

水上 修作 論文内容の要旨

主 論 文

Both CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes fused to heat shock cognate protein 70 (hsc70) can function to eradicate tumors

(Hsc70 に結合した CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞エピトープは共に腫瘍拒絶に有用である)

水上修作、梶原千晶、石川博士、片山一朗、由井克之、鵜殿平一郎
(Cancer Science, 99(5):1008-1015, 2008)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：由井克之教授)

緒言：

腫瘍細胞から精製した gp96, hsp90, hsc70 などの熱ショック蛋白 (Heat shock protein:HSP)は、同種の腫瘍に対する特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導できる。これは腫瘍細胞の中で熱ショック蛋白に結合した CD8⁺ T 細胞エピトープに因ることが明らかになっている。このことを応用し、筆者らは既に Hsc70 と CD8⁺ T 細胞エピトープの融合蛋白による免疫が抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T cells, CTL) を誘導することを示した。本研究では、上記融合蛋白による免疫が *in vivo* で腫瘍の増大を抑制しうるのか検討した。またこの融合蛋白に更に CD4⁺ T 細胞エピトープを付加し、ワクチン効果への影響を検討した。

対象と方法：

1. 融合蛋白の作製:本研究ではモデル抗原として Ovalbumin (OVA) を用いた。マウス hsc70cDNA の両端に OVA の CD8⁺ T 細胞エピトープ (dominant:以下 D)、CD4⁺ T 細胞エピトープ (helper:以下 H) をコードする遺伝子を融合し、プラスミド発現ベクターにクローニングして大腸菌株により蛋白発現させ、精製後使用した (hsc70-DH)。同様にマウス hsc70 単体及び hsc70 に各エピトープが単独で付加された融合蛋白 (hsc70-D, hsc70-H) を作成した。2. CTL の誘導:融合蛋白をマウス腹腔に投与し、最終免疫から 2 週間後に脾臓を回収した。脾臓細胞を CD8⁺ T 細胞エピトープ存在下で培養し、5 日後にエフェクターとして用い ⁵¹Cr 遊離試験を行なった。また ELISPOT assay にてエフェクター細胞の IFN γ 産生能を確認した。3. *in vivo* での抗腫瘍効果の検討:E. G7 (OVA 発現胸腺腫)、M05 (OVA 発現メラノーマ) をマウス背部皮内に投与し、それと前後して融合蛋白を腹腔に投与し、腫瘍径を測定した。また M05 を経静脈的に投与した肺転移モデルにおいても融合蛋白投与による肺転移抑制効果を検討した。

結果：

融合蛋白を用いて免疫をしたマウス脾臓細胞は、IFA をアジュバントとして用いた場合と比較して約 1/10 の抗原量で同等以上の特異的細胞傷害活性、IFN γ 産生能を示した。免疫効果は ELISPOT assay において hsc70-DH が hsc70-D を有為に上回り、脾臓細胞から CD8⁺ T 細胞を除去するとこれらの免疫効果はほぼ完全に消失した。更に、融合蛋白での免疫により *in vivo* で E. G7、M05 の増殖を抑制することが出来、その効果は hsc70-DH, hsc70-D, hsc70-H の順であった。腫瘍接種前より早期の融合蛋白で

の免疫はより強い抗腫瘍効果を示したが、腫瘍接種後の免疫では治療効果は認められなかった。しかしながら、抗原特異的 CD8⁺ ナイーブ T 細胞を融合蛋白と同時に移入した場合には、腫瘍接種後 day6 の免疫 1 回でも腫瘍を拒絶することが出来た。M05 の肺転移モデルでは、融合蛋白の同時投与は転移を強く抑制し、その効果は hsc70-DH が hsc70-D より強力であったが、抗 CD4 抗体投与で hsc70-D と同程度にまで減弱した。

考察:

本研究では、熱ショック蛋白と CD8⁺ T 細胞エピトープ及び CD4⁺ T 細胞エピトープの融合蛋白が、強い特異的 CTL 誘導能と *in vivo* における腫瘍増殖・転移の抑制効果を有することを示した。CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞それぞれの除去実験により融合蛋白 hsc70-DH は CD8⁺、CD4⁺ 双方の T 細胞を活性化出来ること、CD8⁺ T 細胞が直接細胞傷害を行なうことに加えて CD4⁺ T 細胞も抗腫瘍効果を有することが明らかになった。本研究で用いた融合蛋白は効率良く T 細胞を活性化することに加えて、自然の生理活性物質である熱ショック蛋白をアジュバントに用いているため安全面からも有用なワクチンになりうる。これら T 細胞の活性化は、熱ショック蛋白が強力なアジュバントとしてクロスプレゼンテーション（外来性抗原の MHC class I への抗原提示）と樹状細胞の活性化を引き起こした結果と考えられ、そのメカニズムの一端としては熱ショック蛋白受容体を介した抗原提示細胞への効率的な抗原取り込みが挙げられる。近年 CD91, Lox-1, TLR2, 4 等が熱ショック蛋白受容体の候補として挙げられているが、未だ議論に終わりは見えない。今後受容体の同定を始めとした熱ショック蛋白によるクロスプレゼンテーションの機序の解明を進める必要がある。