



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1018 号
氏名	正木 彩子
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary adult T-cell leukemia/lymphoma cell-bearing NOD/Shi-scid, IL-2Rγ null mouse model</p> <p>(成人 T 細胞白血病/リンパ腫マウスモデルにおける autologous 設定での患者由来 Tax 特異的細胞障害性 T 細胞による免疫療法)</p> <p>Journal of Immunology Vol. 191: P. 135-144, 2013</p>
論文審査担当者	<p>主査： 稲垣 宏</p> <p>副査： 岡本 尚, 新実 彰男</p>

論文内容の要旨

【背景】難治性疾患である成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)は、従来の多剤併用化学療法では治癒が困難である。現在、唯一治癒を期待できるのが同種造血幹細胞移植であり、腫瘍免疫が ATL 制御に関与していることが示唆されている。Tax は ATL の原因ウイルスである human T-lymphotropic virus type 1(HTLV-1)由来の蛋白で、HTLV-1 感染細胞の腫瘍化に関与する。Tax は高い抗原性を有し、ATL に対する免疫療法の有望な標的と考えられている。我々は患者由来 Tax 特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)が、自己の新鮮 ATL 細胞に対して *in vitro* で強い細胞傷害活性を発揮することを確認した(Cancer Science Vol. 103: P. 1764-1773, 2012)。本研究では高度免疫不全マウスである NOD/Shi - scid, IL - 2R γ null (NOG)マウスをレシピエントとして患者由来新鮮 ATL 細胞を生着させ、NOG/ATL モデルマウスを作成し、これに同一患者から誘導した Tax 特異的 CTL を投与して細胞免疫療法を行った。

【方法】文書にて同意を得て採取した 3 例の ATL 患者末梢血単核球を、磁気標識抗 CD4 抗体を用いて CD4 陽性分画と陰性分画に分離した。CD4 陽性分画は ATL 細胞として NOG マウスに腹腔内投与し、ATL モデルマウスを作成した。CD4 陰性分画には既知のエピトープペプチドを添加して 14 日間培養し、*in vitro* で Tax 特異的 CTL を誘導した。誘導した CTL を同一患者由来の ATL 細胞を用いて作成した NOG モデルマウスに腹腔内投与し、治療効果を評価した。対照群には細胞培養液を腹腔内投与した。治療効果は解剖時の肉眼的所見、組織学的所見、フローサイトメトリー法による CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数、ELISA 法による血清ヒト可溶性インターロイキン 2 受容体(sIL-2R)濃度、生存曲線で評価した。

【結果】患者 1(慢性型。無治療経過観察中)由来の細胞で作成したモデルでは、治療群および対照群のそれぞれ半数を day 28 で解剖した。治療群で CD4 陽性の異型リンパ球からなる ATL 病変へ CD8 陽性細胞が浸潤することを組織学的に確認した。フローサイトメトリー法による評価では、臓器へ浸潤する CD4 陽性の腫瘍細胞が、治療群で対照群と比較して有意に減少していた。腫瘍マーカーである血清ヒト sIL-2R 濃度は治療群で有意に低下していた。解剖せずに経過観察した対照群は day 80 までに全て死亡したが、治療群は全て生存していた。患者 2 (急性型。化学療法後、長期に寛解を維持) 由来の細胞で作成したモデルにおいても、解剖時のフローサイトメトリー法による評価で、臓器に浸潤する ATL 細胞が減少する傾向を認めた。血清ヒト sIL-2R 濃度も治療群で低下する傾向を認めた。患者 3(急性型、寛解後 6 か月で再発)由来の細胞で作成したモデルにおいては治療効果を確認できなかった。いずれのモデルにおいても CTL 治療による重大な副作用は認めなかった。

【考察】3 人の患者由来細胞を用いて作成した ATL モデルマウスに対する CTL を用いた細胞免疫療法の結果、2 例ではマウス生体内において ATL 細胞の減少と腫瘍マーカーの低下を認めた。1 例ではさらに、生存期間の延長も認めた。マウス生体内で Tax 特異的 CTL は腫瘍へ浸潤し、自己の ATL 細胞を認識し細胞障害活性を発揮した。3 例のそれぞれにおいて治療効果に差異を認めたが、これは末梢血単核球を採取した患者の臨床経過と関連している可能性がある。本研究は、がん患者から誘導した腫瘍特異的 CTL による養子免疫療法が、マウス生体内において治療効果を発揮し、生存期間を有意に延長することを科学的に示した初めての報告である。この結果は、ATL に対する免疫療法の標的として Tax が有望であることを示したとともに、他の悪性腫瘍に対しても試みられている CTL を用いた免疫療法の有用性を支持するものである。

