

図3 がんワクチンにより誘導が期待される免疫反応

ワクチンにより活性化したキラーT細胞が腫瘍を破壊することにより腫瘍からさまざまながん抗原が放出する。それら腫瘍細胞由来のがん抗原を抗原提示細胞が取り込むことで、ワクチン抗原以外の抗原に対するCD4+T細胞、CD8+T細胞の活性が誘導される。

こすことが期待される(図2)。

こうしたがんワクチン療法では、患者は単一の抗原で持続的に刺激され続けるという状況になる。その場合、ワクチンが誘導するキラーT細胞は単一の特異性しかもたないが、それで腫瘍破壊に十分なのか、腫瘍の拒絶などの治療効果に至るのかについては余り明らかではない。以前より、破壊された腫瘍から放出される他の抗原群に対する免疫反応の拡がりが必要であるという見解も強い。これを抗原拡散

(antigen spreading)とよび、その存在は効果的な免疫反応にとって重要であるという見方は強いが、その実態についてはいまだ不明な点が多い(図3)。

### ワクチンによる免疫の活性化は諸刃の剣？ — immunological enhancement —

がんワクチン療法では、がん細胞が発現する抗原のうち免疫原性が高いも

のをワクチン抗原として投与する。それによってさまざまな免疫担当細胞による免疫反応を誘発する(図1)。その免疫反応は常に腫瘍細胞の破壊へと向かっているのか否かという疑問は、今なおきわめて重要な課題である。マウスなどのモデルを用いた研究では、以前から、ワクチンなどの免疫操作がかえって腫瘍増殖を促すことがあることを報告しており、これをimmunological enhancementとよんでいる<sup>1-3)</sup>。これはワクチンのヒトへ

