



| | |
|--------------|---|
| Title | HER-2/neu癌遺伝子誘発マウス自家乳癌モデルにおける抗腫瘍免疫応答動態 |
| Author(s) | 竹内, 憲民 |
| Citation | 大阪大学, 2004, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/45173 |
| 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 | たけ うち のり たみ 竹 内 憲 民 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (歯 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 8 5 8 6 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 16 年 3 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | HER-2/neu 癌遺伝子誘発マウス自家乳癌モデルにおける抗腫瘍免疫応答 動態 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 由良 義明 (副査) 教 授 村上 伸也 助教授 大倉 正也 講 師 和田孝一郎 |

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 HER-2/neu 癌原遺伝子は正常組織で発現し、その産物（蛋白）は何らかの細胞増殖制御に関与していると考えられる遺伝子である。ヒト乳癌の 20～40%ではこの癌原遺伝子の増幅が起こり、HER-2/neu 蛋白の過剰発現が認められる。もしこの蛋白が抗腫瘍 T 細胞の標的抗原として働くのならば、HER-2/neu 蛋白或いはその有効エピートプペプチドを用いた癌ワクチン療法が可能となる。しかしながら、微量とはいえ本来正常細胞が発現する HER-2/neu 蛋白に対して免疫寛容が成立していないのか、果たして抗 HER-2/neu T 細胞免疫が誘導されるのかという根本的な問題がある。HER-2/neu 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが既に樹立されており、このマウスを用いて抗 HER-2/neu 免疫応答の解析が可能な状況にある。トランスジェニックマウスでは生後 5 週頃には乳腺組織に過形成が出現すると共に HER-2/neu 蛋白の過剰発現がみられ、触知可能な乳癌が 20 週以降に発症する。そこで本研究ではこの乳癌自然発症モデルを用い、果たして HER-2/neu 蛋白に対する免疫が人為的に誘導可能か、更には HER-2/neu 蛋白を過剰発現している個体では、人為的免疫導入をすることなく抗 HER-2/neu 免疫応答が起こっているものか、もしそれが起こっているならばその免疫応答は乳癌発症と共にどのように変化するのか、HER-2/neu に対する T 細胞の免疫応答動態を解析した。

〔方法〕 マウス：FVB/n マウスに活性型（変異型）HER-2/neu 癌遺伝子を導入した乳癌自然発症トランスジェニックマウス（FVB/n^{neu}）を Charles River 社より購入し、大阪大学医学部動物実験施設において繁殖させその雌を使用した。野生型 FVB/n マウスは日本クレアより購入した。又、BALB/c マウスとの間で[FVB/n^{neu}×BALB/c]F1 を作製した。腫瘍細胞：自然発症乳癌組織より樹立した株化乳癌細胞 F31 と Meth A を用いた。脾細胞培養系：FVB/n^{neu} の脾細胞全画分を 1～5 日間培養した。又、FVB/n^{neu} 及び野生型の脾細胞より T 細胞と抗原提示細胞（APC）を調製し、種々の組み合わせで培養を行った。

細胞傷害活性の測定：エフェクターの細胞傷害活性は、³H thymidine でラベルした標的腫瘍細胞の DNA fragmentation を指標として検出した。IFN-γ の測定：脾細胞培養中に産生される IFN-γ は ELISA 法にて測定した。

〔結果〕 1) FVB/n^{neu} マウスでは 20 週ころから触知可能な腫瘍が形成され、39 週では全てのマウスで腫瘍形成が認められた。2) 6～7 週の[FVB/n^{neu}×BALB/c] F1 を、マイトマイシン C 処理した F31 又は Meth A で免疫後、F31 又は Meth A で攻撃接種した結果、F31 免疫マウスは F31 に対してのみ、Meth A 免疫マウスは Meth A に対しての

み抵抗性を示した。又 F31 免疫抵抗性は $CD4^+$ T 細胞を除去したマウスでは誘導されなかった。3) FVB/ n^{neu} 脾細胞全画分を培養すると、培養 3～5 日目に高レベルの IFN- γ 産生を認めた。更に培養 5 日目の細胞は F31 標的細胞に細胞傷害活性を示した。これらは野生型の脾細胞では認められなかった。4) FVB/ n^{neu} の脾細胞から得た T 細胞を FVB/ n^{neu} の APC 又は野生型 APC と培養したところ、FVB/ n^{neu} の APC でのみ IFN- γ 産生と細胞傷害活性がみられた。予め培養前に脾細胞から $CD4^+$ T 細胞を除去すると、これらの誘導はみられなかった。5) ポジティブセクション法にて $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $Mac-1^+$ 細胞を調製しエフェクターとした場合、最終的なエフェクターは $Mac-1^+$ 細胞であることが分かった。また、誘導されたエフェクターは F31 のみならず CSA1M や Meth A の MHC の異なる腫瘍細胞に対しても細胞傷害活性を示した。6) FVB/ n^{neu} マウスの IFN- γ 産生、F31 細胞傷害活性は、生後 5 週頃から検出され、10～15 週でピークを示した。しかしながら、この応答は乳癌の発症を抑制できないのみならず、乳癌発症と共にむしろ減弱してゆくことがわかった。この免疫応答の減弱には、APC の抗原提示の異常ではなく T 細胞の機能障害が関与することが明らかとなった。

[考察] 本研究より、HER-2/ neu 誘発腫瘍に対する免疫が FVB/ n^{neu} マウスにおいて誘導しうることが分かった。更に、人為的な免疫導入をすることなく、HER-2/ neu 発現マウスは HER-2/ neu 発現 F31 腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を誘導していることも明らかになった。この腫瘍形成前の免疫応答において HER-2/ neu 蛋白が APC により提示され、その結果、抗 HER-2/ neu $CD4^+$ T 細胞が感作され、その後、 $Mac-1^+$ エフェクター細胞が活性化されると考えられる。さらに、この免疫応答はマウスの週齢によって変化し、腫瘍が形成されると逆に減弱することから、担癌ステージの進行に伴って T 細胞機能に障害をきたすものと考えられる。

これらの研究成果は、腫瘍形成の前段階から HER-2/ neu に対する免疫応答が機能していることを示すものであり、HER-2/ neu 誘発自家腫瘍モデルにおける抗腫瘍免疫応答の減弱、そしてその賦活に関わるメカニズムを明らかにすることが抗 HER-2/ neu 免疫を利用した癌ワクチン療法をはじめ、腫瘍免疫療法を開発する上で本質的かつ不可欠なものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、HER-2/ neu 癌遺伝子誘発マウス自家乳癌モデルを用いて、HER-2/ neu に対する T 細胞の免疫応答動態を解析したものである。その結果、HER-2/ neu に対する免疫応答は腫瘍形成の前段階から成立しており、担癌ステージの進行と共に減弱していくことが明らかとなった。さらに、その減弱には T 細胞の機能障害が関与することが示唆された。

以上の結果は、自己の癌抗原に対する抗腫瘍免疫動態を明らかにすると共に、今後、腫瘍免疫療法の確立を実現させる上で重要な知見を与えるものと考えられる。従って、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。