

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
小林 稔弘	主査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 勝 岡 洋 治 副査 教授 佐 野 浩 一 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 森 浩 志
主論文題名 Enhanced <i>ex vivo</i> Maturation of Peripheral Blood Monocyte-derived Dendritic Cells Pre-treated with Muramyl Dipeptide Analog [MDP-Lys(L18)] (Muramyl Dipeptide Analog [MDP-Lys(L18)]前処置による末梢血単球由来樹状細胞の成熟増強に関する検討)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>樹状細胞(DC)は、特異的細胞性免疫の誘導において、強力な抗原提示細胞として働くことが知られている。近年、末梢血単球から GM-CSF、IL-4 を中心としたサイトカインの刺激により簡便かつ大量に誘導することが可能になった結果、機能解析が進み、DC を利用した腫瘍特異的免疫反応も注目されている。DC による癌免疫療法の確立のため、DC の成熟に最適な conditioned medium を開発することを目的とし結核菌細胞壁骨格画分でアジュバント活性因子となるグリコペプチドである muramyl dipeptide (MDP)の analog(MDP-Lys), romurtide に着目し、romurtide(RM)により樹状細胞の機能増強が起り得るかを検討した。</p> <p>《方法》</p> <p>(1)樹状細胞誘導: 正常人末梢血より単球を Ficol-Hypaque を用いた濃度勾配法および CD14 ビーズを用いて採取し、granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)、interleukin-4(IL-4)存在下に7日間培養し未熟樹状細胞を得た。</p> <p>(2)未熟樹状細胞に HT29 cell line から得た tumor lysate にて抗原感作を行い成熟樹状細胞に分化させた。この際 lipopolysaccharide(LPS), MDP, RM を添加しそれぞれの成熟化程度を下記の項目で検討した。</p> <p>i) フローサイトメトリーによる Phenotype 解析(CD83,CD86,HLA-DR)</p> <p>ii) FITC-dextran 処理フローサイトメトリーによる抗原貪食能</p> <p>iii) シンチレーションカウンターによる Mixed lymphocyte reaction (MLR)での抗原提示能、</p> <p>iv) メチレンブルー法による腫瘍増殖抑制能</p> <p>v) エライザキットによる培養上清中の cytokine (TNF-α、IL-12)測定</p> <p>(3)担癌患者樹状細胞における成熟増強能の確認</p> <p>《結果》</p> <p>1. FACS にて樹状細胞の成熟化を示す表面抗原(CD86,83,HLA-DR)の変化をみると、CD86 は LPS, MDP, RM の薬剤添加で発現が増強している。CD83 は LPS, RM 群ではっきりと増強しているが、MDP 群では変化に乏しい。HLA-DR に関しては何れの薬剤によってもあまり変化が生じなかった。表面抗原の解析において RM は LPS とほぼ等しい効果が得られた。</p>	

2. 樹状細胞は成熟すると抗原取込み能は低下する。FITC-dextran の取り込みを FACS で測定した食食能の検討では MDP 添加群の取込み能はほとんど変化無かったが LPS、RM 添加群では有意な取込み低下を示した。RM は LPS と比較して遜色のない成熟増強が得られた。
3. MLR では無添加群に比して、LPS、RM 群では有意に thymidine の取込みが増加していた(P<0.01)。RM の添加によって LPS には劣るが、T cell への抗原提示能は明らかに上昇し、有効な機能強化が行われたものと考えられた。
4. *in vitro* での腫瘍細胞(HT29)と抗原感作した DC と CD3+ T cells との共培養において、RM 添加群は非添加群に比べて腫瘍増殖を抑制した(P<0.05)。
5. 培養上清中の TNF- α 、IL-12 は無添加のコントロール群に比して、LPS、MDP、RM 群とも著明に高値を示した。
6. 担癌患者の樹状細胞においても RM は表面抗原 CD86、CD83 の発現を増強させ、食食能も低下させており、成熟増強を示した。

《考察および結論》

本研究は樹状細胞の成熟化に最適な conditioned medium の開発を目的として MDP の誘導体 Romurtide(RM)に着目し、RM 添加により樹状細胞の成熟機能増強が起こり得るかを検討した。

