

氏 名	井 畑 峰 紀
( ふ り が な )	(いばた みねのり)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 24 年 2 月 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 該当
学 位 論 文 題 名	Spontaneous rejection of intradermally transplanted non-engineered tumor cells by neutrophils and macrophages from syngeneic strains of mice  (同種同系マウスの皮内に移植した、遺伝子操作をしていない腫瘍細胞の好中球とマクロファージによる自然拒絶)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 森 脇 真 一 教授 大 槻 勝 紀 教授 岡 田 仁 克 教授 東 治 人

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《背 景》

悪性腫瘍に対して様々な治療法が試みられているが、まだ根治が難しく死因の1位になって久しい。1980年から1990年代初頭にかけて、種々のサイトカイン遺伝子を組み込んだ移植腫瘍細胞が、主として顆粒球の浸潤と共に拒絶されることが多くの研究室から報告された。しかし、別の部位に移植した野生型腫瘍細胞の増殖にはあまり阻害効果が見られず、新しい治療法の開発には繋がっていない。

#### 《目 的》

腫瘍周囲の微小環境は腫瘍の増殖に密接に関係している。そこで今回我々は移植した腫瘍細胞が拒絶される際の微小環境、腫瘍内外の浸潤細胞、拒絶の機序を検討した。

## 《方 法》

- 1) B16 メラノーマ細胞、3LL 肺癌細胞、KLN205 扁平上皮癌細胞、Meth A 線維肉腫細胞、I-10 精巣癌細胞、CL-S1 前乳癌細胞や FM3A 乳癌細胞（それぞれ  $3 \times 10^6$  細胞/マウス）を同種同系マウスに皮内接種し、その後の腫瘍径を経時的に計測した。
- 2) 皮内に移植した腫瘍細胞の増殖や拒絶への IFN- $\gamma$  の関与を調べるために、IFN- $\gamma$  ノックアウトマウスを利用した。
- 3) 腫瘍細胞を皮内に移植し、経時的に H.E. 染色や免疫組織染色を行い、腫瘍内や周囲へ浸潤する細胞種を調べた。
- 4) 移植部位の皮膚の蛋白分解酵素処理等により浸潤細胞を経時的に回収した。表面抗原に対する蛍光標識抗体で染色後、標識された浸潤細胞の比率をセルソーターで解析し、それぞれを分取した。アイソトープ ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ) を取り込んだ腫瘍細胞と浸潤細胞を混合培養し、腫瘍細胞からのアイソトープの遊離量で細胞傷害活性を測定した。
- 5) 皮内免疫後、本来、腫瘍細胞が増殖する部位に腫瘍細胞を移植し、移植部に浸潤する細胞の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を測定した。
- 6) 皮内免疫後のワクチン効果の特異性は、I-10 細胞や Meth A 細胞を皮内免疫後、Meth A 細胞や I-10 細胞を本来増殖する腹腔内や筋肉内に移植し、Meth A 細胞数や腫瘍径を経時的に測定して調べた。

## 《結 果》

- 1) 腫瘍細胞を同種同系マウスに皮内移植すると、B16、3LL と KLN205 細胞は増殖し続けたが、Meth A、I-10、CL-S1 および FM3A 細胞は自然拒絶された。
- 2) IFN- $\gamma$  ノックアウトマウスに Meth A 細胞を皮内移植すると、腫瘍は増殖し続けたが、IFN- $\gamma$  を腫瘍周囲に投与すると腫瘍細胞は拒絶された。
- 3) 腫瘍細胞の周囲に大量のマクロファージおよび顆粒球と少量のリンパ球の浸潤がみられたが、腫瘍内へのマクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) の浸潤はほとん

ど見られなかった。

4) マクロファージ (F4/80<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>や Ly-6C<sup>+</sup>細胞など) と好中球 (Ly-6G<sup>+</sup>細胞) が皮内に浸潤し、Meth A 細胞を傷害した。しかし、細胞傷害性Tリンパ球 (CTL ; CD8<sup>+</sup>細胞) やNK 細胞 (NK-1.1<sup>+</sup>細胞) に傷害活性はなかった。

