

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	神 保 絢 子
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Therapeutic role of complement dependent cytotoxicity by leukemia-specific antibody in immunotherapy with leukemia cell-derived heat shock protein 70 (白血病細胞由来の熱ショック蛋白 70 を用いた免疫療法における白血病特異抗体を介した 補体依存性細胞障害活性の役割)</p> <p>共著者名</p> <p>佐藤一也、細木卓明、進藤基博、生田克哉、鳥本悦宏、高後 裕</p> <p>掲載学会雑誌名 未公表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>熱ショック蛋白 (heat shock protein : HSP) は、細胞内で種々の蛋白合成を助ける分子シャペロンであり、細胞質内の HSP70 や小胞体内の GP96 がある。腫瘍細胞由来の HSP は、腫瘍抗原ペプチドと結合しており、結合ペプチドは MHC class I 分子へ輸送され抗原提示細胞 (APC) に提示されるため、抗腫瘍ワクチンとして利用可能である。我々は、同系骨髄移植後の微少残存 B 細胞性白血病マウスに対して、白血病細胞由来の HSP70 の免疫により、白血病特異的な CD8 陽性細胞障害性 T 細胞 (CTL) による抗白血病免疫が誘導され、生存日数を延長できることを明らかにした^{1,2)}。さらに、CD4 陽性 T 細胞も生存日数の延長に必須であることを見だし、CD4 陽性 T 細胞を介した液性免疫が関与している可能性を示した¹⁾。これまで、HSP を用いた癌免疫療法において、CTL による細胞性免疫が主な抗腫瘍効果と考えられてきたが、液性免疫の関与は明らかにされていない³⁾。本研究では、HSP を用いた腫瘍免疫療法においても、この液性免疫誘導による治療効果増強が期待されるか否か、白血病細胞由来 HSP70 のマウスへの免疫による白血病特異抗体の産生と白血病特異抗体を介した補体依存性細胞障害活性 (CDC) 誘導について検討した。</p>			

材 料・方 法

1. **実験動物および細胞株**: 5~6 週齢雌 BALB/c マウスを用いた。細胞株として BALB/c マウス由来 B 細胞白血病細胞株 A20, および骨髄性白血病細胞株 T27A, YAC-1 を用いた。
2. **A20 産生モノクローナル IgG (A20-Ig) およびペプチドの精製**: B 細胞白血病株である A20 細胞の培養上清から Protein-A カラムを用いて A20-Ig を精製した。H-2K^d MHC class-I 結合ペプチドである、A20-Ig の可変領域エピトープ由来の A20 イディオタイプペプチド(A20-IP: DYWGQGTEL) と influenza hemagglutinin 蛋白由来のコントロールペプチド (Flu-HA: IYSTVASSL) を高速液体クロマトグラフィーにて精製した。
3. **HSP70 の精製**: A20 細胞および同系マウス肝組織のライセートを超遠心後 ADP-agarose column および Mono Q を用いて HSP70 を精製した。SDS-PAGE 後に抗 HSP70 抗体を用いたウエスタンブロットにて、精製物が HSP70 であることを確認した。また A20 細胞より ATP-agarose column を用いてペプチドを解離した HSP70 も精製した。
4. **HSP70 のマウスへの免疫**: A20 細胞由来の HSP70 (A20-HSP70) を day 0, 5, 10, 15 に皮下注した。コントロールマウスの免疫には、肝組織由来の HSP70 (liver-HSP70) と磷酸緩衝液 (PBS) を用いた。最終免疫後 1, 2, 3 週目 (day 22, 29, 36) の希釈したプール血清あるいは脾細胞を用いて以下の実験を行った。
5. **抗 A20 細胞抗体の検出**: マウス血清を一次抗体、FITC 結合抗マウス IgG を二次抗体として、A20 細胞に対する蛍光強度をフローサイトメトリー (FCM) を用いて解析した。また、A20-HSP70 もしくは A20-Ig に対するマウス血清の反応性を、HRP 結合抗マウスロバ IgG を二次抗体として enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により解析した。A20-Ig に対する、A20-IP もしくは Flu-HA で前処理したマウス血清中の IgG レベルも、ELISA にて解析した。
6. **CD4T 細胞における細胞内 IL4 の測定**: 免疫マウス脾細胞を各免疫原で刺激後、FITC 結合抗マウス CD4 抗体で標識した脾細胞を膜透過処理し、PE 結合抗マウス IL4 抗体で標識して IL4 産生 CD4T 細胞 (IL4+CD4+細胞) を FCM にて解析した。
7. **免疫マウス血清による CDC の解析**: 標的細胞 (A20, YAC-1, T27A) と非動化マウス血清を混合培養し、ウサギ補体を添加後に標的細胞の trypan blue の取り込みから細胞障害活性を算出した。

