

	みうら さとる
氏 名	三浦 理
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第261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	Appropriate timing of CD40 ligation for RNA pulsed DCs to induce antitumor immunity (RNA 導入した樹状細胞が、効率よく抗腫瘍効果を惹起するため必要な CD40 を介した成熟刺激の検討)
論文審査委員	主査 教授 内藤 眞 副査 教授 下條 文武 副査 教授 安保 徹

博士論文の要旨

【目的】抗腫瘍療法としての樹状細胞(DC)による免疫細胞療法はその有用性が示唆されている。しかし、適切なDCへの抗原導入、成熟刺激の方法に関しては未だ確立されていない。Total-RNAを用いた抗原導入は、PCR法による増幅で微小な腫瘍からでも抗原が得られることや、腫瘍細胞混入の危険性の減少など、利点が多く非常に期待できる方法である。また、表面抗原CD40を介したDCへの成熟刺激は、DCの遊走能を保持しつつ、抗原提示が可能である。ここでは、マウス骨髄から得られたDCに、腫瘍細胞から単離したtotal-RNAを抗原として導入後、固相化CD40抗体による成熟刺激を行い、その抗原提示能を評価するとともに、生体に投与する際に最も効果的な方法について検討した。

【方法】未熟DCはB6マウス骨髄細胞をrmGM-CSFと6日間培養して得られたものを使用し、腫瘍系はメチルコランズレン誘導マウス線維肉腫MCA205、MCA102を使用した。また、CD40刺激はrat anti-mouse CD40抗体をgoat-anti rat IgGを介して固相化したフラスコに一定時間DCを静置することで行った。Total-RNAはMCA205から単離し、lipofection法を用いてDCに導入した。抗原提示能は腫瘍所属リンパ節から得た腫瘍特異的なCD4、またはCD8陽性T細胞とDCを共培養することにより得られた培養上清中のIFN γ 産生量をELISA法で測定することにより評価した。

【結果】まず、GFPをコードしたmRNAをlipofection法によりDCに導入し、FACSを用いてCD11c陽性細胞におけるGFP陽性細胞の比率を測定した。lipofectionを用いた群(7.2%)が使用しない群(1.2%)に比較しGFP陽性細胞が多く認められ、DCに対するlipofection法の有用性を示した。次に、RNA抗原導入後、成熟刺激を与えるまでの適切な間隔について検討したところ、RNA導入後刺激まで1時間の間隔を置くことで最も効果的な抗原提示がなされることが明らかになった。この2つの方法を併用しCD40刺激RNA導入DCを作成した。

In vitroにおけるIFN γ 産生実験において、lipofectionを用いたRNA導入、抗CD40抗体による成熟刺激それぞれの必要性について検討したが、両者の併用でより多くのIFN γ 産生が得られた。さらにCD4、CD8陽性T細胞との共培養では、共にIFN γ 産生が認められ、DCはMHC class I、class II両方を介して抗原提示を行うことができることが示された。また抗原性の異なる腫瘍系(MCA102、B16)ではIFN γ 産生は低く、腫瘍抗原特異性を持つことが示された。

In vivo においては、生体の所属リンパ節において抗腫瘍 T 細胞を誘導できるかどうかを検討した。マウス大腿部に CD40 刺激 RNA 導入 DC を皮下接種した後 7 日目に所属リンパ節を採取、CD62L 低発現 T 細胞をマウス肺転移モデルに養子移入したところ、生存期間が延長した。また、CD40 刺激 RNA 導入 DC をマウスに皮下接種した後、21 日後に腫瘍を腹部に皮下接種して、拒絶できるかどうかを評価したところ、DC 接種群で有意に腫瘍径は縮小する傾向が認められ、防御免疫を獲得できることが明らかになった。

【考察】本研究により、CD40 刺激 RNA 導入 DC は適切なタイミングで成熟刺激を行うことにより、in vitro 並びに in vivo において、MHC class I、class II を介して特異的抗腫瘍効果もつ T 細胞を誘導することが示された。これは、今後の DC を用いた抗腫瘍免疫療法の新しい戦略として応用が期待できるものと考えられる。

(論文審査の要旨)

最近、抗腫瘍療法としての樹状細胞 (DC) による免疫細胞療法の有用性が示唆されている。しかし、適切な DC への抗原導入、成熟刺激の方法に関しては未だ確立されていない。

Total-RNA 抗原導入法は、PCR 法により微小な腫瘍からでも抗原が得られる事や腫瘍細胞混入の危険性の減少など利点が多い。本研究では、lipofection 法による RNA 抗原導入と、すでに報告されている表面抗原 CD40 を介した DC 成熟刺激との併用による抗腫瘍効果を in vitro 並びに in vivo (マウス) で検討した。

In vitro の IFN γ 産生実験において、この DC は腫瘍抗原特異性を持ちつつ、MHC class I、class II を介して CD4、CD8T 細胞それぞれへの抗原提示を行うことができることが示された。

In vivo においてはマウス肺転移モデルに対するリンパ球養子移入療法で生存期間の延長が得られ、DC を皮下接種することにより防御免疫を獲得できることが示された。

以上、CD40 刺激 RNA 導入 DC が in vitro のみならず in vivo においても特異的抗腫瘍効果をもつ T 細胞を誘導できる可能性を示した点に、本研究の学位論文としての価値を認める。