

## 15. 樹状細胞をアジュバントとして利用する粘膜ワクチンの有用性

研究協力者：堤 玲子

感染症に対するパーソナルワクチンとして、強力な抗原提示能を持つ樹状細胞を利用することは、腫瘍に対する免疫療法とともに臨床への応用、効果が期待される分野である。特に遺伝的変異の多いウイルス感染症、種類の多い細菌外毒素あるいはバイオフィルムによって抗原性が特定できなくなる難治性細菌感染症などについては、特定抗原の遺伝子導入による療法よりは、多彩な抗原とその提示が可能な樹状細胞を利用することの価値が高い。樹状細胞の性質は誘導条件によっては様々であることが明らかにされつつあるので、今後は、目的にあった細胞を利用することが肝要であると考えられる。

### <研究目的>

近年、鼻腔や口腔粘膜経由の免疫誘導が血管、皮下、筋肉などの組織経由のそれとは別の経路で行われていることが明らかになりその機構が着目されている。粘膜は、ワクチンとしての異物を投与する経路として侵襲が少ない利点がある一方、免疫誘起のためにはコレラトキシンなどのアジュバントが必要であるといわれている。そこで、本研究では、抗原提示を効率良く行うために樹状細胞を利用することが可能であるかを検討する。

### <材料と方法>

樹状細胞の誘導：C57BL マウスの骨髓細胞を 100ng/ml の GM-CSF 存在下で 10 日間培養し、形態的に特徴のある Class-II を強く発現している樹状細胞を得た。樹状細胞の比率が高いので以後の実験には得られた

細胞をそのまま使用することが可能である。

抗原提示：得られた樹状細胞にあらかじめ  $\beta$ -プロピオラクトンで不活化したコクサッキーウイルス CB3 溶液を加え 12 時間培養を続ける。その後、希釈により GM-CSF 濃度を下げさらに 36 時間培養し成熟化を行う。得られた細胞が抗原提示能を充分もっていることは、あらかじめ CB3 を免疫した C57BL マウスの脾臓細胞と培養すると試験管内でリンパ球の芽球化ならびに増殖反応がおこることで確認した。

ワクチン投与：抗原提示している樹状細胞を洗浄したのち、C57BL マウスに経口、経鼻、皮下、筋肉、静脈、腹腔に投与して、その後生ウイルスによる感染実験を行い抵抗性を観察した。

樹状細胞の体内分布：蛍光色素を貪食させた樹状細胞を経鼻接種し、細胞の体内臓器への移行を観察した。

<結果>

骨髓細胞の培養開始時濃度を  $2 \times 10^5$ /ml 程度に低くすると樹状細胞の収率が上昇した (Table 1)。得られた樹状細胞は、抗原であるウイルス感染細胞磨砕液と培養し成熟させると抗原提示能の指標である MHC-II の発現量が著しく増加することを FACS スキャンヒストグラムで確認した (Fig.1)。免疫マウスの脾臓細胞の活性化能の確認は [ $^3$ H] チミジンの取り込みで確認

した (Fig.2)。マウスに種々の経路で樹状細胞をワクチンとして投与し、さらに追加免疫として、パラホルムアルデヒド固定した樹状細胞を用いるなどした結果、感染防御が可能であった。鼻腔粘膜に投与した樹状細胞は 36 時間ではまだ鼻腔に残っていることがわかった。培養条件によって、より組織内への進入能力の高い樹状細胞がえられる可能性がある。感染防御マウスの免疫能が血中抗体によるのか傷害性 T 細胞などの関与が大きいかなど検討中である。

Table 1 Effect of initial cell concentration on the recovery of dendritic cells

Initial bone marrow cells		Final
Cells/ml	Total cells/10ml	recovered cells
$2 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$4.4 \times 10^6$
$5 \times 10^5$	$5 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$
$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1.3 \times 10^6$

Total bone marrow cells were incubated in RPMI1640-10 supplemented with 100ng/ml GM-CSF for 12 days according to the procedure reported by Manfred B. Lutz et al.( J.Immunol. Meth. 223.(1999)77-92).

