

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 野口 卓郎

### 学位論文題名

#### 細胞内腫瘍抗原に対する新規抗体療法の開発

【背景と目的】細胞表面に発現する腫瘍抗原に対する抗体療法は、現在臨床現場で応用されており、その効果も広く認められている。その作用機序には、がん細胞への直接的な細胞増殖シグナル抑制作用が挙げられるが、抗原抗体免疫複合体の Fc 領域を介した造血細胞による抗体依存性細胞傷害や補体による補体依存性細胞傷害も知られている。また、腫瘍抗原が免疫複合体として Fc 受容体経路で抗原提示細胞に取り込まれることで、抗原提示細胞が活性化を受け、CD8 陽性 T 細胞への抗原提示 (クロスプレゼンテーション) が促進され結果的に抗腫瘍効果が誘導されることも明らかとなってきた。このように、生体内で受動的に形成された腫瘍抗原と抗原特異的抗体とによる免疫複合体は、がん治療における幅広い応用性を期待させるが、多くの腫瘍抗原は細胞表面に発現を認めず、細胞内に局在しており、従来これらは、抗体療法の対象としては不適切と考えられてきた。NY-ESO-1 はがん精巣抗原で、精巣を除いた正常組織で発現を認めないものの、様々な組織由来の腫瘍組織の 20-30%程度で発現を認めるため、臨床応用が期待される腫瘍抗原の一つである。NY-ESO-1 はがん患者において高い免疫原性をもち、腫瘍抗原特異的免疫療法の理想的な標的抗原として考えられているが、細胞膜への結合配列を含まず、局在は細胞内であるため、従来、抗体療法の対象とは考えられていなかった。一方で、がん患者における血清中抗 NY-ESO-1 抗体濃度と NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の頻度の相関や、*in vitro* 実験系で NY-ESO-1 と抗体との免疫複合体が効率的にクロスプレゼンテーションされることが示されている。こうした背景は、何らかの手段で細胞を破壊することにより、細胞内抗原の放出を促進することで、生体内で十分な免疫複合体を形成することができれば、抗腫瘍免疫が誘導される可能性を示唆するものである。

そこで、本研究において、細胞内発現腫瘍抗原のモデル抗原として、NY-ESO-1 を用い、細胞内腫瘍抗原に対する抗体療法を確立するとともに、免疫複合体からの免疫系を介した腫瘍縮小効果についての検討を行った。

【材料と方法】マウスは BALB/c、BALB/c<sup>nu/nu</sup>、C.B-17 SCID、Fc 受容体  $\gamma$  鎖欠損 BALB/c を用いた。細胞株はトランスフェクション法により樹立された NY-ESO-1 発現マウス大腸癌細胞株 CT26 (CT26-NY-ESO-1)、肉腫細胞株 CMS5a (CMS5a-NY-ESO-1)、MAGE-A4 発現 CT26 (CT26-MAGE-A4) を用いた。NY-ESO-1 および MAGE-A4 に対する抗体を各ハイブリドーマより精製した。細胞株の NY-ESO-1 の発現をウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーによる細胞内染色法により確認した。上記細胞株を動物内に皮下接種し、NY-ESO-1 もしくは MAGE-A4 に対する抗体療法の腫瘍縮小効果を、細胞破壊を目的とした抗癌剤と併用し観察した。併用する抗癌剤として、5-FU とドキシソルピシンを用いた。経時的に、所属リンパ節と腫瘍浸潤リンパ球を回収し、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生応答およびメモリーフェノタ

イプを、また、樹状細胞の活性化マーカーの発現状況を、それぞれフローサイトメトリーにて検討した。抗体 Fc 領域の関連性を、Fab 化抗 NY-ESO-1 抗体と Fc 受容体 $\gamma$  鎖欠損 BALB/c を用いて検討した。CT26-NY-ESO-1 に対する 5-FU 治療後に投与したヒト抗 NY-ESO-1 抗体のマウス生体内での腫瘍局所への集積を病理学的に評価した。

