

学 位 論 文 要 旨

氏 名	岡本 幸子
題 目	IFN 誘導による抗腫瘍療法と癌をターゲットとした新規 TCR 遺伝子治療法の開発 (Development of efficient IFN induction method and new TCR gene therapy technology for cancer immunotherapy)

IFN は抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用、免疫応答調節作用など多様な生物活性を有するサイトカインであり、その免疫賦活作用に基づいた抗腫瘍効果が注目されている。一方、二本鎖 RNA poly I:poly C による IFN の誘導現象は古くから知られているが、大量の poly I:poly C を用いる必要があり強い細胞毒性が問題となることが多く、IFN 産生量も十分ではなかった。そこで、遺伝子導入に汎用されているカチオン性リポソームをキャリアーとすることにより、細胞内への poly I:poly C の取り込み効率を改善し、極めて少量の poly I:poly C による IFN の誘導を可能とした。また、担癌マウスを用いて *in vivo* における IFN 誘導能を確認し、抗腫瘍効果を確認した。以上の結果より本誘導法にて、少量の poly I:poly C で効率的な IFN 誘導が可能であり、細胞毒性の軽減が可能であった。さらに、本誘導法を上皮細胞株へ応用し IFN 分泌の方向性を調べ、上皮細胞は刺激を受けた方向へ選択的に IFN を分泌することを明らかにした。また、癌の免疫療法として、腫瘍抗原特異的 TCR 遺伝子を導入した T 細胞を用いた養子免疫療法(TCR 遺伝子治療)が注目されているが、内在性と導入した TCR の競合やミスペアリングによる導入 TCR の発現低下が起これ、自己反応性の TCR 発現の危険性も否定できない。その問題を解決するために、内在性 TCR を siRNA により抑制しておき、コドン変換した TCR 遺伝子を導入して目的の TCR のみを発現させる新規 TCR 遺伝子治療法を確立し、MAGE-A4 および WT1 特異的 TCR 発現ベクターを開発した。臨床応用へ向けて目的の TCR $\alpha\beta$ および siRNA 2 種類合計 4 種類の遺伝子を同時に発現するレトロウイルスベクター (siTCR vector) を種々構築し、最も効果の高いベクターを選択し、遺伝子改変したリンパ球において、内在性 TCR の抑制及び導入 TCR の発現が導入約 1 カ月後まで持続していることを確認した。また、選択した siTCR ベクターに内在性 TCR を抑制する siRNA 配列をさらに 2 種類追加し、より効果的な siTCR ベクターを開発し、低いベクターコピー数にて従来の TCR 発現ベクターよりも目的 TCR の高い発現率と発現強度が得られることを明らかとした。また、siTCR 遺伝子改変 T 細胞は従来型ベクター遺伝子改変 T 細胞より、癌細胞に対してより強い細胞傷害活性を示した。T 細胞を用いた遺伝子治療では、現在のところ細胞の癌化等の報告はされていないが、導入するベクターコピー数を最低限に抑えることにより、安全性を高めることが期待される。本研究は効率的かつ安全性の高い TCR 遺伝子治療法として有用であると考えられ、また TCR 遺伝子の種類によらないユニバーサルな方法であることが期待される。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Sachiko Okamoto
題 目	Development of efficient IFN induction method and new TCR gene therapy technology for cancer immunotherapy (IFN誘導による抗腫瘍療法と癌をターゲットとした新規 TCR 遺伝子治療法の開発)
<p>The IFNs have many biological activities including antiviral effects, inhibition of cell proliferation, regulation of cell differentiation, and modulation of the immune system. Thus it is rational that IFNs have been clinically applied as antiviral and antitumor reagents for more than a decade, and more recently IFN gene transfer to tumors has been intensively attempted for therapeutic purposes. IFN inducers also have the potential for use in clinical treatments. The synthetic double-stranded RNA poly I:poly C is a particularly potent inducer of IFNs. Effective doses of poly I:poly C are, however, so high as to be cytotoxic. In this study, we examined the IFN-inducibility of poly I:poly C complexed with several cationic reagents and found that cationic liposome can induce the production of a substantial amount of type I IFNs even at a two-order lower dose compared with poly I:poly C alone in mouse cell lines. This efficient IFN induction condition caused no significant cytotoxicity in the recipient cells. Furthermore, to evaluate the inducibility of IFN by poly I:poly C / cationic liposome complexes in vivo, the complexes were applied by intratumoral injection. IFN was detected in the tissue culture supernatant and the growth inhibition of established tumors were observed. To apply this IFN induction method to polarized epithelial cells, it is important to investigate IFN secretion polarity induced by poly I:poly C. Mode of secretion of poly I:poly C-induced IFN was examined using epithelial cell lines in a bicameral culture system, and found that in epithelial cells poly I:poly C-induced IFN is preferentially secreted from the stimulated membrane domain, providing a novel insight into the regulation of protein secretion. Adoptive T-cell therapy using lymphocytes genetically engineered to express tumor antigen-specific TCRs is an attractive strategy for treating patients with malignancies. However, there are potential drawbacks to this strategy: mispairing of the introduced TCR α/β chains with the endogenous TCR subunits and competition of CD3 molecules between the introduced and endogenous TCRs can impair cell surface expression of the transduced TCR, resulting in insufficient function and potential generation of autoreactive T-cells. In addition, the risk of tumor development following the infusion of cells with aberrant vector insertion sites increases with the vector copy number in the transduced cells. In this study, we developed retroviral vectors encoding both siRNA constructs that specifically down-regulate endogenous TCR and a codon-optimized, siRNA-resistant TCR specific for the human tumor antigens MAGE-A4 and WT1. At low copy numbers of the integrated vector, the transduced human lymphocytes exhibited high surface expression of the introduced tumor-specific TCR and reduced expression of endogenous TCRs. In consequence, the vector-transduced lymphocytes showed enhanced cytotoxic activity against antigen-expressing tumor cells. Therefore, our novel TCR gene therapy may open a new gate for effective immunotherapy in cancer patients.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	岡本 幸子
審査委員	主査 鹿児島大学 客員教授 浅田 起代蔵
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島大学 客員教授 向井 博之
	副査 鹿児島大学 客員准教授 小山 信人
審査協力者	
題目	IFN誘導による抗腫瘍療法と癌をターゲットとした新規TCR遺伝子治療法の開発 (Development of efficient IFN induction method and new TCR gene therapy technology for cancer immunotherapy)
<p>本研究では癌に対する免疫療法であるサイトカイン療法とTCR遺伝子治療法を、より効率的で安全性の高い治療法として開発することを目的とした。2本鎖RNA poly I:poly CによるIFN誘導は効率が低いため大量のpoly I:poly Cを必要とし、その細胞毒性が問題となっていた。この問題を解決するために、毒性の低い高効率IFN誘導法を開発した。また、TCR遺伝子治療では、患者末梢血のT細胞を使用するため、内在性のTCR遺伝子と導入したTCR遺伝子が競合し、目的外のTCRの発現による導入TCRの発現低下が起こり、またTCRミスペアリングによる自己反応性のTCRの発現の危険性も否定できない。本研究では、内在性のTCRを抑制することにより、どのようなTCRの種類にも応用できる新規TCR遺伝子治療法を開発した。本研究で得られた結果の骨子は以下のとおりである。</p> <p>本研究では、まずカチオン性リポソームを用いることにて、極めて低濃度のpoly I:poly Cにて効率良くIFNが誘導できることを見出し、高効率かつ安全性の高いIFN誘導法を開発した。さらに、本IFN誘導法を用いることでin vivoにおける腫瘍細胞増殖抑制効果を確認した。また、細胞極性を持つ上皮細胞等のIFN分泌方向性は、poly I:poly Cを投与した方向のみへIFNが分泌されることを見出し、IFN分泌と細胞極性との関係に新しい知見を得た。</p>	

