

マウス白血病に対するB7分子を
用いた免疫遺伝子治療

高橋 強 志

論文題目 マウス白血病に対するB7分子を
 用いた免疫遺伝子治療

指導教官名 矢崎 義雄 教授

平成7年4月

東京大学大学院医学系研究科

第一臨床医学専攻 入学

氏名 高橋 強志

目次

I. 緒言	1
II. 方法	
1. 動物	5
2. プラスミド作製	5
3. 細胞株	5
4. レトロウイルスの準備と8709細胞への感染	6
5. フローサイトメトリーによる解析	7
6. CD4+細胞あるいはCD8+細胞あるいはNK細胞の <i>in vivo</i> 除去実験	7
7. 動物実験	9
8. B7導入8709細胞による同系マウスでの免疫反応	9
9. 統計解析	10
III. 結果	
1. マウスB7-1、B7-2遺伝子の8709細胞への導入	11
2. 同系マウス (C3Hマウス) に対する8709細胞の造腫瘍性	14
3. B7-1分子とB7-2分子の同系マウスにおける抗腫瘍効果の比較	17
4. B7導入8709細胞接種群における生存期間の延長にはCD4+T細胞及びCD8+T細胞が必要であるがNK細胞の寄与は少ない	20
5. 放射線照射B7導入8709細胞によるワクチン効果の検討	23
6. B7導入8709細胞の同系マウスへの接種による免疫反応惹起の検討	25

IV. 考察	27
V. 謝辞	36
VI. 文献	37
図1	12
図1説明	13
図2	15
図3	16
図4	18
図5	19
図6	21
図7	22
図8	24
表1	26

I. 緒言

近年、癌に対する免疫療法は有望な治療法となりつつある。その理由として T 細胞活性化のメカニズムが解明されてきていることが挙げられる。T 細胞の抗原特異的活性化には少なくとも 2 つのシグナルが必要であることがわかってきた。第一のシグナルは T 細胞レセプターを介するもので、抗原提示細胞により MHC 上に提示された抗原を T 細胞が T 細胞レセプターで認識することによりシグナルが入る。第二のシグナル (costimulation, 共刺激) は抗原とは独立に入るシグナルである。第一、第二のシグナルとも入る場合 T 細胞は活性化されるが第一のシグナルのみが入る場合その T 細胞はアナジー (anergy) になると考えられている (Mueller et al., 1989; Schwartz et al., 1989)。この第二のシグナルには複数の異なる経路が存在することが知られているが T 細胞の活性化に最も重要な経路は CD28 を介したものでありそのリガンドが B7 分子である。この CD28 を介したシグナルでは IL-2 を主としたサイトカインの mRNA の発現量を上げる、mRNA の発現を安定化するなどの作用がその活性化の本質と考えられている (June et al., 1994)。

B7 分子には B7-1 (CD80) 分子と B7-2 (CD86) 分子があり

(Yokochi et al., 1982; Freeman et al., 1989; Azuma et al., 1993)、ともに免疫グロブリンスーパーファミリーの一つである。そのシーケンスの相同性は 25%である。B7 分子はまた CD28 と相同性のある分子 CTLA-4 とも結合しこの場合は T 細胞に抑制性のシグナルが入ることが知られている (Thompson et al., 1995)。このようにして B7 分子と CD28 分子あるいは CTLA-4 分子との相互作用により T 細胞の活性化は調節されていると考えられている。

B7-1 分子は休止期の抗原提示細胞 (単球、樹状細胞、B 細胞) には発現はほとんどみられず刺激により抗原提示細胞が活性化されることにより B7-2 分子に遅れて細胞表面上に発現する。これに対し B7-2 分子は抗原提示細胞に恒常的に発現し (B リンパ球を除く) 刺激により速やかに発現量が増大していく。B7 分子は T リンパ球を活性化するがこれにより CD40 リガンド分子を発現し、このリガンド分子により抗原提示細胞が CD40 分子を介して更に活性化され B7 分子の発現がより高まることも知られてきている。

腫瘍細胞に B7-1 分子を導入することにより腫瘍細胞を抗原提示細胞として機能させ腫瘍に対する CTL を誘導させることが考えられ、そして実際、腫瘍細胞に B7-1 分子を導入しマウスに接種することに

より抗腫瘍免疫が誘導されることが報告された(Chen et al., 1992; Townsend et al., 1993)。またNK細胞もB7分子により活性化されることが示され(Chambers et al., 1996) B7分子導入腫瘍細胞による抗腫瘍効果の誘導にはNK細胞が関与する場合があることも報告された(Tzzy - Choou et al., 1995)。我々もまた、マウス骨髄性白血病細胞MIにB7-1分子を導入し同系マウス(SL マウス)に接種することにより腫瘍原性の低下、ワクチン効果、治療効果を観察しこれを報告してきた(Hirano et al., 1996)。一方でB7分子ファミリーとしてB7-2分子が同定されYangら(1995)は腫瘍細胞にB7-2分子を導入することによりB7-1分子同様、抗腫瘍効果が誘導できることを確認した。B7-1分子、B7-2分子とも抗腫瘍免疫が誘導されうることが確認されたためどちらの分子がより効果的に抗腫瘍免疫を誘導できるかが免疫学あるいは臨床応用上問題となった。これらを比較した論文がいくつか報告されたが、結論は出ていない(Gajewski et al., 1996, Matulonis et al., 1996, Martin-Fontecha et al., 1996)。

今回、筆者は将来的にヒト白血病に対する免疫遺伝子治療を確立する目的で、マウス白血病細胞を使ったモデルにおけるB7分子の抗腫瘍効果の確認とB7-1分子とB7-2分子のどちらが抗腫瘍効果に有

効であるか比較検討するためにマウス骨髄性白血病細胞株である8709細胞にB7-1、B7-2分子を導入しその抗腫瘍効果を解析した。その結果、8709細胞にB7-1分子を導入した細胞8709/B7-1細胞、8709細胞にB7-2分子を導入した細胞8709/B7-2細胞でともに腫瘍原性が低下することがわかった。そしてこの効果はB7-2分子で著明であった。この抗腫瘍効果を誘導するエフェクター細胞を検討したところ、8709/B7-1細胞、8709/B7-2細胞でともにCD4+T細胞、CD8+T細胞が必要であることがわかった。また、NK細胞の関与は少ないと考えられた。8709/B7-1、8709/B7-2細胞に放射線照射しこれをワクチン接種したところ、明らかな抗腫瘍効果の誘導は確認できなかった。

筆者は本研究によってマウス白血病細胞にB7分子を導入すると免疫原性が高まることを確認した。筆者の系においてはB7-2分子の方が有効であることを観察した。B7導入腫瘍細胞を免疫遺伝子治療に応用する上で条件によってB7-1分子及びB7-2分子を選択する必要があることを本研究は示唆するものである。今後のB7を用いた免疫遺伝子治療の役に立つことを願い、本研究を報告する。

II. 方法

1. 動物

C3H/NeN マウス(H-2K) と Balb/c *nu/nu* ノードマウスは6週令で日本クレアより購入し、東京大学医学部付属動物実験施設内 SPF 環境下で飼育した。実験は6週令から10週令のマウスを用いた。全ての実験は1回に5-10匹のマウスを用いて、少なくとも2回以上の独立した実験を行った。

2. プラスミド作製

報告されているマウス B7-1 cDNA 配列に基づいて RT-PCR にてマウス B7-1 cDNA 全長を取り出した (Freeman et al., 1989)。PCR 産物はサブクローニングにて pBluescript II (Stratagene) に挿入しシーケンスの確認を行った。この B7-1 cDNA をマウス MPSV 由来のレトロウイルスベクター、pSR α MSVneo (Muller et al., 1991) に挿入し pmB7-1 を作成した。マウス B7-2 cDNA 全長は、東みゆき博士 (国立小児病院研究所) より譲渡され、pSR α MSVneo にサブクローニングし pmB7-2 を作成した。

