OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	村上雅樹（むらかみまさき）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 17629 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。この治療法の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。

Tbtramer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ると考えられ、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、本来自己タンパクである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WTl1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。