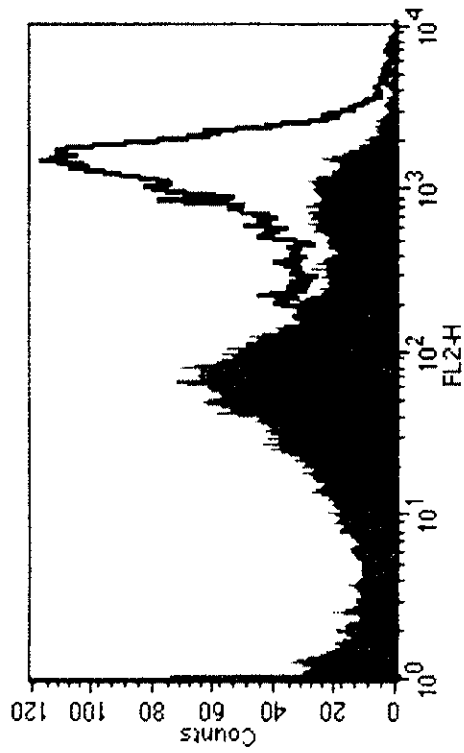


Fig. 1 Maturation of bone marrow derived dendritic cells. At day 10, dendritic cells were pulsed with Inactivated CB3 infected C57BL/ fibroblast lysate for 12h and cultured for another 36 h under lower concentration of GM-CSF (20ng/ml). Cells were stained with PE labelled anti I-a . Gray area , day 10 cell; solid line, day 12cells.

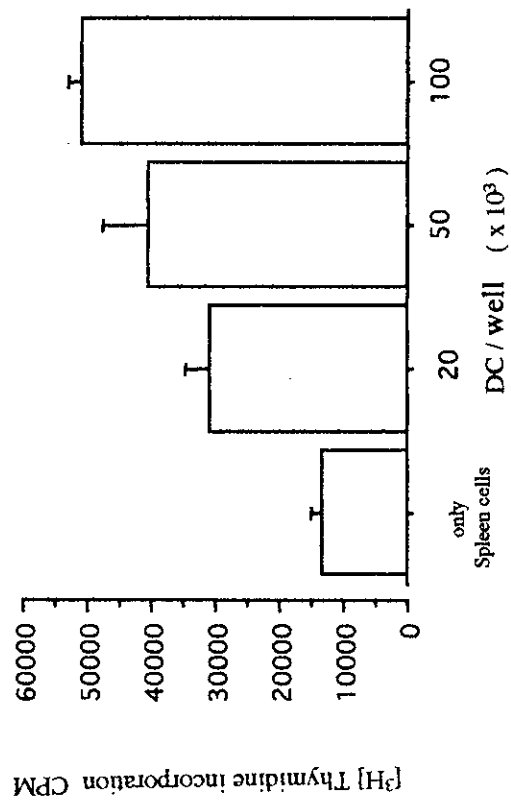


Fig. 2 Stimulation of allogenic spleen cell proliferation by bone marrow derived dendritic cells. Bone marrow derived dendritic cells were pulsed with inactivated CB3 at day 10, and fixed with 1% paraformaldehyde solution and cocultured with  $5 \times 10^5$  spleen cells of C57BL mouse immunized with CB3. After 3 days [<sup>3</sup>H] thymidine was added and incubated for another 16 h.

## 16. 腸管出血性大腸菌に対する腸管免疫の研究

### -Dendritic cell を用いた感染症、および抗腫瘍ワクチンの研究-

研究協力者：柏葉 匡寛<sup>1)2)</sup>、寺島 雅典<sup>1)</sup>、斎藤 和好<sup>1)</sup>

堤 玲子<sup>2)</sup> (岩手医科大学 1)第1外科、2)細菌学)

樹状細胞は感染、腫瘍に対する効率的なT cellの樹立および液性免疫の誘導において臨床への応用、効果が期待されている。我々は患者および健常者の末梢血からcytokine下に樹状細胞を樹立し、形態学的確認に加え、期待されるco-stimulatory factorの強発現を含む膜表面マーカーを検出し、正常の分化・誘導を確認した。さらに新たな抗原導入・提示法として、electroporationによる遺伝子導入を試みたが同法での導入効率は低く(<0.1%)、更なる検討が必要であった。一方、樹状細胞に期待される免疫誘導能で主たる役割を果たすと思われるcytotoxic T lymphocyte(CTL)の誘導に関しては、胃癌患者の腹水中癌細胞のcell lysateでpulseした樹状細胞とPBMCとの共培養にて1例誘導に成功した。今後、末梢血誘導樹状細胞への種々の抗原導入方法の検討と、細菌抽出成分、不活化ウイルスによる抗感染CTLの誘導、あるいは血清中IgGの誘導の検討が予定される。

#### <研究目的>

樹状細胞はその強力な抗原提示能から、効率的なT cellの樹立および液性免疫の誘導においても効果が期待されており、感染、腫瘍に対する治療への応用に期待が高まっている<sup>1),2)</sup>。現在までに、HIVをはじめとするウイルス感染、あるいはcell lysate、peptide、virus、fusion cellを用いた腫瘍関連抗原の強制発現により、様々なin vitro、in vivoでの効果が誘導され報告されている<sup>3),4),5)</sup>。我々は樹状細胞に不活化した細菌・ウイルス、あるいは腫瘍細胞溶解液によるin vitroでの特異的T cellの誘導と治験レベルへの発展を目的とした。技術面では樹状細胞を用いたfusion cellの作成に成功、抗腫瘍効果の誘導に成功した米国 Harvard Medical School, Dana-Farber Cancer Institute, Department of Cancer Pharmacology と collaborationを進め、効率的な実験を可能とした<sup>6)</sup>。今回、現在までに我々が得た結果・見識と、予想される展開について中間報告としてまとめた。