3. 細胞株

COS-7 細胞は RPMI 1640 + 10% 牛胎児血清(FCS)にて培養した。

8709 細胞株(H-2^b)は C3H マウスに放射線照射することにより発症した急性骨髄性白血病より樹立した細胞株であり、吉田 和子 博士(放射線医学総合研究所)より譲渡された (Yoshida et al., 1993)。8709 細胞とその誘導株は 37°C、5% CO₂ メディウム RPMI 1640 + 10% 牛胎児血清、2 mM グルタミン、100 ng/ml ペニシリン-ストレプトマイシンで培養した。

4. レトロウイルスの準備と 8709 細胞への感染

組み換えレトロウイルスは次のように作製した。すなわち、マウス B7-1 プラスミドとマウス B7-2 プラスミド及びコントロールとして mock プラスミド (ベクターのみ) を pSV- ϕ -EMLV (ヘルパーウイルス) とともに DEAE-デキストラン法にて COS-7 細胞に遺伝子導入した。そして COS-7 細胞より産生されたウイルス上清を 8 mg/ml のポリブレン (Sigma) とともに 8709 細胞への感染に用いた。その後、感染した細胞を G418 (300 mg/ml) (GIBCO) で選別しポリクローナルな 8709/B7-1、8709/B7-2、8709/MOCK の細胞株を得た。その後、限界希釈を行い、モノクローナルな 8709/B7-1 と 8709/B7-2 の細胞株を樹立した。この実験に用いた全ての細胞株は独立したレトロウイルス感染と限界希釈によって得られたものである。また、樹立した後

は動物実験に用いる前に14日間以上の培養をは行っていない。

また、樹立した細胞株の培養上清では未感染のNIH3T3細胞に対するneo耐性遺伝子の伝搬が無いことから、これらの細胞株はヘルパーウイルスを産生していないものと考えられた。

5. フローサイトメトリーによる解析

フローサイトメトリーを用いて8709細胞株、及びその誘導株におけるMHC class I (H-2K^b, H-2D^b)、class II (I-A^b, I-E^b)、マウス B7-1、B7-2、ICAM-1分子の発現を調べた。抗体は抗 H-2K^b 抗体 (36-7-5, Pharmingen)、抗 H-2D^b 抗体(15-5-5, Pharmingen)、抗 I-A^b 抗体 (11-5-2, Pharmingen)、抗 I-E^b 抗体 (14-4-4s, Pharmingen)、抗マウス B7-1 抗体 (16-10A1, Pharmingen)、抗マウス B7-2 抗体 (GL1, Pharmingen)、抗マウス ICAM-1 抗体 (3E2, Pharmingen) 及びアイソタイプを合わせたコントロール抗体を用いた。5 x 10⁵ 個の細胞を pH7.4、4℃の条件下で PBS に抗体を加えて反応させた。細胞は PBS で2回洗いフローサイトメトリーで解析した (FACSort, Becton-Dickinson)。

6. CD4+細胞あるいはCD8+細胞あるいはNK細胞の *in vivo* 除去実験

Balb/c nu/nu ノードマウスにプリスタン (Sigma) 0.5 ml を腹腔内接種しておき一週間後にラット抗マウス CD4 抗体 (GK1.5) あるいは

ラット抗マウス CD8 抗体 (53.6-7)を産生するハイブリドーマを腹腔内に接種した。モノクローナル抗体を含んだ腹水を硫酸アンモニウムで沈降させ PBS で溶解した。その後 PBS にて 24 時間透析を行い MabTrap GII (Pharmacia)を用いて精製した。T 細胞の除去実験に関しては各々の同系マウスに腫瘍を接種する 7 日前、および 1 日前に精製した抗体を 0.3 mg/body ずつ腹腔内接種し 7 日後に 0.2 mg/body 接種した。T 細胞の除去が行われていることを確認するために腫瘍接種予定日から 1 4 日後に脾臓を調べ CD4+T 細胞に関してはラット抗マウス CD4 抗体 (RM4-5)及び CD8+T 細胞に関してはラット抗マウス CD8 抗体 (Lyt2.2)でそれぞれの分画の T 細胞が除去できていることを確認した。NK 細胞の除去実験に関してはマウスに抗マウスアシアロ GM1 ウサギ血清 (WAKO Chemicals, Osaka, Japan)を接種した。これは、凍結乾燥した抗血清を 1 ml の蒸留水で溶き PBS で 10 倍希釈した後、マウスの腫瘍接種予定日の 7 日前、1 日前、7 日後に 0.2 ml (20 μ g/body)腹腔内接種した。NK 細胞が除去されていることの確認は、脾細胞の NK アッセイによって行った。これは抗マウスアシアロ GM1 ウサギ血清を接種しておいたマウスから腫瘍接種予定日の 1 4 日後に脾細胞を取り出しこれをエフェクター細胞として用いた。NK

活性はNK感受性があるYAC-1細胞 (RIKEN CELL BANK)を ^{51}Cr でラベルしたものをターゲットとして用いた。アッセイは3穴ずつで2回行った。E/T比は100:1、50:1、25:1、12.5:1とした。% Specific Lysis は以下の式を用いた: (experimental release [cpm] - spontaneous release [cpm]) / (maximum release [cpm] - spontaneous release [cpm]) x 100 = percentage specific lysis

7. 動物実験

細胞はハンクス平衡塩 (HBSS) (GIBCO)で2回洗ったものを用いた。トリパンブルーで染まらない細胞をカウントし適当な濃度に調製し0.2 mlのHBSSに溶かし同系マウスに腹腔内接種した。いくつかの実験では、細胞に始めに ^{137}Cs 線源を用いて160 rad/minで3,500 rad (1rad=0.01 Gy) 照射を行い、その後トリパンブルー染色でカウントを行った。この照射線量は予め実験を行い、8709細胞及びその誘導株は3,000 radの照射で増殖できなくなりました3,500 radを照射した 5×10^5 個の8709細胞をマウスに接種しても腫瘍は生育しないことを確認し設定した。

8. B7 導入 8709 細胞による同系マウスでの免疫反応

6週令のC3Hマウス各2匹ずつの腹腔内に8709/WT、8709/MOCK、8709/B7-1、8709/B7-2細胞を 5×10^5 個接種した。2週間後に脾臓を

取り出しこれをすりつぶしてメッシュでこし PBS(-)にといた。赤血球を溶血させた (RED BLOOD CELL LYSING BUFFER)のち PBS(-)で3回洗浄しカウント。その後 CD3(500A2, Pharmingen)-FITC/CD45R-B220(RA3-6B2, Pharmingen)-PE 及び CD4(RM4-5, Pharmingen)-FITC/CD8(Lyt2.2, Pharmingen)の2重染色を行い FACS を行い解析ソフト、セルクエストを用いてそれぞれの分画の割合を算出した。

9. 統計解析

生存期間は腫瘍接種の日から数え、終了は300日に生存していた場合はと殺し担癌状態を調べた。また log rank test を用いて生存カーブを比較し P 値が 0.05 以下を有意とした。

III. 結果

1. マウス B7-1、B7-2 遺伝子の 8709 細胞への導入

今回の実験で用いた細胞株は 8709 細胞で C3H マウス(H-2^k)に放射線照射することにより発症した、骨髄性白血病細胞株である。8709 細胞は MHC class I の H-2K^k を中等度に発現し H-2D^k をわずかに発現している。しかし MHC class II の I-A^k、I-E^k、B7-1、B7-2、ICAM-1 は発現していない (図 1)。マウス B7-1、B7-2 及び mock ベクターを導入した細胞株はフローサイトメトリーで B7-1、B7-2 及び MHC class I の発現レベルによりスクリーニングを行った。8709/B7-1 及び 8709/B7-2 のポリクローナルなプールから各々 30 以上のモノクローナルな細胞株を樹立しそのうち B7-1 あるいは B7-2 の発現が高いものを選び 8709/B7-1/clone 10 (以後 8709/B7-1)、8709/B7-2/clone 16 (以後 8709/B7-2) とし以後の実験に用いた (図 1)。また同様の実験をそれぞれ別のクローン、8709/B7-1/clone 6 (B7-1 分子の発現レベルは 8709/B7-1/clone 10 の半分)、及び 8709/B7-2/clone 7 (B7-2 分子の発現レベルは 8709/B7-2/clone 16 とほぼ同等) で行いほぼ同様の結果を得た (データ未提出)。

