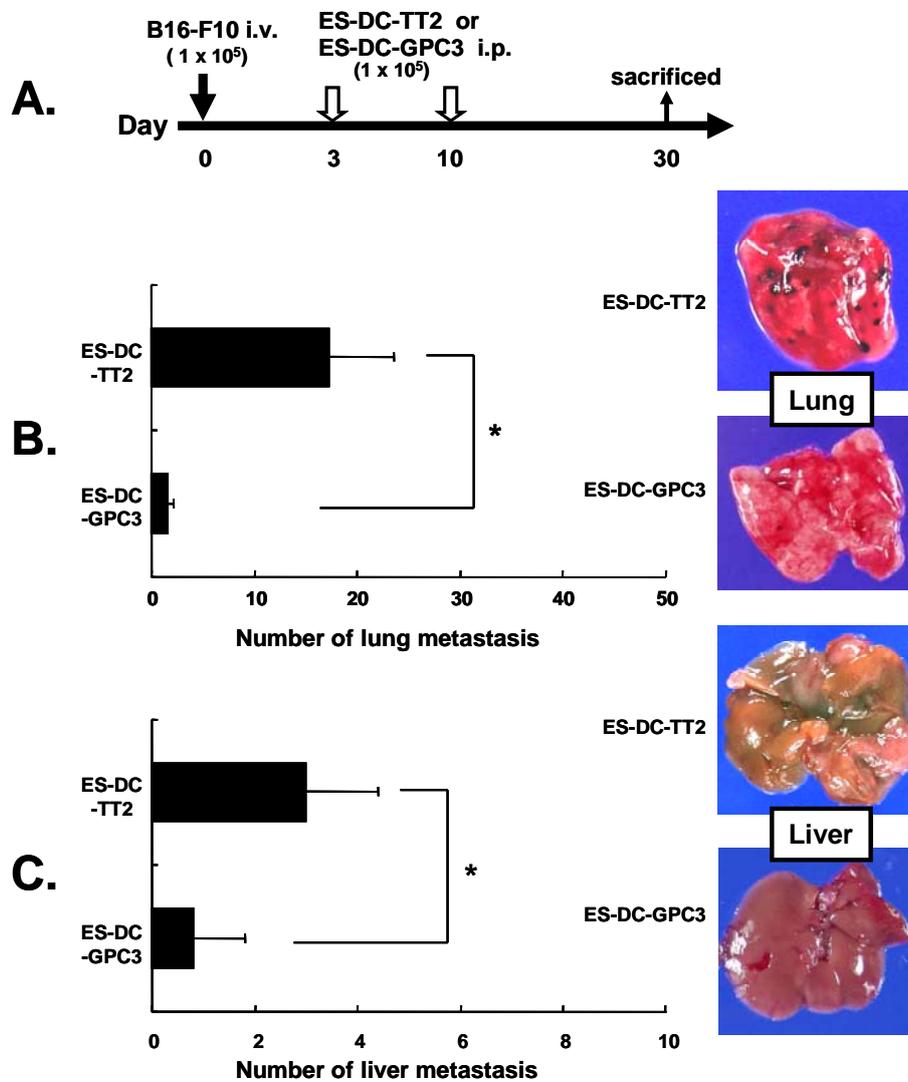


図 16. B16-F10 細胞を用いた転移モデルにおける ES-DC-GPC3 の効果

実験のプロトコールを示す。Day 0 に、B16-F10 細胞をマウス尾静脈より静注し、day 3 と day 10 に ES-DC を腹腔内投与し、day 30 でマウスを解剖して、肺ならびに肝転移の個数を肉眼的にカウントした。データはマウス 5 匹の平均値を示す。その結果、ES-DC-GPC3 治療群で、有意に肺(B)ならびに肝転移(C)が抑制された。肺ならびに肝の切除標本では、ES-DC-TT2 治療群で、多数の大小の結節が認められた。*は、2 群間での有意差を示す(p< 0.05)。

7-9) ES-DC-GPC3 による抗腫瘍効果に関連するエフェクター細胞の同定

さらに、ES-DC-GPC3 によって誘導されるエフェクター細胞のサブセットを決定するために、抗CD4 あるいは抗CD8 抗体をマウスの腹腔内に投与することにより、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞を除去した。その結果、CD4⁺T細胞あるいはCD8⁺T細胞が、それぞれ 90%以上除去されていることを確認した。NK細胞については、抗asialo GM1 抗体を用いて除去した。このような状態のマウスに、ES-DC-GPC3 を免疫し、B16-F10 細胞を皮下移植したところ、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞もしくはNK細胞のいずれかを除去することによって、ES-DC-GPC3 による抗腫瘍効果が観察されなくなったことから、これらの3つのエフェクター細胞のすべてが、抗腫瘍効果を発揮するためには必要であることが示唆された(図 17)。さらに、腫瘍組織の組織学的解析を行ったところ、ES-DC-GPC3 で免疫することによって、腫瘍組織内部あるいは、その周囲により多くの炎症細胞の浸潤が認められた(図 18)。B16-F10 細胞の肺転移巣には、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞が共に浸潤していた。この結果からも、ES-DC-GPC3 による抗腫瘍効果には、CD4⁺T細胞および細胞CD8⁺T細胞のいずれもが関与することが証明された。

