
自家造血幹細胞移植後残存腫瘍への自己抗原・シャペロン
結合体による特異的免疫療法

(研究課題番号 10670931)

平成10年度～平成11年度文部省科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 鳥本悦宏

旭川医科大学医学部助手

はしがき

研究組織

研究代表者：鳥本悦宏（旭川医科大学 医学部 助手）
研究分担者：高後 裕（旭川医科大学 医学部 教授）
（研究協力者：田村保明）

研究経費

平成 10 年度	1,700 千円
平成 11 年度	1,300 千円
計	3,000 千円

研究発表

(1) 論文

- 1 Taya N, Torimoto Y, Hirai K, Hasebe C, Kohgo Y: Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. Br J Haematol, in press

(2) 学会発表

- 1 Sato K, Tamura Y, Torimoto Y, Shindo M, Shinzaki H, Hirai K, Kohgo Y. Novel immunotherapy using heat shock protein preparation of leukemic cells after syngeneic bone marrow transplantation in mice. The American Society of Hematology. 41th Annual Meeting and Exposition. 1999; December 6, New Orleans, Louisiana, USA
- 2 佐藤一也，田村保明，鳥本悦宏，新崎人士，平井克幸，高後 裕：自家骨髄移植後白血病細胞残存モデルにおける熱ショック蛋白を用いた免疫療法，第 61 回日本血液学会総会，1999 年 4 月 21 日，東京
- 3 佐藤一也，田村保明，鳥本悦宏，新崎人士，平井克幸，高後 裕：同系骨髄移植後の白血病細胞残存モデルにおける熱ショック蛋白を用いた免疫療法，第 58 回日本癌学会総会，1999 年 9 月 30 日，広島
- 4 佐藤一也，田村保明，鳥本悦宏，新崎人士，井内康之，進藤基博，高後 裕：同系骨髄移植後の白血病細胞残存モデルにおける熱ショック蛋白を用いた免疫療法，第 62 回日本血液学会総会，2000 年 3 月 16 日，福岡
- 5 佐藤一也，田村保明，進藤基博，新崎人士，平井克幸，鳥本悦宏，高後 裕：骨髄移植後残存腫瘍に対する heat shock protein を用いた免疫療法の基礎的検討，第 3 回北海道臓器移植フォーラム，1999 年 4 月 10 日，札幌
- 6 佐藤一也，田村保明，鳥本悦宏，進藤基博，新崎人士，平井克幸，高後 裕：同系骨髄移植後の白血病細胞残存モデルに対する熱ショック蛋白による免疫療法，第 3 回基盤的癌免疫研究会，1999 年 7 月 14 日，大阪

研究成果

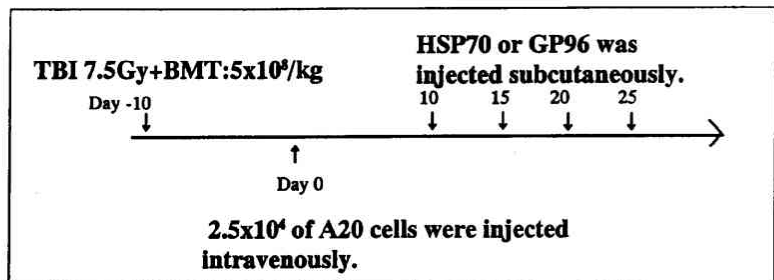
はじめに

熱ショック蛋白 (Heat shock protein; HSP) は細胞内で各種抗原ペプチドと結合し、major histocompatibility complex (MHC) への輸送を助ける分子シャペロンであり、細胞質内に存在する HSP70 や小胞体内に存在する GP96 などがある。これらの HSP は各種の腫瘍抗原ペプチドとも結合しているため、HSP-腫瘍抗原ペプチド複合体を抗腫瘍ワクチンとして利用できる。研究協力者である田村らは、マウスの系にて自己悪性腫瘍細胞から HSP を精製し、HSP-腫瘍抗原ペプチド複合体による自己悪性腫瘍特異的免疫応答を誘導した¹⁾。この結果は、悪性腫瘍に対する自家造血幹細胞移植後の免疫療法に関して新たなアプローチの可能を示すものと考えられた。一方、悪性腫瘍に対する自家造血幹細胞移植では graft versus leukemia (GVL) effect を認めず、移植後再発が問題となる。今回我々は、自家骨髄移植後の minimal residual disease (MRD) に対する免疫療法を想定し、マウスにおいて白血病細胞由来の HSP-腫瘍抗原ペプチドを用いた免疫療法について検討した。