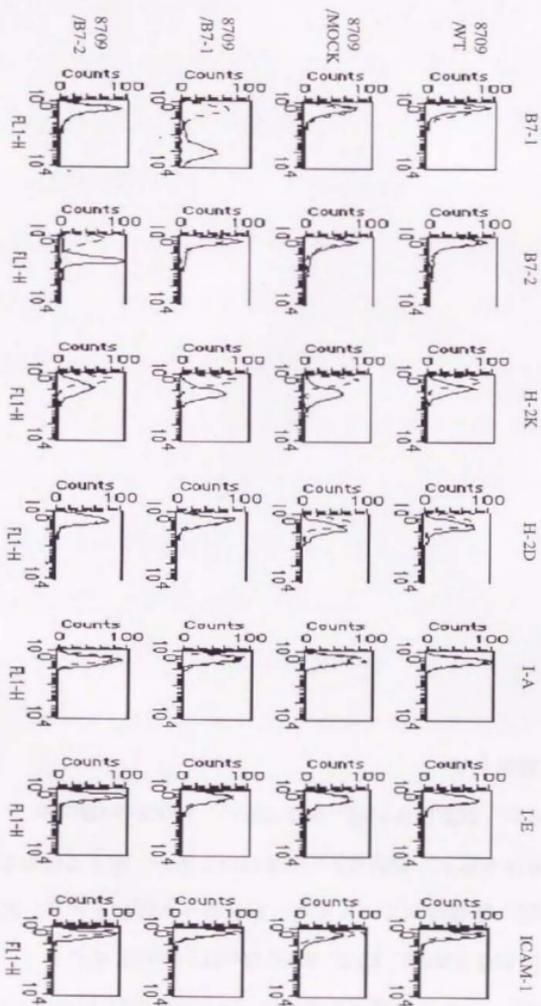


図1. 8709細胞、及びその遺伝子導入株 (8709/MOCK、8709/B7-1、8709/B7-2) におけるB7-1、B7-2、MHC class I、class II そして ICAM-1の発現。点線はアイソタイプコントロール抗体を示し、実線は調べた抗体を示す。細胞は 5×10^5 をPBSで洗い、氷上で抗体を15分反応させた。細胞はその後、PBSで洗い、FACSort (Becton Dickinson)で解析した。

2. 同系マウス (C3H マウス)に対する 8709 細胞の造腫瘍性

マウスは異なった細胞数の 8709 野生株 (8709/WT) を腹腔内接種しその生存期間について検討した。各々の C3H マウス個体集団 (5 匹以上) に 5×10^5 - 5×10^4 の 8709 細胞を接種すると多量の腹水を生じ 10 週以内に全例死亡した (図 2)。これより腫瘍生育最小量は 5×10^4 個/body と考えられた。この実験は 3 回繰り返し同様の結果を得た。死亡したマウスにおいては末梢血と骨髄に白血病細胞が浸潤しまた脾臓も著明に腫大していた。B7 導入 8709 細胞株が野生株と同様の造腫瘍性を保持していることを確認するために *in vitro* または *in vivo* における B7 導入 8709 細胞株の造腫瘍性を検討した。*In vitro* において B7 導入 8709 細胞株の細胞増殖について調べた。8709/WT、8709/MOCK、8709/B7-1、8709/B7-2 細胞を 1×10^5 個から培養し生存細胞の個数を 4 日間にわたり数えたがいずれの細胞においても細胞増殖能に差は認められなかった (図 3)。この実験は 2 回繰り返し同様の結果を得た。次に *in vivo* での造腫瘍性を検討するために Balb/c *nu/nu* ノードマウス (各々 6 匹) に B7 導入 8709 細胞株を接種した。これはノードマウスに 5×10^5 個の細胞を接種しその生存を調べた。結果は 8709/WT、8709/MOCK、8709/B7-1、8709/B7-2 細胞を接種し

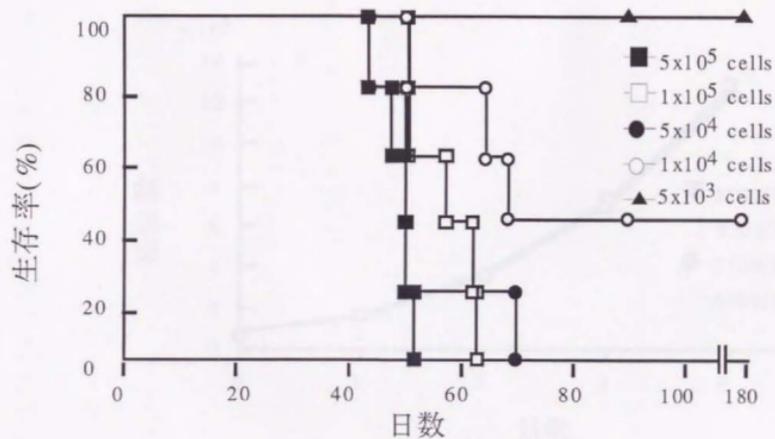


図2. 同系マウスにおける8709細胞の造腫瘍性。同系マウスであるC3Hマウスに8709細胞を 5×10^5 (■)、 1×10^5 (□)、 5×10^4 (●)、 1×10^4 (○)、 5×10^3 (▲) 個腹腔内に接種し生存の有無を観察した。

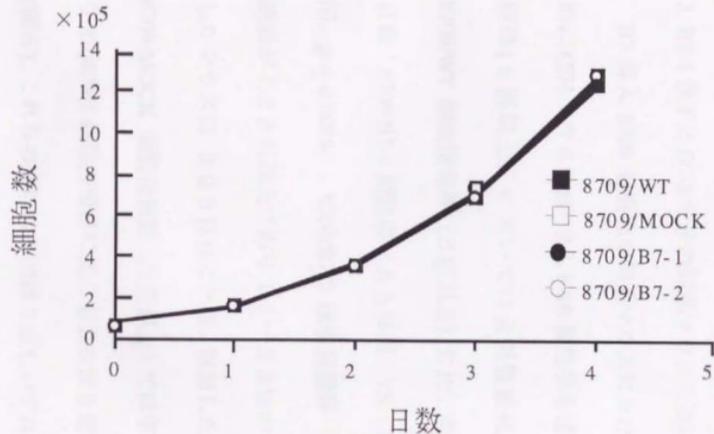


図3 .*In vitro*における8709細胞およびそのB7遺伝子導入細胞における増殖の比較。8709/WT (■)、8709/MOCK (□)、8709/B7-1 (●)、8709/B7-2 (○) 細胞は同様の増殖を示した。1 x 10⁵の細胞数から始め細胞数を4日間数えた。この実験は2度行い同様の結果を得た。

たヌードマウスの集団で生存曲線に差が無く全てのマウスは6週以内に死亡した(図4)。この実験は2回繰り返し同様の結果を得た。

3. B7-1分子とB7-2分子の同系マウスにおける抗腫瘍効果の比較

B7 導入 8709 細胞株の同系マウスにおける造腫瘍性を検討するためにC3HマウスにB7 導入 8709 細胞株を接種した。8709/B7-1 細胞接種群(5匹以上)においては全例腫瘍死したが平均生存日数は8709/WT 細胞接種群(5匹以上)に比し有意に延長した(平均生存日数:8709/B7-1 細胞群 85日間 VS. 8709/WT 細胞群 48日間、 $p = 0.0088$)。8709/B7-2 細胞接種群(5匹以上)では平均生存期間が128日以上であり17-33%のマウスが生存した。生存したマウスは300日目にと殺、解剖したが異常を認めなかった。8709/MOCK 細胞接種群(5匹以上)では平均生存期間は50日であり8709/WT 細胞接種群に比し有意な差を認めなかった($p = 0.7533$) (図5)。これらの実験は2回繰り返しいずれもほぼ同様の結果を得た。また、生存したマウスに関しては8709野生株 5×10^5 再接種を行い抗腫瘍効果が維持されているかを確認した。8709/B7-2 細胞接種マウスで生存した2例においては野生株 5×10^5 接種し86日と102日という生存期間の延長がみられた。

