



Title	造血器悪性腫瘍患者および肺癌患者におけるWT1特異的CD8陽性T細胞の検出
Author(s)	村上, 雅樹
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43907
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	むら 村 上 雅 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 6 2 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	造血器悪性腫瘍患者および肺癌患者における WT1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川瀬 一郎 (副査) 教 授 金倉 譲 教 授 野口眞三郎

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

造血器悪性疾患に対する同種血液幹細胞移植後の患者において、移植片対宿主病 (GVHD) を発症した患者は有意に再発率が低い (移植片対白血病 (GVL) 効果) ことは、抗腫瘍免疫反応で白血病細胞が拒絶されることを示唆し、抗腫瘍免疫療法の根拠となる。また、1) ある抗原が細胞表面抗原でなくても、細胞内でペプチドに断片化され MHC (ヒトでは HLA) class I 分子と complex を作り、細胞表面に提示され CTL に標的抗原として認識され得る、2) その抗原がその腫瘍に特異的な変異を有していなくても過剰発現していれば、これを特異的に認識する CTL を誘導し得る、ことが明らかになってきた。

WT1 遺伝子 (Wilms' tumor gene) は、小児の腎腫瘍である Wilms' tumor の責任遺伝子として発見され、その遺伝子産物 WT1 は細胞の増殖・分化・アポトーシスなどに重要な働きをする。また、造血器悪性疾患や肺癌、胃癌、乳癌などの固形癌で、変異を有さない WT1 が高発現している。

マウスやヒトの細胞を WT1 ペプチド刺激すると、WT1 特異的 CTL が誘導される。また、WT1 ペプチドで免疫したマウスは、移植 WT1 高発現腫瘍細胞を高率に拒絶した。さらに、造血器悪性疾患患者において WT1 に対する抗体産生が健常人に比べて有意に高くなっており、WT1 が免疫原性を持っていること、WT1 に対する液性免疫反応がすでに生じていることが示された。

以上の知見に基づき、我々は WT1 を抗腫瘍特異的免疫療法の標的とする WT1 ペプチドによる癌ワクチン療法の開発を進めている。この治療法的前提条件となるのは、WT1 高発現の腫瘍を持つ患者の体内で、WT1 特異的 CTL precursor (CTLp) が存在することである。これを検証するために、造血器悪性疾患患者および肺癌患者において、WT1 特異的 CTLp の測定を行なった。

【方法ならびに成績】

腫瘍細胞で WT1 遺伝子の有意な高発現が確認されている造血器悪性腫瘍患者または肺癌患者、および健常人からインフォームドコンセントを得て、採血を行ない、単核球細胞 (PBMC) を分離した。

1) WT1 特異的 CTLp frequency (CTLpf) の tetramer による測定

Tetramer は、ペプチドと HLA の complex の 4 量体で、peptide/HLA complex を特異的に認識する CTL と結合する。PBMC 検体中の $CD3^+CD8^+$ tetramer⁺ 細胞を FACS で測定した。その結果、造血器悪性疾患患者と健常人 ($p < 0.05$)、肺癌患者と健常人 ($p < 0.05$) の間でそれぞれ有意差をもって、WT1 特異的 CTLpf の増加を認めた。

2) WT1 特異的 CTLpf の intracellular IFN- γ flowcytometry による測定

PBMC を 2 つに分け、一方を WT1 peptide または irrelevant peptide で peptide pulse し、CTL を刺激する細胞 (feeder) とした。無処理の PBMC にこの feeder 細胞を 1 : 1 で加え、coculture した。この際、細胞内から細胞外への IFN- γ の輸送を止め細胞内に IFN- γ を蓄積させるため、Golgi 体の機能を阻害する Brefeldin A を加えた。その後、表面抗原 CD3、CD8 を染色し、次いでサポニンを含むバッファーで細胞膜透過処理をして細胞内の IFN- γ を染色し FACS 解析した。担癌患者では $CD3^+CD8^+$ IFN- γ^+ 細胞が健常人より多い傾向は見られたが、有意差は認められなかった。

【総括】

Tetramer を用いた解析では、担癌患者で WT1 に対する CTLp が誘導されていることが確かめられた。一方、WT1 に対する IFN- γ 産生能は、担癌患者で高い傾向が見られたものの、健常人との差は有意とは言えなかった。

Tetramer により検出される CTLp は、effector としての機能を有する CTL の他に memory T 細胞、anergy の状態や apoptosis の過程にある CTL が含まれている。最近の報告では、細胞傷害や局所移行に関するマーカーによって tetramer 陽性細胞を検討したところ、これらのマーカーが低発現の、未成熟な段階の CTLp がその大部分を占めており、*in vitro* で複数回の抗原刺激を加えることによって、これらのマーカーを高発現する CTL が誘導されるという。つまり effector としての機能を有する CTLp (細胞質内 IFN- γ 染色法で検出される) は tetramer 法により検出された CTLp の一部のみを占めており、担癌患者では健常人に比べて高い頻度で WT1 特異的 CTLp が検出されたが、その多くは十分に活性化されていないものであると考えられた。しかしこのことは、担癌患者で WT1 に対する $CD8^+$ T 細胞の免疫反応が自然に起きていながら発癌にいたったことと、むしろ符合するとも言える。

この研究で、担癌患者で WT1 特異的 CTLp が高頻度に存在することが明らかになったので、この CTLp を活性化することにより癌に対する細胞性免疫能を増強させ得と考えられ、この結果は WT1 ワクチンによる癌免疫療法への有力な rationale となる。

論文審査の結果の要旨

多くの悪性腫瘍細胞において WT1 遺伝子が高発現していることが明らかになっており、その遺伝子産物を標的とした抗腫瘍免疫療法 (癌ワクチン) が可能かどうかを検討することは重要な課題である。この観点から見れば、患者中で元来自己タンパクである WT1 タンパクが免疫原性を発揮し、WT1 に対する免疫反応が生じているかどうかを検証することが必須である。現在までに、多くの悪性腫瘍患者において IgM 型および IgG 型の抗 WT1 抗体が検出され、WT1 特異的液性免疫反応 (抗体産生) とその抗体のクラススイッチを誘導する WT1 特異的ヘルパー T 細胞の誘導が患者中で生じていることが明らかにされつつある。また、WT1 タンパクが細胞内で process されペプチドとなって HLA と結合し細胞表面に提示され、これが $CD8$ 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に認識されるということが明らかになるにつれ、患者血中の HLA/WT1 ペプチドを特異的に認識する CTL precursor を検出することが急務となった。本研究は、患者血中の WT1 特異的 CTL の検出を HLA テトラマー法および細胞内 IFN- γ 染色法によって試みた。その結果、WT1 タンパクに由来するペプチドを特異的に認識する T 細胞レセプター (TCR) を持った CTL precursor が、大部分は細胞傷害活性を持つまでに成熟はしていないながらも悪性疾患患者血中に存在し、健常人に比べ有意に増加していることが示された。以上のように、本来自体タンパクである WT1 は HLA と共発現されることにより患者中で免疫原性を発揮しうること、および、患者中で WT1 に対する液性および細胞性免疫反応がすでに生じていることが明らかとなった。これらは、WT1 を標的とした癌ワクチンを開発する rationale となる。

この論文は、学位の授与に値すると考えられる。