次に、高効率かつ安全性の高いTCR遺伝子治療法の開発を目指し、多種多様なTCR α 遺伝子およびTCR β 遺伝子をsiRNAにてノックダウンすることを試みた。まず最初に、TCRのC領域のsiRNAを設計し、最適配列を選択した。また、ヒトリンパ球にsiRNAによる抑制回避のためにコドン変換したTCR遺伝子を導入して目的となるTCR強制発現T細胞を作製した。そこに選択したsiRNAを導入して内在性TCRをノックダウンすることで、目的のTCRの細胞表面上への発現が上昇することを見出した。この方法を実用化するために、以下の検討・開発を行った。

- ① 高力価・高発現レトロウイルスベクターである pDON-5 ベクターを開発した。
- ② 効率良くsiRNAを発現させることのできるshRNAループ配列の検討を行い、microRNAのループ配列10種類から効率の高いshRNAループ配列4種類を選択した。
- ③ HLA-A2402拘束性MAGE-A4特異的TCR遺伝子を用いて、目的のTCR遺伝子および内在性TCRに対するsiRNAを同時に発現させることのできるsiTCRレトロウイルスベクターの開発を行い、29種類のレトロウイルスベクターより最適なPM11 siTCRレトロウイルスベクターを選択した。
- ④ siTCRレトロウイルスベクターによる導入TCR遺伝子の発現および内在性TCRの抑制効果は遺伝子導入後1ヶ月以上持続していることを明らかとした。
- ⑤ さらにsiRNA配列を追加した改良型 PM11-w siTCRレトロウイルスベクターを開発した。
- ⑥ siTCRレトロウイルスベクターはヒトリンパ球においてコントロールベクターと比較して、導入TCRの5倍以上の発現率と高い発現強度を示し、低プロウイルスコピー数で高い目的TCRの発現率と発現強度が得られることを明らかにした。
- ⑦ siTCRレトロウイルスベクターは、コントロールベクターと比較してより強い細胞傷害活性を示すことを明らかとした。
- ⑧ siTCRレトロウイルスベクターはHLA-A2402拘束性WT1特異的TCR遺伝子にも応用できることを証明した。

