

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
高橋 猛	主査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 瀧 内 比 呂 也 副査 教授 森 脇 真 一 副査 教授 芝 山 雄 老
主論文題名 Rejection of Intradermally Injected Syngeneic Tumor Cells from Mice by Specific Elimination of Tumor-associated Macrophages with Liposome-encapsulated Dichloromethylene Diphosphonate, followed by Induction of CD11b <sup>+</sup> /CCR3 <sup>+</sup> /Gr-1 <sup>+</sup> Cells Cytotoxic against the Tumor Cells (腫瘍に関連したマクロファージを DMDP リポソームによって特異的に除去し、腫瘍細胞に細胞傷害活性を持つ CD11b <sup>+</sup> /CCR3 <sup>+</sup> /Gr-1 <sup>+</sup> 細胞を誘導することによる、マウス皮内に移植された同種同系腫瘍細胞の拒絶)	
学位論文内容の要旨	
<p>(目的)</p> <p>腫瘍増殖時、腫瘍周辺は低酸素状態に陥っており、この低酸素領域に浸潤する腫瘍関連マクロファージ【tumor-associated macrophages (TAM)】が腫瘍増殖に必要不可欠であると報告されている。すなわち、TAM は、低酸素領域で種々のサイトカインに刺激され、腫瘍の増殖、浸潤、転移、血管新生を促進することが示唆されている。本研究の目的は、腫瘍の増殖に関与する TAM を特異的に除去すれば、腫瘍の増殖、転移、血管新生を抑制できるのか調べることである。そこで、dichloromethylene diphosphonate (DMDP)-liposome を腫瘍周辺に皮内注射して TAM を特異的に除去できるか、また、TAM の特異的除去によって腫瘍の増殖が阻害されるかを検討した。</p> <p>(方法)</p> <p>腫瘍には、皮内移植後、増殖し続ける B16 (melanoma)、KLN205 (squamous cell carcinoma)、および 3LL (Lewis lung carcinoma) を使用した。腫瘍の増殖に関与する TAM を特異的に除去するために、DMDP-liposome を使用した。DMDP-liposome は、膜非透過性細胞毒である DMDP を liposome で包み込んだもので、好中球やマクロファージが貪食する。しかし、マクロファージは liposome を分解する lipase を持っているため、包み込んでいた細胞毒が細胞内に漏出し、マクロファージを特異的に傷害し、除去することができる。B16、KLN205 や 3LL 細胞をそれぞれ C57BL/6、DBA/2 や C57BL/6 マウスの皮内に注射し、その周辺に DMDP-liposome や PBS-liposome (対照) を投与した。それらの腫瘍増殖に対する効果を、腫瘍径を経時的に測定して調べた。</p> <p>腫瘍細胞 5×10<sup>5</sup> 個を PBS 0.1 ml に溶解し、マウス背側中央に皮内注射した。マウスを 3 群に分け、1、2 群は、腫瘍周辺に腫瘍接種後、0、2 日目に、DMDP-liposome や PBS-liposome を周囲 4 ヶ所に、各 0.05 ml 皮内注射した。これに無処置群(腫瘍のみ接種したもの)を加えた計 3 群の腫瘍径を、数ヶ月間計測した。使用した DMDP-liposome 原液の濃度は liposome を含む 10 ml PBS 溶液に、DMDP を 0.4 g 溶解したものである。</p> <p>使用した 3 種類の腫瘍細胞の中で、最も DMDP-liposome に抵抗性を示した B16 黒色腫細胞で以下の実験を行った。B16 黒色腫細胞 5×10<sup>5</sup> 個を PBS 0.05 ml に溶解し、マウスの背部中央に皮内注射した。マウスを 3 群に分け、1、2 群は、腫瘍周辺に腫瘍接種後、3 日おきに、計 6～12 回、原液を 3 倍、5 倍あるいは 10 倍希釈した DMDP-liposome あるいは PBS-liposome (対照) を周囲 4 ヶ所に、各 0.05 ml 皮内注射した。これに無処置群(腫瘍のみ接種したもの)を加えた計 7 群の腫瘍径を、数ヶ月間継続して測定した。</p> <p>B16 黒色腫細胞 5×10<sup>5</sup> 個を PBS 0.05 ml に溶解し、マウスの背部中央に皮内注射し、腫瘍が肉眼で確認できる接種後約 5 日目にマウスを 3 群に分け、1、2 群は、確認できた腫瘍周辺に、第 5、8、11、14、17、</p>	

20日目に、原液を10倍、5倍あるいは3倍希釈したDMDP-liposomeかPBS-liposome(対照)を周囲4ヶ所に、各0.05 ml皮内注射した。これに無処置群(腫瘍のみ接種したもの)を加えた7群の腫瘍径を、数ヶ月間計測した。

(結果)

DMDP-liposomeの原液を腫瘍周辺に2回皮内注射すると、B16、KLN205、3LLのすべてにおいて腫瘍の増殖は有意に抑制されたが、B16 黒色腫細胞がDMDP-liposome治療に最も抵抗性を示した。しかし、B16 黒色腫細胞の増殖は、DMDP-liposomeの濃度依存的に抑制され、0、3、6、9、12、15日目に、計6回の5倍希釈DMDP-liposomeを注射すると、12匹の内4匹(33%)で腫瘍が拒絶された。5倍希釈のDMDP-liposomeを12回注射した群においては、その拒絶率はより高率(66%)で、3倍希釈を12回投与した群では、腫瘍の成長は著明に抑制され、すべて拒絶された。対照的に、PBS-liposome処置した群では腫瘍の成長にまったく影響がなかった。また、腫瘍接種後、腫瘍径が2.6mmとなった時点で、10倍希釈と5倍希釈したDMDP-liposomeを6回投与すると濃度依存的に腫瘍の増殖は抑制された。そして、3倍希釈のDMDP-liposomeを12回腫瘍周辺に皮内注射すると、腫瘍の成長が阻害抑制されるだけでなく、すべてのマウスで腫瘍が拒絶された。これらの結果は、腫瘍関連マクロファージを特異的に除去すると、腫瘍の増殖が抑制されるだけでなく、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が誘導され拒絶された可能性を示唆している。

