

Title	Memory Th1 Cells Augment Tumor-Specific CTL following Transcutaneous Peptide Immunization
Author(s)	細井, 亮宏
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59053">https://hdl.handle.net/11094/59053</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

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

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

Osaka University

【113】

氏名	ほそ い あき ひろ 細 井 亮 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学位記番号	第 24860 号
学位授与年月日	平成23年7月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Memory Th1 Cells Augment Tumor-Specific CTL following Transcutaneous Peptide Immunization (メモリー Th1 細胞は経皮ペプチド免疫による腫瘍特異的 CTL 誘導を増強する)
論文審査委員	(主査) 教 授 宮坂 昌之 (副査) 教 授 平野 俊夫 教 授 竹田 潔

## 論文内容の要旨

効果的な癌の免疫細胞治療を実現するためには、腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を活性化し増殖させ細胞傷害活性を持った腫瘍特異的CTLへと分化させることが重要である。腫瘍特異的CTLを誘導するためには生体内の腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を*ex vivo*で培養した樹状細胞(DC)で刺激する方法が用いられているが、DCの培養は最適化が困難という問題がある。そのためDCを*in vivo*で直接ターゲティングする免疫法が注目されている。TLR7リガンドであるイミキモドとCTLエピトープペプチドを皮膚に塗布する経皮ペプチド免疫法(TCI)は、病原体の感染時の反応をイミキモドによって皮膚内に起こすことで皮膚内のDCを活性化、成熟させ、同時に塗布したCTLエピトープペプチドをDCに取り込ませ腫瘍特異的CTLを誘導する免疫法である。TCIは生理的な条件に近い効率的な免疫法と考えられ、DCを培養してペプチドパルス後に生体に投与する免疫法に取って代わる可能性がある。そこで私はTCIの腫瘍特異的CTLの誘導及び抗腫瘍効果を検討した。またTCIにTh

エピトープペプチドを加えることでメモリーTh (mTh) 細胞を活性化し、mTh細胞のCD40リガンドによるDCのライセンスングをTCIに導入することで、腫瘍特異的CTLの誘導及び抗腫瘍効果の増強を試みた。Thエピトープペプチドとして、結核菌が分泌する主要なタンパク質の一つであるAg85Bの抗原エピトープでありマウスにおいてI-A<sup>b</sup>拘束性にTh1応答を強く誘導し、T-regを誘導しないpeptide-25を選択した。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

腫瘍特異的CTLの誘導をTCIとDCワクチンについて比較した。C57BL/6マウスにメラノーマ抗原hgp100特異的TCRを発現しているpme1-1マウス (Thy1.1<sup>+</sup>) の脾細胞を $5.0 \times 10^6$ 個、尾静脈から移入しその後TCIを実施した。DCワクチンとしてhgp100ペプチドでパルスした $1.0 \times 10^6$ 個の成熟DCをマウスに免疫した。5日後脾臓を摘出しELISPOT法で抗原特異的なIFN- $\gamma$ 産生細胞を検出したところ、TCIを行った群で抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞を検出し、それらの実数はDCワクチンによるものと同程度であった。また脾細胞中のThy1.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の頻度をFCMで測定したところ、TCIを行った群で増強し、それらの実数はDCワクチンによるものと同程度であった。これらの細胞の抗原特異的なIFN- $\gamma$ 産生を細胞内IFN- $\gamma$ 染色法で検討したところ、Thy1.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞は抗原特異的にIFN- $\gamma$ を産生した。

次に、peptide-25特異的mTh1細胞のライセンスングが及ぼすTCIによる腫瘍特異的CTLの誘導への増強効果を検討した。peptide-25特異的mTh1細胞はpeptide-25とIFAをマウスに免疫することで得た。peptide-25の免疫から4週間後、脾臓を摘出し $3.5 \times 10^7$ 個の脾細胞をC57BL/6マウスに移入し、その5日後 $1.0 \times 10^7$ 個のpme1-1マウスの脾細胞を移入しモデルマウス (mTh1<sup>+</sup>nCTL<sup>+</sup>マウス) を作成した。これらのマウスにTCIを行い、5日後脾臓を摘出し、peptide-25特異的mTh1細胞の活性化についてはELISPOT法によりpeptide-25特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞を測定することで検討した。また腫瘍特異的CTLの頻度とその細胞傷害活性は細胞内IFN- $\gamma$ 染色法と*in vivo* CTLアッセイで検討した。その結果、TCIはpeptide-25特異的mTh1細胞の活性化を誘導し、それらの活性化は細胞傷害活性を持った腫瘍特異的CTLの誘導を増強した。TCIの抗腫瘍効果とmTh1細胞の活性化によるその増強効果を癌の予防及び治療モデルで検討したところ、両者でTCIは抗腫瘍効果を示し、mTh1細胞の活性化はTCIの抗腫瘍効果を増強した。

#### 〔 総括 〕

TCIは、*in situ*で皮膚内のDCをターゲティングし生理的な条件に近い形で腫瘍特異的なCTL応答を誘導する免疫法である。私は、TCIは細胞傷害活性を持った機能的な腫瘍特異的CTLを誘導し、さらにpeptide-25特異的mTh1細胞の活性化によって増強することを示した。Ag85Bは、PPD<sup>+</sup> (purified protein derivative-positive) 健康人においてTh1応答を誘導することが示されており、大半の日本人はAg85Bまたはpeptide-25特異的mTh1細胞を保持していると考えられる。したがって多くの癌患者において、Ag85Bまたはpeptide-25特異的mTh1細胞と腫瘍特異的CTLをTCIによって同時に活性化することで抗腫瘍免疫応答を増強させた治療法の開発が可能であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

CTLの誘導には、樹状細胞 (DC) によるCD8<sup>+</sup>T細胞への抗原提示が重要である。末梢で刺激を受けたDCは、T細胞に抗原提示しCTLを誘導する。このようなDCの作用を利用してCTLを誘導するためには、培養したDCを用いて免疫に用いる方法と、*in vivo*においてDCをターゲティングする方法がある。末梢血からDCを培養することが可能になったが、どのよ

うなDCを培養すればよいか未解決の課題が多い。そこで後者の方法の中で経皮ペプチド免疫法に注目し検討を行った。

TLR7リガンドのimiquimodとCTLペプチドを皮膚に塗布しマウスを免疫した。B16メラノーマ細胞のCTLペプチドを用いてマウスを免疫し、CTL誘導と抗腫瘍効果を解析した。またCD4<sup>+</sup>T細胞によるヘルプを目的とし、ヘルパーペプチドを加えて免疫することで、CTL誘導と抗腫瘍効果を増強できることを示した。

本内容は学位に値するものと認める。