論文審査の結果の要旨

[背景]成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)の治療として、唯一治癒を期待できるのが同種造血幹細胞移植であり、腫瘍免疫が ATL 制御に関与していることが示唆されている。Tax は ATL の原因ウイルスである human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) 由来の蛋白で、HTLV-1 感染細胞の腫瘍化に関与する。Tax は高い抗原性を有し、ATL に対する免疫療法の有望な標的と考えられている。我々はこれまでに、患者由来 Tax 特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)が、自己の新鮮 ATL 細胞に対して *in vitro* で強い細胞傷害活性を発揮することを確認した。本研究では高度免疫不全 NOD/Shi - scid, IL - 2R γ null (NOG)マウスをレシピエントとして患者由来新鮮 ATL 細胞を生着させ、NOG/ATL モデルマウスを作成し、これに同一患者から誘導した Tax 特異的 CTL を投与して細胞免疫療法を行った。[方法]3 例の ATL 患者末梢血単核球を、磁気標識抗 CD4 抗体を用いて CD4 陽性分画と陰性分画に分離した。CD4 陽性分画は ATL 細胞として NOG マウスに腹腔内投与し、ATL モデルマウスを作製した。CD4 陰性分画には既知のエピトープペプチドを添加して 14 日間培養し、*in vitro* で Tax 特異的 CTL を誘導した。誘導した CTL を同一患者由来の ATL 細胞を用いて作製した NOG モデルマウスに腹腔内投与し、治療効果を評価した。対照群には細胞培養液を腹腔内投与した。治療効果は解剖時の肉眼的所見、組織学的所見、フローサイトメトリー (FCM) 法による CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数、ELISA 法による血清ヒト可溶性インターロイキン 2 受容体 (sIL-2R) 濃度、生存曲線で評価した。[結果]患者 1 (慢性型。無治療経過観察中) 由来の細胞で作成したモデルでは、治療群および対照群のそれぞれ半数を day 28 で解剖した。治療群で CD4 陽性の異型リンパ球からなる ATL 病変へ CD8 陽性細胞が浸潤することを組織学的に確認した。FCM 法による評価では、臓器へ浸潤する CD4 陽性の腫瘍細胞が、治療群で対照群と比較して有意に減少していた。腫瘍マーカーである血清ヒト sIL-2R 濃度は治療群で有意に低下していた。解剖せずに経過観察した対照群は day 80 までに全て死亡したが、治療群は全て生存していた。患者 2 (急性型。化学療法後、長期に寛解を維持) 由来の細胞で作成したモデルにおいても、解剖時の FCM 法による評価で、臓器に浸潤する ATL 細胞が減少する傾向を認めた。血清ヒト sIL-2R 濃度も治療群で低下する傾向を認めた。患者 3 (急性型、寛解後 6 か月で再発) 由来の細胞で作成したモデルにおいては治療効果を確認できなかった。いずれのモデルにおいても CTL 治療による重大な副作用は認めなかった。[考察]3 人の患者由来細胞を用いて作成した ATL モデルマウスに対する CTL を用いた細胞免疫療法の結果、2 例ではマウス生体内において ATL 細胞の減少と腫瘍マーカーの低下を認めた。1 例ではさらに、生存期間の延長も認めた。マウス生体内で Tax 特異的 CTL は腫瘍へ浸潤し、自己の ATL 細胞を認識し細胞障害活性を発揮した。3 例のそれぞれにおいて治療効果に差異を認めたが、これは末梢血単核球を採取した患者の臨床経過と関連している可能性がある。

【審査内容】第一副査の岡本教授からは、今回の研究で測定した CTL が抗原依存性および抗原特異的に起こっている証左は何かなど 12 項目、主査の稲垣から ATL 病型と細胞障害活性との関連など 10 項目、第二副査の新実教授からは悪性リンパ腫の分類や原発不明癌についてなど 3 項目の質問があった。これらの質問に対して申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究は、がん患者から誘導した腫瘍特異的 CTL による養子免疫療法が、マウス生体内において治療効果を発揮し、生存期間を有意に延長することを科学的に示した初めての報告である。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判定した。

論文審査担当者 主査 稲垣 宏 副査 岡本 尚 新実 彰男