

	いしだ あきら
氏 名	石田 晃
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第231号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Generation of Anti-tumour Effector T Cells from Naïve T Cells by Stimulation with Dendritic/tumour Fusion Cells (ナイーブ T 細胞からの抗腫瘍エフェクターT 細胞の誘導;樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を用いた試み)
論文審査委員	主査 教授 安 保 徹 副査 教授 下 條 文 武 副査 教授 内 藤 眞

博士論文の要旨

緒言

腫瘍免疫応答は腫瘍細胞に免疫原性が存在し引き起こされる免疫である。その腫瘍免疫応答の重要な役割を担うのが腫瘍抗原特異的 T 細胞である。しかしながら生体内にこれらの抗腫瘍 T 細胞が存在するにもかかわらず悪性腫瘍細胞が増殖し、転移し続けるのは、宿主における抗腫瘍 T 細胞の数が少ないこと、生体内では抗腫瘍 T 細胞が十分機能し得ないためと考えられる。養子免疫療法は体内にできた腫瘍を根絶することを目的とした魅力ある手法であり、これに関しこれまでたくさんの研究が行なわれてきた。生体外で腫瘍抗原を T 細胞に感作させる方法が作り出され、その方法により抗腫瘍エフェクター T 細胞が多く作り出せるようになった。T 細胞は抗原提示細胞によって腫瘍抗原の提示を効果的にうけることがわかっている。最も強力な抗原提示細胞は樹状細胞であり、樹状細胞は腫瘍抗原を T 細胞に提示し、刺激し活性化させる。私たちは、電気パルス法により樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を作成してきた。これらの融合細胞は生体内外で特異的な抗腫瘍応答を引き起こし、他の方法よりも優れた T 細胞への刺激活性を有することが示されている。この研究は、樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞が持つ強い免疫原性を利用し、生体外で抗腫瘍エフェクター T 細胞を作成し、増殖させる養子免疫療法としての新しい方法を提案することを目的として行なった。

方法

腫瘍細胞 D5 はマウス黒色腫 B16/BL6 由来の細胞、腫瘍細胞 LLC は B6 由来の自然発生肺癌細胞、また腫瘍細胞 MCA205、102 は B6 由来化学発癌剤誘発線維肉腫である。樹状細胞はマウス骨髄細胞を 顆粒球単球コロニー刺激因子、IL-4 添加完全培地で 8 日間培養して得られた細胞である。この樹状細胞は MHC クラス I、II、共刺激分子を高発現している。樹状細胞と放射線照射した腫瘍細胞を 2:1 の割合で 浮遊液 に懸濁し、その懸濁液に AC 電流をかけ細胞の配列を形成させた後、DC パルスをかけ融合を起こさせた。数時間の培養の後、付着細胞を回収した。融合効率は、パルス前に腫瘍細胞を細胞質染色用蛍光色素で染色し、パルス後に得られた細胞を樹状細胞マーカーで染色し FACS 解析を行なった。これらの樹状細胞と腫瘍細胞を使用し 30~40% の効率で融合細胞を生成することに成功した。ナイーブ T 細胞はマウスの脾臓からの CD62L 陽性 T 細胞を使用した。CD62L 陽性 T 細胞を樹状細胞と D5 の融合細胞、樹状細胞と D5 の混合細胞とともに低濃度の IL-2 存在下にそれぞれ 9 日間培養した。密度勾配遠心法で非付着性細胞を再度生成し得られた細胞を IVS (生体外刺激) 細胞とした。

結果

細胞数は一度減り6日目以降増加することがわかった。融合細胞を用いて培養した方がより多く細胞が得られた。9日間の培養後、IVS細胞はCD8優位となりCD62Lの減弱、およびCD25、CD69の増強が認められた。これらIVS細胞の生体内外での抗腫瘍効果を解析した。

樹状細胞とD5の融合細胞によるIVS細胞と混合細胞によるIVS細胞を、各種腫瘍細胞で刺激し、IFN- γ の産生量をELISA法で測定した。融合細胞によるIVS細胞では、D5で刺激した際に大量のIFN- γ 産生が認められたが、他の腫瘍で刺激した際は、産生増加はわずかだった。混合細胞によるIVS細胞では、腫瘍特異性は認められず、IFN- γ の産生増加も低レベルだった。

生体でのこのIVS細胞の抗腫瘍効果についてはマウス肺移転モデルを作成し検討した。

マウスにD5を静注し3日後にIVS細胞を静注、同日から4日間IL-2を腹腔内投与し、18日後に肺移転数をカウントした。樹状細胞と腫瘍の混合細胞でのIVS細胞投与群では治療効果は明らかではなかったが、融合細胞でのIVS細胞投与群では有意な肺移転数の減少が認められた。また、IVS細胞、IL-2をそれぞれ単独で投与した場合は治療効果は得られず、両方投与することで治療効果が得られた。腫瘍を接種する前にマウスを全身照射した場合としない場合とでは治療効果に差は認めなかった。マウス肺移転モデルを利用した生存期間の検討では、融合細胞でのIVS細胞を投与することにより生存期間が延長し、さらに投与するIVS細胞の数に依存することが証明された。融合細胞でのIVS細胞の治療効果における抗原特異性の検討では、樹状細胞とD5の融合細胞によるIVS細胞をD5、MCA205、MCA102で作成した担癌マウスにそれぞれ投与した結果、D5担癌マウスのみで治療効果が得られた。

考察

この研究で、樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を使い、生体外でナイーブなT細胞からエフェクターT細胞を誘導することに成功した。それらのエフェクターT細胞は生体外で特異的抗腫瘍活性をもち、生体内では腫瘍特異的な治療効果を示した。この手法は癌に対する養子免疫療法における新たなアプローチの基礎となりうると考えられた。

(論文審査の要旨)

本研究は、樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞が持つ強い免疫原性を利用し、生体外で抗腫瘍エフェクターT細胞を作成する新たな方法を提案することを目的として行った。

腫瘍細胞D5(マウス黒色腫)と樹状細胞から電気的パルス法で融合細胞を作製し、これとマウスの脾臓から得られたナイーブT細胞を共培養し、得られた細胞をIVS(生体外刺激)細胞とした。これらIVS細胞の生体内外での抗腫瘍効果を検討した。

IVS細胞の表現型はCD8優位となりCD62Lの減弱、およびCD25、CD69の増強が認められた。樹状細胞とD5の融合細胞によるIVS細胞を各種腫瘍細胞で刺激すると、腫瘍特異的にIFN- γ の産生が認められた。マウス肺移転モデルを使用した生体でのIVS細胞の抗腫瘍効果の検討では、融合細胞でのIVS細胞投与群で有意な肺移転数の減少と、生存期間の延長が認められた。また、その抗腫瘍効果は腫瘍特異的なものであった。

以上、樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を使い、生体外でナイーブなT細胞からエフェクターT細胞を誘導することは可能であり、それらのエフェクターT細胞は生体内外で特異的抗腫瘍活性をもつことを示した点に、本研究の学位論文としての価値を認める。