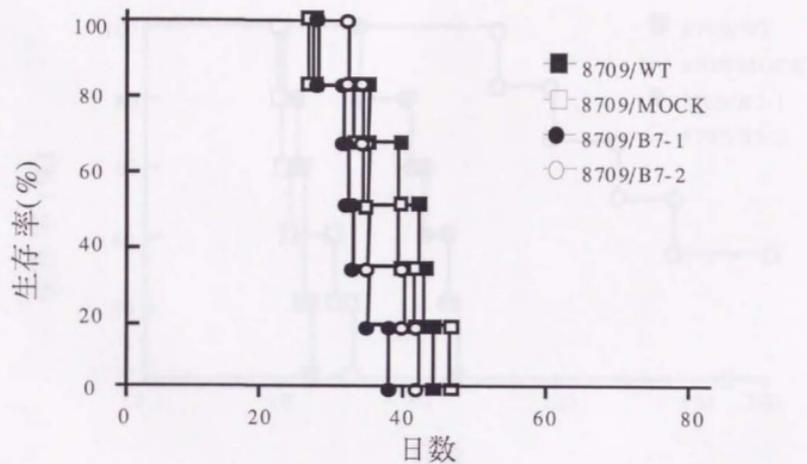


図4 .*In vivo*における造腫瘍性の検討。Balb/c nu/nuヌードマウスにおける8709細胞及びそのB7導入細胞で造腫瘍性は変わらず。各6匹のヌードマウスの集団に8709/WT (■)、8709/MOCK (□)、8709/B7-1 (●)、8709/B7-2 (○)の細胞を 5×10^5 個マウス腹腔内に接種しその生存の有無を観察した。

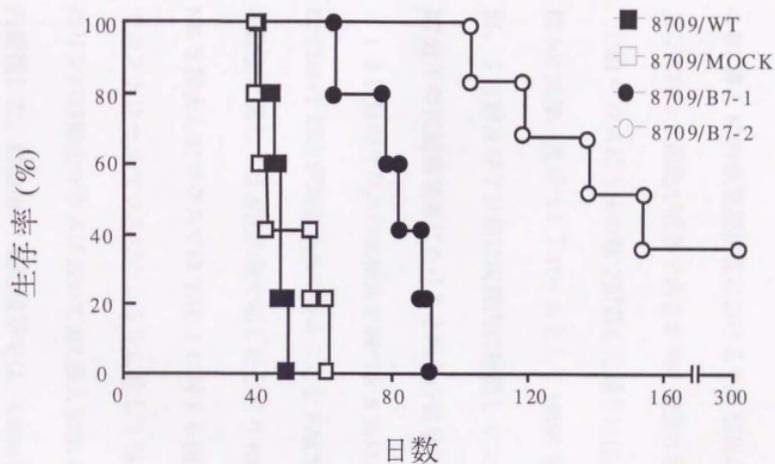


図5. B7-1分子導入8709細胞とB7-2分子導入8709細胞における抗白血病効果の差違。各々5-6匹のマウス集団に 5×10^5 個の8709/WT (■)、8709/MOCK (□)、8709/B7-1 (●)、8709/B7-2 (○)細胞を腹腔内に接種。生存期間を300日、まで観察した。この実験は2回繰り返し同様の結果を得た。

4. B7 導入 8709 細胞接種群における生存期間の延長には CD4+ T 細胞及び CD8+ T 細胞が必要であるが NK 細胞の寄与は少ない

C3H マウスに方法の章で記載した通りに抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 NK 抗体、及びコントロールとして HBSS を、腫瘍を接種する 7 日前、1 日前及び 7 日後に腹腔内に接種しリンパ球亜分画を除去して B7 分子の抗腫瘍効果におけるそれらの寄与について調べた。7 日目と 14 日目のマウスの末梢血を調べ 98% 以上の CD4+T 細胞あるいは CD8+T 細胞が除去されていることを FACS で確認した。NK 細胞の除去に関しては方法の章で示したとおり NK アッセイで評価した。NK を除去したマウスでは YAC-1 に対する細胞障害は E/T 比 50 : 1 でコントロールマウスでの 25% に比し 1% 以下であった。これらのリンパ球除去マウスにおいて B7 導入 8709 細胞を 5×10^5 個を腹腔内接種した。8709/B7-1 細胞接種では、CD4+T 細胞あるいは CD8+T 細胞を除去した群では全てのマウスは 9 週以内に腫瘍死し B7-1 分子導入による抗腫瘍効果は消失した。しかし、NK 細胞を除去した群では HBSS を接種したコントロールマウスと比較して有意差を認めず B7-1 分子導入による抗腫瘍効果は保たれた (図 6)。8709/B7-2 細胞接種においても同様の結果が得られ CD4+T 細胞あるいは CD8+T 細

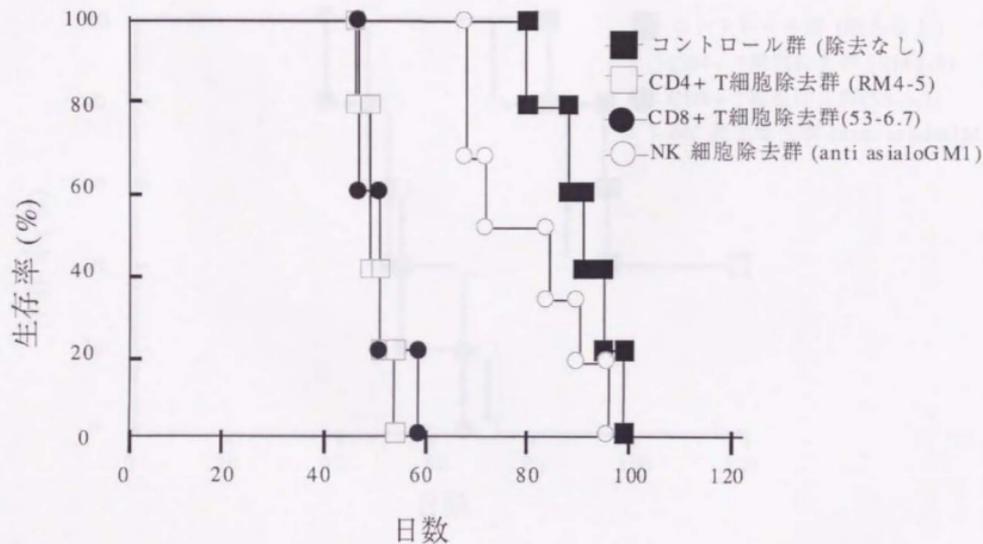


図6. 8709/B7-1細胞はCD4+ T細胞あるいはCD8+ T細胞を除いたマウス個体群では抗白血病効果は消失する。マウスはCD4+ T細胞 (□) あるいはCD8+ T細胞 (●)、NK細胞 (○) を抗体でした後、 5×10^5 個の8709/B7-1細胞を腹腔内接種した。コントロール群にも 5×10^5 個の8709/B7-1細胞を腹腔内接種した。各々5匹の集団で行った。また、同実験を繰り返し同様の結果を得た。