#### <材料と方法>

**樹状細胞の誘導：** 健常者および担癌者からヘパリン添加で25mLの末梢血を採取し、Ficollによる比重遠心にてPBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell) を分離した。樹状細胞はこれらを洗浄後、5%AB serum RPMI 6 mLにてsuspendして、6well plateの3 wellに分注し、37℃で2時間培養した。培養液中の浮遊細胞を除去した後、接着細胞を各2mLのGM-CSF,IL-4,TNF $\alpha$ 添加5%AB serum RPMIにて5-7日間培養し、樹状細胞とした。

**形態・表現型の検索：** 培養した樹状細胞倒立位相差顕微鏡にて樹状細胞特異的な形態を観察した。さらに洗浄後、5-10x10<sup>6</sup>の細胞に対し、2-10 $\mu$ Lの各種FITC結合抗体を添加し、氷上にて30分染色し、洗浄後flow cytometerにてHLA-class I, DR, CD40,54,80,86の発現を検討した。また、スライドグラス上にcytospinで付着させた細胞を、酵素抗体法を用いて抗HLA-DR抗体にて染色し、発現と形態を観察した。

### 腫瘍細胞溶解液による樹状細胞の

pulsing : 抗原への被曝、取込み前後でのDCの表現型の変化を検索する目的で、 $< 1 \times 10^7$ の樹状細胞に対し、腫瘍細胞 $0.5-1 \times 10^6$ を低浸透圧法にて抗原抽出し細胞溶解液を $200 \mu\text{L}$ に調整し、一昼夜共培養し、洗浄後PBSにて調整後、flow cytometerにてpulse前後の発現型の変化について検討した。

In vitro でのCTLの誘導: 培養後の樹状細胞を、接着細胞を除去したPBMC(T cell rich population)と1:20の比にて24-well plateで2 mLの培養液で共培養した。開始後24時間に $200 \text{IU}$ のヒトIL-2を加え、さらに5-7日間培養した。途中培養液が黄色に変化した場合、1 mLの培養液をIL-2  $50 \text{IU/mL}$ の新鮮培養液と交換した。これらの共培養を2-3回繰り返しT cellの誘導を試みた。経過中にT cellの著明な減少、あるいはCTL assayにて多量の細胞数が必要な場合は、 $1-5 \times 10^5$ 個のT cellに対しmitomycin  $60 \text{ng/mL}$ にて処理した $2.5 \times 10^7$  autologous PBMCと $5 \times 10^6$  allogenic PBMCを $30 \text{ng/mL}$ の抗CD3モノクローナル抗体(OKT3)の存在下で一昼夜共培養した。その後 $200 \text{IU}$ のヒトIL-2を加え、さらに7-14日間培養した。途中培養液が黄色に変化した場合、1 mLの培養液をIL-2  $50 \text{IU/mL}$ の新鮮培養液と交換した。増殖したT cellをFicoll比重遠心にて分離し、洗浄後effector cellとしてCTL活性を検出した。

### 腫瘍細胞に対する CTL (Cytotoxic T

Lymphocyte) assay : 培養後増殖したT cellを洗浄後target cellとした採取した癌患者の胸水、腹水をヘパリン添加して採取、2層Ficoll比重遠心分離して、リンパ球と腫瘍細胞を分離した。これを1時間 $^{51}\text{Cr}$ にてlabelingして、洗浄後target cellとしてCTLとeffector:target比で20:1,10:1,5:1の割合で、4時間共培養して、上清中への $^{51}\text{Cr}$ の放出をガンマカウンターで検出した。コントロールとしてPBMCを同数でeffector cellとした。

### 樹状細胞に対する遺伝子導入の試み: 抗

原提示の新たな可能性を検討する為、樹状細胞に対しelectroporationにてplasmidに組み込んだreporter geneをtransfectionし、その発現をみた。遺伝子導入方法としては、non-viralであることがその安全性、使用認可の問題から現実的と考えられた為、green fluorescence protein (GFP)を組み込んだpE2GFPというplasmidを作成し、この蛋白の発現にて導入効率を検討した。pE2GFP vectorはhuman elongation factor 1a promoterを含むpEBB vectorにClonetech社のpEGFP vectorのcDNAを組み込み、Qiagen社のカラムで精製した。electroporationはBTM社のElectroSquarePoratorT820を用いて、幾つか条件の設定し、効率の最良化を試みた。遺伝子導入の効率は蛍光顕微鏡にてGFPからの緑色の蛍光の発現にて判定した。

