

Title	Increased Immunogenicity of Tumor-Associated Antigen, Mucin 1, Engineered to Express $\alpha$ -Gal Epitopes : A Novel Approach to Immunotherapy in Pancreatic Cancer
Author(s)	出口, 貴司
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58143">https://hdl.handle.net/11094/58143</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【27】

氏 名	出口 貴 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 2 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 10 月 27 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Increased Immunogenicity of Tumor-Associated Antigen, Mucin 1, Engineered to Express $\alpha$ -Gal Epitopes: A Novel Approach to Immunotherapy in Pancreatic Cancer ( $\alpha$ -gal epitopes (異種糖鎖抗原)/Anti-Gal(ヒト自然抗体)糖鎖免疫反応を 応用した新しい膵癌免疫療法の開発)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 澤 芳 樹 (副査) 教 授 福 澤 正 洋 教 授 竹 田 潔

## 論文内容の要旨

### [目的]

膵癌は本邦癌死亡原因第 5 位の疾患である。膵癌は症状の発現が遅く早期発見が困難であるため、手術適応となる割合は膵癌全体の約 30%にすぎない。たとえ根治手術を行えたとしても術後 5 年生存率は 20%に満たず、消化器癌の中でも最も予後の悪い癌の一つであり、術後補助療法の発展が期待されている。

現在膵癌術後補助療法の一つとして Mucin1 (MUC1) を標的分子とした膵癌免疫療法の臨床研究が進められている。しかし癌抗原の抗原性が低い点や、癌末期の担癌患者では抗体産生能や細胞障害性 T 細胞の機能が弱い等の問題点があり臨床の有効性はいまだ報告されていない。

さて、ブタの臓器をヒトに移植する異種移植においてブタ移植片を分単位で拒絶する超急性拒絶反応 (hyperacute rejection: HAR) が臨床応用への障壁となっている。この HAR のメカニズムはブタ細胞に多量に発現している異種糖鎖抗原  $\alpha$ -gal epitopes (Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R) とヒト自然抗体 Anti-Gal との激烈な抗原抗体反応により補体が活性化し、さらに ADCC により急速に拒絶される反応である。 $\alpha$ -gal epitopes はタンパク糖鎖、脂質糖鎖の糖鎖末端構造で、 $\alpha$ 1,3-ガラクトース転移酵素 ( $\alpha$ 1,3GT) により生合成される。 $\alpha$ -gal epitopes は多くの哺乳類で発現しているが、ヒト、旧世界ザルでは  $\alpha$ 1,3GT は偽遺伝子となり失活し  $\alpha$ -gal epitopes を生合成できない。その代わりヒト自然抗体: 抗  $\alpha$ -Gal 抗体 (Anti-Gal) を多量に産生する (循環 IgG の約 1%)。私は、この強力な免疫反応を膵癌免疫療法に応用することに着目した。ヒト膵癌細胞の癌抗原タンパク: MUC1 の糖鎖末端に  $\alpha$ -gal epitopes を発現させ糖鎖構造をリモデリングし癌ワクチンとして投与することで生来備わっている大量の Anti-Gal 自然抗体との免疫反応を介して効率的に癌抗原の抗原提示を行い、抗腫瘍免疫を誘導することができると考え、本研究を行った。

また近年の報告では癌根治のためには、癌幹細胞の制御が必須であるとされている。しかし放射線、抗癌剤に抵抗性であることなどにより癌幹細胞の有効な制御法は報告されていない。そこで膵癌の癌幹細胞マーカーである CD44, CD24 が糖タンパクであることに着目し、癌幹細胞マーカーに  $\alpha$ -gal epitopes を生合成することで癌幹細胞に対する免疫療法を誘導できるかも解析した。

### [方法]

- ① MUC1 発現ヒト膵癌細胞株 PANC1 に  $\alpha$ 1,3GT 遺伝子を導入し  $\alpha$ -gal epitopes を発現させ ( $\alpha$ -gal PANC1)、細胞ワクチンとしてヒトと同じ自然抗体 Anti-Gal を持つ  $\alpha$ 1,3GT ノックアウトマウス (以下 KO mice) に免疫し MUC1 に対する免疫反応、抗腫瘍効果を ELISA, ELISPOT, MLR にて解析し Parental PANC1 による細胞ワクチンと比較検討した。
- ②  $\alpha$ -gal epitopes を発現しないマウスメラノーマ細胞株 B16F10 にヒト MUC1 全長遺伝子を導入し MUC1-B16F10 を樹立、細胞ワクチン投与したマウスに皮下投与を行い、腫瘍増大抑制効果と生存期間を比較検討し、in vivo における有効性を解析した。
- ③ Parental PANC1 から抗体磁気ビーズを用いて CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>PANC1 を分離し、細胞ワクチンで免疫したマウス血清に抗 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>PANC1 抗体が産生されているかを flow cytometry にて解析した。

### [成績]

- ①  $\alpha$ -gal PANC1 ワクチン群では Parental PANC1 ワクチン群に比し、抗 MUC1 抗体産生 B 細胞は有意に多く増殖し (P<0.0001)、抗 MUC1 抗体の産生は 8~16 倍強く誘導された。MUC1 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞は有意に強く誘導された (P<0.0001)。また、MLR では抗腫瘍免疫反応は MUC1 ペプチド、PANC1 細胞に対し特異的であった。
- ② 皮下腫瘍サイズが 200mm<sup>2</sup> に達する時間は、Parental PANC1 ワクチン群に比し  $\alpha$ -gal PANC1 ワクチン群では有意に延長効果を認めた (Parental PANC1 ワクチン群: 平均 12.8 $\pm$ 1.1 日,  $\alpha$ -gal PANC1 ワクチン群: 25.4 $\pm$ 7.6 日, P=0.005)。またマウスの生存期間も  $\alpha$ -gal PANC1 ワクチン群は Parental PANC1 ワクチン群に比し有意に延長した (Parental PANC1 ワクチン群: 平均 21.1 $\pm$ 10.5 日,  $\alpha$ -gal PANC1 ワクチン群: 平均 41.4 $\pm$ 10.4 日, P=0.003)。
- ③ Parental PANC1 ワクチン群では認めなかったが、 $\alpha$ -gal PANC1 ワクチン群において膵癌の癌幹細胞集団である CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>PANC1 細胞群に対し抗体の産生を認めた。

### [総括]

$\alpha$ -gal epitopes を生合成し、膵癌の癌関連抗原の糖鎖構造をリモデリングすることで癌関連抗原の抗原性を増強させ、通常の膵癌細胞だけでなく膵癌癌幹細胞をも包括した膵癌免疫療法を構築できる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

膵癌は予後不良の疾患であり、外科的手術が唯一根治の期待できる治療法であるが再発率は高く、臨床効果の高い集学的治療の開発が急務である。現在膵癌に対する補助療法として膵癌抗原である MUC1 を対象とした免疫療法の臨床研究が進められているが、有効な効果が得られていない。そこで MUC1 の抗原性の増強が免疫療法の開発につながると考え、研究テーマとした。

MUC1 を異種移植の原因を引き起こす糖鎖である  $\alpha$ -gal epitopes でリモデリングし、自然抗体である Anti-Gal との抗原抗体反応を利用して抗腫瘍効果、抗原特異性 CTL を誘導したことを *in vitro*, *in vivo* において証明した。またこの研究が癌幹細胞への新しい治療法になる可能性を示した。

これらの研究は、膵癌に対する新しい免疫療法の開発に寄与すると期待され、学位の授与に値すると考えられる。