

氏名	井上直也
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医博第2678号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻
学位論文題目	Dendritic cells coinjected with tumor cells treated with an anticancer drug to induce tumor rejection に関する研究 (抗癌剤処理腫瘍細胞と樹状細胞の併用による腫瘍拒絶誘導)
論文調査委員	(主査) 教授 内山 卓 教授 武藤 誠 教授 今村正之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目的]

抗癌剤投与時の抗腫瘍メカニズムにおける腫瘍免疫の役割について、化学療法で誘導された腫瘍細胞の apoptosis と宿主免疫担当細胞である樹状細胞 (dendritic cell; DC) に着目し、検討した。

#### [材料と方法]

- (1) CT26 (マウス大腸癌細胞株) を BALB/c マウス背部皮内に接種後、mitomycin C (MMC) 2 mg/kg 投与群と PBS 投与群で CT26 の腫瘍体積の推移を観察。
- (2) MMC 0.1mg/ml で CT26 を 45 分間処理 (*in vitro*)。トリパンブルー染色にて生細胞数を、Hoechst 染色で核の形態変化を観察。Annexin V-FITC と Propidium Iodide で染色し flow cytometry にて apoptosis に陥った細胞の割合を解析。0.01 ~ 100  $\mu$ g/ml の濃度の条件下でも検討した。
- (3) CT26 担癌マウスに MMC 2 ~ 4 mg/kg を腹腔内投与し、2 日後の腫瘍切片における apoptosis 細胞の分布を抗 single-stranded DNA 抗体にて染色し観察。
- (4) MMC 0.1mg/ml で 45 分間処理した CT26  $1 \times 10^6$  個単独又は、骨髓由来の培養 DC  $5 \times 10^5$  個を混合し BALB/c マウスを免疫。2 週間後に CT26 を背部皮内に接種し腫瘍の増殖を観察。
- (5) 実験(4)で腫瘍を拒絶したマウスの脾細胞を CT26 と混合培養し、2 日後の上清中の INF- $\gamma$  濃度を測定。また、CT26 存在下に 5 日間培養し細胞傷外性 T 細胞 (CTL) 誘導し、CT26 に対する CTL 活性を測定した。
- (6) CT26 担癌マウスに MMC 2 mg/kg を腹腔内投与し、2, 9 日後に  $5 \times 10^5$  個の DC を腫瘍近傍に接種し、治療効果を検討した。

#### [結果]

- (1) MMC 投与群は 6 匹中 3 匹で腫瘍消失。腫瘍体積も有意に抑制された。
- (2) MMC 処理で CT26 の生細胞数は 2 日間で 1/80 に減少。Hoechst 染色でもクロマチン凝縮像を確認。MMC 処理直後で Annexin V 陽性の細胞が 85%、2 日後にはほぼ全ての細胞が Annexin V 陽性であった。臨床上有効とされる 0.1  $\mu$ g/ml の濃度で 36% の細胞が Annexin V 陽性となった。
- (3) MMC の *in vivo* 投与で腫瘍に apoptosis を惹起することが免疫組織染色で確認された。
- (4) MMC 処理 CT26 単独投与群で 8 匹中 1 匹 (12.5%) が腫瘍を拒絶したのに対し、DC 混合投与群では 13 匹中 7 匹 (53.8%) が腫瘍を拒絶。
- (5) 両群の腫瘍拒絶マウスの脾細胞の比較で、MMC 処理 CT26 単独投与群の脾細胞は *in vivo* で CT26 に反応して 14.4pg/ml の INF- $\gamma$  を産生し、CTL 活性は 1.37% であったのに対し、DC を共に投与した群では、INF- $\gamma$  産生が 50.7pg/ml、CTL 活性が 36.38% と共に高い値を示した。

(6) MMC+DC 投与群は MMC+PBS 投与群に比べ、優位に腫瘍の増殖を抑制した。

[結論]

MMCが *in vitro* & *in vivo* でCT26に対し apoptosisを誘導することを確認し、MMC処理したCT26と骨髄由来DCを混合投与することにより、CT26に対し protection immunityを認め、この免疫マウスより効率的にCTLを誘導できた。さらに担癌マウスでの少量MMCとDCの併用治療群で有意の腫瘍増殖抑制が得られることから、抗癌剤によるapoptosis誘導と樹状細胞併用による免疫化学療法の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は抗癌剤に樹状細胞療法を併用することで癌増殖抑制効果が増強するか否かを検討した。

CT26 (マウス大腸癌細胞株) 担癌BALB/cマウスへの mitomycin C (MMC) 腹腔内投与 (2 mg/kg, 3回) で腫瘍増殖が抑制された。MMCは *in vitro*, *in vivo* でCT26にapoptosisを惹起した。*In vitro* でMMC処理したCT26単独投与群 (CT26-MMC) に比し、CT26-MMC+DC投与群のマウスは有意に (P=0.016) 腫瘍拒絶率が高く、強い細胞傷害性T細胞活性を示した。DCがapoptosis細胞を貪食し抗原提示することで protection immunityが *in vivo* で誘導できる可能性が示唆された。

臨床的モデルとしてCT26担癌マウスにMMCを腹腔内投与 (2 mg/kg, 1回) し2, 9日後にDCを腫瘍近傍に接種すると、PBS接種に比し有意に (P<0.01) 腫瘍増殖を抑制した。少量MMCとDC併用治療で強い腫瘍増殖抑制が得られたことから、抗癌剤と樹状細胞併用による免疫化学療法の臨床応用の可能性が示唆された。

以上の研究は癌治療における細胞性免疫関与の解明に貢献し、癌に対する免疫化学療法の発展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15年12月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。