樹状細胞は MHC class I, II あるいは接着分子や costimulatory 分子を強力に発現しており、ナイーブ T 細胞を抗原特異的に活性化できる抗原提示細胞で、未熟樹状細胞は抗原食食能を示し、抗原を捕捉し成熟化後、遊走して2次リンパ組織で T 細胞に抗原を提示するという精緻な機能を持つ。現在までに樹状細胞成熟化の際に、LPS、CD40L やサイトカイン(IL-2、IL-12 等)を添加すると成熟増強をおこすとの報告がみられるが人体への投与を考えた場合、副作用や毒性の問題が避けられず臨床治験例で有効な成熟増強を試みた報告はみられない。

本研究の結果、RM は成熟増強を来し得ると既知である LPS と比較しても、十分な樹状細胞成熟増強作用を有することを表面抗原、食食能、MLR、腫瘍増殖抑制能の結果を示し証明した。また、通常免疫抑制状態にあると考えられる担癌患者の樹状細胞でも同様の成熟増強が得られることを示した。

この結果を導くものとして、培養上清中のサイトカインを測定したところ IL-12、TNF- α がコントロール群に比して LPS、RM ともに上昇していることが確認された。

樹状細胞成熟化時に LPS や CD40L の刺激を受けると DC 自らが IL-12 を産生して Th1 反応を誘導することは知られている。今回の研究においても、RM 添加時に IL-12 の産生増加が確認され、同様の機序で Th1 系の活性化が生じていると考えた。一方、TNF- α 存在下では成熟 DC の MHC class II 生合成増強が起こり、樹状細胞表面の MHC class II - 抗原ペプチド複合体増加を生じ、強い抗原提示能を生ずることも知られている。RM 添加時の成熟増強は樹状細胞自身が産生する IL-12、TNF- α の関与による Th1 系および MHC-class II 関連の機序にあると考えられた。

RM は製品化(Nopia™)されており、安全性は確立されている。これの成熟増強能は、今後の樹状細胞による癌免疫治療を発展させるものと考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	小林 稔弘
論文審査担当者		主 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 勝 岡 洋 治 副 査 教授 佐 野 浩 一 副 査 教授 大 槻 勝 紀 副 査 教授 森 浩 志	
主論文題名 Enhanced <i>ex vivo</i> Maturation of Peripheral Blood Monocyte-derived Dendritic Cells Pre-treated with Muramyl Dipeptide Analog [MDP-Lys(L18)] (Muramyl Dipeptide Analog [MDP-Lys(L18)]前処置による末梢血単球由来樹状細胞の成熟増強に関する検討)			
論文審査結果の要旨			
<p>近年、癌免疫治療が現実的かつ具体的に行われるようになってきた。その中でも、樹状細胞療法は T 細胞を用いた養子免疫療法等に比して、抗原提示細胞である樹状細胞を用いた方法は癌特異的免疫療法である。しかしながら、現時点において化学療法等の既存の治療法を上回る結果は得られていない。</p> <p>本研究は、抗原提示を受けた未熟樹状細胞の成熟能を増強する最適な conditioned medium の開発を目的として行われたものである。申請者は以前から免疫賦活物質と知られていた muramyl dipeptide のアナログである romurtide (RM) に着目し、フローサイトメリーでの樹状細胞の成熟マーカーとなる表面抗原の解析、成熟時に低下する貪食能、Mixed lymphocyte reaction による抗原提示能の解析、<i>in vitro</i> での腫瘍増殖抑制能、培養上清中のサイトカインの検討から有効な成熟増強が成立することを証明している。さらには免疫抑制状態にあると考えられる進行担癌患者から得られた樹状細胞でも成熟増強が行われるという結果および結論を得ている。この結果は、従来より強力な免疫賦活物質であることが知られる lipopolysaccharide(LPS)と比しても遜色ない。</p> <p>RM は臨床薬剤としてすでに製品化された物質で、LPS のように毒性を危惧する必要はなく、比較的安価でもある。申請者によって得られた RM が樹状細胞の成熟化を増強させるという本研究の結果は、癌に対する免疫治療の治療効果を増強させ得る可能性をおおいに秘めており、新しい癌免疫治療の確立ひいては癌患者の予後の向上に資するところ大なるものと考ええる。</p> <p>以上より、本論文は本学大学院学則第9条に定める所の博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>主論文公表誌 Bulletin of The Osaka Medical College 52(1) : 9-18, 2006</p>			