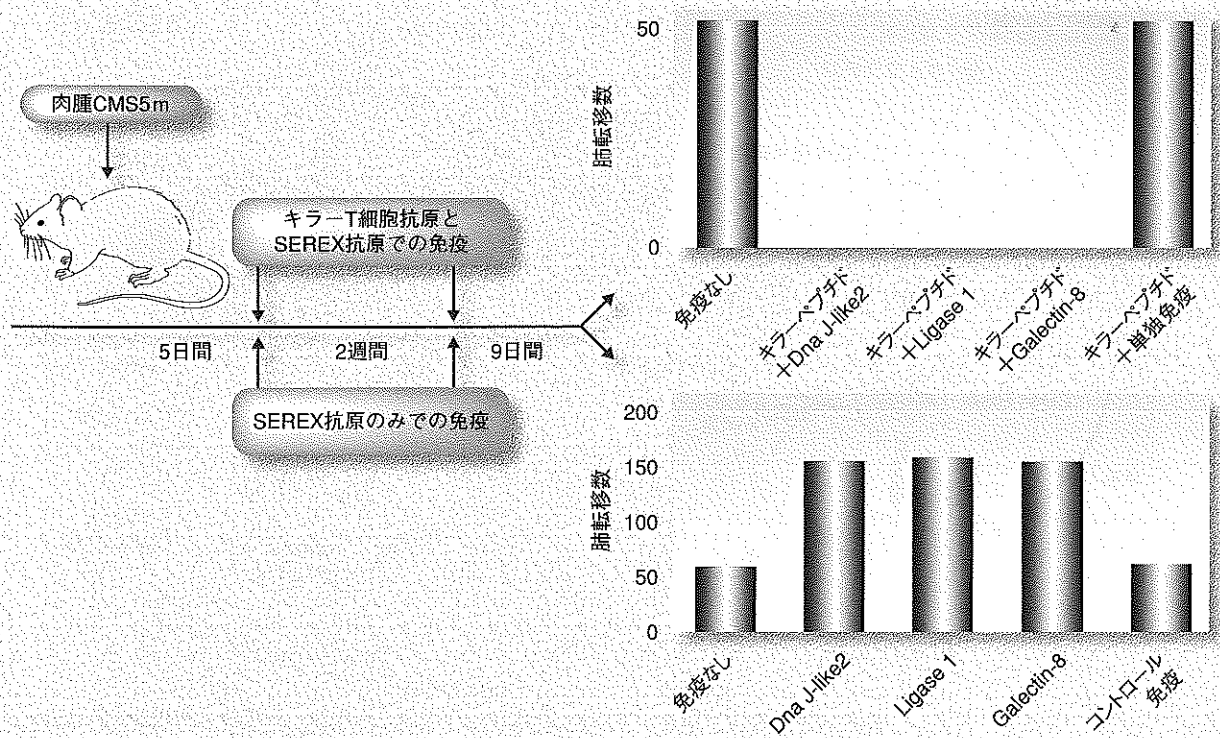


図4 SEREX同定抗原(Dna J-like2、Ligase 1、Galectin-8)による免疫は肺転移の抑制および増悪を誘発する

SEREX同定抗原(Dna J-like2、Ligase 1、Galectin-8)による免疫は、腫瘍に対する2つのまったく異なった免疫反応を誘導する。SEREX同定抗原と肉腫CMS5m由来のキラーT細胞抗原での免疫では、キラーT細胞抗原単独免疫

よりもはるかに強く腫瘍の肺転移を抑制する。一方、SEREX同定抗原での単独免疫は肺転移を増悪させる。

の応用を試みるにあたって看過できない現象である。最近、われわれは動物を用いた実験的腫瘍での解析において、がんワクチンが明らかな腫瘍増悪を誘発することを見出し、その機構を詳細に解析した。

### その1. SEREX抗原を用いた免疫は腫瘍肺転移に対する抑制と増悪の二面性効果を引き起こしうる

がん患者血清は腫瘍由来の自己抗

原に対する抗体を含むことがあり、患者血清を用いた発現クローニング法 (serological identification of antigens by recombinant expression cloning ; SEREX法) によって免疫原性が高い腫瘍由来自己抗原分子を同定することができる。そうして見いだされた「SEREX抗原」を、腫瘍を投与したマウスに対して免疫し、抗腫瘍免疫応答の変化を解析した。マウスに投与した腫瘍はCMS5mというマウス肉腫株で、静脈内に投与すると多数の肺転移を生じ、マウスは通常5、6週間で死亡する。SEREX抗原を単独もしくは

CMS5m肉腫が発現するキラーT細胞抗原とともに免疫し、その効果を比較検討した。その結果、SEREX抗原の共免疫により、CMS5m由来キラーT細胞抗原免疫による肺転移の抑制効果が著しく増強した(図4)。共免疫の効果を解析するために、免疫されたマウスからCD8<sup>+</sup>T細胞を回収し、特異的CD8<sup>+</sup>T細胞誘導に対するSEREX抗原共免疫のヘルパー効果をELISPOTアッセイにて解析した。その結果、キラーT細胞抗原とSEREX同定自己抗原の共免疫により、キラーT細胞抗原の単独免疫に比べて、特異的CD8<sup>+</sup>T

細胞の誘導が4～8倍に増加した。この増強効果は抗CD4抗体による処理で完全に消失したことから、キラーT細胞抗原とSEREX同定自己抗原との共免疫の際にみられた抗腫瘍活性の増強効果は、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞によるものと考えられた。

ところが、SEREX抗原を単独で免疫すると、図4下段に示すようにコントロールに比べてきわめて著明な肺転移の増悪が認められた<sup>4-6)</sup>。この傾向は、3種類のSEREX抗原分子いずれにおいても認められた。マウスをCD4もしくはCD25に対する抗体であらかじめ処理することにより、SEREX抗原単独免疫での肺転移増悪は消失したことより、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の関与が強く示唆された。SEREX抗原の1つ、DnaJ-like 2で免疫されたマウス由来のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞を未処置マウスに輸注したところ、まったく同様の肺転移の増悪が認められた。この結果は、SEREX抗原単独での免疫では、強い免疫抑制活性を有するCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞が誘導されたことを示している。

### CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞活性およびCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞活性の誘導はIFN- $\gamma$ によりコントロールされている