### <結果>

#### 樹状細胞の誘導と表現型の検索:

25 mLの末梢血から $3-5 \times 10^7$ のPBMCが得られ、さらに5-7日間の培養で $5-1 \times 10^6$ の樹状細胞の誘導が可能だった。形態は突起を有する浮遊細胞で、約半数が10個前後のclusterを形成し増殖していた(図1)。cytospineにてスライドグラス上に貼り付け、抗HLA-DR抗体にて免疫染色したところ、半数以上の細胞にAECによる赤色の陽性像が細胞膜上にみられ、一部では典型的な樹上の突起が染色された(図2)。さらに、FACSでの検索では、HLA-class I強陽性, DR半数が陽性, CD40半数が陽性, 54強陽性, 80強陽性, 86弱陽性であった(図3)。

### 腫瘍細胞溶解液による樹状細胞の

pulsing : 樹状細胞のpulse前後の表現型の変化をFACSにて検討したが、大きな変化はみられず、costimulatory factorの発現低下はみられなかった(結果は提示せず)。

**In vitro**でのCTLの誘導：樹状細胞のpulse後に、接着細胞を除去したPBMC(T cell rich population)を24-well plateで5-6日間培養した。形態的には、培養開始時T cellが一時的に増大し、Day 2-3で縮小化した。経過中Day 1に200IU/mL, Day 5,8にIL-2 50IU/mLを追加投与した。Day 5付近までT cellが僅かに漸減するが、以降はCTL誘導可能症例では著明な細胞数の減少はみられなかった。CTL assayの為に1x10E6以下の細胞数の場合は、mitomycin 60ng/mLにて処理した2.5x10E7 autologous PBMCと5x10E6 allogenic PBMCを30ng/mLの抗CD3モノクローナル抗体(OKT3)の存在下で一昼夜共培養し、Day 1に200IU/mL, Day 5,8にIL-2 50IU/mLを追加投与し増殖を試みたところ、平均して2x10E5から1-5x10E6、約5倍のT cellが得られた(結果は提示せず)。

**腫瘍細胞に対する CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) assay**：樹状細胞のT cell刺激・分化誘導能の検討の為、のべ5例の患者(乳癌胸水症例2例、胃癌1例)で、CTLの誘導が行われ、3例の患者でCTL cloneの誘導に成功した。症例1(胃癌腹水1例)では、腹水の再採取にて十分な癌細胞が回収可能で、effector:target比20:1にて21.1%の細胞殺傷性が認められた。症例2(乳癌胸水1例)では、抗癌剤投与後2週間後の為、十分量の癌細胞が胸水から採取困難で、殆どがリンパ球であった。これに対して同様の比で樹立したCTLを共培養したところ、細胞殺傷性はみられなかった。症例3の乳癌胸水1症例では、胸水の再採取にて十分な癌細胞が回収可能であったが、細胞殺傷性はみられなかった。患者には七回に渡る化学療法、腎移植の既往、免疫抑制剤の投与歴があり、Thバランス、免疫学的環境の変化が原因と考えられた。(図4)

**樹状細胞に対する遺伝子導入**：2x10E7/mLの樹状細胞に対し図5に示す様な条件で、遺伝子導入を試み、1x10E7の樹状細胞に30 $\mu$ g, 600mV, 99 $\mu$ sec, 10回のpulseで約0.1%の細胞にGFPの発現を認めた。しかし、施行後24時間以内に培養液を交換した際にトリパンブルーでの検鏡では平均20%の死細胞がみられたことから、生存した細胞にも過大な傷害がある可能性が示唆され、現在それらの細胞のHLA, costimulatory moleculeの発現についてFACSで検討中である。

