

氏 名（本籍）	よし 吉	だ 田	ひろし 寛
学位の種類	博 士（医 学）		
学位記番号	医 博 第 1 9 0 9 号		
学位授与年月日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻		
学位論文題目	Novel adenovirus expressing human 4-1BB ligand enhances antitumor immunity against cholangiocarcinoma （human 4-1BB ligand発現新規アデノウイルス は胆管癌に対する抗腫瘍免疫を増強する）		

（主 査）

論文審査委員	教授 松 野 正 紀	教授 金 丸 龍之介
	教授 林	富

論文内容要旨

目 的

胆管癌は局所浸潤性が高度で、近接した大血管に直接浸潤し切除不能となることが多い。我々は切除不能胆管癌を対象として積極的に集学的治療を展開してきたが、延命効果は得られるものの最終的に症例を失うことを数多く経験した。さらなる予後改善には強力な治療手段の開発が急務であり、養子免疫療法の基礎的研究を進めてきた。今回 T 細胞活性化の costimulatory molecule である 4-1BB ligand (以下 4-1BBL) に着目し、胆管癌に対する抗腫瘍免疫における効果を検討した。

方 法

Human 4-1BBL 発現アデノウイルス (以下 Ad4-1BBL) を作製し、このアデノウイルスを用いて腫瘍細胞に 4-1BBL を発現させ養子免疫療法におけるエフェクター細胞の活性化を図った。

- (1) RT-PCR 法を用いて活性化ヒトマクロファージ細胞株から 4-1BBL の cDNA を単離し、これを E1・E3 欠損 5 型アデノウイルスに組み込み Ad4-1BBL を作製した。
- (2) Western blot と flow cytometry により Ad4-1BBL による癌細胞への遺伝子導入効率を種々の腺癌細胞株を用いて検討した。
- (3) MTS assay 法による細胞傷害性試験で、ヒト末梢血単核球 (以下 PBMCs) と PBMCs を抗 CD3 抗体と IL-2 で刺激して誘導した活性化 T 細胞 (以下 T-LAK cells) をエフェクター細胞とした際の抗腫瘍活性を測定した。
- (4) ELISA 法を用い、4-1BBL 発現胆管癌細胞株と T-LAK cells または PBMCs の混合培養でのサイトカイン産生を測定した。
- (5) SCID mice 担癌モデルを用い、*in vivo* での Ad4-1BBL+T-LAK cells 投与による遺伝子免疫治療の抗腫瘍効果を検討した。

結 果

- (1) Ad4-1BBL は種々の腺癌細胞株に高率に感染し、短時間で濃度依存性に 4-1BBL を発現させた。またその発現効率は高く、10 pfu/cell という低濃度のアデノウイルスで十分な発現を認めた。
- (2) T-LAK cells をエフェクター細胞として用いた 48 時間細胞傷害性試験で、Ad4-1BBL 感染

群では非感染群およびコントロールベクター（以下 AdNull）感染群と比較し有意にその抗腫瘍活性の増強を認めた。またその効果は、4-1BBL のレセプターである可溶性 4-1BB を用いた blocking test で濃度依存性に阻害された。

- (3) 同様の細胞傷害性試験で naive PBMCs をエフェクター細胞として用いた場合、48 時間 assay ではその効果は軽度であったが、72 時間 assay で PBMCs の抗腫瘍活性は有意に増強された。これは naive な PBMCs では 4-1BB の発現を認めず、癌細胞等との接触による活性化でこの発現が誘導されることに起因すると考えられた。このような理由からその効果発現には時間を要するものの、naive な PBMCs の抗腫瘍活性を誘導できたことから、投与されたエフェクター細胞だけではなく生体内に存在する免疫担当細胞の抗腫瘍効果をも誘導できる可能性が示唆された。
- (4) 4-1BBL 発現胆管癌細胞株との混合培養によりエフェクター細胞からの IFN-gamma, IL-2, GM-CSF の産生が有意に増加した。これらのサイトカイン産生増加は、その抗腫瘍活性が増強される 1 つの要因と考えられた。
- (5) 胆管癌皮下移植 SCID マウスを用いた *in vivo* 治療実験において、Ad 4-1BBL 単独投与群や AdNull+T-LAK cells 投与群では未治療群と同様な腫瘍増殖を認めたのに対し、Ad 4-1BBL+T-LAK cells 投与群では治療後 10 週間にわたる有意な腫瘍の増大抑制効果を認めた。

総 括

これらの結果は、4-1BBL の強力な T 細胞活性化能を示唆し、Ad 4-1BBL を用いた遺伝子免疫治療の臨床展開の端緒になるものと考えられる。

審査結果の要旨

胆管癌は局所浸潤性が高度で切除不能となることが多く、治療成績向上を目的とした養子免疫療法の研究が進められている。効果的な抗腫瘍免疫を得るためには、T細胞と抗原間で共刺激分子や他の細胞間接着分子の結合が必要不可欠であり、これら諸分子の研究も盛んに行われてきた。最近、新たな共刺激分子として4-1BBLという分子が同定され、マウスでの強力なT細胞活性化能が示され注目されている。本研究ではヒト4-1BBL発現新規アデノウイルスベクター(Ad4-1BBL)の作製に成功し、種々の手法を用いて4-1BBLが抗腫瘍免疫に果たす役割、機能の解析を行うとともに、胆管癌を標的としたAd4-1BBLの臨床応用への検討を加えている。

RT-PCR法により活性化ヒトマクロファージ細胞株から4-1BBLのcDNAを単離し、これをE1・E3欠損5型アデノウイルスに組み込みAd4-1BBLを作製した。このAd4-1BBLは種々の腺癌細胞株に高率に感染し短時間で濃度依存性に4-1BBLを発現させることが、Western blotおよびflow cytometryで確認された。胆管癌細胞株を標的としたMTS assay法による*in vitro*実験では、非感染群およびコントロールベクター(AdNull)感染群と比較しAd4-1BBL感染群で、エフェクターであるT-LAKの有意な抗腫瘍活性増強を認め、この効果は4-1BBLのレセプターである4-1BB可溶性蛋白を用いたblocking testで濃度依存性に阻害された。エフェクターをnaive PBMCとしても同様の結果を得ている。4-1BBL発現胆管癌細胞株とT-LAKまたはPBMCを48時間混合培養し、その培養上清中のサイトカイン濃度をELISAで測定したところ、T-LAKとPBMCのいずれもIFN- γ 、IL-2、GM-CSF産生が有意に増加し、一方IL-4とIL-10の産生には変化を認めなかった。また、胆管癌皮下移植SCIDマウスを用いた*in vivo*治療実験で、Ad4-1BBL単独投与群やAdNull+T-LAK投与群では未治療群と差を認めなかったのに対し、Ad4-1BBL+T-LAK投与群では治療後10週間にわたる有意な腫瘍の増大抑制効果を認めた。

以上より、4-1BBLはマウス同様ヒトT細胞においても強力な活性化シグナル伝達能を有し、Ad4-1BBLを用いた遺伝子免疫療法は胆管癌の有効な治療手段となりうると考察している。

本研究は新たなアデノウイルスベクターの作製とその臨床応用に向けた基礎実験として評価され、いずれの結果もすでに確立された手法を用いて導き出されており、データの信頼性は高い。外科的治療では限界のある胆管癌治療に対して新たな遺伝子免疫治療の可能性を示したという点で、学位論文に値する重要な研究といえる。