図 17

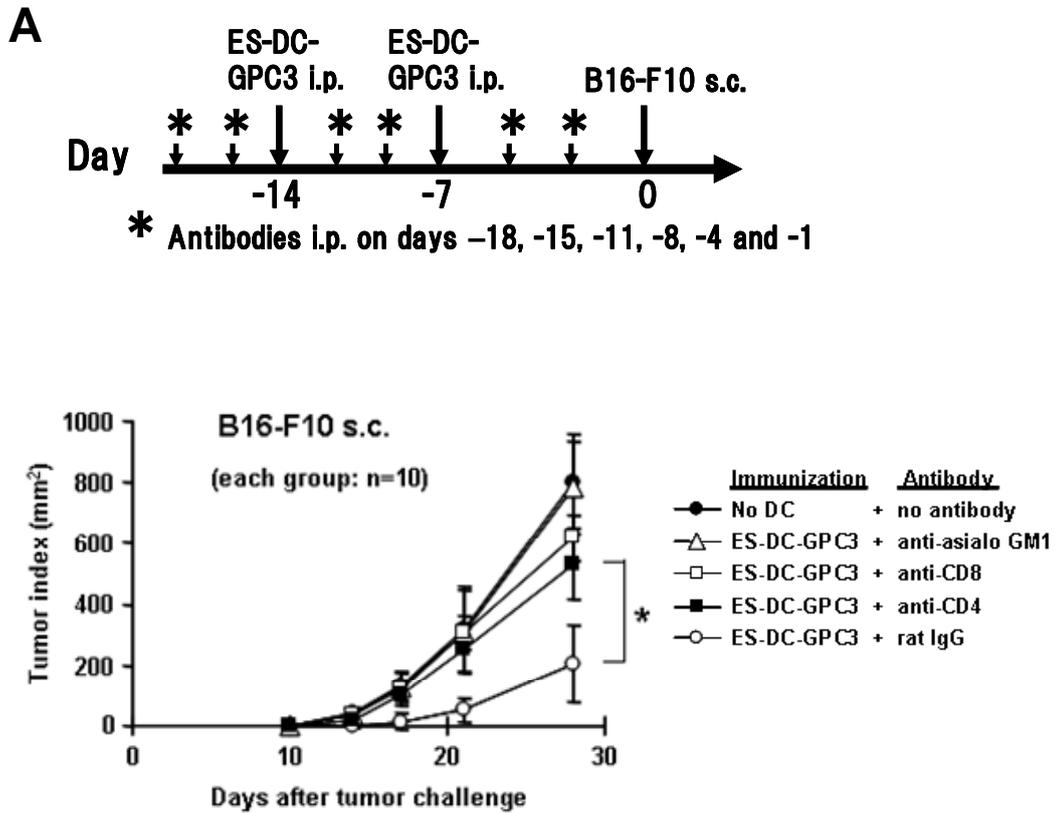


図 17. ES-DC-GPC3 による抗腫瘍免疫の誘導における CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の関与

A に実験のプロトコールを示す。抗 CD4mAb あるいは抗 CD8mAb を計 6 回腹腔内投与して、マウス生体内の CD4⁺T 細胞あるいは CD8⁺T 細胞を除去した。1 × 10⁵ 個の ES-DC-GPC3 を腹腔内に 2 回免疫し、5 × 10³ 個の B16-F10 細胞を皮下移植し、腫瘍の増殖について観察した。体内の CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞あるいは NK 細胞を除去すると、ES-DC-GPC3 による腫瘍増殖抑制効果は消滅した。この結果より、ES-DC-GPC3 により誘導された抗腫瘍免疫応答には、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞および NK 細胞のいずれもが重要な役割を果たしていると考えられた。* は、2 群間での有意差を示す (p < 0.05)。