#### <結語>

CTL、および液性免疫の分化誘導を期待する樹状細胞の臨床応用を考えた場合、CD34 progenitorから、あるいは末梢血からの分化・誘導が一般的であるが、その実際の誘導にはある程度の習熟が必要と思われる。また、入手可能なcytokineからの培養の至適条件の決定は不可欠である。今回我々は、樹状細胞を用いた抗原提示能について、PBMCからの誘導する系の樹立と、抗原刺激による樹状細胞の表現型の変化を、腫瘍から抽出した蛋白を抗原としてco-stimulatory factorの変化を含めて検索した。結果は健常者、担癌者ともにPBMCからの樹状細胞の樹立に成功し、その表現型から正常な樹状細胞への分化が確かめられた。また、その機能評価として抗原pulse後の樹状細胞とT cellとの共培養によって腫瘍反応性のT cellの誘導に成功した。一方、CTLの樹立に関しては、T cell cloneの維持・増殖にて不成功に終わることもあり、一部のcompromised host等の免疫状態の変化が背景にある宿主での樹状細胞の誘導能が関与すると推察された。しかし、その分岐点に関わるThバランスの変化、上清内のcytokineの種類と分泌量の変化に関しては現在検討中であり、免疫療法の適応を考える面から結果が待たれる。さらに、臨床応用の立場でO-157等細菌感染における中和抗体の産生刺激として、Th2を介するB cellの増殖・抗体産生刺激において樹状細胞の寄与を検索した報告は少ない7)。



局所リンパ節で起こりうる樹状細胞からの免疫複合体の提示と、B cellによる認識、抗体産生が抗細菌効果として有用であり、in vivoでの実験系での誘導、血清中の抗体価の上昇の確認が必要である。今後、マウスモデルでの樹状細胞によるワクチン後の抗体価の測定と、致死性細菌・ウイルスに対する感染抵抗性から実際の細菌に対する樹状細胞の関与の検討を予定している。また、細菌、ウイルスのepitopeが次々に近年明らかになっていることを踏まえ、これらの抗原をDNAレベルで効率良く導入可能かどうかは、HLAの制限が無い点からも興味深い。そこで我々はelectroporationによる遺伝子導入を試みた。導入効率は0.1%以下と非常に低かったが、多量の樹状細胞がさらに効率良く採取可能であれば、 $5 \times 10^5$ 程度の細胞に遺伝子を導入、これをワクチンとして利用することは不可能ではないと考えられた。ただし細胞の傷害もみられた為、lipofection等、他の方法での導入効率と細胞の表現型の観察を含めた今後の検討が必要とされた。最後に、今回の我々の検討では、1)ヒト末梢血からの樹状細胞の誘導に習熟し、その形態学・膜表面の表現型を確認した、2)樹状細胞の機能評価として、in vitroでのCTLの誘導に成功した、3)樹状細胞に対するplasmid DNAによる遺伝子導入に着手、今後の指針を示唆する基礎的データを得た。これらの結果から、樹状細胞への細菌・ウイルス感染epitopeの効率的導入によるワクチンの開発への基盤が得られ、また腫瘍ワクチンへの応用の発展性が強く示唆された。

### <最後に>

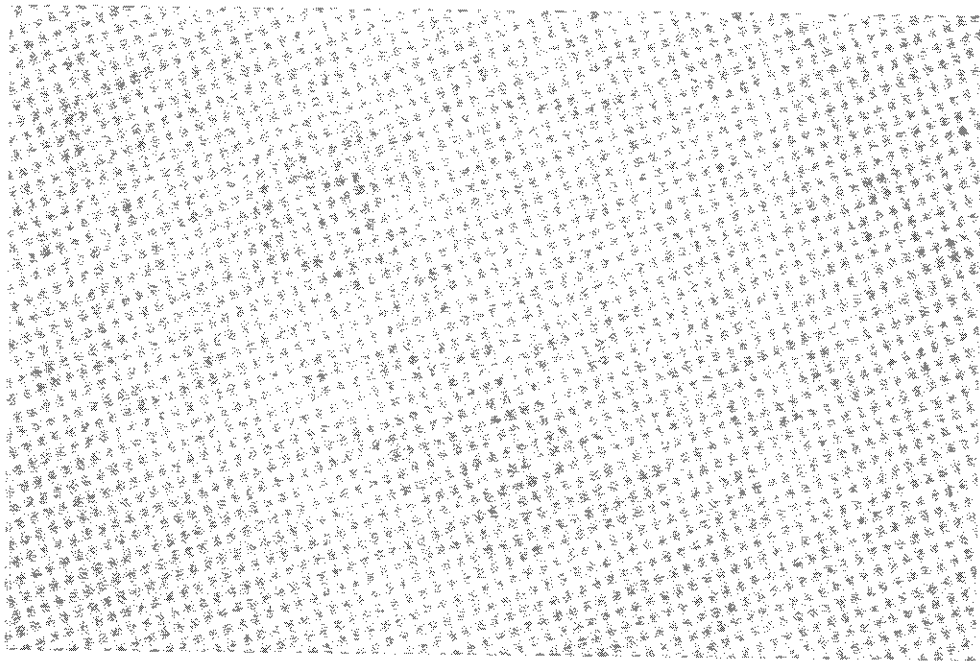
この実験は、全面的に岩手医科大学細菌学、佐藤成大教授に御指導・御監修頂いた。また、同細菌学、堤 玲子先生に実技指導・理論について御指導頂いた。また、同第1外科、斎藤 和好教授、寺島 雅典講師にも御理解頂き、実験を進めることが出来たことを附記し、4先生方に深く感謝致します。