この可能性を調べるために、腫瘍接種後0、3日目にPBS-liposomeまたはDMDP-liposomeを投与し、6日目に皮膚の組織像を調べた。DMDP-liposome接種後、腫瘍内のTAMの数はDMDP-liposomeの濃度依存的に減少し、腫瘍周辺への別の種類のマクロファージとGr-1<sup>+</sup>細胞の浸潤が認められた。腫瘍接種後0、3、6日目にDMDP-liposome接種後、腫瘍周辺への浸潤細胞の細胞傷害活性が8日目にピークに達したので、浸潤細胞を種々の表面抗原に対する抗体で標識し、それらの細胞のB16黒色腫細胞に対する細胞傷害活性を測定した。その結果、腫瘍を傷害する細胞の表面抗原はCD11b<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup>で、形態は電顕像から単球様マクロファージであることが判明した。

(考察)

DMDPリポソームを用いて腫瘍関連マクロファージを特異的に除去すると、腫瘍増殖は抑制されるだけでなく、腫瘍細胞が拒絶された。マクロファージを除去し腫瘍増殖を抑制すると、腫瘍周辺への別の種類のマクロファージ、CCR3<sup>+</sup>細胞やGr-1<sup>+</sup>細胞などの浸潤が認められ、腫瘍細胞傷害活性を持つ細胞は単球様マクロファージであることが判明した。今後、種々の腫瘍細胞に対するDMDP-liposomeの効果が調べられ、また、種々の臓器のTAMを特異的に除去する方法が開発されれば、ヒトでの種々の癌治療に応用できる可能性がある。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第号	氏名	高橋 猛
論文審査担当者		主査 教授 谷川 允彦 副査 教授 瀧内 比呂也 副査 教授 森脇 真一 副査 教授 芝山 雄老	
主論文題名 Rejection of Intradermally Injected Syngeneic Tumor Cells from Mice by Specific Elimination of Tumor-associated Macrophages with Liposome-encapsulated Dichloromethylene Diphosphonate, followed by Induction of CD11b <sup>+</sup> /CCR3 <sup>+</sup> /Gr-1 <sup>+</sup> Cells Cytotoxic against the Tumor Cells (腫瘍に関連したマクロファージを DMDP リポソームによって特異的に除去し、腫瘍細胞に細胞傷害活性を持つ CD11b <sup>+</sup> /CCR3 <sup>+</sup> /Gr-1 <sup>+</sup> 細胞を誘導することによる、マウス皮内に移植された同種同系腫瘍細胞の拒絶)			
論文審査結果の要旨			
<p>Dichloromethylene Diphosphonate (DMDP)-liposome を静脈内注射すると、肝臓や脾臓のマクロファージが特異的に除去されることが知られている。本研究では、腫瘍の増殖に関与すると言われている tumor-associated macrophage (TAM) を特異的に除去するために、マウス皮内に移植した腫瘍細胞の増殖に対する DMDP-liposome 皮内注射の影響を調べている。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 原液の DMDP-liposome を、腫瘍細胞を移植した 0 日目と 2 日目に腫瘍の周囲(腫瘍から数 mm 離れた4箇所)に計 0.2 ml/回)に投与すると、使用した3種類(3LL 肺癌細胞、KLN205 扁平上皮癌細胞、B16 黒色腫細胞)の腫瘍細胞の増殖が抑制された。</li> <li>2. 使用した3種類の腫瘍細胞の中で、最も DMDP-liposome 治療に抵抗性を示した B16 黒色腫細胞の増殖が、DMDP-liposome の濃度および投与回数依存的に抑制された。</li> <li>3. DMDP-liposome を 3 倍希釈で 12 回投与した群では腫瘍が拒絶され、その効果は腫瘍接種後、腫瘍径が 2.6 mm となった時点で投与を開始しても同様であった。</li> <li>4. 腫瘍移植後、0 日目と 3 日目に 3 倍希釈の PBS-liposome (対照) または DMDP-liposome を投与し、6 日目に皮膚の組織像を調べた。その結果、腫瘍内の TAM の数は DMDP-liposome の濃度依存的に減少し、腫瘍周辺への別の種類のマクロファージ、CCR3<sup>+</sup>細胞や Gr-1<sup>+</sup>細胞などの浸潤が認められた。</li> <li>5. DMDP-liposome 投与後、腫瘍周辺への浸潤細胞の細胞傷害活性が 8 日目にピークに達したので、浸潤細胞を種々の表面抗原に対する抗体で標識し、それらの細胞の B16 黒色腫細胞に対する細胞傷害活性を測定した。その結果、腫瘍を傷害した細胞の表面抗原は CD11b<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup>で、形態は電顕像から単球様マクロファージであることが判明した。</li> </ol> <p>今後、種々の腫瘍細胞に対する DMDP-liposome の効果が調べられ、また、種々の臓器の TAM を特異的に除去する方法が開発されれば、ヒトでの種々の癌治療に応用できる可能性がある。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(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) Cancer Immunol. Immunother. DOI 10.1007/s00262-009-0708-5: 2009, In press</p>			