

# 論文内容要旨

## 論文題目

Vaccination with hybrid cells and co-cultured cells of different dendritic cells and cancer cells prevents hepatic colonization of murine colonic cancer in different degrees

異なる樹状細胞と癌細胞の融合細胞および共培養細胞はマウス大腸癌の肝臓へのコロニー形成を各々抑制する

責任講座： 病理学第一 講座

氏 名： 中澤 雄一

## [内容要旨]

目的：樹状細胞は生体内における主要な抗原提示細胞であり、樹状細胞を用いた悪性腫瘍に対する様々な免疫療法が広く行われている。一方、樹状細胞にはその表面マーカーの発現により、複数のサブタイプが報告されている。マウスでは、骨髄系樹状細胞 (mDC)、CD8 陽性樹状細胞 (CD8<sup>+</sup> DC)、形質細胞様樹状細胞 (pDC) の存在が報告されており、マウスモデルを利用した免疫療法の研究には骨髄系樹状細胞が利用されている。この研究では、異なるマウス樹状細胞 (mDC, CD8<sup>+</sup> DC, pDC) とマウス結腸癌細胞 (colon 26) の融合細胞、および共培養細胞をワクチンとして用い、マウス結腸癌の肝転移モデルにおける抗腫瘍効果を検討した。

方法：マウス (BALB/c, female) 骨髄から培養した mDC、脾臓から分離した CD8<sup>+</sup> DC, pDC を、それぞれ colon 26 細胞と融合および共培養した。マウスに2週間の間隔において融合細胞および共培養細胞を2回腹腔内投与し、さらに1週間後に脾臓から colon 26 を注入後、癌性腹膜炎をさけるため、脾臓を摘出した。2週間後にマウスの肝臓を摘出し肝表面の結節数を確認し、検討を行った。融合および共培養に用いる樹状細胞を、それぞれの樹状細胞の非活性型、活性型に分けて検討し、コントロールにはリン酸緩衝液を腹腔内投与したマウスを用いた。また、それぞれの融合細胞を2回腹腔内投与したマウスの脾細胞を用い、colon 26 に対する細胞傷害活性を測定した。

結果：コントロール群のすべてのマウス (n=10) は肝臓に多発性の結節を伴っていた。非活性型 (n=5)、活性型 (n=5) mDC を融合に用いたマウスでは全てのマウスで肝臓に結節は認められなかった (p<0.01)。非活性型 (n=3)、活性型 (n=6) mDC を腫瘍細胞と共培養したマウスでは、それぞれ3匹、2匹の肝臓に結節を認めたが、結節の数はいずれもコントロールのマウスと比べて少なかった (活性型: p<0.01)。非活性型 (n=6) CD8<sup>+</sup> DC を融合に用いたマウスでは全てのマウスで肝臓に腫瘍は形成されず、活性型 (n=8) を用いた群では4匹が肝臓に腫瘍を形成していたが、結節の数はコントロール群と比べて有意に少なかった (p<0.01)。非活性型 (n=2) CD8<sup>+</sup> DC および活性型 (n=2) CD8<sup>+</sup> DC を共培養した群では、いずれも肝臓に腫瘍は認められなかった。非活性型 (n=6) pDC を融合に用いたマウスでは3匹に、活性型 (n=5) では1匹に肝臓に腫瘍の形成を認めたが、いずれの群もコントロールと比較して有意に肝臓での腫瘍の形成が抑制された (非活性型: p<0.05, 活性型: p<0.01)。非活性型 (n=4) pDC を共培養に用いたマウスでは1匹に肝臓に腫瘍の腫瘍を認めたが、活性型 (n=3) では肝臓に腫瘍の形成を認めなかった (非活性型: p<0.01)。融合細胞を腹腔内投与したマウスの脾細胞の colon 26 に対する細胞傷害活性は、非活性型、活性型 mDC を融合に用いたマウスで誘導されたが、それら以外のマウスでは誘導されなかった。細胞傷害活性の測定には、リンパ節からの十分な数のリンパ球の分離が困難なため、マウスの脾細胞を用いており、この実験系における厳密な抗腫瘍効果を反映するものではないが、mDC と colon 26 の融合細胞を投与したマウスの脾細胞のみが細胞傷害活性を示した点から、CD8<sup>+</sup> DC, pDC の融合細胞における抗腫瘍効果は、mDC による機序と異なると考えられた。その機序を解明するため、細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞に発現するグランザイム B の発現について、それぞれの樹状細胞および融合細胞で検討した。mDC とその融合細胞ではグランザイム B の発現が認められなかったが、CD8<sup>+</sup> DC, pDC とそれらの融合細胞はグランザイム B を発現していた。

考察：mDC と colon 26 の融合細胞は効果的にマウスにおける肝臓の腫瘍形成を抑制した。CD8<sup>+</sup> DC, pDC においては実験数が少ないものの、共培養細胞は融合細胞と比較し、効果的にマウスにおける肝臓の腫瘍形成を抑制した。CD8<sup>+</sup> DC, pDC の抗腫瘍効果については十分な裏付けが必要であるが、この実験結果から mDC と異なる抗原提示の機序が存在している可能性が考えられた。CD8<sup>+</sup> DC と pDC におけるグランザイム B の発現から、CD8<sup>+</sup> DC と pDC は腫瘍細胞を直接傷害する能力をもつことが、その機序に関与している可能性が示唆された。

