

氏名	ふるもと かつよし 古元克好
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	論医博第1753号
学位授与の日付	平成13年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Spleen-derived dendritic cells engineered to enhance interleukin-12 production elicit therapeutic antitumor immune responses. (IL-12 遺伝子導入脾細胞由来樹状細胞を用いた腫瘍免疫誘導)
論文調査委員	(主査) 教授 湊 長博 教授 千葉 勉 教授 今村 正之

論文内容の要旨

【背景と目的】 悪性腫瘍に対する腫瘍免疫療法の主流は活性化 T リンパ球による細胞性免疫である。腫瘍特異的な T 細胞を活性化させるためには、腫瘍特異的な抗原を T 細胞に提示することが必要で、抗原提示細胞、特に樹状細胞 (dendritic cell, 以下 DC) が重要となる。DC は抗原を取り込み、プロセッシングし、T 細胞に提示して腫瘍特異的な T 細胞の増殖を促進する。DC のこの能力に着眼した研究は多いが、多くは DC に *ex vivo* で腫瘍抗原をパルスする方法をとっている。しかし、ヒトの腫瘍抗原が正確に同定されていない現状では問題点が多い。本研究では DC に、細胞性免疫の誘導に重要な役割をもっとされるインターロイキン12 (以下 IL-12) 遺伝子を導入して腫瘍近傍に注入し、腫瘍特異的な細胞性免疫を誘導できるか否かを実験した。【材料と方法】 BALB/c マウスの脾細胞から BSA 密度勾配遠心によって得た低密度細胞をまき、2 時間後に浮遊細胞を除去し、18 時間後に付着細胞を除去して mGM-CSF 存在下に約 5 日間培養し DC として用いた。flowcytometry でこの population は、DC マーカー CD11c 及び class II を高度に発現し、補助刺激分子 B7-1, B7-2 を中等度に発現していたが、リンパ系マーカー CD8 α の発現はほとんどなかった。この DC に IL-12 遺伝子をコードした adenovirus を MOI 100 で感染させて IL-12 遺伝子を導入した。IL-12 遺伝子導入 DC 5×10^5 個からの IL-12 の産生量は、1.4-3.2 ng/ml/48hs であった。BALB/c マウスに CT26 マウス大腸癌細胞を day0 に 1×10^6 個皮下移植し、day5, 10 に 5×10^5 個の遺伝子導入 DC を腫瘍近傍に注入して腫瘍径の変化を測定した。また、day30 以後に回収した脾細胞を *in vitro* で親細胞で再刺激し、IFN- γ の産生量、脾細胞の増殖、NK 及び CTL 活性を測定した。さらに、腫瘍内の T 細胞の浸潤の有無を凍結切片の免疫染色で検討した。加えて、IL-12 遺伝子を導入した線維芽細胞あるいは IL-12 遺伝子をコードした adenovirus と、IL-12 遺伝子導入 DC との抗腫瘍効果を比較した。【結果】 IL-12 遺伝子導入 DC (DCIL-12) 投与群では、コントロール遺伝子導入 DC (DCLacZ) 投与群に比し腫瘍増殖の抑制を認めた ($n=6$, day31 で DCIL-12 群: $351.3 \pm 264.3 \text{ mm}^3$ vs DCLacZ 群: $1504.1 \pm 454.1 \text{ mm}^3$, $P < 0.05$)。in vitro での親細胞での再刺激に対する脾細胞からの IFN- γ の産生は DCIL-12 群で著明に上昇しており (72 時間の血清中で DCIL-12 群: $1206.0 \pm 256.5 \text{ pg/ml}$ vs DCLacZ 群: $132.9 \pm 94.0 \text{ pg/ml}$)、DCIL-12 群の脾細胞の増殖は DCLacZ 群の 2.83 倍であった。また、DCIL-12 群で親細胞に特異的な CTL 活性が認められた (E:T 比=100:1 で DCIL-12 群: $50. \pm 4.3\%$ vs DCLacZ 群: $6.2 \pm 3.7\%$)。NK 活性は、DCIL-12 群でその効果が長く続く傾向が見られた。皮下腫瘍の免疫組織学的検討で、DCIL-12 群で CD4, CD8 陽性細胞の浸潤を認めた。DCIL-12 群では、IL-12 遺伝子導入線維芽細胞 (FibroIL-12) 投与群と比しても有意な腫瘍増殖抑制がみられ ($n=6$, day40 で DCIL-12 群: $115.1 \pm 74.7 \text{ mm}^3$ vs FibroIL-12 群: $843.8 \pm 276.6 \text{ mm}^3$, $P < 0.05$)、IL-12 adenovirus (AdIL-12) 投与群と比べても有意な腫瘍増殖抑制がみられた ($n=6$, day35 で DCIL-12 群: $381.4 \pm 158.4 \text{ mm}^3$ vs AdIL-12 群: $1802.1 \pm 486.9 \text{ mm}^3$, $P < 0.05$)。【結論】 IL-12 遺伝子を導入した脾臓由来の樹状細胞は腫瘍増殖抑制に有効であった。腫瘍免疫治療では、腫瘍抗原を DC に取り込ませることが必要のため、腫瘍近傍に DC を投与することが望ましく、腫瘍近傍接種が可能な臨床例への応用を目指して更に研究を進めたい。

論文審査の結果の要旨

申請者は、悪性腫瘍の免疫治療の中心となる腫瘍特異的な T 細胞を活性化する目的で、強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cell, 以下 DC) に着目し、DC に細胞性免疫の誘導に重要なインターロイキン12 (IL-12) 遺伝子を導入して腫瘍近傍に注入することで腫瘍特異的な細胞性免疫を誘導できるか否かを実験した。BALB/c マウスの脾細胞から調整した DC に adenovirus を用いて IL-12 遺伝子を導入した。IL-12 遺伝子導入 DC 5×10⁵ 個からの IL-12 の産生量は、1.4-3.2ng/ml/48hs であった。BALB/c マウスに CT26 マウス大腸癌細胞を day0 に 1×10⁶ 個皮下移植し、day5, 10 に 5×10⁵ 個の遺伝子導入 DC を腫瘍近傍に注入して腫瘍径の変化を測定したところ、IL-12 遺伝子導入 DC (DCIL-12) 投与群で、コントロール遺伝子導入 DC 投与群に比し腫瘍増殖の抑制を認めた。in vitro で脾細胞を親細胞で再刺激し、DCIL-12 群で脾細胞の増殖、IFN- γ の産生量、CTL 活性の上昇と NK 活性の延長を認めた。また、DCIL-12 群の皮下腫瘍の免疫染色で CD4, CD8 陽性細胞の浸潤をみた。さらに、DCIL-12 投与群は、IL-12 遺伝子導入線維芽細胞投与群又は IL-12adenovirus 投与群と比べても有意な腫瘍増殖抑制を示した。

以上の研究は、樹状細胞と IL-12 の組み合わせによって誘導される抗腫瘍効果のメカニズムの解明に貢献し、悪性腫瘍の新しい免疫治療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年3月19日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。