

|          |   |
|----------|---|
| 氏名       | まつもとさちこ<br>松本幸子   |
| 学位の種類    | 博士(生命科学)  |
| 学位記番号    | 乙第14号   |
| 学位授与年月日  | 平成17年 7月25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   | Allogeneic gastric cancer cell-dendritic cell hybrids induce tumor antigen (carcinoembryonic antigen) specific CD8+ T cells<br>(胃癌細胞株と樹状細胞の融合細胞による腫瘍抗原特異的細胞障害性 CD8+T リンパ球の誘導) |
| 学位論文審査委員 | (主査) 林 真 一<br>(副査) 清水英治 池口正英  |

## 学位論文の内容の要旨

強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cell: DC) が生体外でサイトカインを用いて単球から培養可能であることが 1990 年代はじめに報告されて以来、DC を用いた腫瘍抗原特異的免疫治療の試みがさかんに行われている。同時に腫瘍抗原に関する研究も多く行われ、免疫原性の高い悪性黒色腫ではいくつかの腫瘍抗原 (MAGE3, MART-1, gp100 など) が同定され、これらの抗原ペプチドを DC に負荷して臨床応用が試みられ、実際に腫瘍抗原特異的細胞障害性 CD8+T リンパ球 (CTL) の誘導に成功している。一方、この方法では患者個々の HLA タイプによるペプチドの利用の制限や腫瘍関連抗原を同定する必要性など様々な問題がある。この問題を解決するために腫瘍細胞そのものを抗原として使用することが試みられている。最近の報告では DC と腫瘍細胞の融合細胞の有用性が腎癌や乳癌などで報告されている。そこで今回われわれは、免疫原性の低い腫瘍である胃癌に対して DC 免疫療法を行うために胃癌細胞株 (MKN-45) と DC の融合細胞を作製し、この融合細胞を用いて腫瘍抗原特異的 CTL が誘導可能かどうか検討した。

### 方法

#### 1. 腫瘍細胞とDCの融合細胞

DC は HLA-A24 陽性の健常成人より得た末梢血単核球 (PBMC) から成熟型 DC を誘導した。腫瘍細胞は胃癌細胞株 (MKN45) を使用した。DC との細胞融合は電気的融合法とポリエチレングリコール (PEG) 法を併用して行った。

#### 2. CTLの誘導

CD8+T リンパ球はPBMC から磁気ビーズを用いて分離した。この CD8+T リンパ球を融合細胞で週に 1 回、計 3 回刺激し、CTL を誘導した。腫瘍抗原特異的 CTL の存在は HLA テトラマー（抗原ペプチド/HLA 複合体の四量体）染色、Elispot 法、<sup>51</sup>Cr 遊離法にて解析した。

## 結 果

### 1. MKN-45 と DC の融合細胞の作製

電気的融合法と PEG 法との併用により約 20% の融合細胞を常時得ることが可能であった。フローサイトメーター解析では融合細胞には DC と MKN-45 の両表面分子の発現が認められた。またこの融合細胞は同種 CD4+T リンパ球の増殖を誘導できることから、抗原提示細胞としての機能が確認された。

### 2. 融合細胞による腫瘍抗原特異的 CTL の誘導

MKN-45 と DC の融合細胞によって CD8+T リンパ球を刺激して CTL を誘導した。誘導された CTL は MKN-45 に対して高い細胞障害活性を示した。さらにこの CTL は他の胃癌細胞株である MKN-1 に対しても細胞障害活性を示すことから、なんらかの胃癌特異的腫瘍抗原を認識している可能性が示唆された。また、この細胞障害活性は抗 MHC クラス I 抗体によって抑制されることからクラス I 拘束性であることが確認された。さらに、MKN-45 が発現する癌胎児抗原 (carcinoembryonic antigen ; CEA) も認識出来ることが CEA ペプチドを標的とした Elispot 法、<sup>51</sup>Cr 遊離法および CEA/HLA-A24 テトラマーを用いたフローサイトメーター解析で確認された。

## 考 察

悪性腫瘍の治療に免疫治療を行う試みはこれまでも多くなされており、実際に免疫原性の高い腫瘍である悪性黒色腫では、その有効性が報告されている。一方で、免疫原性の低い多くの悪性腫瘍（乳癌、肺癌、消化器癌など）に対して免疫治療が有用な治療となり得るかどうかは依然不明である。この点に関して Disis らは Her2 陽性乳癌患者において Her2 に対する細胞性および液性免疫が誘導されていることを明らかにした。さらに乳癌や卵巣癌患者に見られる PCD (paraneoplastic cerebellar degeneration) は腫瘍細胞が発現する cdr2 に対して誘導された CTL によって同じく cdr2 を発現する脳細胞が破壊されることにより発症することが示された。これらの事実は、たとえ免疫原性の低い腫瘍に対しても免疫が誘導されることを示したものであり、免疫治療の可能性を示すデータと考えられる。

今回の検討では融合細胞をつくる方法として PEG 法と電気的融合法を併用するという新しい方法を用いたが、実際に従来のもものと比較し、より多くの融合細胞が得られた。さらにこの融合細胞を用いて腫瘍抗原特異的 CTL を誘導することに成功した。今回我々は日本で患者の多い胃癌に注目し、胃癌細胞株を用いて検討を行ったが、我々が知りうる範囲では、これは胃癌に対して融合細胞を用いて腫瘍抗原特異的 CTL を誘導できることを示した最初の報告である。

## 結 論

DCと腫瘍細胞の融合細胞は腫瘍特異的 CTL を誘導できることが示され、胃癌患者に対する新しい治療方法として胃癌細胞株と DC の融合細胞を用いた免疫治療の有用性が示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は免疫原性の低い腫瘍である胃癌に対して DC 免疫療法を行うために胃癌細胞株 MKN-45 と DC の融合細胞を作製し、この融合細胞が誘導する CTL について検討したものである。その結果、作製した融合細胞には DC と MKN-45 の両表面分子の発現、抗原提示細胞としての機能が確認され、さらにこの融合細胞を用いて腫瘍抗原特異的 CTL を誘導できることが判明した。本論文の内容は、胃癌患者に対する新しい治療方法として胃癌細胞株と DC の融合細胞を用いた免疫治療の有用性を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認められる。