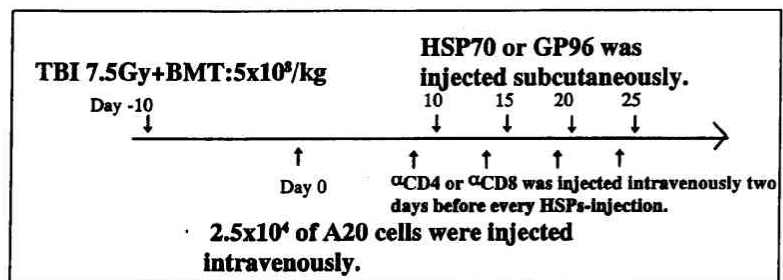
材料・方法

移植の conditioning は Uharek らの方法に従い ¹³⁷Cs を線源とし Total body irradiation (TBI) 7.5Gy を recipient mouse に施行し、同系の健常マウスより採取した骨髄細胞を、TBI 後に有核細胞数にて 5×10^8 /kg 眼窩静脈より輸注した²⁾。その後、同系マウス B リンパ性白血病細胞株 A20 を

2.5×10^4 接種した。この日を Day 0 とし、D10 より 4 回 HSP を次の各群に免疫した。PBS 皮下注群 (control 群)、正常マウス肝臓由来 HSP70、GP96 投与群、A20 由来 HSP70 および GP96 の免疫群に分けて生存日数を Kaplan and Meier 法を用いて比較検討した。HSP の精製は、A20 の lysate を超遠心後、ADP-agarose column および Mono Q を用いて HSP 70 を精製した。同様に ConA column および Mono Q を用いて GP 96 を精製した。精製された HSP は、Bradford protein assay にて蛋白量を測定し、SDS-PAGE 後鍍銀染色にて精製蛋白の存在を確認した。また、これらの免疫反応における T 細胞の関与を証明するため、抗 CD4 あるいは抗 CD8 抗体を、

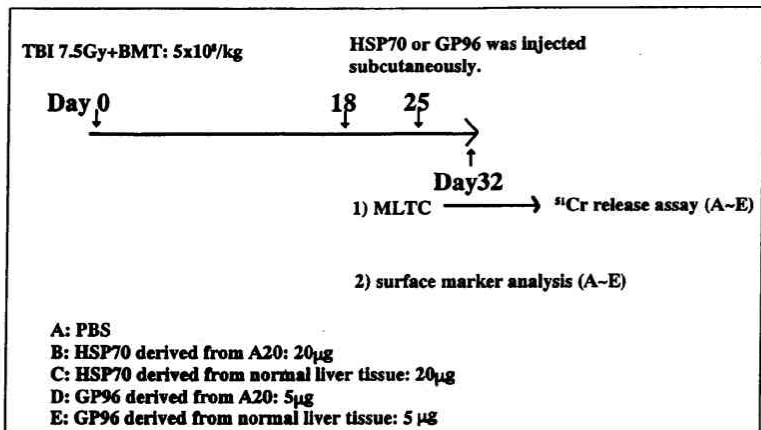


同系骨髄移植後のHSPを用いた免疫療法の実験プロトコール



HSPによる生存期間延長効果におけるCD4あるいはCD8陽性T細胞のin vivo除去の影響

HSP 免疫の 2 日前に合計 4 回腹腔内投与した CD4 あるいは CD8 T 細胞除去マウスを作成し control 群、非除去群との生存日数を比較検討した。さらに、HSP の免疫応答が腫瘍特異的に行われているかどうかを証明するために、同様のモデルにて HSP 免疫後のマウスの脾細胞を用いて細胞障害性 T 細胞 (CTL) が誘導できるかどうかを Cr release assay にて検討した。また HSP 免疫後のマウスの脾細胞における naive CD4 のマーカーである CD62L の発現について flow cytometer による two color 解析を行った。