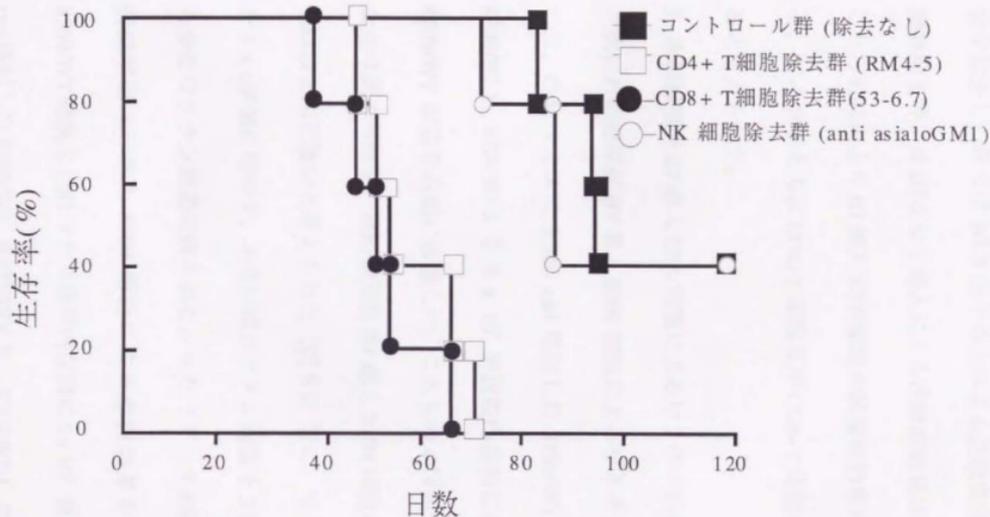


図7. 8709/B7-2細胞はCD4+ T細胞あるいはCD8+ T細胞を除いたマウス個体群では抗白血病効果は消失する。マウスはCD4+ T細胞 (□) あるいはCD8+ T細胞 (●)、NK細胞 (○) を抗体でした後、 5×10^5 個の8709/B7-2細胞を腹腔内接種した。コントロール群にも 5×10^5 個の8709/B7-2細胞を腹腔内接種した。各々5匹の集団で行った。また、同実験を繰り返し同様の結果を得た。

胞を除去した群では B7-2 分子導入による抗腫瘍効果は消失し、NK 細胞除去群では B7-2 分子導入による抗腫瘍効果は保たれた (図 7)。

これらの結果より B7 導入 8709 細胞の抗腫瘍効果の発現には B7-1 分子、B7-2 分子ともに CD4+T 細胞及び CD8+T 細胞の両方が必要であると考えられた。

5. 放射線照射 B7 導入 8709 細胞によるワクチン効果の検討

次に放射線照射 B7 導入 8709 細胞によるワクチン効果について調べた。C3H マウスに 3,500 rad 照射した 8709/WT、8709/MOCK、8709/B7-1、8709/B7-2 を 5×10^5 個腹腔内左側に接種し 10 日後に 8709/WT 細胞を右側に接種した。これらの 4 群間で生存曲線に有意な差は認められず、放射線照射 B7 導入 8709 細胞によるワクチン効果はほとんど無いと考えられた (図 8)。更に、ワクチンする細胞量を 5×10^6 個に増やす、あるいはワクチン回数を 3 回に増やしたが明らかなワクチン効果は得られなかった (データ未提出)。また、放射線照射 B7 導入 8709 細胞による治療効果を検討するために 8709/WT 細胞を C3H マウス腹腔内左側に 5×10^5 個接種した後、3,500 rad 照射した 8709/WT、8709/MOCK、8709/B7-1、8709/B7-2 を 5×10^5 個、腹腔内右側に 2 日後、8 日後、14 日後に接種したが全ての群

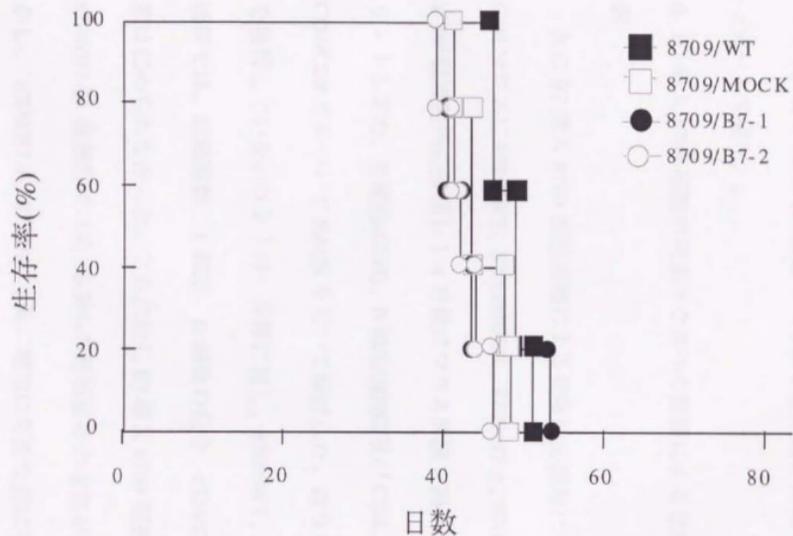


図8. B7導入8709細胞は免疫原性が無い。各々5匹の集団のマウスに 5×10^5 個の3,500rad放射線照射した8709/WT (■)、8709/MOCK (□)、8709/B7-1 (●)、8709/B7-2 (○)細胞を腹腔内接種し10日後 5×10^5 個の8709/WT細胞を接種した。この実験は2回繰り返し同様の結果を得た。

のマウスは8週以内に死亡し明らかな治療効果は確認できなかった
(データ未提出)。

6. B7 導入 8709 細胞の同系マウスへの接種による免疫反応惹起の検討

次に B7 導入 8709 細胞接種による免疫反応惹起について調べた。

C3H マウスに 8709/WT、8709/MOCK、8709/B7-1、8709/B7-2 細胞を 5×10^5 個腹腔内に接種し 14 日後にマウス脾臓を摘出し総細胞数をカウントした。T 細胞(CD3)、B 細胞(B220)及び CD4、CD8 の割合、CD4/CD8 比について FACS を用いて検討した。週令を合わせた細胞を接種していないコントロール群に対し、8709/WT、8709/MOCK 接種群では、総細胞数、T 細胞、B 細胞の割合、CD4/CD8 比に有意な差は認められなかった。これに対し B7 導入 8709 細胞 (8709/B7-1、8709/B7-2) 接種群では約 20-50%の総細胞数の増加が認められた。しかし、8709/B7-1、8709/B7-2 間に増加に有意な差はなくまた T 細胞、B 細胞の割合、CD4/CD8 比にも有意な差は認められなかった (表 1)。

	細胞数(x10 ⁷)	CD3(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4/CD8	B220(%)
control-1	2.7	22.1	16.3	6.4	2.5	39.8
control-2	3.5	22.2	16.6	7.3	2.3	41.6
8709/WT-1	2.7	20.5	15.8	7.0	2.3	43.4
8709/WT-2	2.4	17.9	14.8	5.9	2.5	39.7
8709/MOCK-1	2.3	25.5	21.2	9.6	2.2	40.1
8709/MOCK-2	3.5	20.5	16.6	8.2	2.0	39.7
8709/B7-1-1	3.6	21.8	14.4	6.7	2.1	41.2
8709/B7-1-2	4.9	21.2	14.9	7.0	2.1	42.0
8709/B7-1-1	4.2	24.3	17.2	8.6	2.0	41.1
8709/B7-2-2	4.5	21.2	16.8	7.5	2.2	48.8

表1 .B7導入8709細胞の同系マウスへの接種による免疫反応惹起の検討—C3Hマウスに 5×10^5 の8709/WT、8709/MOCK、8709/B7-1、8709/B7-2を接種し14日後に脾臓を摘出し総細胞数をカウントしCD3、CD4、CD8、B220陽性細胞をFACSで調べた。

