

氏名（本籍）	もう たい たつ や（佐賀県） 馬 渡 達 也
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第 1057 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	<b>A novel and effective cancer immunotherapy mouse model using antigen-specific B cells selected <i>in vitro</i></b> ( <i>in vitro</i> で選択・誘導した抗原特異的 B 細胞を用いた新規抗腫瘍免疫療法モデルの構築)

論文審査委員 (主査) 教授 北村 大介  
教授 安部 良 教授 後飯塚 僚  
教授 中村 岳史 嘱託教授 江角 浩安

## 論文内容の要旨

免疫療法は、化学療法・外科的療法・放射線療法に次ぐ第四の治療法として現在認知されつつある。その免疫療法の中でも研究が盛んな療法に、細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞や樹状細胞を用いた養子移入免疫療法と、抗原への特異性を利用したモノクローナル抗体療法が挙げられる。現在行われている養子移入免疫療法は細胞傷害性細胞を活性化させるものが主流となっている。担癌患者の末梢血中に存在する、あるいは腫瘍組織に浸潤している細胞傷害性の T 細胞や NK 細胞を取り出し、試験管内(*in vitro*)で活性化させ同じ担癌患者に戻すことで、腫瘍の排除を促進させるという治療法である。また、担癌患者由来の樹状細胞に腫瘍特異抗原を提示させ、これを患者本人に戻すことで、間接的に細胞傷害性 T 細胞や NKT 細胞を活性化させるという治療法も活発に研究されている。

一方、抗体療法に関しては既に一部の癌に対して高い治療効果を示している。モノクローナル抗体医薬は標的分子に対し高い特異性を持ち、作用機序や代謝機構がよく分かっていることから、効果及び副作用の予測が比較的容易であり、開発のリスクは少ない。またハイブリドーマ法やファージディスプレイ法など、様々なモノクローナル抗体の作製法が開発され、現在も日々改良がなされている。前者の場合、モノクローナル抗体はマウス等

の動物を抗原で免疫した後、抗原特異的抗体を産生するハイブリドーマの作製を経て抗体が作製されるが、これをヒトに投与するとこの抗体に対するヒト抗体が出現し、抗体の作用が減弱されてしまう恐れがある。よって、ハイブリドーマから単離した動物の抗体遺伝子を基に、組換えによりヒトとのキメラ抗体やヒト化抗体を作製する必要がある。しかし、その行程は煩雑であり、組換えにより抗体の抗原親和性や安定性が低下する可能性があり、そのためヒト体内での効果を予測し難いと言う問題を抱えている。一方、ファージディスプレイ法の場合、ヒト抗体遺伝子のライブラリーから選別することにより完全ヒト抗体を作製する事が可能である。しかし、H鎖とL鎖がランダムな組み合わせとなることから膨大なライブラリーサイズが必要となり、また、大腸菌内で発現させた抗体には糖鎖が付かないので、最終的に動物細胞で発現させた場合にその抗体の特異性や安定性が変わってしまう可能性がある。モノクローナル抗体医薬を個別に作製するかわりに、担癌患者の体内で抗腫瘍抗体を効果的に誘導することができるならば、有用な治療法になり得ると考えられる。しかしながら腫瘍細胞に対する液性免疫を効果的に誘導する治療型ワクチンは、まだ確立されていない。

抗体はB細胞の最終分化形態であるプラズマ細胞から産生される。免疫応答の過程で、抗原に反応したB細胞は増殖して胚中心を形成し、その中で抗原に高親和性のB細胞が選択される。その一部は記憶B細胞へと分化し、脾臓やリンパ節において長期間生存し、二次免疫応答に備える。また一部は骨髄に移行し長期間生存し、特異抗体を産生し続ける長期生存プラズマ細胞 (long-lived plasma cell: LLPC) に分化する。担癌患者に液性免疫を誘導するワクチンはまだ確立されていないが、担癌患者の血清中には抗癌抗体が検出されることがあるから、癌抗原に対するB細胞の免疫応答は起こり得ると思われる。そこで私は担癌患者の末梢血からB細胞を採取し、*in vitro* で増殖させ、その中から抗原特異的なB細胞を選択し、それを担癌患者に戻すことで、患者体内でLLPCが形成され持続的な抗腫瘍抗体が産生され、長期にわたる腫瘍抑制効果が発揮されるのではないかと考えた。