5) Meth A 細胞を皮内接種後 1 ヶ月 (拒絶後約 10 日) のマウスに Meth A 細胞を本来増殖し続ける腹腔内に移植しても、ほとんど増殖せず拒絶された。浸潤細胞の細胞傷害活性は、移植後 5 日で最も高く、主たるエフェクター細胞は CTL であった。

6) Meth A細胞で皮内免疫後、腹腔内に移植したMeth A細胞は拒絶されたが、筋肉内に移植したI-10腫瘍細胞は、非免疫マウス同様、増大した。また、I-10細胞で皮内免疫後、筋肉内に移植したI-10細胞は拒絶されたが、腹腔内に移植したMeth A細胞は、非免疫マウス同様、増殖した。

#### 《結 語》

マウス皮内に同種同系の腫瘍細胞を移植すると、7細胞株のうち4細胞株で腫瘍細胞が自然拒絶され、IFN- $\gamma$ はその拒絶に必須であった。皮内へ移植した腫瘍細胞の自然拒絶では、TAM の浸潤はほとんどなく、エフェクター細胞はマクロファージと好中球で、CTL や NK 細胞は移植腫瘍細胞の傷害に関与しなかった。皮内免疫後、同じ腫瘍細胞を本来増殖する部位に移植した場合、皮内に移植した腫瘍細胞特異的に拒絶され、その際の主たるエフェクター細胞は CTL であった。これらの結果は、今後腫瘍拒絶における IFN- $\gamma$ の関与の詳細がさらに解析され、TAM ではないマクロファージと好中球を腫瘍細胞周囲に誘導する因子等が明らかになれば、根治が難しい悪性腫瘍に対する新しい治療法に繋がる可能性を示唆する。

## 論文審査結果の要旨

根治が難しい悪性腫瘍に対して様々な治療法が試みられているが、新しい治療法の開発には繋がっていない。本研究において申請者は、移植後腫瘍細胞が拒絶される際の部位、関与する免疫細胞と拒絶の機序を調べるために、7種類の同種同系の腫瘍細胞を野生型マウスや IFN- $\gamma$ ノックアウトマウスの皮内に接種した。そして移植部位の免疫組織染色や浸潤細胞の種類と比率を経時的に解析し、浸潤細胞の腫瘍細胞に対する傷害活性を測定した。さらに皮内免疫のワクチン効果を確認する目的で腫瘍が拒絶される際の抗原特異性を検討した。

その結果、(1) B16 メラノーマ細胞、3LL 肺癌細胞、KLN205 扁平上皮癌細胞は皮内移植後増殖し続けたが、Meth A 線維肉腫細胞、I-10 精巣癌細胞、CL-S1 前乳癌細胞や FM3A 乳癌細胞は自然拒絶された。(2) IFN- $\gamma$ が腫瘍細胞の自然拒絶に必須であった。(3) 免疫組織染色では、腫瘍内へのマクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) の浸潤はほとんど見られなかった。(4) マクロファージと好中球が主として腫瘍の周囲に浸潤し、腫瘍細胞を傷害したが、CTL や NK 細胞には傷害活性がなかった。(5) 皮内接種した Meth A 細胞の皮内接種拒絶後約 10 日のマウスに Meth A 細胞を本来増殖する腹腔内に移植すると、ほとんど増殖せずに拒絶され、主たるエフェクター細胞は CTL であった。(6) 皮内免疫のワクチン効果は、皮内免疫した腫瘍細胞に特異的であった。

申請者らは、MHCクラスI抗原をほとんど発現していない腫瘍細胞は皮内で増殖し続け、強く発現している腫瘍細胞は自然拒絶されることを確認している。今後、IFN- $\gamma$ の役割や、TAMではないマクロファージと好中球を腫瘍細胞周囲に誘導する因子等を明らかにすれば、悪性腫瘍の新しい治療法に繋がる可能性がある。

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。

(主論文公表誌)

Microbiology and Immunology 55 (10): 726-735, 2011