

学位論文題名

Vaccination of fusion cells of rat dendritic  
and carcinoma cells prevents tumor growth *in vivo*

(ラット樹状細胞と癌細胞との融合細胞の  
ワクチン投与による生体での腫瘍増殖の抑制)

学位論文内容の要旨

目的

現在、日本人の死亡原因の一位は悪性新生物であるが、多くの悪性新生物では必ずしも決定的と言える治療法は見つかっていない。そこで手術療法、化学療法、放射線療法といった既存の治療法に加え、免疫療法など新しい治療法の確立が強く求められており、近年、免疫療法のうち特に樹状細胞を利用した細胞療法の研究が盛んに進められている。今後、樹状細胞の機能解析、分離培養技術の進歩および癌抗原の同定に伴って、樹状細胞を用いた治療は、ますます重要な役割を果たしていくものと考えられる。樹状細胞は骨髄幹細胞に由来し、末梢で抗原を獲得した後、リンパ器官へと移動してT細胞に抗原を提示し活性化する抗原提示細胞としての強力な機能をもつ細胞である。樹状細胞を使った免疫療法には、腫瘍特異的抗原が既知の場合はその蛋白やペプチドを樹状細胞に添加する方法や抗原遺伝子を導入する方法が試みられている。一方、未知の癌特異的抗原を含む多数の抗原を標的とする場合には、可溶化した癌細胞を樹状細胞に加える方法や癌細胞の mRNA を導入する方法のほか、樹状細胞と腫瘍細胞との融合細胞を用いる方法が行われ、マウスなどの動物モデルでの有効性や最近ではヒトへの臨床応用も報告されている。

本研究では、この融合細胞を用いた免疫療法の効果やその応用について検討する目的で、ラット肝癌細胞株を用いた移植癌をモデルとして、樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を使った免疫療法効果の検討を行った。

材料と方法

6週から8週齢の雄のWKAH系ラットを用いた。樹状細胞は原田らの方法に準じてラット脾臓から分離した。癌細胞としては化学発癌WKAH系ラット肝癌細胞株KDH-8および対照には同じく化学発癌させたWKAH系ラット神経膠芽腫細胞株KEG-1を用いた。どちらも可移植性で、KDH-8はWKAH皮下に $1 \times 10^4$ 個接種すると約3週目より皮下腫瘍を形成し、約8週目で全て腫瘍死することを確認した。

細胞融合は樹状細胞とKDH-8とを等量混合し、polyethylene glycol法にて行った。7日間培養後、major histocompatibility complex (MHC) class IIをマーカーとして、magnetic cell sorting (MACS)により分離し、融合細胞として実験に用いた。融合細胞中に残存する腫瘍細胞が増殖し優位になったものについては、再度MACSを行い、MHC class II陽性細胞が15%以上のものを実験に用いた。

MACSおよびフローサイトメトリー、免疫染色、細胞傷害抑制試験には市販または供与されたマ

ウス単クロン抗体および抗血清を用いた。

融合細胞による *in vivo* での抗腫瘍効果は、マイトマイシン C で不活化した  $1 \times 10^6$  個の融合細胞をラット皮下に 2 回投与後、 $1 \times 10^4$  個の KDH-8 を皮下移植し、その腫瘍形成の有無で判定した。また、このときの腫瘍部位を組織学的、免疫組織化学的に検討した。融合細胞により腫瘍形成に抵抗性を示したラットに対しては、その効果の特異性を確認するため、KDH-8 あるいは KEG-1 の再移植を行った。免疫治療のモデルとして、KDH-8 に対する抵抗性を獲得したラットの脾細胞から分離、*in vitro* で再刺激した T 細胞を用いた養子免疫治療効果や、外科的腫瘍切除術後に融合細胞を 1 週毎に投与し、腫瘍の再発抑制効果を検討した。

T 細胞の KDH-8 に対する細胞傷害活性や特異性の検定は、上記同様の *in vitro* で再刺激した T 細胞を用いた細胞傷害試験および抗体による細胞傷害抑制試験で行った。