CTLの誘導とその解析のプロトコール

成績

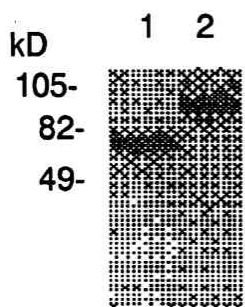


図1 精製したHSP70 (lane 1) およびGP96 (lane 2) SDS-PAGE後の鍍銀染色

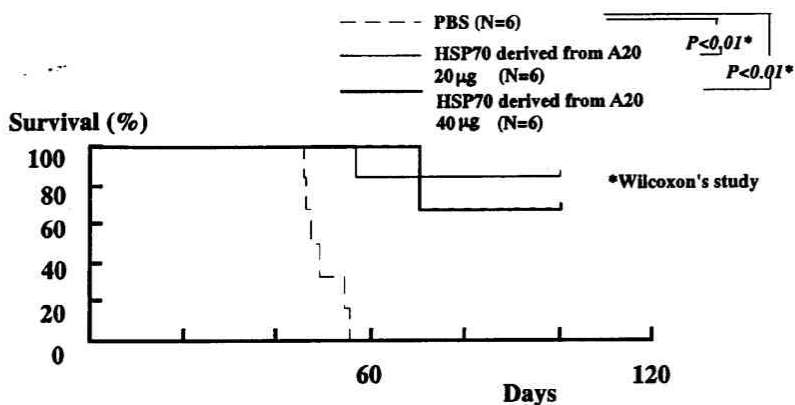


図2 HSP70免疫による生存期間の延長

図 1 に精製した HSP の鍍銀染色像を示す。本精製法にてほぼ単一の蛋白分画が精製されていることが示される。これらの HSP70 および GP96 を用いて以下の実験を行った。今回の実験モデルでは同系骨髓移植後に接種した A20 によって全例が移植後 60 日以内に死亡した。それに対して A20 由来 HSP70 免疫群および GP96 免疫群においては、control 群に比べて生存日数の有為な延長を認めた (図 2、3)。

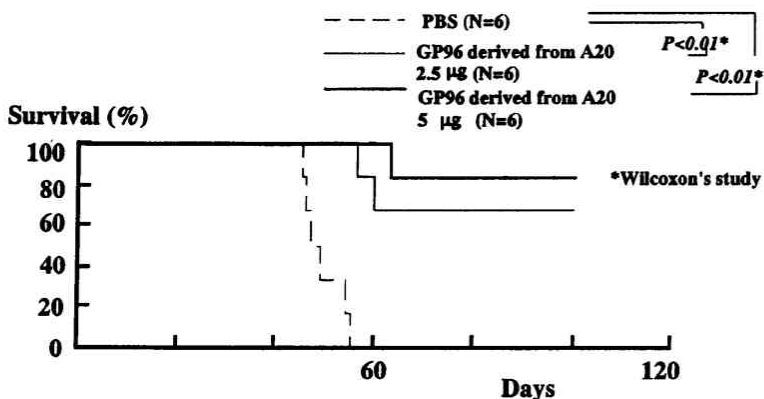


図3 GP96免疫による生存期間の延長

これらの結果は、投与した HSP によって A20 に対する免疫応答が誘導され A20 が排除されたものと考えられた。そこで、次に、この実験モデルにおいて CD4 および CD8 陽性 T 細胞が関与することを *in vivo* で検討するために、マウスに抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体を投与し、A20 接種後の生存日数を検討した。図 4、5 に示すように HSP70 および GP96 投与による生存日数の延長効果は CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を除去することで消失しており、A20 の排除に T 細胞が重要な役割を果たしていることが示された。

そこで、次に関与する T 細胞をより詳細に検討した。まず、HSP 投与マウスに A20 に対する特異的な CTL が誘導されているか否かを検討するため、HSP 投与マウス脾細胞を effector 細胞とし A20 を target 細胞とする細胞障害活性を検討したところ、図 6 に示すように、HSP70、GP96 を免疫した群ではともに、A20 由来 HSP 投与群では control 群および肝臓由来 HSP 投与群よりも有意に A20 に対する細胞障害活性が高かった。しかしながらこの細胞障害活性は natural killer 細胞の target 細胞である YAC-1 に対しては認められず、A20 由来の HSP を投与することで A20 に特異的な CTL が誘導されたことが示された。