IV. 考察

B7-1 分子と B7-2 分子のどちらがより効果的に抗腫瘍効果を誘導できるかに関してはいくつかの報告がなされており B7-1 分子の方が有効だとする報告 (Gajewski et al., 1996, Matulonis et al., 1996)が多いが B7-2 分子の方が有効だとする報告 (Martin-Fontecha et al., 1996)もあり (筆者の調べた限りこの一報のみ) 結論は得られていない。今回の研究はこの点を明らかにするとともに、将来的にヒト白血病に対する B7 分子を用いた免疫療法を臨床応用することを目的としたマウスでの基礎実験である。今回の実験では C3H マウスに放射線照射することにより誘導されたマウス骨髄性白血病細胞株 8709 細胞を用いた。結果は、B7 導入 8709 細胞を同系マウスに接種すると B7-1 分子、B7-2 分子を導入した細胞ともに野生株に比し生存期間の延長を認めた。B7 導入 8709 細胞では生存期間は延長するものの生存率が低く B7 導入 8709 細胞接種で生存したマウスに 8709 野生株を再接種することは統計的に十分な数を行うことはできなかった。しかし 8709/B7-2 細胞接種マウスで生存した 2 例においては野生株 5×10^5 接種し 86 日と 102 日という生存期間の延長がみられた。通常同系マウスに野生株 5×10^5 接種すると 60 日以内に全例死亡すること

が観察されており例数が2例と少なく統計的な評価には耐えないが、B7 導入 8709 細胞に対し実際に免疫反応が起こっている可能性の一つとして考えられた。今回の系に関しては、生存期間の延長及び生存率の上昇の点で B7-1 分子より B7-2 分子の方が抗腫瘍効果が優位である可能性が考えられた。B7 分子は CD28 レセプターを介して T 細胞を活性化させるが、逆に CTLA-4 レセプターを介して活性化 T 細胞を抑制する作用がある (Krummel et al., 1995)。その親和力は CTLA-4 分子の方が CD28 分子に比し高いため今回用いた 8709/B7-1 細胞および 8709/B7-2 細胞のそれぞれのクローンにおける B7 分子の発現レベルが異なるために起きた可能性も残る。しかし本実験では B7-1 分子の発現が図 1 での 8709/B7-1 細胞での B7-1 分子発現量の半分の発現量のクローン (8709/B7-1/clone F6) でも同様の結果を得ており B7 分子の発現量の本結果にあたる影響は少ないと考えている。また他の影響によるクローンの差で生存期間、生存率などの得られた結果が異なる可能性もあるが *in vitro* における 8709 細胞及びその B7 遺伝子導入細胞において増殖を比較しその結果 *in vitro* 増殖ではクローン間に有意な差は認められなかった。また、ヌードマウスを用いた 8709 細胞及びその B7 遺伝子導入細胞接種によるマ

ウスの生存期間に有意な差は認められなかった。これらの結果よりクローンの差が生存期間、生存率に与えた影響は少ないと思われる。勿論クローン間の差の結果への影響は否定できない。

8709 細胞の免疫原性は野生株を放射線照射して免疫してもワクチン効果が得られなかったことから非常に弱いと考えられた。Martin-Fontecha ら (1996)は、免疫原性の弱い TS/A アデノカルシノーマ細胞株、あるいは B16.F1 メラノーマの細胞株に B7-1 分子あるいは B7-2 分子を導入しその抗腫瘍効果を比較しておりいずれの場合も B7-2 分子を導入した腫瘍株の方が抗腫瘍効果が大きくその原因として免疫原性が弱い場合には B7-1 分子よりも B7-2 分子の方が効率よく抗腫瘍免疫が誘導できるのではないかと予想している。今回の筆者の結果もこの予想に沿うものであり少なくとも免疫原性が弱い場合には B7-2 分子の方が B7-1 分子に比し抗腫瘍免疫を効果的に誘導できる場合があると考えられた。この機序に関しては不明であるが可能性としては B7-2 分子の方が B7-1 分子より CTL を誘導する効率が高いこと、CTL を誘導する効率はほぼ同じだが、誘導される CTL の性質 (サイトカイン産生、細胞障害活性など) が異なることなどが予想される。Kuchroo ら (1995)や Lenschow ら (1995) は B7-1 分

子と B7-2 分子では、ヘルパー T 細胞のうちの Th1 細胞と Th2 細胞の誘導のされかたが異なることを報告しており (B7-2 分子は Th2 細胞を有意に誘導する) 興味深い。また、Eck ら (1997) は B7-1 分子は CD28 レセプターの発現を下げるが B7-2 分子はその効果は弱いことを報告している。したがって、免疫遺伝子治療を臨床応用する上で B7-1 分子と B7-2 分子で抗腫瘍効果の得られ方が異なる場合があり、どちらを用いるかは腫瘍の種類、あるいは個々のケースで変わる可能性があり今後の課題である。

次に筆者は B7 導入 8709 細胞により誘導された抗腫瘍効果に寄与するリンパ球亜分画を調べた。結論で述べたように、B7-1 あるいは B7-2 分子導入による抗腫瘍効果発現には CD4+T 細胞と CD8+T 細胞の両方が必要であると考えられた。一般的には、B7 導入腫瘍細胞の抗腫瘍効果の発現には CD8+T 細胞が重要であるという報告が多いが (Chen et al., 1992, Townsend et al., 1993)、CD4+T 細胞と CD8+T 細胞の両方が必要となる系も報告されている (Li et al., 1994, Baskar et al., 1995)。8709 細胞に関しては class I 分子 (H-2K^b) を発現しているが、class II 分子 (I-A^b/I-E^b) は発現していないので、CD8+T 細胞は腫瘍細胞上の class I に提示された腫瘍抗原は直接認識できるが、CD4+T 細

胞は直接は活性化できないと考えられる。CD4+T 細胞が活性化される機序としては 8709 細胞から放出された腫瘍抗原を抗原提示細胞が取り込みペプチドに処理してこれを class II で提示することにより腫瘍特異的 T 細胞が誘導され活性化されている可能性がある。Huang ら (1996) は、B7 分子が導入された腫瘍細胞の抗腫瘍効果はある程度は腫瘍抗原を直接 CD8+T 細胞に提示することにより誘導されるが、主な機序は宿主の抗原提示細胞によって腫瘍抗原が取り込まれ提示されることにより CTL が誘導されていることを報告している。筆者は、免疫原性が非常に弱い場合は B7 導入腫瘍細胞の抗腫瘍効果発現には CD4+T 細胞と CD8+T 細胞の両方が必要である場合が多いと予想している。マウス NK 細胞は CD28 分子を発現しており B7 分子によって活性化され得るため抗腫瘍免疫に主要な役割を果たす場合がある (Geldhof et al., 1995, Chambers et al., 1996, Tzyy-Chou et al., 1995)。しかし筆者の系においては、マウスの *in vivo* 除去実験の結果から NK 細胞は抗腫瘍効果において重要な働きをしていないと考えられた。これには、MHC class I の発現レベルや 8709 細胞の NK 細胞感受性に寄るところが大きいのではないかと推察される。

放射線照射 B7 導入腫瘍細胞がワクチン効果あるいは治療効果を

誘導できるか否かに関しては、不明な点が多い。Matulonis ら (1995) はマウス骨髓球系細胞である 32D 細胞に p210^{bcr/abl} を発現させ白血病細胞としこれに B7-1 遺伝子を導入した系において放射線照射した B7 導入 32Dp210 細胞を多数回マウスに接種したがワクチン効果を誘導できなかつたと報告している。彼らは、また照射していない B7 導入 32Dp210 細胞を単回投与することによりワクチン効果が得られたことを併せて報告している。これに対し放射線照射 B7 導入腫瘍細胞がワクチン効果あるいは治療効果を誘導できるという報告は多数なされている。マウス白血病細胞の系に限っても、Dunussi-Joannopoulis ら (1996) の報告がありまた、筆者らも免疫原性の弱いマウス骨髓性白血病細胞である M1 細胞に B7-1 分子を導入することによりワクチン効果及び治療効果を観察している (Hirano et al., 1996)。今回の筆者の実験系においてはいくつかの条件検討を行ったが、放射線照射した B7-1 あるいは B7-2 導入 8709 細胞でワクチン効果及び治療効果を誘導することはできなかった。これは免疫原性が弱い細胞であることが大きな要因であると考えられるが一方で、M1 の様に免疫原性が弱くても効率よくワクチン効果及び治療効果を誘導する場合もあり、B7 分子以外にどのような分子がこれらを規定しているかは B7