SEREX抗原の免疫により認められる、まったく異なる2種類のCD4<sup>+</sup>T細胞活性の誘導が、いかなるメカニズムによりコントロールされているかを

検討するため、SEREX抗原単独免疫による*in vivo*肺転移増悪へのIFN- $\gamma$ 、インターロイキン(IL)-2、IL-4、IL-10、IL-12などの種々のサイトカインの関わりを検討した。SEREX抗原を単独で免疫した場合の肺転移の増悪は、IFN- $\gamma$ とともに免疫することにより認められなくなった。また、SEREX抗原とキラーT細胞抗原との共免疫でCD4<sup>+</sup>T細胞が抑制性からヘルパー活性へと変化するの、キラーT細胞の産生するIFN- $\gamma$ によることも合わせて明らかとなった<sup>7)</sup>。

## その2. ペプチドワクチンによる腫瘍増悪とその機構

近年、主としてキラーT細胞が認識する抗原ペプチドをワクチン源とするペプチドワクチンが、多くの臨床試験で評価され、開発が進められている。その基盤となっているのは、種々のマウス実験腫瘍において、キラーT細胞認識ペプチドを用いたペプチドワクチンが腫瘍増殖の抑制を導くといういくつかの報告である。しかしながら一方で、(今も臨床試験で頻用される)ペプチドとフロイント不完全アジュバント(IFA：臨床試験で広く用いられているモンタナイド)の混合投与というペプチドワクチンの投与方法は、投与経路やスケジュール、投与量によっては、抗原特異的CD8<sup>+</sup>細胞の活性化ではなく「免疫寛容」を誘導してしまうことが、マウスモデルで報告されている<sup>8,9)</sup>。ペプチドワクチンにより免疫寛容が誘導されると、それと相関して腫瘍の増

悪も観察される<sup>10,11)</sup>。このペプチドワクチンによる免疫寛容や腫瘍増悪に対する詳細な機構は最近まで不明であった。

われわれは、がん抗原の一つであるヒトNY-ESO-1蛋白質のマウスにおけるキラーT細胞認識エピトープを同定した。これをペプチドワクチンとして、IFAと混合して担がんマウスに免疫し、抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の機能ならびに抗腫瘍効果について検討した。その結果、ペプチドワクチン/IFA投与群では、抗原特異的キラーT細胞が誘導されたにもかかわらず、明らかな腫瘍の増悪が観察された<sup>12)</sup>。同様の結果は2種類の異なった実験腫瘍と3種類のペプチドワクチンで観察され、関与する免疫反応はワクチンに用いたペプチド特異的であった(図5)。なお、比較対照として使用したDNAワクチン(キラーT細胞エピトープおよびヘルパーT細胞エピトープを同時に含む)では、キラーT細胞誘導と同時に著明な腫瘍抑制効果が認められた。さらに検討を進めた結果、ペプチドワクチンにより誘導される抗原特異的キラーT細胞では、PD-1などの抑制性受容体やFas受容体の発現が上昇しており、アポトーシスが誘導されていた。この結果は、ペプチドワクチンにより誘導される抗原特異的T細胞は疲弊した状態に陥っていることを強く示唆する。このような現象は腫瘍局所においてより顕著に観察され、ペプチドワクチンが誘導した抗原特異的T細胞の約80%がアポトーシスに陥っていた<sup>12)</sup>。