また、図 7 に示すように HSP 免疫後のマウスの CD4 陽性脾リンパ球における CD62L の発現は、A20 由来 HSP70、

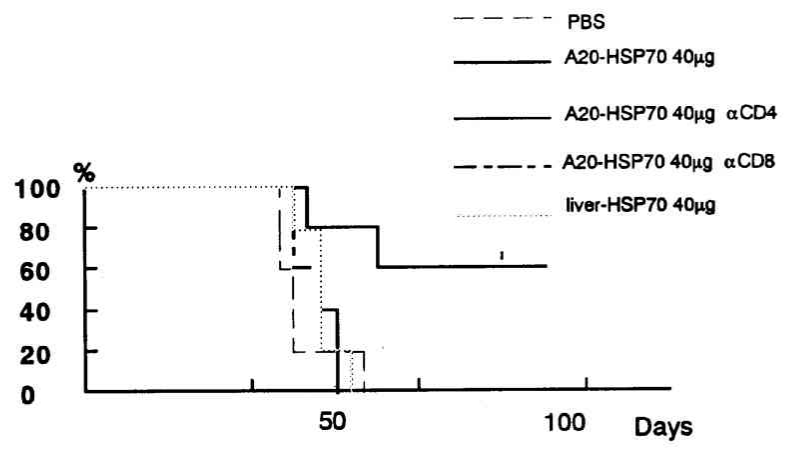


図4 HSP70免疫による生存期間延長間におよぼすT細胞除去の影響

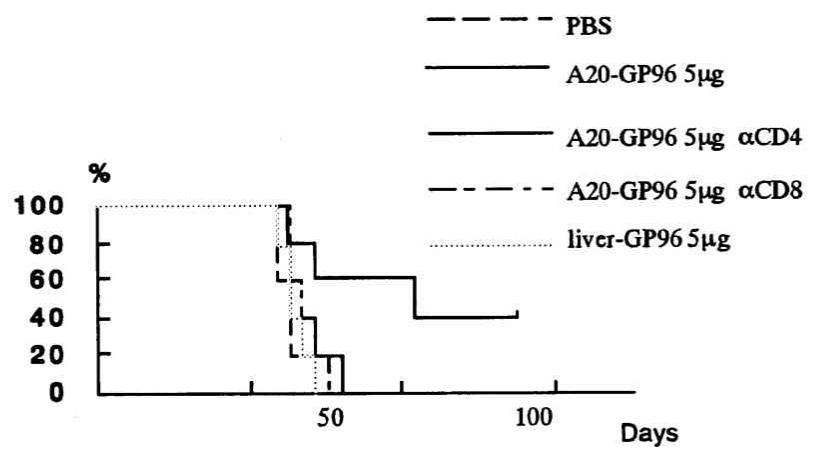


図5 GP96免疫による生存期間延長間におよぼすT細胞除去の影響

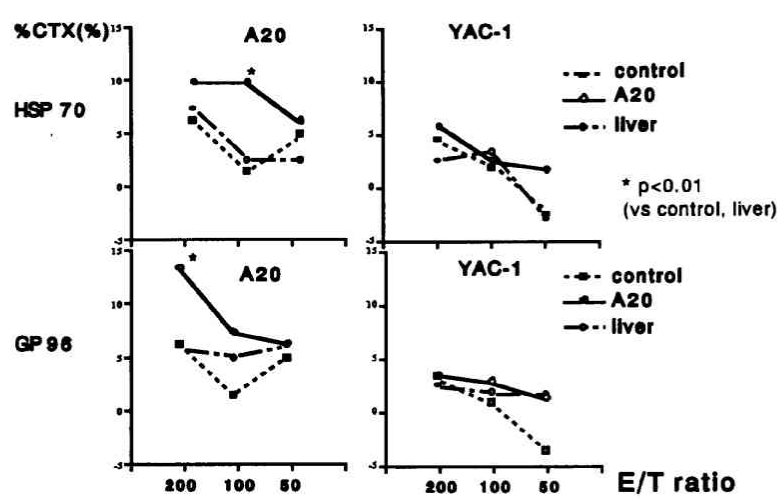


図6 HSP免疫マウスにおけるA20に対する特異的CTLの誘導

GP96 投与群では control 群および肝臓由来 HSP 投与群よりも有意に低下していた。このことは、CD4 陽性 T 細胞における naive 細胞が減少していることを示しており、HSP 投与によって HSP に反応した CD4 陽性 T 細胞が活性化し memory 細胞が増加したものと考えられた。