これらの結果、siTCRレトロウイルスベクターは、内在性TCRを抑制することにより、低プロウイルスコピー数にて高い導入TCRの発現が得られ、またTCRミスペアリングを軽減させることが可能であることから、高効率かつ安全性の高い新規TCR遺伝子治療として多いに期待できるものである。

以上のように、本論文でまとめた研究は高効率かつ安全性の高い癌免疫療法の開発に大きく貢献するものであり、開発した高効率IFN誘導法は癌の治療のみならず、IFN誘導のメカニズムの研究にも応用できる方法である。さらに、本研究にて開発した高力価・高発現レトロウイルスベクターおよびshRNAループ配列は、遺伝子発現や遺伝子ノックダウンの研究に利用することができ、遺伝子工学の発展に大きく寄与するものである。したがって、審査委員一同は、本論文は博士（学術）の学位論文として十分な価値を持つと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏名	岡本 幸子
審査委員	主査 鹿児島 大学 客員教授 浅田 起代蔵
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀 大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島 大学 客員教授 向井 博之
	副査 鹿児島 大学 客員准教授 小山 信人
審査協力者	
実施年月日	平成 22 年 1 月 8 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成 22 年 1 月 8 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆答により外国語 (英語) の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、本研究が農学の分野だけでなく、生命科学および遺伝子工学の分野に貢献する研究成果を提供したことにより、博士 (学術) の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏名	岡本 幸子
[質問 1]	proviral copy数に関して、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した時、実際に、copy数がどれぐらい増加すると癌化の危険性が高まるのか。
[回答 1]	本研究のようにT細胞を対象とした遺伝子治療に関しては、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入で生じる癌化のリスクは極めて低いとされており、これまで癌化の報告はない。proviral copy数がどこまでなら大丈夫であるというデータは無いが、幹細胞に遺伝子導入する場合は5コピー以下とされており、copy数を抑える事は重要と考えている。本研究で開発したsiTCRベクターを使用する事でcopy数を低く抑えて高い発現量を得る事ができるので、危険性が回避されるのではと期待している。
[質問 2]	siTCRベクターで導入したTCRの機能はCTLアッセイでしか確認していないのか。
[回答 2]	TCRの発現はテトラマーで確認しており、本研究では現在のところCTLアッセイに加えIFN γ のELISAや細胞内染色でその機能を確認している。マウスなどを用いた動物実験で、MAGE-A4陽性HLA-A2402陽性癌細胞の傷害を指標として効果確認を行うことは可能である。
[質問 3]	siRNAが目的遺伝子以外に影響を与える事はないのか。
[回答 3]	siRNAを使用する場合はoff target effectを確認する必要があるとあり、現在DNAマイクロアレイで解析を行っている。ただ、DNAマイクロアレイ解析では、siRNAに限らず何かを細胞に導入する事で多くの遺伝子の発現変動が観察されてしまうので、何がoff target effectなのか、その判断が難しい。
[質問 4]	PM11はsiRNAが2個、PM11-wは4個搭載されているが、siRNAの数をさらに増やすことにより抑制効果は増していくのか。
[回答 4]	本研究では、1つのターゲット遺伝子に対して配列の異なるsiRNA2種類を用いることで抑制効果が上がったので、siRNAの種類を増やせば効果は高まると推定している。しかし、詳細な検討を行ったところ、PM11-wのRNA干渉効果はPM11よりも上昇したが期待したほどの効果上昇は見られず、むしろ発現させたTCR遺伝子の発現量が上昇していた。その理由は、shRNAによってmRNAはより複雑な2次元構

造を取るようになるので、その2次元構造により mRNAの安定性が上昇し、発現レベルが向上したと考察している。

[質問 5] 同じ物をタンデムに搭載しても良いのか。

[回答 5] 同じ物をタンデムに並べると発現量は上昇するが、大腸菌でベクタープラスミドを調製する際や、組換えレトロウイルスを作製する際に、同じ配列間で組換えを起こしてしまい、正しいベクターやウイルスができないという問題が生じるので、同じ配列を入れる事は避けたほうが良いと考えている。