図 18

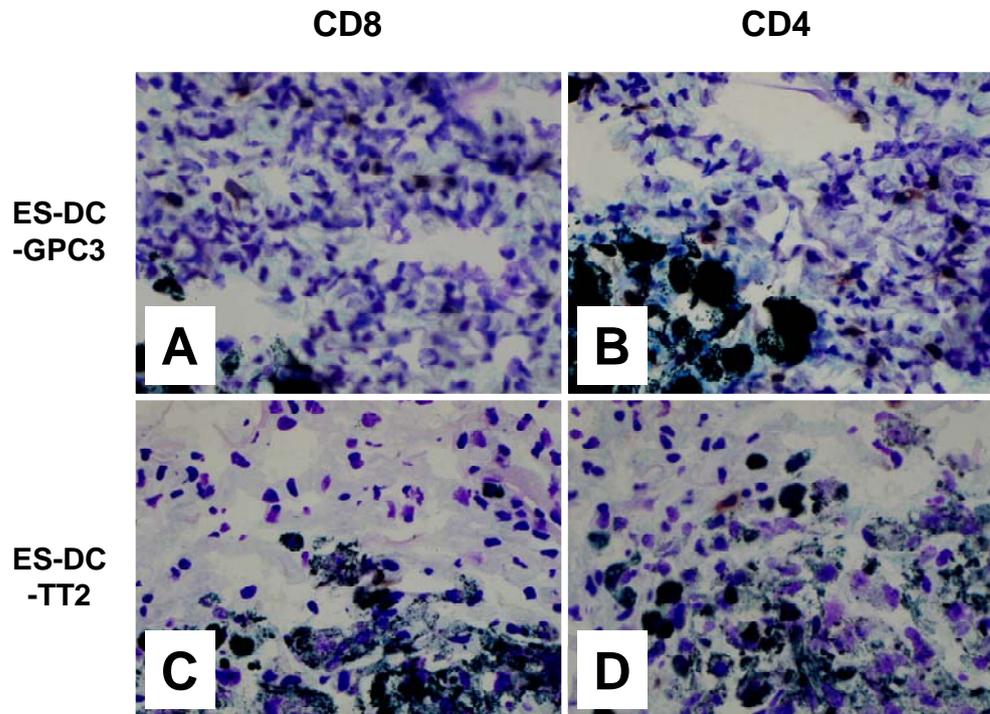


図 18. 腫瘍周囲へのCD4⁺T細胞ならびにCD8⁺T細胞の浸潤

図 17 に示すプロトコールに従って、 1×10^5 個のB16-F10 細胞をマウス尾静脈から静注し、マウスの腹腔内に 1×10^5 個のES-DC-GPC3 (A, B)あるいはES-DC-TT2 (C, D)を2回投与した。Day 30 に、マウスから肺組織を摘出し、抗CD8 抗体 (A, C)、抗CD4 抗体 (B, D)による免疫染色を行った。AとBに示すようにES-DC-GPC3 を投与したマウスでは、ES-DC-TT2 投与マウスと比較して、腫瘍の内部ならびに周囲により多くの炎症細胞 (CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞)の浸潤が認められた。

8 考察

我々は、本研究において、癌胎児性抗原であるGPC3を発現するように遺伝子改変されたES-DCが、GPC3陽性のB16メラノーマ細胞株のサブクローンであるB16-F10細胞に対して抗腫瘍効果を発揮するかどうかを検証した。GPC3遺伝子を導入したES-DCを免疫に用いることで、多種類のペプチドを認識するCTLが誘導された。ES-DC-GPC3を投与することによって、予防実験モデル、治療実験モデルの両方で、自己免疫現象を起こすことなく、抗腫瘍効果を誘導できた。ES-DC-GPC3による抗腫瘍免疫応答は、GPC3陽性の腫瘍細胞に対してのみ誘導され、同じB16サブクローンであるGPC3陰性のB16-F1やMCA205に対しては、誘導されなかった。エフェクター細胞除去実験や組織学的解析結果から、ES-DC-GPC3による抗腫瘍効果は、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞およびNK細胞のいずれもが関与することが示された。

本研究で用いたMCA205やB16-F10細胞は、C57BL/6マウス由来の腫瘍細胞であるため、CBF1マウス内の一部のNK細胞に認識される可能性がある。つまり、CBF1マウスでは、C57BL/6マウスの場合と比較して、より強い免疫原性を示すと思われる。しかしながら、コントロールとして用いた無治療群やES-DC-TT2投与群に、B16-F10細胞やMCA-GPC3細胞を移植することにより、CBF1マウスのすべてが死亡したことから、CBF1マウスにとっても十分侵襲性を示すと考えられた。

