

氏名(本籍) 長尾成敏(岐阜県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位授与番号 乙第 1333号
 学位授与日付 平成15年2月19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 Significance of mixed dendritic cell and tumor cell culture using GM-CSF and TNF- α for augmentation for activated killer cells for adoptive immunotherapy
 審査委員 (主査) 教授 佐治重豊
 (副査) 教授 高見剛 教授 森脇久隆

論文内容の要旨

担癌患者に対する養子免疫療法は、活性化リンパ球をInterleukin-2(IL-2), IL-12, interferon(IFN)などのサイトカインで刺激する組み合わせによって治療効果を向上させてきた。しかし、この環境をin vitroで再現するためには、多くの課題が残されている。ところで、近年抗原処理細胞の1つで、高い抗原提示能力を有する樹状細胞(DC)の培養・増殖方法が確立され、俄に注目を集めている。この場合、樹状細胞は抗原捕獲と抗原処理およびリンパ球への抗原提示が可能であるが、成熟段階によっては全く異なる動きを示す可能性が指摘されている。すなわち、末梢血単核球をIL-4とGM-CSF添加培地で培養・刺激して誘導された未熟樹状細胞は、腫瘍抗原を捕らえることができても細胞傷害性Tリンパ球を刺激することは困難で、DC細胞を成熟化させるためにtumor necrosis factor- α (TNF- α)などを添加する方法が用いられている。一方、強力な抗原処理細胞(APC)でもある樹状細胞は、癌養子免疫療法の新しいツールとして期待されているが、成功のためには適切な条件設定のもとで培養することが肝要で、この場合は腫瘍細胞とリンパ球との混合培養(MLTC)で誘導される活性化リンパ球の系と樹状細胞との絡みがキーポイントになる。

そこで今回、申請者らは養子免疫療法において、樹状細胞により細胞障害性リンパ球(CTL)細胞を効率的に誘導できるかを確認した上で、TNF- α 添加による樹状細胞成熟への影響と樹状細胞の成熟化がCTL誘導にもたらす影響を検索した。さらに、最も効率的に抗原捕獲とプロセッシングを行う方法として、どの成熟段階の樹状細胞と腫瘍細胞をパルスさせるのかを、各成熟過程のDCと抗原で刺激したTリンパ球の細胞傷害作用から推察・評価した。

研究対象と研究方法

樹状細胞の培養法：健康人末梢血単核球を1時間培養後、非付着細胞を除去し12時間前培養後、harvestして得られた単核球をGM-CSF (50ng/ml)とIL-4 (100ng/ml)添加培地で培養刺激して未熟樹状細胞(DC)を誘導し、以下の実験に供した。

実験1：抗癌剤処理した不活化胃癌細胞株MKN45とリンパ球をMLTCし、活性化リンパ球を誘導する系に、上記樹状細胞を添加刺激した場合の活性化リンパ球の傷害活性増強度を ^{51}Cr release assayにて測定した。

実験2：樹状細胞をTNF- α (50ng/ml)添加培地で培養・刺激した場合の、樹状細胞の成熟化を検索した。また、TNF- α による樹状細胞の成熟化はフローサイトメトリーにてCD83マーカー発現程度から確認した。さらに、成熟樹状細胞をMKN45とリンパ球で混合培養し、同様に傷害活性の増強程度を検索した。

実験3：DCに腫瘍細胞を混合する最も効果的なタイミングを決定するため、①TNF- α 添加前、②TNF- α 添加直後、③成熟化したDCと癌細胞とPBMCsの混合培養時の3群を作製し検討した。なお、対照群として④DCなし群、⑤PBMCsのみの2群、計5群を設定した。本実験では活性化リンパ球培養時にPHA刺激PBMCから産

生されたサイトカイン含有培養上清を添加しcludeなサイトカイン環境下で培養した。

検討項目：5群の各群で(1)細胞数増加程度，(2)Pheno type，(3)サイトカイン産生能，(4)標的細胞，MKN45(auto)，MKN28(hetero)，Daudy(LAK活性)，K562(NK活性)細胞に対する細胞傷害活性，を測定した。

研究結果

実験1：樹状細胞の添加によりautoのMKN45に対する傷害活性は増強される傾向にあったが，有意差はみられなかった。

実験2：樹状細胞をTNF- α 添加培地で培養すると，CD83陽性細胞比率が増加し，樹状細胞の成熟化が確認された。また，この成熟樹状細胞を添加した活性化リンパ球の細胞傷害活性は，非添加群に比べ増強効果を示した。

実験3：樹状細胞の抗原捕獲と処理，提示能が異なった成熟段階で発現されることから，MKN45と樹状細胞との混合培養時期を種々想定し比較検討した結果，①TNF- α 添加前，すなわち未熟な樹状細胞と混合培養したのち樹状細胞にTNF- α を加えて成熟化させた群が，細胞数の増加，サイトカイン産生量，傷害活性がより効果的に誘導されていた。また，K562に対する傷害活性（NK活性）の増強が観察されたことから，樹状細胞は腫瘍特異的な傷害活性を獲得したリンパ球の誘導とNK活性を増強させる能力を有するなど多彩な機能の存在が示唆された。

考察と結語

癌の治療成績は外科手術，化学療法，放射線療法の進歩により向上をみているが，これらに代わる新しい治療法の開発も望まれている。癌免疫療法はこれらに続く第4の治療法として期待されたが，現時点ではその地位を獲得したとは言い難い。一方近年，サイトカインが遺伝子組み替え技術により量産可能となり，多彩な機能を持った免疫細胞が同定，誘導されるようになり，あらたな展開を迎えている。教室でも従前の養子免疫療法に，抗原提示細胞である樹状細胞を添加することで，より効率的な抗腫瘍効果増強策を試みている。本研究で，未成熟段階の樹状細胞に腫瘍細胞をパルス後，TNF- α を加えて樹状細胞を成熟化させ，その後リンパ球に加えて培養する方法が，より高い細胞傷害活性を獲得した活性化リンパ球を誘導できる可能性が高いことが確認された。また，樹状細胞は抗原提示細胞として用いたが，先の結果で示したごとく樹状細胞には腫瘍特異的な傷害活性を有するリンパ球群の増強のみではなく，NK活性をも増強する可能性が示唆された。この効果が，樹状細胞の直接的な作用によるのか，複雑に絡み合ったサイトカインネットワークによる総合的なものかは今後の検討が必要であるが，樹状細胞は養子免疫療法分野において，多彩で有用な作用を発揮できる細胞と推察された。

論文審査の結果の要旨

申請者 長尾成敏は，癌の養子免疫療法における活性化リンパ球増強のために，樹状細胞の有用性を種々検討し，付着性単核球からIL-4とGM-CSFで誘導された未成熟段階の樹状細胞に腫瘍細胞を接触させた後，TNF- α で成熟化させ，リンパ球にパルスすることで，より強力な活性化リンパ球が誘導されることを明らかにした。この研究の成果は癌免疫療法の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Significance of mixed dendritic cell and tumor cell culture using GM-CSF and TNF- α for augmentation for activated killer cells for adoptive immunotherapy

Biotherapy 16 (6) : 612-622, 2002