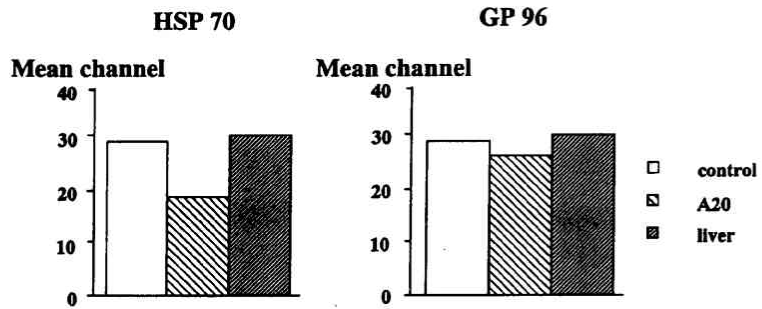


図7 HSP免疫マウスにおけるCD62L陽性naive CD4細胞の減少

考察・今後の展望

悪性腫瘍における腫瘍特異的抗原ペプチドの同定による特異的抗腫瘍免疫の誘導は良く解析されており、これら抗原ペプチドを用いたワクチン療法の報告も見られる。しかし、実際にはHLAの異なる個々の症例に対してそれぞれの腫瘍ごとに抗原ペプチドを同定することは困難である。それに対して、Srivastavaらは、HSPが各種の腫瘍抗原ペプチドと結合していることを利用して、このHSP・ペプチド複合体をワクチンとして用いることを提唱した³⁾。細胞内でペプチドはHSP70などと結合し transporter associated with antigen processing (TAP) を介して endoplasmic reticulum (ER) 内へ運ばれる。さらにER内でも、TAPからMHC class I分子へ受け渡される課程においてGP96が抗原ペプチドが結合している。すなわち、HSPを用いた免疫療法においては、HSPに結合した broad spectrum なペプチドが利用できるうえ、HSPは多形性を認めず異なるハプロタイプの症例にも使用できるなどの利点があり、より実際的である。一方、近年盛んな悪性腫瘍に対する自家造血幹細胞移植は、ドナー不在例や高齢者にまで安全に施行されているが、移植後に残存するMRDに対するGVL効果がなく再発が最大の問題となる。

本研究より、HSP-腫瘍抗原ペプチド複合体を同系骨髄移植後早期の免疫系の再構築の時期に投与することで、白血病細胞残存マウスに対し腫瘍免疫を誘導しうる可能性が示された。HSP-peptide 複合体を用いた腫瘍免疫の研究^{3,4)}は最近になり増えてきているが、血液悪性腫瘍や自家造血幹細胞移植後の残存腫瘍に対する免疫療法の研究は皆無であり、今後は、臨床材料を用いて、ヒト白血病細胞からHSPを分離・精製しCTLを誘導できることを検討した後に、自家造血幹細胞移植患者に対する臨床応用を念頭において検討していきたい。

引用文献

- 1) Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK: Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*. 278: 117, 1997
- 2) Uharek L, Glass B, Gaska T, Gassmann W, Loeffler H, Mueller-Ruchholts W: Influence of donor lymphocytes on the incidence of primary graft failure after allogeneic bone marrow transplantation in a murine model. *Br J Haematol*. 88: 79, 1994

- 3) Srivastava PK, Udono H, Blachere N, et al.: Heat shock proteins transfer peptide during antigen processing and CTL priming: *Immunogenetics*. 39: 93, 1994
- 4) Udono H, Srivastava PK: Heat-shock protein70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med*. 178: 1391, 1993