### <引用文献>

1. Schuker G. and Steinman R.M. 1997. Dendritic cells as adjuvant for immune-mediated resistance to tumor. *J.Exp.Med.*186 :1183-1187
2. Wilson C.C. et al. 1999. HIV-1-specific CTL responses primed in vitro by blood-derived dendritic cells and Th1-biasing cytokines. *J Immunol.*162:3070-3078.
3. Gong J et al. 1997. Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells. *Gene Ther.* 4:1023-1028.
4. Fields RC et al. 1998. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA.* 95:9482-9487.
5. Kawashima I et al. 1998. The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors. *Human Immunology.* 59: 1-14
6. Gong J, et al. 1997. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med.* 1997 :3:558-61.
7. Villacres-Eriksson M. et al. 1995. Antigen presentation by naive macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. *Clin Exp Immunol.* 102:46-52.

### <学会発表>

1. 第21回外科免疫研究会、柏葉匡寛ら「腫瘍cell lysateでパルスされたPBMC由来樹状細胞によるin vitroでのCTLの誘導」H12.5.26 於和歌山



**図1 ヒト末梢血由来樹状細胞の形態  
= 突起を有する細胞がclusterを形成、増殖**

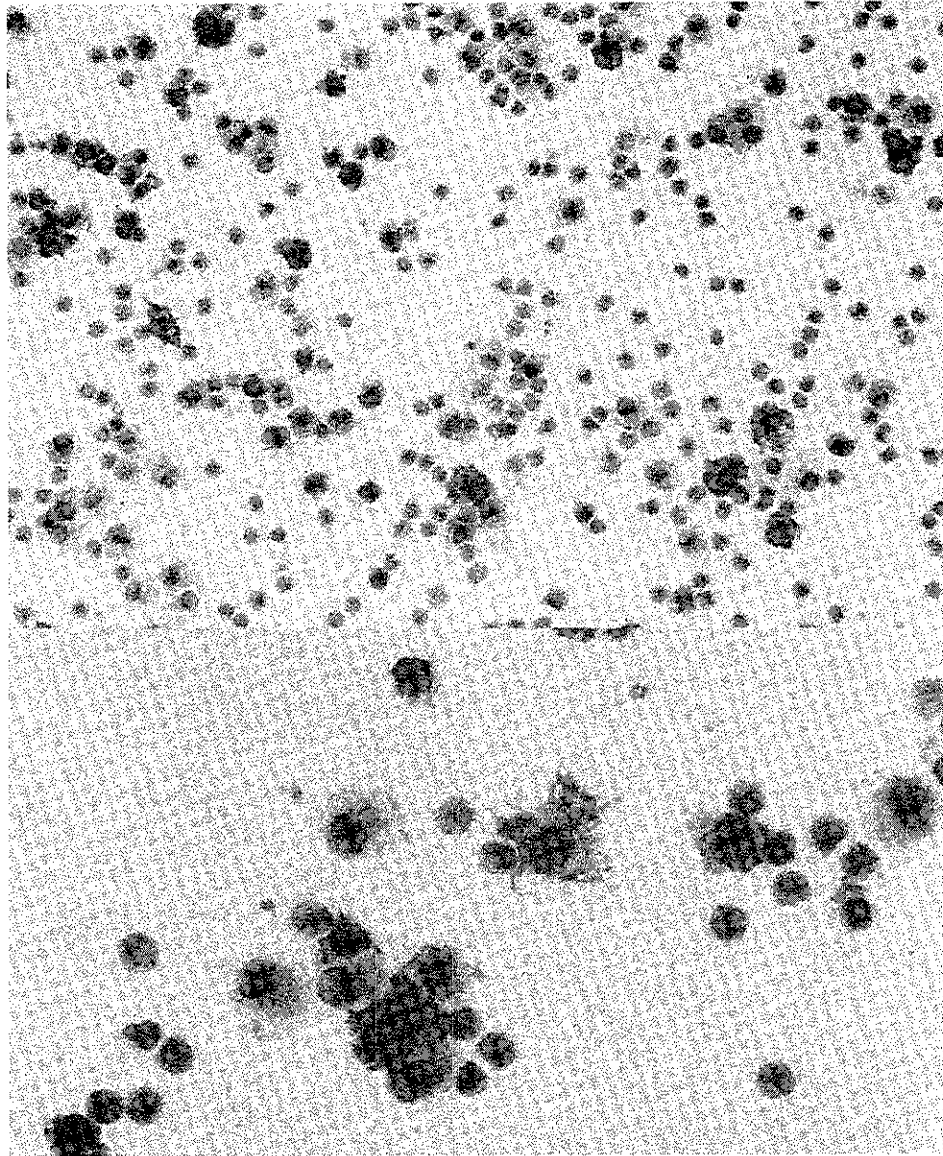
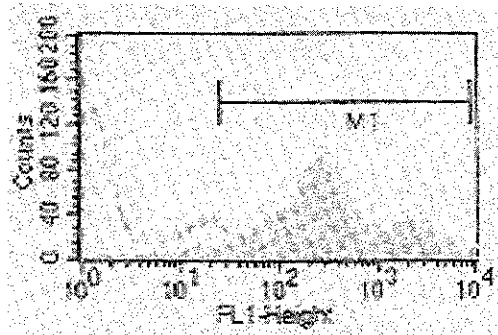
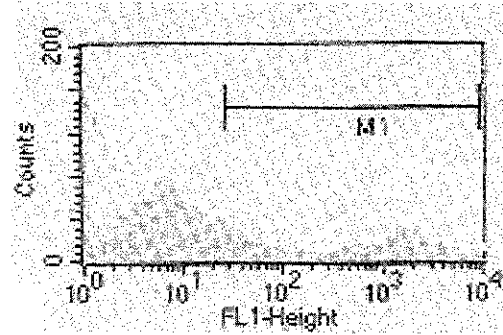