本実験で行ったクロミウム放出試験では、ES-DC-GPC3あるいはES-DC-TT2で感作されたCTLは、MCA205やB16-F1に対しても弱い細胞傷害活性を示した。また、同様の現象は、ELISPOTアッセイの結果においても観察された。我々は、このような”バックグラウンド”反応を示すエフェクター細胞の同定までは至っていない。しかしながら、*in vivo*での抗腫瘍効果としては観察されなかった。

また、皮下移植実験において、B16-F10とMCA-GPC3とでは、拒絶効果にかなりの違いが認められた。これは、MHCクラスIの発現の違いによるものではないかと考えられた。B16細胞は、IFN- γ 処理しなければほとんどMHCクラスIを発現しない。NK細胞が産生するIFN- γ により、B16細胞表面上のMHCクラスIの発現が増加し、GPC3特異的なT細胞による攻撃が可能になると考えられることから、ES-DC-GPC3による抗腫瘍効果の誘導には、NK細胞の存在も必要不可欠と考えられた。これは、図17に示す抗体の*in vivo*投与による腫瘍免疫におけるエフェクター細胞の同定に関する実験結果と一致している。

我々は、以前大腸癌細胞株Colon26にGPC3を遺伝子導入した細胞に対して、GPC3特異的な免疫応答を誘導できることを報告した。今回の研究において、メラノーマ細胞株B16-F10がGPC3を自然発現することを発見し、以前の報告と同様にGPC3で免疫することにより、B16-F10の拒絶を誘導できることを証明した。癌胎児性抗原であるGPC3のヒト正常臓器における発現は、胎盤や胎生期の肝に限定される。さらに、マウスとヒトの組織におけるGPC3の発現分布は非常に類似している。結果として、GPC3を標的としたメラノーマあるいは肝細胞がんに対する免疫療

法の可能性が示唆され、臨床応用が期待される。

また、メラノーマ細胞株 B16-F10 は GPC3 を自然発現する一方で、B16-F1 では、その発現が見られなかった。B16-F1、B16-F10 細胞はいずれも、B16 野生株の肺の転移巣から分離させたサブクローンであるが、B16-F1 より B16-F10 がより継代された細胞株であることより、より強い転移傾向を示すと考えられる(48)。この過程において、GPC3 を発現するようになったことから、GPC3 が癌の転移に関して何らかの役割を担っているかもしれないが、今後の GPC3 の機能解析を含め、これを検証する必要があると考えられる。

近年、腫瘍抗原をパルスした樹状細胞を体内へ投与することにより、抗原特異的な T 細胞を活性化できるという報告が数多く見られる(49-52)。腫瘍抗原由来のペプチドを負荷させた樹状細胞による腫瘍免疫療法の臨床試験が、多施設で行われている。これらの臨床試験では、患者の末梢血の単球から樹状細胞を誘導している場合が多い。樹状細胞の供給源として、大量の単球を得るためにアフエレーシスが必要であるが、これは胆癌患者にとってはかなりの負担であると考えられる。さらに、樹状細胞を、患者ごとまたは治療ごとに誘導しなければならないという手間とコストがかかることも問題である。

一方、ES-DC の源である ES 細胞は、無限に増殖する能力をもっている。我々は、DC の無限な供給源としてヒト ES 細胞を使用できるかもしれない。さらに、ウィルスベクターなどを用いることなく、遺伝子改変された樹状細胞を得ることができるだろう。ES-DC を用いることは、腫瘍抗原だけでなく免疫活性分子などを発現するような複数の遺伝子の導入も可能である。我々は、これまでにモデル抗原である OVA および T 細胞などに遊走を誘導するケモカインを発現する ES-DC を投与することにより、マウス体内で OVA 発現腫瘍細胞に対して抗腫瘍免疫応答を誘導することに成功している(22)。重要なことは、本研究で ES-DC による免疫療法が外来抗原である OVA に対してだけでなく、マウスとヒトに共通の癌胎児性抗原である GPC3 に対しても、その可能性が証明されたことである。

遺伝子改変 ES-DC による抗原特異的な免疫制御の臨床応用に向けて、最近カニクイザルの ES 細胞由来の樹状細胞を樹立し、さらに外来遺伝子を発現させることにも成功している。ES-DC を臨床応用する際に、患者の HLA の相違が問題になることが予想される。しかし、最近我々は、一部の MHC のみを共有したセミアロジェニックなマウス ES-DC を用いた場合にでも、抗原特異的な CTL の免疫応答を誘導できることを確認している。日本人において HLA クラス I 対立遺伝子の中で最も高頻度(約 60%)である HLA-A24 をもつ ES-DC を一旦樹立すれば、より多くの患者を有効かつ容易に治療することが可能と考えられる。将来、GPC3 を発現するヒト ES-DC を用いた免疫療法が、メラノーマあるいは肝癌の治療として有効となる可能性を秘めている。