[質問 6] 癌細胞にはいろいろな抗原があるが、TCRはその都度作製しなければならないのか

[回答 6] HLAのタイプが同じである事が前提だが、例えばMAGE-A4は多くの大腸癌の患者さんで発現しているので、MAGE-A4に対して強い認識能を持つTCRを得ることで同じTCR遺伝子を使用する事ができる。また、各種癌抗原と各種MHC Class Iに対応したTCR遺伝子を揃えておけば、どんな患者さんにもTCR遺伝子治療を適応できるようになる。

[質問 7] 作製したTCR遺伝子導入細胞は、正常細胞に対する傷害性を誘導するような事はないのか。

[回答 7] TCRはMHC Class Iに癌抗原が提示された細胞を認識するので、癌抗原を発現していない正常細胞を攻撃する事はないと考えられる。

[質問 8] 癌細胞は複数の抗原を発現していることもあるが、2種類のTCRを1つの細胞に同時に発現させてそのような癌細胞に対する傷害効果を高める事は可能か。

[回答 8] 2種類のTCR遺伝子を1つの細胞に導入すると、細胞内に2種類のTCR α と β が存在することになり、その間でミスペアリングを起こしてしまうので、あまり効果は上がらないと考えられる。むしろ、TCR遺伝子を1つずつ導入した2種類の細胞を調製して、混合して投与する方が効果的と考えられる。

[質問 9] 内在性TCRの発現が抑制されることにより導入TCRの発現量が増加する事に関して、内在性TCRのmRNA量は低下するが、導入したTCRのmRNA量は変わらないのに導入TCRのタンパク量は多くなっているが、これは、膜上でのレセプターの量が決まっているのか、翻訳段階で制限があるのか、どこに制限があるのか。

[回答 9] TCR α β ヘテロダイマーがまず形成されてこれが細胞表面上に提示されるためにはCD3分子と複合体を形成する事が必要であり、このCD3分子の量に制限があるので競合が生じて目的とするTCRの細胞膜上での発現量が低下してしまう。細胞膜上のトータルなTCRの発現量は変わらない。

[質問 1 0] siTCRベクターで採用したshRNAループの評価に関して、新規な40種類のmiRNAからランダムに10種類選択してループを評価したという事であるが、分類分けして各グループから代表を選択するなどではなく、ランダムに選択した理由は何か。

[回答 1 0] miRNAはMPSSという方法で解析したが、それほど大量ではないデータで解析し、独自性を出すためにその中から新規のmiRNAを選択したのであまり多くの配列は得られなかった。効果的なループ構造に関する法則は報告されていないため、それら数種類の配列から10種類をランダムに選択した。No.7ループの配列はTTTTが含まれていて、これはPol. IIIプロモーターのターミネーターシグナルであるのでうまくいかないことが予測されたがそれも選択し、逆にバイアスをかけないように、どのような配列が良いかを見つけるためにランダムに選択した。

[質問 1 1] 効果的なshRNAループNo. 2, 3, 9, 10は他のループと比べて、高い抑制効果を持つ配列として共通点はあるのか。

[回答 1 1] ループの長さもまちまちで、その配列においても共通点は特に見られなかった。

[質問 1 2] shRNAループNo. 2, 3, 9, 10の抑制効果を示したグラフは他の配列に比べて有意差は余り見られないように思えたが、有意差はあるのか。

[回答 1 2] No.7ループの効果は良くなく、No.1ループも少し効果が低いですが、それ以外はどれも効果的で、ループ間の有意差は余り見られなかった。コントロールとして用いた一般的に使用されている配列は人工的にデザインした配列であるが、本研究で得られたループ配列はmiRNAから得られたものなので、生体内で確実にプロセッシングされる配列であるため、極端に効果が悪いものは無かったのではと考えている。

[質問 1 3] 効率の良いループはそのsiRNA配列には関係なく、良いものは良いのか。

[回答 1 3] 本研究では、GFP用に2種類、インテグリン α 用に1種類の計3種類の配列でしかRNAi効果の確認は行っていないが、その全てに同じような傾向が見られたので、効果を保障するものではないが、おそらくsiRNAの配列に関係なく効果的と考えて

いる。

[質問 1 4] 内在性TCR $\alpha\beta$ とのミスペアリングが問題という事が本研究の始まりと思うが、これまでいくつかTCR遺伝子治療の研究が行われているが、その中でミスペアリングによって正常組織が障害を受けたという報告はあるのか。

[回答 1 4] これまでにミスペアリングによる有害事象の報告はないが、内在性TCR $\alpha\beta$ とミスペアリングが生じることは確かである。ミスペアリングTCRが有害事象を引き起こすかどうかは確率の問題であるが、本研究で開発したsiTCRレトロウイルスベクターでミスペアリングをなくしてリスクを軽減させる事は重要と考えている。