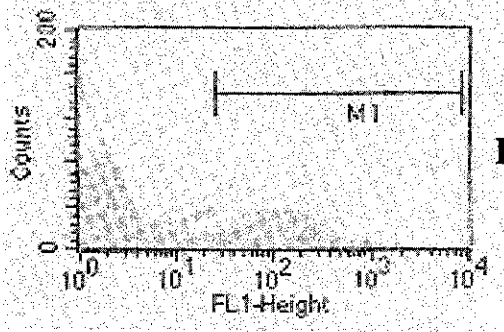
図2 ヒト末梢血由来樹状細胞の抗HLA-DR抗体による免疫染色  
= 細胞膜が赤色に染まるHLA-DR陽性細胞 =



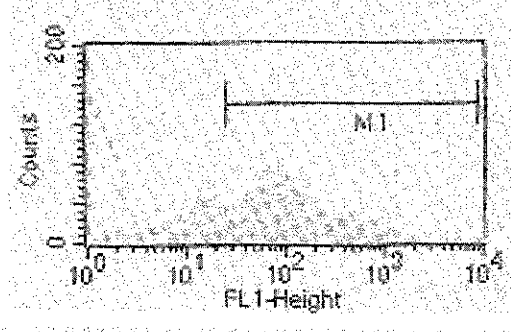
**HLA  
class I**



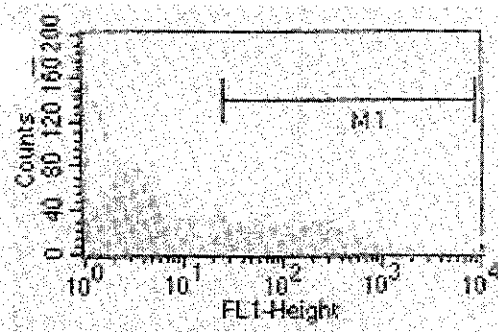
**CD54**



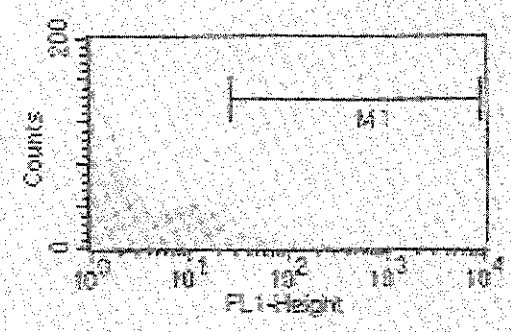
**HLA-DR**



**CD80**



**CD40**



**CD86**

**図3 FACSによる各種膜抗原の発現**

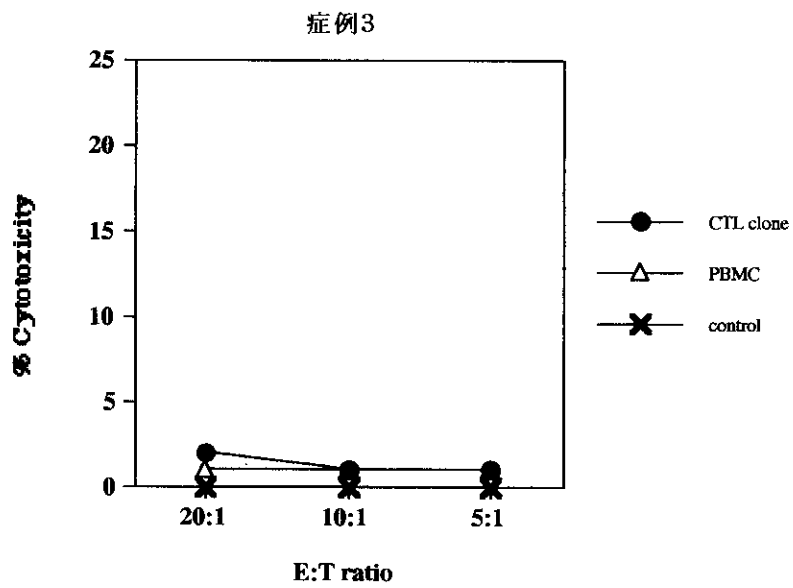
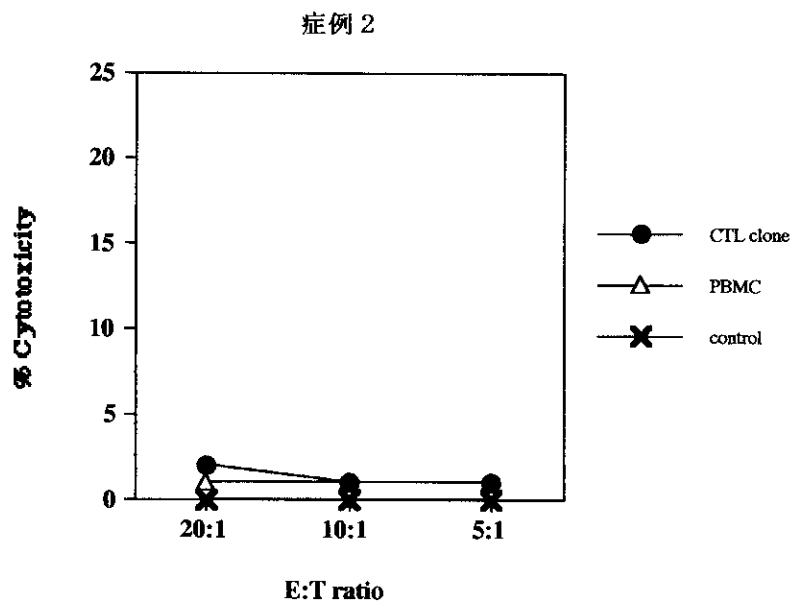
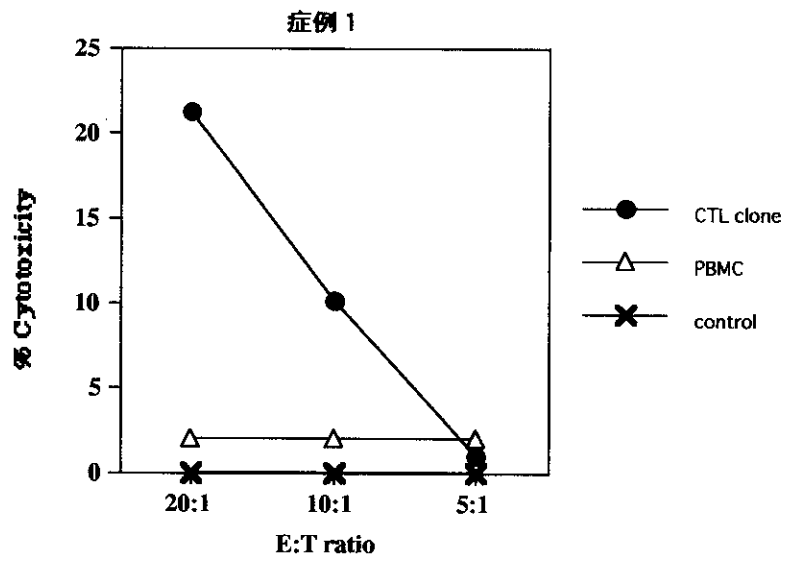


图 4 CTL assay

細胞数	溶液	sample volume( $\mu$ L)	DNA量( $\mu$ g)	Voltage(V)	Pulse length	pulse 回数	chamber間隙	after pulse	Results
2x10E7/mL	PBS	500	30	600	99 $\mu$ sec	10	4	on ice for 15'	yield <0.1%
2x10E7/mL	PBS	250	5	250	65msec.	1	4	on ice for 15'	almost none
2x10E7/mL	PBS	500	15	500	10 $\mu$ sec.	20	2	on ice for 15'	almost none
2x10E7/mL	PBS	500	15	350	99 $\mu$ sec	5	2	on ice for 15'	almost none

図 5 electroporationの条件とGFPの発現結果