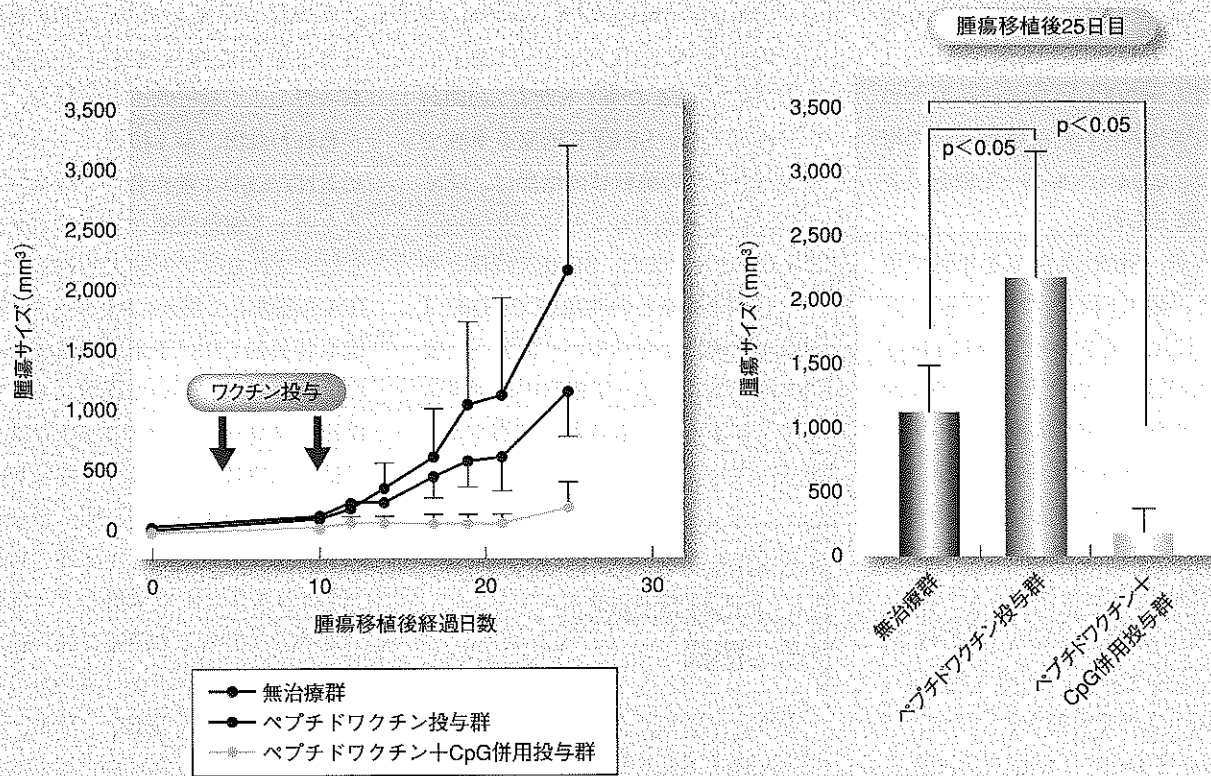


図5 キラーT細胞ペプチドワクチンとIFA免疫での腫瘍増悪とCpG追加による腫瘍抑制

マウスに $1 \times 10^6$ 個のCT26-NY-ESO-1を皮下移植しNY-ESO-1p81-88ペプチド単独もしくはCpG併用にてワクチンを行った。腫瘍サイズを週3回計測し、腫瘍増殖について検討した。その結果、PBS投与群と比較し、ペプチド

ワクチン投与群においては腫瘍増悪が観察された。しかし、ペプチドワクチンにCpGを併用して投与することにより、腫瘍増悪が改善され強力な腫瘍拒絶効果が誘導された(n=5)。

## がんペプチドワクチンの有効性の改善：アジュバントの併用

キラーT細胞エピートープだけをワクチン抗原とするペプチドワクチンでは原理上、ヘルパーT細胞や抗原提示細胞による適切な活性化が欠如する点については、これまでも指摘されてきた。前述のペプチドワクチンによる免疫寛容・腫瘍増悪という現象も、そうしたことが要因となっている可能性がある。

そこでペプチドワクチンに種々の免疫アジュバントを併用することにより、改善が図れないか検討した。アジュバントの活性成分として、toll-like receptor (TLR)、RIG-I-like receptor (RLR)、NOD-like receptor (NLR)に対するさまざまなリガンドのほか、有機性物質などが知られている。なかでも、TLR9のリガンドであるCpGオリゴDNAをペプチドワクチンと併用したときの抗原特異的CD8<sup>+</sup>細胞の性質や抗腫瘍効果について検討した。その結果、ペ