## 結果

*in vivo* における融合細胞のワクチン効果の検討では、control 群である樹状細胞あるいは KDH-8 のみで前処置したラットにおいて、どちらのラット群でも KDH-8 移植後約 4 週目には 100% の腫瘍形成を認めしたが、融合細胞であらかじめ免疫したラットでは 80 日後でも 26 頭中 18 頭に腫瘍形成を認めなかった。さらに、腫瘍形成を認めなかったラットへ再度 KDH-8 を移植しても、8 頭中 6 頭で腫瘍の形成が抑制された。しかし、異なる腫瘍である KEG-1 を移植した 3 頭では全てに腫瘍の形成を認めた。したがって、融合細胞のワクチン効果は腫瘍特異的であると考えられた。病理組織学的には融合細胞で免疫したラットでは、control ラットでほとんど見られない腫瘍周囲からの多数の CD8 陽性リンパ球の浸潤および腫瘍に多数の ssDNA 陽性アポトーシス死細胞を認めた。次に融合細胞の免疫により腫瘍形成に抵抗性を獲得したラット脾 T 細胞の細胞傷害性を検討すると、KDH-8 に特異的な細胞傷害活性を認めた。この細胞傷害活性は抗 CD8 および抗 class I 抗体を添加すると抑制され、腫瘍へ浸潤していたと同様の CD8 陽性リンパ球で class I 拘束性の KDH-8 特異的細胞傷害性 T 細胞であることが確認された。さらに、この KDH-8 に特異的な細胞傷害活性を有する T 細胞を腫瘍細胞と混合してラット皮下に投与すると強い腫瘍増殖抑制を認めた。また、外科的腫瘍切除後に融合細胞を接種することによって 6 頭中 5 頭で腫瘍再発を抑制できた。

## 考察

抗腫瘍免疫療法のワクチンとして樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を用いる利点は、未知の抗原に対しても対応できること、単一の抗原と異なり複数の腫瘍抗原を提示していると考えられ腫瘍細胞の変異にも対応できる可能性があること、樹状細胞に比べ比較的安定で培養できることが挙げられる。また、MHC class I および class II のほか副刺激分子を発現しており、養子免疫療法に必要な細胞傷害性 T 細胞の増殖にもそのまま使用できる。一般に融合細胞を用いた抗腫瘍免疫療法では融合細胞の高い純度が求められる傾向にあるが、今回の研究では 15% と必ずしも高い純度の融合細胞を使用していないにも関わらず腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導され、その抗腫瘍効果は発揮された。一方、今回の研究ではすでに形成された腫瘍に対しての効果は不十分であった。しかし、外科的腫瘍切除後の再発防止には融合細胞によるワクチン効果は有効であり、今回は検討していないが他の免疫療法や化学療法、放射線療法との組み合わせにより、効果的な治療法となる可能性が高く、今後の検討課題である。

## 結語

融合細胞をワクチンとして接種することにより、*in vivo* で腫瘍の増殖を抑制することができた。免

疫組織学的検討および細胞傷害試験の結果から、この抑制効果は腫瘍に対する特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導されたことによるものと考えられた。また、養子免疫療法および外科的腫瘍切除後の再発抑制治療など臨床応用への可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 卷 暹

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## Vaccination of fusion cells of rat dendritic and carcinoma cells prevents tumor growth *in vivo*

(ラット樹状細胞と癌細胞との融合細胞の  
ワクチン投与による生体での腫瘍増殖の抑制)

近年、免疫療法のうち特に樹状細胞を利用した細胞療法の研究が盛んに進められている。本研究では、この融合細胞を用いた免疫療法の効果やその応用について検討する目的で、ラット肝癌細胞株を用いた移植癌をモデルとして、樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を使った免疫療法効果の検討を行った。