【結果】CT26-NY-ESO-1、CMS5a-NY-ESO-1 の NY-ESO-1 の発現を細胞表面に認めず、細胞内に認めた。In vitro で 5-FU 処理された CT26-NY-ESO-1 より、NY-ESO-1 が培養上清中より放出されることを ELISA にて確認した。また、in vivo で CT26-NY-ESO-1 への抗 NY-ESO-1 抗体の腫瘍局所への集積は 5-FU との併用により著明に増加していた。CT26-NY-ESO-1 担癌 BALB/c マウスに対し、5-FU と抗 NY-ESO-1 抗体の併用療法を行ったところ、5-FU 単独投与群に比し、有意な腫瘍縮小効果の増強を認め、抗体単独投与群では無治療群と効果に差を認めなかった。併用療法の増強効果は、抗原と抗体の特異性に依存していた。CMS5a-NY-ESO-1 担癌 BALB/c マウスに対しても、ドキソルビシンと抗 NY-ESO-1 抗体の併用により、抗腫瘍効果の増強を認めた。BALB/c<sup>nu/nu</sup> と CD8 陽性細胞除去抗体を用いた実験より、併用療法の増強効果が CD8 陽性 T 細胞依存性であることが明らかとなった。併用療法群においては、5-FU 単独治療群に比し、NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞における IFN $\gamma$  および TNF $\alpha$  産生の上昇とエフェクター／メモリーフェノタイプの増加を認めた。そして、NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導に相関して、樹状細胞活性化マーカーの上昇を認めた。併用療法の腫瘍縮小増強効果は、Fab 化抗 NY-ESO-1 抗体または Fc 受容体 $\gamma$  鎖欠損 BALB/c を用いた場合には消失した。

【考察】CT26-NY-ESO-1 に対する 5-FU と抗 NY-ESO-1 抗体の併用療法により、腫瘍縮小効果の増強を認めた機序は、生体内で形成された免疫複合体の Fc 領域と Fc 受容体を介して樹状細胞に取り込まれ、効率的なクロスプレゼンテーションを経て、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導されているものと推測された。トランスレーショナルリサーチの位置づけから、本研究では、現在臨床現場で抗体療法と併用して広く用いられている抗癌剤を、細胞内抗原の放出を目的とする治療法として採用したが、今後、放射線療法、局所凍結療法といった腫瘍細胞死を直接的に誘導する他の治療法と細胞内腫瘍抗原特異的抗体との併用療法の効果の検討も期待される。今回、他のサブクラスに比べ抑制型 Fc $\gamma$  受容体への結合親和性の高いマウス IgG1 で抗腫瘍効果免疫応答観察されたのは、興味深い結果となった。5-FU 投与の有無で樹状細胞における活性化型／抑制型 Fc $\gamma$  受容体比は変化しなかったが、他の造血細胞における同比や Fc $\gamma$  受容体以下のシグナルが変化した可能性を検討することと、各 Fc $\gamma$  受容体欠損マウスを用いた動物実験や既存の IgG1 から他のサブクラスへクラススイッチした抗体を用いた比較検討実験を行うことにより、細胞内抗原に対する抗体療法の最適化が図られることが期待された。本モデルでは、NY-ESO-1 に対し、ヒト同様に内因性液性免疫の誘導を認めたが、その濃度は外因性に投与した場合に比べると、はるかに低い濃度であり、治療効果を得るためには、早期に高い抗体 NY-ESO-1 血中濃度を維持することが肝要と推測された。

【結論】今回の研究で、細胞内腫瘍抗原に対する抗体療法が、抗癌剤との併用により腫瘍縮小効果の増強と予後の改善に寄与することが示された。その作用機序は、生体内で形成された免疫複合体を介した抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導であった。今後、本研究の概念に基づいた、臨床応用が進むことを期待する。