

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 田中 努

題 目 : Fundamental studies for Autologous Tumor Vaccine therapy  
(自家がんワクチン療法に対する基礎的研究)

## 論文要旨 :

近年、獣医学の進歩、飼育環境の改善、ワクチネーションの普及等に伴って動物の寿命が延長してきている。それに伴い、癌をはじめとする老化に起因する様々な疾患が増加している。獣医学領域における癌の標準治療は、医学領域と同様、外科手術、放射線治療、化学療法である。しかしこれらの三大治療のみによる治療では全ての癌を治療することは不可能である。そのため、医学領域では標準治療に加えて免疫療法など、様々な治療法が検討されている。免疫療法は、副作用の無い治療法として、人医領域では研究・臨床応用が為されており、獣医領域においても関心が高まっている。免疫療法の一つである自家がんワクチン (Autologous Tumor Vaccines: ATVs) 療法は、外科摘出した癌組織から抗原を抽出し、生体に接種することで癌の再発・転移を防止する治療法である。しかし、症例によっては ATVs 療法が有効ではないことがある。この原因として、抗原提示細胞による抗原提示量の低下、生体の免疫抑制状態が関与している可能性が大きい。本研究ではこの 2 点に注目して ATVs 療法をより効果的な療法にするための基礎実験を行った。

第 1 章では、抗原提示細胞による抗原提示量について検討した。CD8<sup>+</sup> T 細胞に対する MHC class I による外因性抗原の提示は **cross-presentation** と呼ばれる。熱ショックタンパク質 (HSPs) が **cross-presentation** による効率的な細胞傷害性 T 細胞 (CTLs) を誘導することは証明されている。Hsp90 は最も豊富な細胞内可溶性 HSP であり、分子シャペロンとして働く。ネズミを用いた実験で Hsp90 とがん抗原ペプチドの複合体がエンドソーム経路を経て樹状細胞 (DCs) によって **cross-presentation** されることは既に証明されている。しかしながら、ヒト DCs でも同様に Hsp90 とペプチドの複合体を **cross-presentation** し、ペプチド特異的な CTLs を誘導するかどうかは明らかになっていなかった。今回、ヒト DCs によっても Hsp90 とペプチドの複

(別紙様式第 3 号)

合体が効率的に cross-presentation され、ペプチド特異的 CTLs を誘導することを明らかにした。さらに、内部に移行した Hsp90 とペプチドの複合体が Rab5<sup>+</sup>、EEA1<sup>+</sup>の静的初期エンドソームに厳密にソート、加工され、エンドソームリサイクリング経路を通して MHC class I に結合することを確認した。これらの結果は、Hsp90 による静的初期エンドソームに対する抗原のターゲティングが効率的な cross-presentation に不可欠であることを示唆している。

第 2 章では、生体の免疫状態について検討した。小胞体 (ER) ジスルフィド・オキシダーゼ (ERO1- $\alpha$ ) は PDI を介してジスルフィド結合を形成する。ジスルフィド結合は分泌タンパク質や細胞表面タンパク質が適切な高次構造をとり、機能するために必要である。今回、ERO1- $\alpha$  が種々の癌で過剰発現していることを確認した。そこで腫瘍増殖と ERO1- $\alpha$  の関係について検討した。BALB/c マウスを用いた *in vivo* 実験において、ERO1- $\alpha$  を knockdown したマウス乳がん細胞 4T1(KD)はコントロール細胞 (SCR) と比べ腫瘍生長の抑制が認められた。対照的に、ERO1- $\alpha$  過剰発現細胞 (OE) はコントロール細胞 (mock) と比べて腫瘍生長の促進が認められた。しかし、ヌードマウスを用いた実験ではすべての群で腫瘍生長に差は認められなかった。このことから、ERO1- $\alpha$  の発現は腫瘍免疫を減弱させることが示唆された。SCR と KD 由来の腫瘍組織を観察したところ、KD と比べて SCR の腫瘍周囲で高密度の顆粒球の浸潤が認められ、これらの細胞は polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) と同定された。加えて、分子内ジスルフィド結合をもつ G-CSF と CXCL1/2 の分泌量がコントロールと比べて KD で低下が、OE で増加が認められた。これらの変化は転写後のレベルで調節されていた。以上より、腫瘍内での ERO1- $\alpha$  の過剰発現は MDSCs に関与するサイトカイン、ケモカインを調節することによって、PMN-MDSCs を遊走させ、T 細胞免疫を抑制していることが示唆された。