平成 18 年 1 月 23 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名 中澤 雄一

論文題目 Vaccination with hybrid cells and co-cultured cells of different dendritic cells and cancer cells prevents hepatic colonization of murine colonic cancer in different degrees

異なる樹状細胞と癌細胞の融合細胞および共培養細胞はマウス大腸癌の肝臓へのコロニー形成を各々抑制する

審査委員：主審査委員

木村 理



副審査委員

本郷 誠治



副審査委員

富田 孝彦



審査終了日：平成 18 年 1 月 4 日

樹状細胞は生体内における主要な抗原提示細胞であり、樹状細胞を用いた悪性腫瘍に対する様々な免疫療法が広く行われている。マウス樹状細胞にはその表面マーカーの発現により、骨髄系樹状細胞 (mDC)、CD8 陽性樹状細胞 (CD8<sup>+</sup> DC)、形質細胞様樹状細胞 (pDC) の存在が報告されている。

申請者らは、異なるマウス樹状細胞 (mDC, CD8<sup>+</sup> DC, pDC) とマウス結腸癌細胞 (colon 26) の融合細胞、および共培養細胞をワクチンとして用い、マウス結腸癌の肝転移モデルにおける抗腫瘍効果を検討した。

方法：マウス (BALB/c, female) 骨髄から培養した mDC、脾臓から分離した CD8<sup>+</sup> DC, pDC を、それぞれ colon 26 細胞と融合および共培養した。マウスに 2 週間の間隔をおいて融合細胞および共培養細胞を 2 回腹腔内投与し、さらに 1 週間後に脾臓から colon 26 を注入後、癌性腹膜炎をさけるため、脾臓を摘出した。2 週間後にマウスの肝臓を摘出し肝表面の結節数を確認し、検討を行った。融合および共培養に用いる樹状細胞を、それぞれの樹状細胞の非活性型、活性型に分けて検討し、コントロールにはリン酸緩衝液を腹腔内投与したマウスを用いた。また、それぞれの融合細胞を 2 回腹腔内投与したマウスの脾細胞を用い、colon 26 に対する細胞傷害活性を測定した。

結果：コントロール群のすべてのマウス (n=10) は肝臓に多発性の節を伴っていた。非活性型 (n=5)、活性型 (n=5) mDC を融合に用いたマウスでは全てのマウスで肝臓に結節は認められなかった (p < 0.01)。非活性型 (n=3)、活性型 (n=6) mDC を腫瘍細胞と共培養したマウスでは、それぞれ 3 匹、2 匹の肝臓に結節を認めたが、結節の数はいずれもコントロールのマウスと比べて少なかった (活性型: p < 0.01)。非活性型 (n=6) CD8<sup>+</sup> DC を融合に用いたマウスでは全てのマウスで肝臓に腫瘍は形成されず、活性型 (n=8) を用いた群では 4 匹が肝臓に腫瘍を形成していたが、結節の数はコントロール群と比べて有意に少なかった (p < 0.01)。非活性型 (n=2) CD8<sup>+</sup> DC および活性型 (n=2) CD8<sup>+</sup> DC を共培養した群では、いずれも肝臓に腫瘍は認められなかった。非活性型 (n=6) pDC を融合に用いたマウスでは 3 匹に、活性型 (n=5) では 1 匹に肝臓に腫瘍の形成を認めたが、いずれの群もコントロールと比較して有意に肝臓での腫瘍の形成が抑制された (非活性型: p < 0.05, 活性型: p < 0.01)。非活性型 (n=4) pDC を共培養に用いたマウスでは 1 匹に肝臓に腫瘍の形成を認めたが、活性型 (n=3) では肝臓に腫瘍の形成を認めなかった (非活性型: p < 0.01)。融合細胞を腹腔内投与したマウスの脾細胞の colon 26 に対する細胞傷害活性は、非活性型、活性型 mDC を融合に用いたマウスで誘導されたが、それら以外のマウスでは誘導されなかった。細胞傷害活性の測定には、リンパ節からの十分な数のリンパ球の分離が困難なため、マウスの脾細胞を用いており、この実験系における厳密な抗腫瘍効果を反映するものではないが、mDC と colon 26 の融合細胞を投与したマウスの脾細胞のみが細胞傷害活性を示した点から、CD8<sup>+</sup> DC, pDC の融合細胞における抗腫瘍効果は、mDC による機序と異なると考えられた。その機序を解明するため、細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞に発現するグランザイム B の発現について、それぞれの樹状細胞および融合細胞で検討した。mDC とその融合細胞ではグランザイム B の発現が認められなかったが、CD8<sup>+</sup> DC, pDC とそれらの融合細胞はグランザイム B を発現していた。

考察：mDC と colon 26 の融合細胞は効果的にマウスにおける肝臓の腫瘍形成を抑制した。CD8<sup>+</sup> DC, pDC においては実験数が少ないものの、共培養細胞は融合細胞と比較し、効果的にマウスにおける肝臓の腫瘍形成を抑制した。CD8<sup>+</sup> DC, pDC の抗腫瘍効果については十分な裏付けが必要であるが、この実験結果から mDC と異なる抗原提示の機序が存在している可能性が考えられた。CD8<sup>+</sup> DC と pDC におけるグランザイム B の発現から、CD8<sup>+</sup> DC と pDC は腫瘍細胞を直接傷害する能力をもつことが、その機序に関与している可能性が示唆された。