成 績

1. A20 細胞および肝組織から精製した蛋白は、ウエスタンブロットにて抗 HSP70 抗体と反応を示す HSP70 であることを確認した。
2. 免疫マウス血清中の抗 A20 細胞抗体の検出を試みた。最終免疫から 1, 2 週目のマウスでは、A20-HSP70 免疫マウス (A20-HSP マウス) 血清 IgG による A20 細胞の平均蛍光強度 (MFI) は、liver-HSP70, PBS 接種マウス (liver-HSP マウス, PBS マウス) と同程度であったが、3 週目では高値を示した。A20-HSP70 の最終免疫から 3 週目に抗 A20 細胞抗体を検出したため、3 週目の血清

を用いて以下の実験を行った。

3. 抗 A20 細胞抗体の A20-HSP70 への反応性を ELISA で検討した。A20-HSP マウス血清中の A20-HSP70 を認識する IgG 抗体価は、X20, X100 ともに liver-HSP, PBS マウスと比べて有意に高値を示したことより、抗 A20-HSP70 抗体の産生が確認された。また、ペプチドを解離した A20-HSP70 を認識するマウス血清中の IgG 抗体価を検討したところ、liver-HSP, PBS マウス血清では、結合ペプチドの有無にかかわらず、IgG 抗体価に有意差を認めなかったが、A20-HSP マウス血清では、ペプチド解離により A20-HSP70 を認識する IgG の反応性が完全に消失した。以上より、A20-HSP70 免疫は A20-HSP70 結合ペプチドを認識する IgG 産生を誘導した。
4. A20-Ig やその可変領域エピトープ由来の A20-IP は同系マウスに対して免疫原性を持つ。A20-HSP マウス血清の認識する A20-HSP70 結合候補ペプチドの検索のため、まず A20-HSP マウス血清の A20-Ig 特異的な反応性を検討した。A20-HSP マウス血清中の A20-Ig を認識する IgG 抗体価は liver-HSP, PBS マウスに比べて有意に高値であった。次に抗 A20-Ig 抗体が A20-IP を認識するか否かを検討するため、A20-IP で前処理した A20-HSP マウス血清の、A20-Ig に対する反応性を検証したところ、無処理もしくはコントロールペプチド前処理血清に比べて、A20-IP 前処理血清中の A20-Ig を認識する IgG 抗体価が有意に低下した。以上より、A20-HSP70 免疫は抗 A20-Ig 抗体の一つとして A20-IP 特異的な抗体産生を誘導した。
5. A20-HSP70 免疫による Type-2 Helper T 細胞 (Th2) の関与を、CD4T 細胞内の IL4 産生から検証した。A20-HSP70 で刺激された IL4+CD4+細胞は、最終免疫後 1 週目では、liver-HSP70, PBS 刺激に比べ有意に高値であったが、2、3 週目では各刺激間で差は認めなかった。また A20-HSP70 で刺激された、1 週目の各免疫マウス脾細胞中の IL4+CD4+細胞は、A20-HSP マウスにおいて最も高率であった。以上より、A20-HSP70 の最終免疫後 1 週目に、CD4T 細胞による A20-HSP70 特異的な IL4 の産生が誘導された。
6. 最終免疫後 3 週目のマウス血清の A20 に対する CDC 活性を検討した。A20-HSP マウス血清は、補体無添加では A20 に対する細胞障害活性を認めなかったが、補体添加により x20, x10 いずれの血清においても、liver-HSP, PBS マウスに比べ有意に細胞障害活性が高値となった。一方、YAC-1, T27A を標的細胞とした場合は、A20-HSP マウス血清は PBS マウス同様 CDC 活性を認めなかった。

考 案

本研究では、自己白血病細胞由来の HSP70 の免疫が白血病特異ペプチドを認識する抗体を誘導し、その抗体を介した CDC が白血病拒絶に重要な役割を担っている可能性を示した。HSP を用いた癌免疫療法において、遺伝子組み換え HSP と腫瘍抗原との複合体の免疫による抗原特異的な抗体産生の報告はあるが、自家腫瘍由来の HSP の免疫により、腫瘍特異的な抗体産生や、CDC を含めてその抗体を介した細胞障害活性は証明されておらず、本研究で得られた知見は、臨床応用に際してより実際的であり有用な情報となりうる。

