

審査の結果の要旨

氏名 米山 さとみ

本研究は、癌の増殖・転移に必要不可欠である新生血管を標的とした免疫療法の開発を目的とし、まず最初にマウスの大腸癌モデルを用いて検討を行った。すなわち、腫瘍血管内皮細胞を標的とした樹状細胞ワクチンを作製し、同ワクチン投与による抗腫瘍効果の有無、及びその免疫機序の解析を行った。次いで、ヒト内皮細胞－樹状細胞ワクチンを作製し、*in vitro*にて抗腫瘍効果の機序を検討した。それぞれの検討において、下記の結果を得ている。

1. マウス大腸癌移植モデルを作製し、投与するワクチンの種類によって次の 5 群に分けて検討した。すなわち、①同種（マウス）内皮細胞である HSE の抽出抗原を提示した樹状細胞ワクチン投与群（HSE-DC）、②異種（ヒト）内皮細胞である HUVEC の抽出抗原を提示した樹状細胞ワクチン投与群（HUVEC-DC）、③マウス線維芽細胞である 3T3 の抽出抗原を提示した樹状細胞ワクチン投与群（3T3-DC、コントロール 1）、④抗原提示しない樹状細胞ワクチン投与群（DC、コントロール 2）、⑤PBS のみ投与群（PBS、コントロール 3）とした。また、それぞれのワクチンの投与時期によって、予防プロトコール（ワクチンを投与した後に大腸癌細胞（Colon-26）をマウスに移植）、または、治療プロトコール（Colon-26 をマウスに移植した後にワクチンを投与）に従ってワクチンを投与し、抗腫瘍効果を検討した。予防プロトコールは、マウス皮下腫瘍モデルで検討したが、HSE-DC 群、HUVEC-DC 群において、マウス大腸癌の皮下腫瘍形成及び皮下腫瘍の増大が有意に抑制された。一方、治療プロトコールは、大腸癌肺転移モデルにおいて検討したが、予防プロトコールと同様、HSE-DC 群、HUVEC-DC 群において、肺転移の抑制が認められた。
2. マウス大腸癌移植モデルにおける内皮細胞－樹状細胞ワクチンの抗腫瘍効果の機序を解明するため、細胞性免疫の誘導について、マウス脾細胞より分離した T 細胞による細胞傷害活性を検討した。HSE-DC 群、HUVEC-DC 群マウス由来の T 細胞は、それぞれの内皮細胞に対して強い細胞傷害活性を示したが、Colon-26 に対する細胞傷害活性は認めなかった。
3. 同マウスモデルにおいて、内皮細胞－樹状細胞ワクチンによる液性免疫の誘導を検討するため、マウス血清中の抗体を解析した。HSE-DC 群、HUVEC-DC 群のマウス血清中に、内皮細胞の膜蛋白に反応性を示す抗体を認めた。また、内皮細胞に対する補体依存性の強い細胞傷害活性を示したが、Colon-26 に対する細胞傷害活性は認めなかった。
4. 次いで、初期免疫に関与する NK 細胞について検討したところ、HSE-DC 群、HUVEC-DC 群の NK 細胞は、内皮細胞に対して強い細胞傷害活性を示した。DC 群の NK 細胞も同様であったが、その効果は弱かった。
5. 上記、内皮細胞－樹状細胞ワクチン投与によって誘導された免疫が抗新生血管作

6. 次に、ヒト樹状細胞の内皮細胞抗原提示能について検討した。同種内皮細胞（HUVEC）抽出抗原を提示させた樹状細胞（HUVEC-DC）の表面抗原を解析したところ、抗原提示しない樹状細胞（DC）に比べ、HLA-DR、CD1a、CD40、CD80、CD83、CD86の発現増加を認めた。また、抗原提示能をMLR法にて検討したところ、HUVEC-DCはアロリンパ球の増殖を強く誘導した。
7. 内皮細胞－樹状細胞ワクチンによる細胞性免疫の誘導について、*in vitro*にて解析した。内皮細胞－樹状細胞ワクチンとヒト末梢血由来の単核球を共培養して得たT細胞の細胞傷害活性を検討した。内皮細胞抗原提示樹状細胞（HUVEC-DC群）が誘導したT細胞は、同種内皮細胞に対して強い細胞傷害活性を示したが、Colon-26に対する細胞傷害活性を認めなかった。また、DCのみ（DC群）にて誘導されたT細胞は、内皮細胞、大腸癌のいずれに対しても細胞傷害活性を示さなかった。さらに、HUVEC-DC群のCD8<sup>+</sup>T細胞の割合は、DC群よりも増加していた。
8. HUVEC-DC群のCD8<sup>+</sup>T細胞が産生するサイトカインを測定すると、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6の産生が増加していた。主にType1サイトカインの産生を誘導することから、細胞傷害活性の結果と同様、細胞性免疫が主に誘導されていると考えられた。
9. NK細胞の活性を検討したところ、HUVEC-DC群のNK細胞は、DC群に比較し、内皮細胞及び大腸癌細胞に対してより強い細胞傷害活性を示した。また、NK細胞の表面抗原であるCD56も高発現しており、NK細胞の活性化が確認された。

以上、本論文はマウスモデルにおいて、内皮細胞抽出抗原を提示した樹状細胞ワクチンが、内皮細胞を傷害するT細胞及び特異的な抗体産生を誘導し、また、NK細胞を活性化することにより、大腸癌の皮下腫瘍増殖や肺転移形成に対して抑制的に作用することを確認した。また、ヒト樹状細胞もマウス同様に同種内皮細胞抗原を提示し、内皮細胞を傷害するT細胞を誘導し得ることを確認した。本研究は、最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞を用いて、腫瘍の増殖・転移に必須とされる新生血管を標的とした免疫療法の開発に関する研究であり、本分野において重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。