9 結論

我々の最終的な目標は、このような遺伝子改変 ES-DC を生体に投与し、抗原特異的な免疫制御を行うことにある。本研究では、メラノーマに自然発現する抗原 GPC3 を ES 細胞に遺伝子導入し、遺伝子改変 ES-DC を用いて GPC3 特異的な抗腫瘍免疫応答が可能であることを示した。将来的には ES-DC システムを用いて抗原と共に免疫刺激性分子や免疫抑制因子、サイトカインなどの免疫調節分子を発現させることにより、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、移植臓器に対する拒絶反応、癌などの治療法の開発に応用できないかと考えている。

10 参考文献

1. Germain RN MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;76:287-299
2. Berke G The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735-773
3. Lanier LL, Phillips JH Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today* 1996;17:86-91
4. York IA, Rock KL Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369-396
5. Heemels MT, Ploegh H Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995;64:463-491
6. Bjorkman PJ et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512-518
7. Jardetzky TS et al. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991;353:326-329
8. Falk K et al. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290-296
9. Engelhard VH Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1994;12:181-207
10. Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995;41:178-228
11. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991;219:277-319
12. Jardetzky TS et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 1994;368:711-718
13. Stern LJ et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994;368:215-221
14. Huang AY et al. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994;264:961-965
15. Inaba K et al. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 1998;188:2163-2173
16. Legge KL et al. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med* 2002;196:217-227

17. Smithers M et al. Clinical response after intradermal immature dendritic cell vaccination in metastatic melanoma is associated with immune response to particulate antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:41-52
18. Märten A et al. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:637-644
19. Butterfield LH et al. Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clinical Cancer Research* 2003;9:998-1008
20. Stift A et al. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:135-142
21. Inaba K et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693-1702
22. Matsuyoshi H et al. Enhanced priming of antigen-specific CTLs in vivo by embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein: application to antitumor vaccination. *J Immunol* 2004;172:776-786
23. Gonzalez AD et al. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol* 1998;141:1407-1414
24. Filla MS et al. Distribution of syndecans 1-4 within the anterior segment of the human eye: expression of a variant syndecan-3 and matrix-associated syndecan-2. *Exp Eye Res* 2004;79:61-74
25. Bansal R et al. Developmental and FGF-2-mediated regulation of syndecans (1-4) and glypican in oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neurosciences* 1996;7:276-288
26. Veugelers M et al. Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1999;274:26968-26977
27. Paine-Saunders S, Viviano BL, Saunders SGPC6, a novel member of the glypican gene family, encodes a product structurally related to GPC4 and is colocalized with GPC5 on human chromosome 13. *Genomics* 1999;57:455-458
28. Pilia G et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* 1996;12:241-247
29. Cano-Gauci DF et al. Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol* 1999;146:255-264
30. Capurro MI et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 2005;65:6245-6254

31. Nakatsura T et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16-25
32. Nakatsura T et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clinical Cancer Research* 2004;10:6612-6621
33. Nakatsura T et al. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clinical Cancer Research* 2004;10:8630-8640
34. Yagi T et al. A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem* 1993;214:70-76
35. Senju S et al. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 2003;101:3501-3508
36. Kodama H et al. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol* 1994;22:979-984
37. Fernandez NC et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999;5:405-411
38. Bakker J, Lin X, Nelson WG. Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277:22573-22580
39. Niwa H et al. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2002;22:1526-1536
40. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991;108:193-199
41. Hirata S et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand. *J Immunol* 2005;174:1888-1897
42. Nakatsura T et al. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:936-944
43. Yoshitake Y et al. Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clinical Cancer Research* 2004;10:6437-6448
44. Lutz MB et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999;223:77-92
45. Bourgault Villada I et al. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses. *Cancer Res* 2004;64:8761-8766

46. Böhm W et al. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol* 1998;161:897-908
47. Fukui M et al. Therapeutic effect of dendritic cells loaded with a fusion mRNA encoding tyrosinase-related protein 2 and enhanced green fluorescence protein on B16 melanoma. *Tumour Biol* 2004;25:252-257
48. Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature New Biol* 1973;242:148-149
49. Wen YJ et al. Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood* 2002;99:3280-3285
50. Asavaroengchai W, Kotera Y, Mulé JJ. Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:931-936
51. Zwaveling S et al. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 2002;169:350-358
52. Prins RM, Odesa SK, Liao LM. Immunotherapeutic targeting of shared melanoma-associated antigens in a murine glioma model. *Cancer Res* 2003;63:8487-8491