本研究では、白血病細胞由来の HSP70 の免疫により IL4+CD4+細胞の活性化から 2 週間後に抗白血病抗

体が産生された。腫瘍細胞由来の HSP70 の結合ペプチドは、APC に取り込まれた後 MHC class-I, II 分子上に輸送されるが、class-II 分子に運ばれた抗原ペプチドは、T 細胞受容体を介して Th 細胞から Th2 サイトカインの産生を促し B 細胞の活性化を導く。一方、Th2 サイトカイン刺激から約 2 週間後に B 細胞からの IgG の産生が最大になるとされている。従って A20-HSP70 が APC に取り込まれ、HSP70 結合ペプチドを認識した Th 細胞が活性化され IL4 を産生し、刺激され増殖した B 細胞が、最終的には A20-HSP70 結合ペプチド特異的な抗体産生を導いたと考えられる。

B 細胞株である A20 細胞を用いた本研究では、免疫原性を有する A20-Ig やイディオタイプペプチド (IP) を用いた詳細な研究が可能であり、A20-HSP70 の免疫により A20-IP に対する特異抗体の産生を証明しえた。一方我々は、A20-HSP70 の免疫により A20-HSP70 結合ペプチドに対する抗体産生を明らかにした。従って A20-IP が A20-HSP70 の結合ペプチドであるか否かは解明すべき点ではあるが、A20-IP は、それ自身が CTL 誘導エピトープであり、MHC class-I 結合ペプチドである点が、HSP70 結合ペプチドとしての特徴とも共通しており、A20-HSP70 結合ペプチドの一つである可能性がある。

我々は A20 細胞由来の HSP70 と樹状細胞の併用により、最終免疫から 1 週後に CTL 活性の著しい増強が可能であることを報告している²⁾。一方、本研究では最終免疫から 3 週後に、抗 A20 細胞抗体の誘導と A20 細胞特異的な CDC 活性を証明した。HSP を用いた癌免疫療法では、腫瘍特異的な細胞性免疫と液性免疫の最適な誘導時期が異なる可能性があるが、その違いを利用して各々を増強することで、さらに効果的な抗腫瘍免疫を誘導できる可能性がある。

結 論

白血病細胞由来の HSP70 の免疫は、動物実験レベルで、Th2 細胞の活性化を介して抗白血病細胞抗体を誘導し、その抗体は白血病細胞由来の HSP70 に結合する白血病特異的ペプチドを認識する可能性が考えられた。また抗白血病細胞免疫の機序の一つとして、その抗体を介した白血病特異的な CDC の関与が考えられた。

引 用 文 献

1. Sato K, Torimoto Y, Tamura Y, Shindo M, Shinzaki H, Kohgo Y. Immunotherapy using heat-shock protein preparations of leukemia cells after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood* 2001; 98: 1852-1857
2. Iuchi Y, Torimoto Y, Sato K, Tamura Y, Jimbo J, Inamura J, Shindo M, Ikuta K, Ohnishi K, Kohgo Y. Combined use of dendritic cells enhances specific antileukemia immunity by leukemia cell-derived heat shock protein 70 in a mouse model with minimal residual leukemia cells. *Int J Hematol* 2006; 84: 449-458.
3. Srivastava PK. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 185-194.