分子を利用した癌免疫療法の臨床応用を行う適応を考える上で重要な問題であり今後の研究課題である。M1細胞はICAM-1分子を発現しており8709細胞はICAM-1分子を発現していないため、8709細胞にB7分子（B7-1あるいはB7-2分子）とICAM-1分子を共発現させた細胞でワクチン効果を現在調べているがワクチン効果ははなさない（データ未提出）。しかしこのことは必ずしもB7導入8709細胞ではワクチン効果を誘導できないと結論するものでなく今後も多種の条件検討をしより解析を深めたいと考えている。B7-1分子とIL-2、IL-12などとの組み合わせで抗腫瘍効果の増強が報告されておりこれらサイトカインや他の免疫関連分子との組み合わせも重要である。

今回の系においてはB7導入による免疫反応が8709細胞接種マウスにおいて起きていることの根拠は弱い（CD4+あるいはCD8+T細胞の除去による生存期間延長効果の消失は認められるが）。このためB7導入8709細胞を同系マウスに接種し2週後にその脾臓を解析し免疫反応の動きがみられるかを検討した。結果は腫瘍細胞を接種していない同週令のコントロール群に比し8709/WT、8709/MOCK接種群で何れも有意差を認めず、8709/B7-1、8709/B7-2接種群では脾

臓の総細胞数が20-50%増加が認められた。しかしT細胞、B細胞の割合及びCD4/CD8比に関してはB7-1、B7-2何れの群もコントロール群に比し有意な差は認められなかった。従ってB7導入細胞をマウスに接種すると特異的あるいは非特異的な免疫反応（あるいは炎症反応）がおこり脾細胞数が増加することがわかったがT細胞、B細胞あるいはCD4/CD8比などに変化をみるまでは至らず、またB7-1、B7-2間に明らかな差を見出すことはできなかった。

結論として我々は、ある条件下においてはB7-2分子の方がB7-1分子より効果的に抗腫瘍効果を誘導できる可能性を示した。そしてこの場合、CD4+T細胞、CD8+T細胞の両方が関与することを明らかにした。しかし、B7導入腫瘍細胞でワクチン効果、治療効果は誘導できなかった。これは、条件によっては誘導できる可能性はあると思われる。幸い、筆者らの検討によりヒト白血病細胞においてはclass I、class IIの発現が高い場合が多く、またICAM-1分子もしばしば発現していることがわかっている（Hirano et al., 1996）。従ってヒト白血病細胞においては適当な腫瘍抗原が出ていさえすれば免疫原性がありヒト白血病におけるB7分子を用いた免疫遺伝子療法は、有効である可能性があると思われる。将来的にB7分子を用いた免疫遺伝子

治療が行われていくに際し、筆者が今回明らかにした B7-1、B7-2 分子の差違および B7 分子のみでの免疫遺伝子治療の限界の研究が役に立ち、これらの分子が適当な条件で臨床応用されていくことが望まれる。

V. 謝辞

本研究の遂行にあたりまして御指導と御鞭撻くださいました東京大学医学部第三内科矢崎義雄教授に心から感謝いたします。

本研究の共同研究者、かつ助言者でもある東京大学無菌治療部平井久丸助教授に心から感謝いたします。

本研究の共同研究者である東京大学第三内科血液グループの平野直人氏、高橋宗春氏、千葉滋氏に心から感謝いたします。

マウス B7-2cDNA をいただきました国立小児病院の東みゆき氏、適切なアドバイスをいただきました順天堂大学医学部免疫学教室八木田秀雄助教授に心から感謝いたします。

8709 細胞をいただきました放射線医学総合医学研究所の吉田和子氏に心から感謝いたします。

東京大学医学部第三内科血液グループの皆様に感謝いたします。

VI. 文献

AZUMA, M., ITO, D., YAGITA, H., OKUMURA, K., PHILLIP, JH., LANIER, LL., and SOMOZA, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* **366**, 76-9.

BASKAR, S., GLIMCHER, L., NABAVI, N., JONES, RT., and OSTRAND-ROSENBERG, S. (1995). Majorhistocompatibility complex classII+B7-1+ tumor cells are potent vaccines for stimulating tumor rejection in tumor bearing mice. *Journal of Experimental Medicine* **181**, 619-629.

CAVALLO, F., MARTIN-FONTECHA, A., BELLONE, M., HELTAI, S., GATTI, E., TORNAGHI, P., FRESCHI, M., FORNI, G., DELLABONA, P., and CASORATI, G. (1995). Co-expression of B7-1 and ICAM-1 on tumors is required for rejection and the establishment of a memory response. *European Journal of Immunology* **25**, 1154-62.

CHAMBERS, BJ., SALCED, M., and LJUNGGREN, HG. (1996). Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity* **5**, 311-317.

CHEN, L., MCGOWAN, P., ASHE, S., JOHNSTON, J., Li, Y., HELLSTROM, I., and HELLSTROM, K. E. (1994). Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine* **179**, 523-32.

CHEN, L., ASHE, S, BRADY, W.A., HELLSTROM, I., HELLSTROM, K.E., LEDBETTER, J.A., MCGOWAN, P., and LINSLEY, P.S. (1992).

Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* **71**, 1093-102.

DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K., WEINSTEIN, H.J., NICKERSON, P.W., STROM, T.B., BURAKOFF, S.J., CROOP, J.M., and ARCECI, R.J. (1996). Irradiated B7-1 transduced primary acute myelogenous leukemia (AML) cells can be used as therapeutic vaccines in murine AML. *Blood* **87**, 2938-46.

ECK, SC., CHANG, D., WELLS, AD., and TURKA, LA. (1997). Differential down-regulation of CD28 by B7-1 and B7-2 engagement. *Transplantation* **64**, 1497-9.

FREEMAN, G.J., FEEDMAN, A.S., SEGIL, J.M., LEE, G., WHITMAN, J.F., and NADLER L.M. (1989). B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *Journal of Immunology* **143**, 2714-22.

GAJEWSKI, T.F. (1996). B7-1 but not B7-2 efficiently costimulates CD8+ T lymphocytes in the P815 tumor system in vitro. *Journal of Immunology* **156**, 465-72.

HABU, S., FUKUI, H., SHIMAMURA K., KASAI M., NAGAI Y., OKUMURA K., and TAMAOKI N. (1981) In vivo effects of anti-asialo GMI. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *Journal of Immunology*. **127**,34-8.

GELDHOF, AB., RAES, G., BAKKUS, M., DEVOS, S., THIELEMANS, K., and DE BAETSELIER, P. (1995). Expression of B7-1 by highly

metastatic mouse T lymphomas induces optimal natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Research* **55**, 2730-2733.

HIRANO, N., TAKAHASHI, T., TAKAHASHI, T., OHTAKE, S., HIRASHIMA, K., EMI, N., SAITO, K., HIRANO, M., SHINOHARA, K., TAKEUTI, M., TAKEDAZU, F., TSUNODA, S., OGURA, M., OMINE, M., SAITO, T., YAZAKI, Y., UEDA, R., and HIRAI H. (1996). Expression of costimulatory molecules in human leukemias. *Leukemia* **10**, 1168-76.

HIRANO, N., TAKAHASHI, T., TAKAHASHI, T., AZUMA, M., YAZAKI, Y., YAGITA, H., and HIRAI, H. (1997). Protective and therapeutic immunity against leukemia induced by irradiated B7-1 (CD80)-transduced leukemic cells. *HUMAN GENE THERAPY* **8**, 1375-1384.

HUANG, AY., BRUCE, AT., PARDOLL, DM., and LEVITSKY, HI. (1996). Does B7-1 expression confer antigen-presenting cell capacity to tumors in vivo? *Journal of Experimental Medicine* **183**, 769-76.

JUNE, CH, BLUESTONE, JA., and NADLER, LM. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunological Today* **15**, 321-331

KUCHROO, VK., DAS, MP., BROWN, JA., RANGER, AM., ZAMVIL, SS., SOBEL, RA., WEINER, HL., NABAVI, N., and GRIMCHER, LH. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707-718.

