

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                       |     |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 博士（ 医 学 ）                                                                                                                                                                                                             | 氏 名 | 宮 本 和 恵 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Optimal stimulation for CD70 induction on human monocyte-derived dendritic cells and the importance of CD70 in naïve CD4+ T cell differentiation<br>（ヒト単球由来樹状細胞に CD70 の高発現を誘導する条件と、ナイーヴ CD4 陽性 T 細胞の分化における CD70 の重要性） |     |         |
| （論文内容の要旨）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                       |     |         |
| <p>ヒト単球由来樹状細胞（Monocyte-derived dendritic cell; MoDC）は癌に対する DC ワクチン療法に頻用されることから、その最適化は臨床的に重要な課題である。TNF ファミリー分子 CD70 は、T 細胞上の CD27 に活性化シグナルを送る重要な共刺激分子である。とりわけ、CD27 は他の TNF レセプターファミリー分子と異なり、ナイーヴ T 細胞にも発現することから、T 細胞の一次反応の増強に機能すると考えられる。また、マウス DC 上の CD70 はそれ単独で免疫寛容を免疫誘導へ転換させ、抗腫瘍免疫反応を誘発することが報告されている。したがって、（１）どのような培養条件によってヒト MoDC 上に CD70 が高発現するか、（２）ヒト MoDC の刺激によるナイーヴ T 細胞の活性化において、CD70-CD27 シグナルがどのような役割を果たすかを明らかにすることが、MoDC を用いた癌免疫療法の成績向上に有用と期待される。したがって、上記の２点を明らかにするために本研究を行った。</p> <p>単球から DC を誘導する際の培養条件には、</p> <p>① 未熟 DC を誘導するために GM-CSF とともに添加する基本サイトカインの種類 --- IL-4、IFN-α、TNF-α、IL-15</p> <p>② 未熟 DC を誘導するための培養期間 --- 短期間（３日間）、標準期間（７日間）</p> <p>③ 成熟刺激因子の種類 --- Toll-like receptor リガンド、CD40 リガンド、プロスタグランジン(PG)E<sub>2</sub></p> <p>④ 培地の組成 --- ウシ血清添加培地、無血清培地の４つのパラメータがある。これらのうち、</p> <p>① IFN-α</p> <p>② ３日間</p> <p>③ TNF-α、IL-1β, PGE<sub>2</sub> の混合物</p> <p>④ 無血清培地 CellGro®DC</p> <p>の組合せが最も強く CD70 を誘導した。とりわけ、IFN-αで誘導した未熟 DC（IFN-DC）は、他の未熟 DC と異なり、いずれの成熟刺激によっても CD70 を発現したことから、MoDC 上に CD70 を誘導する最も重要な基本サイトカインである。</p> <p>また、MoDC でナイーヴ CD4<sup>+</sup>または CD8<sup>+</sup> T 細胞を刺激すると、いずれの T 細胞も活性化後 CD70 を発現した。</p> <p>次に、MoDC と同種ナイーヴ CD4<sup>+</sup> T 細胞の共培養系に抗 CD70 阻害抗体を添加したところ、T 細胞による Th1 サイトカイン、Th2 サイトカイン、TNF-α の産生が抑制される一方、免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生は逆に増強した。また、MoDC 上の CD70 の発現レベルにかかわらず、抗 CD70 抗体によってサイトカイン産生が抑制された。したがって、DC 上に発現している</p> |                                                                                                                                                                                                                       |     |         |

|                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD70 のみならず、培養中に T 細胞上に誘導される CD70 もナイーヴ CD4 <sup>+</sup> T 細胞上の CD27 にシグナルを伝達し、T 細胞に広汎な免疫活性化能を付与すると考えられた。                                                                                                                                               |
| 一方、MoDC と同種ナイーヴ CD8 <sup>+</sup> T 細胞の共培養系に抗 CD70 抗体を添加しても、T 細胞による IFN- $\gamma$ 産生とグランザイム B の発現は抑制されなかった。したがって、MoDC の刺激を受けたナイーヴ CD8+ T 細胞の機能獲得に CD27 シグナルは必要ではなく、他のシグナルが補完すると考えられた。                                                                   |
| 以上より、本研究によって、多機能なサイトカインである IFN- $\alpha$ に、MoDC 上への CD70 の誘導という新たな機能が加えられた。また、ヒト MoDC によるナイーヴ T 細胞の活性化において、CD27 シグナルは CD8 <sup>+</sup> T 細胞よりも CD4 <sup>+</sup> T 細胞の免疫活性化能獲得に重要な役割を果たすと考えられた。本研究から、MoDC を用いた癌免疫療法において、CD27 シグナルが免疫反応の増強に寄与することが示唆される。 |
|                                                                                                                                                                                                                                                        |
| (論文審査の結果の要旨)                                                                                                                                                                                                                                           |
| マウス DC 上の CD70 は単独で免疫寛容を免疫誘導へ転換させ、抗腫瘍免疫反応を誘導することが報告されている。したがって、① 癌に対する DC ワクチン療法に頻用されるヒト単球由来樹状細胞 (MoDC) 上に CD70 の高発現を誘導する条件と、② ヒト MoDC の刺激によるナイーヴ T 細胞の活性化における CD70-CD27 シグナルの役割を明らかにする為、本研究を行った。                                                      |
| ①では、単球から CD70 陽性 DC を誘導する最適な培養条件をフローサイトメトリーにて検討し、IFN- $\alpha$ があらゆる種類の成熟刺激との組み合わせで、MoDC 上に C D 70 を最も強く誘導する重要な基本サイトカインであることを示した。                                                                                                                      |
| ②では、MoDC と同種ナイーヴ CD4+ T 細胞の共培養系に抗 CD70 阻害抗体を添加したところ、T細胞による Th1/Th2 サイトカイン、TNF- $\alpha$ の産生が抑制される一方、免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生は逆に増強した。しかし、ナイーヴ CD8+ T 細胞では IFN- $\gamma$ 産生とグランザイム B の発現は抑制されなかった。                                                       |
| 以上の研究は、多機能なサイトカインである IFN- $\alpha$ に MoDC 上への CD70 の誘導という新たな機能を加えるとともに、MoDC の刺激を受けたナイーヴ CD4+ T 細胞の活性化における CD70-CD27 シグナルの重要性を明らかにするものであり、樹状細胞の機能増強法の最適化とその癌免疫療法への応用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 22 年 3 月 29 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。                                                                                                                                                                                       |
|                                                                                                                                                                                                                                                        |

要旨公開可能日：                      年                      月                      日 以降