このようなB細胞を用いた養子移入免疫療法が実現していない理由の一つとして、ウィルスでトランスフォームする以外にB細胞を*in vitro* で十分に増殖させる方法がなかったことが考えられる。例えば、種々のマイトーゲンを加えて*in vitro* で培養した場合、B細胞は2~3日間の増殖の後、急速に死に至り、細胞数増加は10倍程度にすぎなかった。これに対し、私の所属する研究室では、CD40LとBAFFを発現したフィーダー細胞(40LB)上でマウスナイーブB細胞をIL-4とIL-21を順番に添加して培養することで、胚中心B細胞の形質を持つ細胞 [induced germinal-center B (iGB)細胞] に分化させ、8日で約10000倍にまで増大させる系(iGB細胞培養系)を確立した。さらに、このiGB細胞をガンマ線照射したマウスに戻すと、IL-4で培養した細胞は記憶B細胞様に、IL-21まで培養した細胞は長期生存プラズマ細胞様に分化・生着させることができた。そこでこの系を応用し、B

細胞を用いた養子移入療法の可能性をマウスモデルにより検証することにした。

癌代替抗原として鶏卵リゾチーム (hen egg lysozyme: HEL) を膜型 (mHEL) として発現させたマウスメラノーマ細胞株 B16 (B16-mHEL) を作製した。1 日前に B16-mHEL を移入したマウスに、HEL 特異的な免疫グロブリン遺伝子を持つ Hy10 マウス由来の iGB 細胞、もしくは野生型(WT)マウス由来の iGB 細胞、あるいはコントロールとして PBS のみをそれぞれ移入した。3 週間後にマウスの肺を観察したところ、Hy10 由来の iGB 細胞移入群のみで、B16-mHEL の肺転移が顕著に抑制されていた。また Hy10 由来の iGB 細胞移入群では、WT 由来の iGB 細胞や PBS 移入のコントロール群に比べ、生存日数が有意に延長していた。Hy10 由来の iGB 細胞移入群では HEL に対する IgG1 抗体が、血清中に一ヶ月以上にわたり検出されたことから、*in vitro* で誘導した iGB 細胞由来の LLPC から産生された抗体が腫瘍の増大を抑制したと考えられた。

この系を抗腫瘍療法としてヒトに応用するためには、膨大な B 細胞レパートリーの中から癌抗原特異的な B 細胞を選択して増殖させる必要がある。そこで私は *in vitro* で抗原特異的な B 細胞だけを選択する培養系の構築を試みた。活性化 B 細胞表面には Fas という受容体蛋白が発現し、これが Fas リガンド(FasL)と結合すると B 細胞内部にシグナルを送りアポトーシスを起こす。しかし、この時 B 細胞表面の B 細胞受容体(BCR)と抗原が結合すると、この細胞死が抑制されることが知られている。そこで、レトロウイルスベクターを用いて 40LB 細胞に mHEL を発現させ 40LB-mHEL を作製し、さらに FasL を発現させて 40LB-mHEL-FasL 細胞を作製した。40LB 上で増殖させた iGB 細胞をこれらの細胞上で順に培養することで、mHEL 抗原に結合する iGB 細胞だけを生き残らせ、さらに 40LB 細胞上で増殖させることができた。さらに、B 細胞集団の中で存在比率が 0.01%という極めて少ない抗原特異的な B 細胞であっても濃縮できることを示した。このように濃縮した HEL 特異的な iGB 細胞を用いても、B16-mHEL 細胞の肺転移を抑制することができた。

この方法は、ハイブリドーマやファージディスプレイ法と比べて、抗体作製期間が短縮することができ、複雑な遺伝子組換えを必要とせず完全ヒト抗体を作製できるという利点があると考えられる。また、動物免疫やパニングのための精製抗原が必要なく、遺伝子導入により抗原をフィーダー細胞上に発現させればよいことから、これまで精製が難しかった膜貫通蛋白に対する B 細胞も選択できる。この点において、従来の精製抗原をプローブとして結合 B 細胞をセルソーターにより選別する方法に比べても有利である。