KRUMMEL, MF., and ALLISON, JP. (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 459-465

LENSCHOW, DJ., HO, SC., SATTAR, H., RHEE, L., GRAY, G., NABAVI, N., HEROLD, KC., and BLUESTONE, JA. (1995) Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Journal of Experimental Medicine*. **181**(3), 1145-55.

LI, Y., MCGOWAN, P., HELLSTROM, I., HELLSTROM, K.E., and CHEN, L. (1994). Costimulation of tumor-reactive CD4+ and CD8+ T lymphocytes by B7, a natural ligand for CD28, can be used to treat established mouse melanoma. *Journal of Immunology* **153**, 421-8.

MARTIN-FONTECHA, A., CAVALLO, F., BELLONE, M., HELTAI, S., IEZZI, G., TORNAGHI, P., NABAVI, N., FORINI, G., DELLABONA, P., and CASORATI, G. (1996). Heterogeneous effects of B7-1 and B7-2 in the induction of both protective and therapeutic anti-tumor immunity against different mouse tumors. *European Journal of Immunology* **26**, 1851-1859.

MATULONIS, U. A., DOSIOU, C., LAMONT, C., FREEMAN, G. J., MAUCH, P., NADLER, L. M., and GRIFFIN, J. D. (1995). Role of B7-1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells. *Blood* **85**, 2507-15.

MATULONIS, U., DOSIOU, C., FREEMAN, G., LAMONT, C., MAUCH, P., NADLER, L. M., and GRIFFIN, J. D. (1996). B7-1 is superior to B7-

2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct. *Journal of Immunology* **156**, 1126-31.

MUELLER, D. L., JENKINS, M. K., and SCHWARTZ, R. H. (1989). Clonal expansion vs. functional clonal inactivation: a costimulatory pathway determines the outcome of T cell receptor occupancy. *Annual Review of Immunology*. **7**, 445-480.

MULLER, A.J., YOUNG, J.C., PENDERGAST, A.M., PONDEL, M., LANDAU, N.R., LITTMAN, D.R., and WITTE, O.N. (1991). BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Molecular & Cellular Biology* **11**, 1785-92.

SCHWARTZ, R. H. (1989). Acquisition of immunological self-tolerance. *Cell* **57**, 1073-1081.

THOMPSON, C.B. (1995). Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation?. [Review] [23 refs]. *Cell* **81**, 979-82.

TOWNSEND, S.E., and ALLISON, J.P. (1993). Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells [see comments]. *Comment in: Science* 1993 Jan 15;259(5093):310-1. *Science* **259**, 368-70.

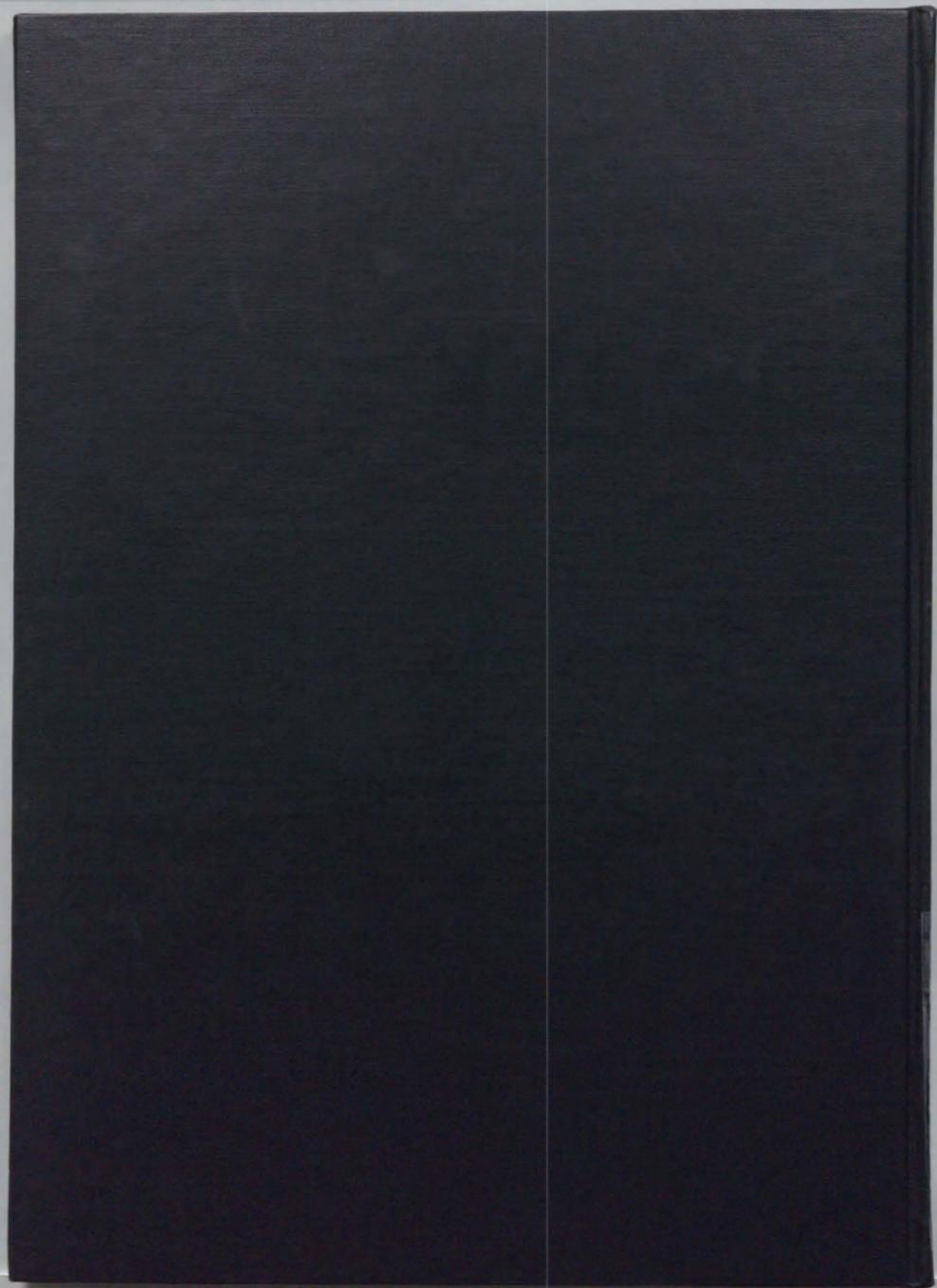
TZYY-CHOU, WU., ALEX, Y.C.HUANG., ELIZABETH, M. JAFFEE., HYAM, I. LEVITSKY., DREW, M. PARDOLL. (1995). A reassessment of

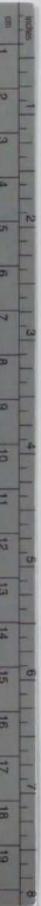
the role of B7-1 expression in tumor rejection. *Journal of Experimental Medicine*. **182**, 1415-1421

YANG, G., HELLSTROM, K. E., HELLSTROM, I., and CHEN, L. (1995). Antitumor immunity elicited by tumor cells transfected with B7-2, a second ligand for CD28/CTLA-4 costimulatory molecules. *Journal of Immunology* **154**, 2794-800.

YOKOCHI, T., HOLLY, R. D., and CLARK, E. A. (1982). B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphoma. *Journal of Immunology*. **128**, 823-827.

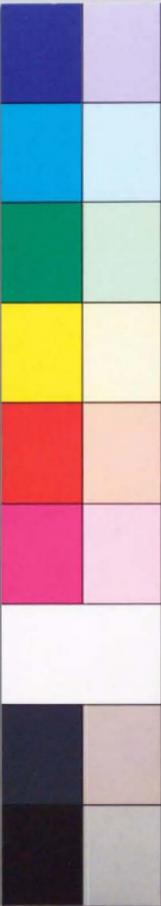
YOSHIDA, K., NEMOTO, K., NISHIMURA, M., and SEKI, M. (1993). Exacerbating Factors of Radiation-induced Myeloid Leukemogenesis. *Leukemia Research* **17**, 437-440.





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak