

論 文 内 容 要 旨

【は じ め に】

胆管癌の治療としては病変存在部位を en-bloc に切除する外科治療が理想的ではあるが、実際に遭遇する症例は進行癌が多く、広範囲の胆管樹沿いの浸潤や隣接臓器への浸潤、高度な肝門部の大血管浸潤などのため切除不能例が多数を占めるのが現実であった。われわれは 1988 年より、胆道内瘻化や胆管腔内放射線照射療法、腫瘍局注癌化学療法、肝動注癌化学療法を駆使して切除不能胆道癌症例に対する積極的な集学的治療を展開してきたが、飛躍的な治療成績向上のためには高い腫瘍特異性を有する治療法の開発が不可欠であると考えていた。

【目 的】

胆管癌に対する新しい免疫療法を確立するために、Bispecific 抗体 (BsAb) を用いて腫瘍特異性の高い治療法を検討し、臨床に応用すべく *in vitro*、および胆管癌移植 SCID マウス治療モデルにおいて基礎的研究をすること。

【方 法】

腺癌に発現が高い MUC1 (ムチンコア蛋白の一つ) に着目し、本抗体を用いて BsAb を 3 種類作製し、胆管癌に対するターゲッティング性を向上させ、*in vitro*、および胆管癌移植 SCID マウス治療モデルにおいて効果を検討した。さらに、この効果を増強させるため、BsAb の併用と IL-12 を用いて effector 細胞を作製し、更なる効果を検討した。BsAb は、MUC1 に対する抗体 (MUSE11) と抗 CD3 抗体 (OKT-3) (MUC1xCD3 BsAb) あるいは抗 CD2 抗体 (TS2/18.1.1) (MUC1xCD2 BsAb) および、抗 CD28 抗体 (15E8) (MUC1xCD28 BsAb) から化学的合成法により作製し、ゲル濾過にて精製した。effector 細胞の LAK 細胞は、末梢血リンパ球を抗 CD3 抗体及び IL-2 100U/ml にて 48 時間培養後 IL-2 100U/ml で培養しアッセイに用いた。IL-12 誘導の LAK 細胞は末梢血リンパ球を IL-2 300U/ml と IL-12 20U/ml により誘導した。標的細胞は当施設で樹立した胆管癌細胞株 (TFK-1)、その他 OCUCCh-LM1, HuCC-T1 を用い、コントロール群として MUSE11 と反応しない肝細胞癌株 (HT-17) を用いた。細胞傷害活性測定は MTT 法アッセイにて行った。*in vivo* の治療モデルは、SCID マウス背部に胆管癌細胞株を移植後 10 日より 4 日連続で尾静脈より BsAb にて感作した LAK 細胞を静注することにより施行した。

【結 果】

各細胞株との MUSE11 との反応は TFK-1 および OCUC_h-LM1 において強く反応するが、HuCC-T1 に対しては弱く反応した。また、HT-17 に対しては反応を認めなかった。作製した 3 つの BsAb は両者とも分子量約 100kDa であり、FACS にて、MUC1 と CD3, MUC1 と CD2, MUC1 と CD28 のそれぞれ 2 つの抗原決定基を同時に認識する合成抗体であることを確認した。細胞傷害活性は、MUC1xCD3 BsAb 0.5 μ g/ml にてプラトーに達し、以下の実験を BsAb 0.5 μ g/ml にて施行した。TFK-1 に対し MUC1xCD3 BsAb 0.5 μ g/ml 添加群にて E/T ratio 5 で 59% の細胞傷害性を示し、無添加群と比較して有意な細胞傷害活性の増強が認められた。さらに抗 CD2 抗体を添加しても細胞傷害活性の増強は認められなかったが、MUC1xCD2 BsAb を添加することにより、MUC1xCD3 BsAb 単独より約 10% の細胞傷害活性の増強があり、bispecific 抗体で CD2 と架橋することにより細胞傷害活性が増強したと考えられた。また、MUSE11 と反応しない HT-17 では MUC1xCD3 BsAb を添加しても細胞傷害活性の増強はほとんど認められず、MUC1 を発現している腫瘍細胞のみに特異的な細胞傷害活性の増強が確認された。このことはブロッキングテストにより確認した。一方、IL-12 誘導 LAK を用いての細胞傷害活性は、IL-12 誘導 LAK 単独にても約 50%、さらに MUC1xCD3 BsAb を添加すると 78% もの細胞傷害性を認め、高い抗腫瘍性を発揮した。また、LAK 細胞と BsAb の併用効果を *in vivo* の胆管癌移植 SCID マウスモデルにおいて検討すると、MUC1xCD3 BsAb と MUC1xCD28 BsAb の併用時において腫瘍増殖抑制効果を認め、臨床応用に期待できる結果であった。

【結 語】

MUSE11 による BsAb による養子免疫療法は、LAK 細胞にターゲッティング性を持たせると共に、細胞傷害性の増強効果により、従来、十分な効果が期待できなかった胆管癌をはじめとする腺癌系の悪性腫瘍への免疫療法に道を開くものと考えられる。

審査結果の要旨

胆管癌の治療としては病変存在部位を en-bloc に切除する外科治療が理想的ではあるが、進行癌が多く、切除不能例が多数を占めるのが現状である。集学的治療を展開してきたが、飛躍的な治療成績向上のためには高い腫瘍特異性を有する治療法の開発が不可欠であると考えていた。そこで、胆管癌に対する新しい免疫療法を確立するために、Bispecific 抗体 (BsAb) を用いて腫瘍特異性の高い治療法開発し、臨床に応用すべく *in vitro*, および *in vivo* において基礎的研究を施行した。BsAb は、MUC1 に対する抗体 (MUSE11) と抗 CD3 抗体 (MUC1×CD3 BsAb) あるいは抗 CD2 抗体 (MUC1×CD2 BsAb) および、抗 CD28 抗体 (MUC1×CD28 BsAb) から化学的合成法により作製した。LAK 細胞は、末梢血リンパ球を抗 CD3 抗体及び IL-2 にて 48 時間培養後 IL-2 で培養しアッセイに用いた。IL-12 誘導の LAK 細胞は末梢血リンパ球を IL-2 と IL-12 により誘導した。標的細胞は胆管癌細胞株 TFK-1, OCUC_h-LM1, HuCC-T1 を用い、コントロール群として MUSE11 と反応しない肝細胞癌株 (HT-17) を用いた。*in vivo* の治療モデルは、SCID マウス背部に胆管癌細胞株を移植後 10 日より 4 日連続で尾静脈より BsAb にて感作した LAK 細胞を静注することにより施行した。作製した 3 つの BsAb とも分子量約 100kDa であり、FACS にて、それぞれ 2 つの抗原決定基を同時に認識する合成抗体であることを確認した。細胞傷害活性は、MUC1×CD3 BsAb 0.5 μg/ml にてプラトーに達した。TFK-1 に対し MUC1×CD3 BsAb 0.5 μg/ml 添加群にて E/T ratio 5 で 59% の細胞傷害性を示し、無添加群と比較して有意な細胞傷害活性の増強が認められた。さらに MUC1×CD2 BsAb を添加することにより、MUC1×CD3 BsAb 単独より約 10% の細胞傷害活性の増強があり、BsAb 2 種併用により細胞傷害活性が増強したと考えられた。一方、IL-12 誘導 LAK を用いての細胞傷害活性は、IL-12 誘導 LAK 単独にても約 50%、さらに MUC1×CD3 BsAb を添加すると 78% もの細胞傷害性を認め、高い抗腫瘍性を発揮した。胆管癌移植 SCID マウスモデルにおいては、MUC1×CD3 BsAb と MUC1×CD28 BsAb の併用時において腫瘍増殖抑制効果を認め、臨床応用に期待できる結果であった。

以上、抗 MUC1 抗体を用いた BsAb により、LAK 細胞にターゲティング性を持たせると共に細胞傷害性の増強効果を示し、従来十分な効果が期待できなかった胆管癌をはじめとする腺癌系の悪性腫瘍への癌免疫療法の効果を明らかにしたこれらの研究成果は学位の授与に値するものである。