*in vivo*における融合細胞のワクチン効果の検討では、control 群である樹状細胞あるいは KDH-8 のみで前処置したラットにおいて、どちらのラット群でも KDH-8 移植後約 4 週目には 100%の腫瘍形成を認めたが、融合細胞であらかじめ免疫したラットでは 80 日後でも 26 頭中 18 頭に腫瘍形成を認めなかった。さらに、腫瘍形成を認めなかったラットへ再度 KDH-8 を移植しても、8 頭中 6 頭で腫瘍の形成が抑制された。しかし、異なる腫瘍である KEG-1 を移植した 3 頭では全てに腫瘍の形成を認めた。したがって、融合細胞のワクチン効果は腫瘍特異的であると考えられた。病理組織学的には融合細胞で免疫したラットでは、control ラットでほとんど見られない腫瘍周囲からの多数の CD8 陽性リンパ球の浸潤および腫瘍に多数の ssDNA 陽性アポトーシス死細胞を認めた。次に融合細胞の免疫により腫瘍形成に抵抗性を獲得したラット脾 T 細胞の細胞傷害性を検討すると、KDH-8 に特異的な細胞傷害活性を認めた。この細胞傷害活性は抗 CD8 および抗 class I 抗体を添加すると抑制され、腫瘍へ浸潤していたと同様の CD8 陽性リンパ球で class I 拘束性の KDH-8 特異的な細胞傷害性 T 細胞であることが確認された。さらに、この KDH-8 に特異的な細胞傷害活性を有する T 細胞を腫瘍細胞と混合してラット皮下に投与すると強い腫瘍増殖抑制を認めた。また、外科的腫瘍切除後に融合細胞を接種することによって 6 頭中 5 頭で腫瘍再発を抑制できた。

抗腫瘍免疫療法のワクチンとして樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を用いる利点は、未知の抗原に対しても対応できること、単一の抗原と異なり複数の腫瘍抗原を提示していると考えられ腫瘍細胞の変異にも対応できる可能性があること、樹状細胞に比べ比較的安定で培養できることが挙げられる。また、MHC class I および class II のほか副刺激分子を発現しており、養子免疫療法に必要な細胞傷害性 T 細胞の増殖にもそのまま使用できる。一般に融合細胞を用いた抗腫瘍免疫療法では融合細胞の高い純度が

求められる傾向にあるが、今回の研究では 15% と必ずしも高い純度の融合細胞を使用していないにも関わらず腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導され、その抗腫瘍効果は発揮された。一方、今回の研究ではすでに形成された腫瘍に対しての効果は不十分であった。しかし、外科的腫瘍切除後の再発防止には融合細胞によるワクチン効果は有効であり、今回は検討していないが他の免疫療法や化学療法、放射線療法との組み合わせにより、効果的な治療法となる可能性が高く、今後の検討課題である。

融合細胞をワクチンとして接種することにより、*in vivo* で腫瘍の増殖を抑制することができた。免疫組織学的検討および細胞傷害試験の結果から、この抑制効果は腫瘍に対する特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導されたことによるものと考えられた。また、養子免疫療法および外科的腫瘍切除後の再発抑制治療など臨床応用への可能性が示唆された。

口頭発表において吉木敬教授より養子免疫療法モデルの特異的リンパ球接種のタイミングについて、外科的腫瘍切除術後の腫瘍の再発抑制効果モデルでの腫瘍ワクチンの投与経路について、融合細胞の融合効率について、臨床における腫瘍ワクチンの不活化方法について質問があった。つづいて加藤紘之教授より外科的腫瘍切除術後の腫瘍の再発抑制効果モデルでのラットの観察項目について、具体的な臨床症例と重ね合わせて腫瘍周囲へのリンパ球浸潤に関する考察について質問があった。また葛巻より融合細胞の染色体分析の実施について、融合細胞の表面抗原発現などの安定性について、樹状細胞と腫瘍細胞を混合した場合の抗腫瘍効果について、外科的腫瘍切除術後の腫瘍の再発抑制効果モデルの融合細胞以外にワクチン接種の実施についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

この論文は、樹状細胞と腫瘍細胞との融合細胞が、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導し、生体で強い腫瘍抑制効果を示すことを証明したことで高く評価され、今後臨床応用に向けての発展も強く期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。