## 論文審査の結果の要旨

近年、癌に対する新たな免疫療法として、養子移入免疫療法とモノクローナル抗体療法が注目されている。養子移入免疫療法は癌に対する細胞傷害性細胞を担癌患者の血液や癌組織から取り出し、試験管内(*in vitro*)で活性化させ、同じ担癌患者に戻すという方法である。一方、抗体療法は既に一部の癌に対して高い治療効果を示している。モノクローナル抗体医薬は標的分子に対し高い特異性を持ち、効果及び副作用の予測が比較的容易なため、開発のリスクは少ない。しかし、ヒト化の過程で煩雑な遺伝子組換え技術が必要であり、それによって抗体の特異性や抗原親和性、安定性が低下する可能性がある。モノクローナル抗体医薬を個別に作製するかわりに、担癌患者の体内で抗腫瘍抗体を効果的に誘導することができるならば、有用な治療法になり得ると考えられるが、腫瘍細胞に対する液性免疫を効果的に誘導する治療型ワクチンは、未だ確立されていない。一方、癌抗原特異的な抗体産生細胞であるプラズマ細胞あるいはその前駆細胞である B 細胞を患者に移入するという養子移入免疫療法は理論的に可能であるが、このような方法が実現していない理由の一つとして、B 細胞を *in vitro* で十分に増殖させる方法がなかったことがあげられる。そこで申請者は、所属する研究室で開発された、フィーダー細胞を用いて B 細胞を著しく増殖させる培養法 [induced germinal-center B (iGB)細胞培養系]を利用して、癌抗原特異的 B 細胞を選択・増殖させて、担癌患者に戻すという治療法のマウスモデル作成を試みた。

まず、iGB 細胞をマウスに移入すると、iGB 細胞は骨髄プラズマ細胞に分化して、4週以上にわたって抗体を産生することを確認した。次に、癌代替抗原として鶏卵リゾチーム (hen egg lysozyme: HEL)を膜型(mHEL)として発現させたマウスメラノーマ細胞株 B16 (B16-mHEL)を作製した。この B16-mHEL を前日に移入したマウスに、HEL 特異的な免疫グロブリン遺伝子を持つ Hy10 マウス由来の iGB 細胞を移入すると、B16-mHEL の肺での増殖が顕著に抑制され、マウスの生存日数が有意に延長した。Hy10 iGB 細胞を移入されたマウスでは抗 HEL IgG1 抗体が、血清中に長期間検出されたことから、この iGB 細胞から分化した長期生存プラズマ細胞から産生された抗体が腫瘍の増大を抑制したと考えられた。

この系を抗腫瘍療法としてヒトに応用するためには、膨大な B 細胞レパートリーの中から癌抗原特異的な B 細胞を選択して増殖させる必要がある。そこで申請者は *in vitro* で抗原特異的な B 細胞だけを選択する培養系の構築を試みた。活性化 B 細胞表面の Fas という受容体蛋白が、Fas リガンド(FasL)と結合するとアポトーシスを起こす。しかし、この時 B 細胞表面の B 細胞受容体 (BCR)と抗原が結合すると、この細胞死が抑制されると考えられている。そこで、40LB 細胞に mHEL を発現させた細胞、さらに FasL を発現させた細胞をそれぞれ作製した。40LB 上で増殖させた iGB 細胞をこれらの細胞上で順に培養することで、mHEL 抗原に結合する iGB 細胞だけを生き残らせ、さらに 40LB 細胞上で増殖させることができた。さらに、B 細胞集団の中で存在比率が 0.01%という極めて少ない抗原特異的 B 細胞であっても濃縮できることが示された。このようにして濃縮した HEL 特異的 iGB 細胞を用いて、B16-mHEL 細胞の肺での増殖を抑制することができた。

この方法は、既存のモノクローナル抗体療法と比べて、ヒト化モノクローナル抗体作製にかかる分の時間が短縮でき、完全ヒト抗体を *in vitro* で誘導することができるという利点がある。また、一般的な抗体作製法に必要な精製抗原を用いる必要がないため、精製が難しい膜貫通蛋白に対する B 細胞も比較的容易に選択できると思われる。

以上、本論文は、高度な方法論を駆使して十分に実験を積み重ねた上で新たな癌治療法のモデルを確立し、その有効性を検証している。この治療法は、今後の展開次第では臨床応用の可能性も期待される。よって、学問的にのみならず、社会的にも重要な研究内容であると判断できる。したがって本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認められる。