参考文献

1. 進藤基博、佐藤一也、神保絢子、細木卓明、生田克哉、佐野文子、西村和子、鳥本悦宏、高後 裕. 急性骨髄性白血病に対する骨髄非破壊的前処置による臍帯血移植後voliconazole投与中に発症した肺ムコール症. 臨床血液 2006 ;48 :412-417.
2. Iuchi Y, Torimoto Y, Sato K, Tamura Y, Jimbo J, Inamura J, Shindo M, Ikuta K, Ohnishi K, Kohgo Y. Combined use of dendritic cells enhances specific antileukemia immunity by leukemia cell-derived heat shock protein 70 in a mouse model with minimal residual leukemia cells. Int J Hematol 2006; 84: 449-458.
3. 神保絢子、佐藤一也、生田克哉、稲村純季、細木卓明、進藤基博、大西浩平、三代川齊之、鳥本悦宏、高後 裕. Neuron specific enolase産生多発性骨髄腫. 臨床血液 2006 ;47 :1381-1386.
4. 井内康之、佐藤一也、神保絢子、稲村純季、進藤基博、生田克哉、新崎人士、大西浩平、渡邊真司、鳥本悦宏、高後 裕. 甲状腺癌に対する¹³¹I内照射治療後に発症したt(4;11)(q21;q23)を有する急性リンパ性白血病. 臨床血液 2005; 46 :1202-1207.
5. Inamura J, Ikuta K, Jimbo J, Shindo M, Sato K, Torimoto Y, Kohgo Y. Upregulation of hepcidin by interleukin-1beta in human hepatoma cell lines. Hepatol Res. 2005;33:198-205.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	神保 絢子
審査委員長 若 宮 伸 隆 ㊦ 審査委員 高 後 裕 ㊦ 審査委員 鳥 本 悦 宏 ㊦			
学 位 論 文 題 目 Therapeutic of complement dependent cytotoxicity by leukemia-specific antibody in immunotherapy with leukemia cell-driven heat shock protein 70 (邦題：白血病細胞由来の熱ショック蛋白70を用いた免疫療法における白血病特異抗体を介した補体依存性細胞障害活性の役割)			
<p>熱ショック蛋白 (heat shock protein: HSP) は、細胞内で種々のタンパク合成を助ける分子シャペロンであり、細胞内の HSP70 や小胞体内の GP96 がある。腫瘍細胞由来の HSP は、腫瘍抗原ペプチドと結合しており、結合ペプチドは MHC class I 分子に輸送され抗原提示細胞 (APC) に提示されるため、抗腫瘍ワクチンとしての応用が計画されている。近年鳥本らのグループは、マウスの系で、同系骨髄移植後、B 細胞性白血病残存ケースにおいて、白血病細胞由来の HSP70 の免疫により、抗白血病細胞免疫が誘導され、生存日数の延長を誘導できることを明らかにした。また、その際の抗腫瘍免疫では、CD8 陽性細胞障害性 T 細胞 (CTL) と CD 陽性 T 細胞が必須であることを見出している。</p> <p>論文提出者は、上記の白血病細胞由来の HSP70 を用いた、抗腫瘍免疫における液性免疫誘導に注目し、補体依存性細胞障害効果についての役割の検討を行った。</p> <p>方法としては、B 細胞白血病細胞株 A20 細胞や肝臓から HSP70 を精製し、これらをマウスに免疫して、マウスの抗 HSP70 血清を得た。次に得られたマウス血清中における抗 A20 細胞抗体や A20-Ig に対する抗体の測定をフローサイトメトリーや ELISA</p>			

法にて行った。また、免疫マウスにおける脾臓細胞を用いて、免疫原での *in vitro* 再刺激後に、CD4T 細胞の細胞内 IL4 を測定した。最後に免疫マウス血清を用いて、標的細胞 (A20, YAC-1, T27A) に対する補体依存性細胞障害活性の測定を行った。

その結果として、B 細胞白血病細胞株 A20 細胞由来 HSP70 (A20-HSP70) や肝臓から得られた精製 HSP70 (liver-HSP70) の免疫により得た、マウスの血清において、抗 A20 細胞抗体が、3 週目の A20-HSP70 免疫マウスにおいて検出された。さらに、抗 A20 細胞抗体は、ELISA にて A20-HSP70 への反応性が明らかになった。また、A20-HSP70 におけるペプチド解離処理により、ELISA の反応性が減少した。つぎに、A20-HSP70 免疫マウス血清において、A20-Ig に対する反応性を ELISA 法によって明らかにし、その結合活性は、A20-Ig の可変領域由来イディオタイプペプチド結合 (A20-IP) カラムによる吸収により、減弱することを明らかにした。さらに本血清が、補体依存性に優位に A20 細胞への細胞障害性活性を持つことを見出した。

以上のことから、本研究での新しい発見は、マウスの系で、腫瘍由来の HSP70 の免疫により、抗腫瘍抗体の誘導と腫瘍細胞特異的な補体依存性細胞障害活性を有する抗体の誘導ができることを明らかにしたことである。これらの結果は、従来の腫瘍特異的な細胞障害性 T 細胞の誘導とともに、抗腫瘍免疫の両輪を作るものであり、本法で使われた腫瘍由来の HSP70 が、優れた腫瘍ワクチンの候補であることを示している。これらで得られた知見は今後、ヒト腫瘍における、ワクチン開発に役立つ可能性があり、臨床的に非常に意義深いと考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。