プチドワクチン(とIFA)の単独投与時に認められた特異的キラーT細胞におけるPD-1やFasの発現上昇が消失し、アポトーシスも抑制されるとともに、*in vivo*における強い腫瘍増殖抑制効果が誘導された(図5)。

## おわりに

がん特異的なT細胞の活性化を目論むがんワクチンは、動物実験モデルで

の検証や臨床試験を通じて、効果的にがんの縮小や増殖抑制を誘導しうるとはこれまでも示されてきた。しかしながらいずれにおいても、得られる結果が限局的であるのも事実である。がんに対する免疫応答のより深い理解と、それに基づいたより工夫されたワクチンなどの免疫療法の開発が必要なのはいうまでもない。現在がんワクチンに用いられているほとんどのがん抗原は、比較的免疫原性の高い自己抗原である。われわれはワクチンを重ねることにより、自己(腫瘍)抗原反応性のT細胞を活性化し、それが腫瘍細胞の破壊へと連なることを一義的に目指し

ている。しかしながらわれわれのもつ免疫系は過剰な自己抗原反応性を制限する機構を有することも当然であり、制御性T細胞はその代表的なものと考えられる。上述したSEREX抗原による免疫効果の二面性はその一つと考えられる。今一つのキラーT細胞エピトープペプチドワクチンとIFAによる免疫は、免疫バランスに必要なヘルパーT細胞や抗原提示細胞の適切な活性化を伴わず、状況によってはかえってキラーT細胞の片寄った活性化を強め、宿主内全体における特異的T細胞の不活化や消失へと連なることを示唆している。また同時に、適切なアジュ

バントの使用やIFN- $\gamma$ などのサイトカイン活性の誘発は、免疫環境を望ましい方向に改変し抗腫瘍活性の著しい増強へと結びつき得ることも期待される。これら動物実験で得られたレッスンは人にどのようにあてはまるのかは、常に議論される課題ではあるが、ヒトを対象としての臨床試験とその結果の解釈の際には是非とも留意すべきことであろう。

がんワクチンの有効性が次第に明らかになりつつあるいまこそ、科学的により優れたアプローチが工夫されることが大切である。

## 文献

- 1) Kaliss N. Immunological enhancement of tumor homografts in mice: a review. *Cancer Res* 1958; 18: 992-1003.
- 2) Ichim C. Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy. *J Transl Med* 2005; 3: 8.
- 3) Chiarella P, Reffo V, Bruzzo J, Bustuoabad O, Ruggiero R. Therapeutic Anti-Tumor Vaccines: From Tumor Inhibition to Enhancement. *Clinical Medicine* 2008; 2: 237-45.
- 4) Nishikawa H, Tanida K, Ikeda H, Sakakura M, Miyahara Y, Aota T, et al. Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14571-6.
- 5) Nishikawa H, Kato T, Tanida K, Hiasa A, Tawara I, Ikeda H, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10902-6.
- 6) Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Saito K, Ikeda H, Kuribayashi K, et al. Definition of target antigens for naturally occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 681-6.
- 7) Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Ikeda H, Kuribayashi K, Allen PM, et al. IFN- $\gamma$  controls the generation/activation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in antitumor immune response. *J Immunol* 2005; 175: 4433-40.
- 8) Aichele P, Kyburz D, Ohashi PS, Odermatt B, Zinkernagel RM, Hengartner H, et al. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 444-8.
- 9) Aichele P, Brduscha-Riem K, Zinkernagel RM, Hengartner H, Pircher H. T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *J Exp Med* 1995; 182: 261-6.
- 10) Toes RE, Blom RJ, Offringa R, Kast WM, Melief CJ. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol* 1996; 156: 3911-8.
- 11) Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 7855-60.
- 12) Muraoka D, Kato T, Wang L, Maeda Y, Noguchi T, Harada N, et al. Peptide vaccine induces enhanced tumor growth associated with apoptosis induction in CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2010; 185: 3768-76.