今回の実験結果より、ATVs 療法に Hsp90 と複合化した抗原を使用することによって、より強く CTLs が誘導できる可能性がある。さらに、ERO1- $\alpha$  の機能を阻害することによって免疫抑制状態の解除が可能となり、今まで以上の治療効果が期待できる可能性があることが判明した。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	田中 努
審 査 委 員	主 査： 鳥取大学 教 授 岡本 芳晴
	副 査： 鳥取大学 教 授 竹内 崇
	副 査： 山口大学 教 授 田浦 保穂
	副 査： 鳥取大学 教 授 今川 智敬
	副 査： 鳥取大学 准教授 杉山 晶彦
題 目	Fundamental studies for Autologous Tumor Vaccine therapy (自家がんワクチン療法に対する基礎的研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>近年、獣医学の進歩、飼育環境の改善、ワクチネーションの普及等に伴って動物の寿命が延長してきている。それに伴い、癌をはじめとする老化に起因する様々な疾患が増加している。獣医学領域における癌の標準治療は、医学領域と同様、外科手術、放射線治療、化学療法である。しかしこれらの三大治療のみによる治療では全ての癌を治療することは不可能である。そのため、医学領域では標準治療に加えて免疫療法など、様々な治療法が検討されている。免疫療法は、副作用の無い治療法として、人医領域では研究・臨床応用が為されており、獣医領域においても関心が高まっている。免疫療法の一つである自家がんワクチン(Autologous Tumor Vaccines: ATVs)療法は、外科摘出した癌組織から抗原を抽出し、生体に接種することで癌の再発・転移を防止する治療法である。しかし、症例によっては ATVs 療法が有効ではないことがある。この原因として、抗原提示細胞による抗原提示量の低下、生体の免疫抑制状態が関与している可能性が大きい。本研究ではこの 2 点に注目して ATVs 療法をより効果的な療法にするための基礎実験を行った。</p> <p>第 1 章では、抗原提示細胞による抗原提示量について検討した。CD8<sup>+</sup> T 細胞に対する MHC class I による外因性抗原の提示は cross-presentation と呼ばれる。熱ショックタンパク質(HSPs) が cross-presentation による効率的な細胞傷害性 T 細胞 (CTLs) を誘導することは証明されている。Hsp90 は最も豊富な細胞内可溶性 HSP であり、分子シャペロンとして働く。ネズミを用いた実験で Hsp90 とがん抗原ペプチドの複合体がエンドソーム経路を経て樹状細胞</p>	

(DCs) によって cross-presentation されることは既に証明されている。しかしながら、ヒト DCs でも同様に Hsp90 とペプチドの複合体を cross-presentation し、ペプチド特異的な CTLs を誘導するかどうかは明らかになっていなかった。今回、ヒト DCs によっても Hsp90 とペプチドの複合体が効率的に cross-presentation され、ペプチド特異的 CTLs を誘導することを明らかにした。さらに、内部に移行した Hsp90 とペプチドの複合体が Rab5<sup>+</sup>、EEA1<sup>+</sup> の静的初期エンドソームに厳密にソート、加工され、エンドソームリサイクリング経路を通して MHC class I に結合することを確認した。これらの結果は、Hsp90 による静的初期エンドソームに対する抗原のターゲティングが効率的な cross-presentation に不可欠であることを示唆している。

第 2 章では、生体の免疫状態について検討した。小胞体 (ER) ジスルフィド・オキシダーゼ (ERO1- $\alpha$ ) は PDI を介してジスルフィド結合を形成する。ジスルフィド結合は分泌タンパク質や細胞表面タンパク質が適切な高次構造をとり、機能するために必要である。今回、ERO1- $\alpha$  が種々の癌で過剰発現していることを確認した。そこで腫瘍増殖と ERO1- $\alpha$  の関係について検討した。BALB/c マウスを用いた *in vivo* 実験において、ERO1- $\alpha$  を knockdown したマウス乳がん細胞 4T1(KD) はコントロール細胞 (SCR) と比べ腫瘍生長の抑制が認められた。対照的に、ERO1- $\alpha$  過剰発現細胞 (OE) はコントロール細胞 (mock) と比べて腫瘍生長の促進が認められた。しかし、ヌードマウスを用いた実験ではすべての群で腫瘍生長に差は認められなかった。このことから、ERO1- $\alpha$  の発現は腫瘍免疫を減弱させることが示唆された。SCR と KD 由来の腫瘍組織を観察したところ、KD と比べて SCR の腫瘍周囲で高密度の顆粒球の浸潤が認められ、これらの細胞は polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) と同定された。加えて、分子内ジスルフィド結合をもつ G-CSF と CXCL1/2 の分泌量がコントロールと比べて KD で低下が、OE で増加が認められた。これらの変化は転写後のレベルで調節されていた。以上より、腫瘍内での ERO1- $\alpha$  の過剰発現は MDSCs に関与するサイトカイン、ケモカインを調節することによって、PMN-MDSCs を遊走させ、T 細胞免疫を抑制していることが示唆された。

今回の実験結果より、ATVs 療法に Hsp90 と複合化した抗原を使用することによって、より強く CTLs が誘導できる可能性がある。さらに、ERO1- $\alpha$  の機能を阻害することによって免疫抑制状態の解除が可能となり、今まで以上の治療効果が期待できる可能性があることが判明した。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の取得に値するものであると審査員一同は認めた。