

審査の結果の要旨

氏名 松本 明彦

本研究は、第一部で進行性腎細胞癌患者に対して樹状細胞を用いた腫瘍特異的免疫療法を行うことで、安全性の確認と抗腫瘍効果を得ることを目的として行ったものと、第二部でヒト樹状細胞に発現する Notch リガンドの変化を観察することで末梢性免疫応答との関与について解析することを目的にして行ったものであり、下記の結果を得ている。

(第一部)

1. 進行性腎細胞癌患者に対して試験を行い、患者 1~3 ともフローサイトメトリーによる解析で 95%以上の細胞は CD80、CD83、CD86、CCR7 が強度陽性となり、成熟 DC への分化を確認した。なお投与時の細胞液の細菌および真菌培養検査はすべて陰性であり、エンドトキシン濃度は測定限界以下であった。有害事象は皮内投与部位の軽度発赤のみで、NCI-CTC の grade 3~5 に該当する所見はなかった。
2. 臨床評価では、患者 1 は癌性リンパ管症による腫瘍関連死となり PD と判定した。患者 2 は肺転移が増大傾向となり、新たに腰椎への骨転移を認め PD と判定した。患者 3 は評価対象部位の肺転移に変化なく SD と判定した。
3. 免疫学的評価では、DTH 法は患者 2 においては KLH のみで 4~16 週間後まで陽性所見を認めた。患者 3 においては KLH および腫瘍抽出蛋白で 4~16 週間後まで陽性所見を認めた。さらに同上の患者で ELISpot 法を施行したが、2 症例とも末梢血単核球中の IFN- γ 産生細胞数の有意な増加を認めなかった。

(第二部)

1. ヒト Notch リガンド導入 CHO(r)細胞のそれぞれの発現量をフローサイトメトリーで解析し、いずれも発現良好なクローン細胞を樹立した。これらの細胞に対してヒト Notch リガンド抗体が特異的な抗体反応を示すことを確認した。
2. Notch リガンド抗体によるフローサイトメトリー解析により、ヒト単球では Delta1、Jagged1 および Jagged2 が発現していた。未熟 DC では Jagged1 のみが発現し、Delta1 および Jagged2 の発現は消失した。成熟 DC では Jagged1 の発現が未熟 DC の発現より減弱した。

3. 成熟 DC に可溶性ヒト CD40 リガンドまたはヒト CD40 リガンド発現 U251 細胞を用いる 2 種類の系とも、DC における Delta4 発現の上昇を認めた。また未熟 DC に AxCAhCD40L を感染させた場合、CD40 リガンド、CD83 および Delta4 発現の上昇が確認され、Jagged1 発現の変化は認められなかった。
4. ヒト未熟 DC に対してヒト Delta4 の刺激を行うことで DC の成熟化マーカーである CD83 発現の上昇や、共刺激分子である CD86 発現の増強を確認した。またヒト未熟 DC をサイトカインにより成熟化させる際に、ヒト Delta4 の刺激を行うことで、DC の Delta4 発現が上昇することを確認した。
5. ヒト CD8T リンパ球を CD3 抗体で刺激することでその 90%以上で活性化マーカーの CD69 発現が陽性となり、さらに Notch2 発現の増強が確認された。
6. MAPPER による解析により Delta4 の上流 500bp からエクソン 1 までの配列において、NF-κB ファミリーである p50 と 4ヶ所、p65 と 3ヶ所、c-Rel と 2ヶ所での結合が予測された。ヒト未熟 DC に対して AxCAhCD40L の感染により発現した Delta4 が、SC-514 を添加した場合には濃度依存性にその発現が抑制されたが、CD40L、CD83 および Jagged1 の発現には変化はなかった。

以上、本論文は第一部で進行性腎細胞癌患者に対して樹状細胞を用いた免疫細胞療法を行うことにより、安全性を確認することができ、免疫学的解析において抗腫瘍効果を確認することができた。このことから樹状細胞の作製方法やプロトコールの更なる改良を行うことで、臨床効果を期待できると考えられる。また第二部でヒト樹状細胞における Notch リガンドの発現変化を TNF- α , IL-1 β , PGE2 や CD40 リガンドによる刺激により蛋白レベルで確認し、その他の結果からも Notch シグナルが末梢性免疫応答の制御に関与することが考えられる。特に CD40 リガンドの刺激により活性化された DC は強力な Th1 誘導能を有するが、その際に Delt4 を発現することが確認されたことから、悪性腫瘍に対しての免疫細胞療法を検討する上でも重要な結果と推察され、学位の授与に値するものと考えられる。