

称号及び氏名	博士（獣医学）	水戸 凱
学位授与の日付	平成23年3月31日	
論文名	イヌ腫瘍に対するインターフェロンガンマ併用樹状細胞治療に関する研究	
論文審査委員	主査	稲葉 俊夫
	副査	児玉 洋
	副査	笹井 和美
	副査	杉浦 喜久弥

論文要旨

緒言

現在、腫瘍に対する治療法としては、外科療法・放射線療法・化学療法が主流となっている。これらの治療法では劇的な効果がみられるものの、正常組織に対する侵襲を伴い、また、後遺症や副作用などの深刻なダメージを生じる場合が多い。そこで近年、生体内に本来備わっている腫瘍排除に関わる免疫を利用して治療を行う免疫細胞療法が安全で副作用のない腫瘍の治療法として期待されている。この治療法は、腫瘍が患者の免疫機能の低下により、排除されずに増殖する状態となっているという考えに基づき、腫瘍細胞に対して有効な捕捉排除機能を持つとされている細胞傷害性 T 細胞 (CTL) やナチュラルキラー (NK) 細胞などの T ヘルパータイプ 1 (Th1) 免疫系細胞を活性化させることを目的としている。樹状細胞 (DC) は最も強力な抗原提示細胞であり、種々の抗原を取り込み、細胞性免疫および体液性免疫を開始させることのできる細胞で、腫瘍免疫の開始に必須の細胞である。また、CTL や NK 細胞の活性化を促進し、また、キラー DC として直接腫瘍細胞を攻撃することも報告されている。これらの特性を利用し、DC を体外に取り出して腫瘍抗原を認識させ、再び体内に戻すことによって腫瘍免疫を賦活できることが期待でき、ヒトにおいて現在までに、非上皮性悪性腫瘍（メラノーマ、骨髄腫）や、上皮性悪性腫瘍（甲状腺癌、肝細胞癌、膵癌、腎癌）に対して臨床試験が行われてきた。しかしながら、その治療効果は、患者の半数以上で腫瘍の進行を抑えられていないのが現状である。この理由として、免疫刺激のほとんどない生体内における DC の劣化や腫瘍による免疫抑制作用などが考えられる。これらの障害を克服するには、DC 接種の場において DC の成熟および活性を亢進させ、加えて Th1

免疫反応を促進する微小環境を構築することが必要と思われる。一方、インターフェロンガンマ (IFN γ) は Th1 免疫系を著しく活性化し、腫瘍に対する免疫反応を増強するサイトカインとされているが、DC の成熟および活性化に影響を及ぼすか否かは未だ明らかでない。イヌは、ヒトと同じ生活圏を持ち、乳癌、前立腺癌、リンパ腫などヒトと共通の癌を自然発症する。したがって、癌を自然発症したイヌを治療することによって、本治療法のヒトでの有効性を十分に検討できると考えられる。

本研究では、イヌにおいて自然発症した腫瘍に対して、樹状細胞に IFN γ を併用する免疫細胞療法を検討した。

第1章 樹状細胞の成熟および免疫活性化能に対する IFN γ の影響

強力な抗腫瘍免疫反応を誘導し、それを維持していくためには、CTL あるいは NK 細胞といったエフェクター細胞を活性化するのみでは不十分で、免疫反応においてそれらの細胞の上流に位置する Th1 細胞、さらに上流に位置する DC を活性化しなければならない。いくつかの DC の種類の中でも末梢血単球由来 DC は、Th1 免疫反応を活性化し、また、材料を容易に採取できることから抗腫瘍免疫治療に最もよく用いられている。そこで、本章では、*in vitro* の実験系において、イヌ末梢血単球由来 DC の成熟、免疫活性化能および腫瘍傷害活性に対する IFN γ の影響を調べた。

第1節 イヌ単球由来 DC の成熟および免疫活性化能に対する IFN γ の影響

イヌ単球由来 DC の成熟および免疫活性化能に対する IFN γ の影響について調べた。

イヌ末梢血単核球から抗ヒト CD14 抗体を用いて単球を分離し、イヌ顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) およびインターロイキン (IL) -4 とともに 7 日間培養したところ、細胞の大きさは著しく増加し、ほとんどの細胞は、円形で、丸い核と細胞質内に顆粒を持っていた。これらの細胞は、細胞表面にベール様の構造物を表面に持っており、未成熟 DC の特徴を示した。この未成熟 DC を IFN γ とともにさらに 5 日間培養したところ、成熟 DC の特徴である二つの核と長い突起を持った細胞の出現が認められた。対照として、未成熟 DC をサイトカイン非存在下で 5 日間培養した場合は、細胞の大きさは増加したが、ベール様の構造物は退化消失した。細胞の抗原提示能あるいは免疫活性化能は、細胞表面での抗原提示分子あるいは免疫共刺激分子の発現量に相関する。そこで、抗原提示分子である主要組織適合抗原クラス II (MHC II) および CD1a、免疫共刺激分子である CD80 および CD86 の発現をフローサイトメトリーによって測定した。GM-CSF と IL-4 との培養によって分化誘導した未成熟 DC において、上記すべての分子の発現量は単球と比較して有意に増加したが、その後 100 U/ml 以上の IFN γ と 5 日間培養することによってさらに増加した。対照として行ったサイトカイン非存在下の 5 日間の培養で、これらの分子の発現は未成熟 DC に比べ低下した。また、単球のマーカーである CD14 や骨髄球のマーカーである CD11c の発現は IFN γ との培養で増加を示さず、IFN γ による発現の増加は、抗原提示分子および免疫共刺激分子に特異的であることが判明した。IL-12 は Th1 免疫系を特異的に活性化するサイトカインで、主に DC から産生される。この IL-12 の産生量も未成熟 DC を IFN γ と培養することによって、IFN γ の濃度依存性に増加した。

以上の結果から、IFN γ は Th1 免疫系のエフェクター相を活性化するのみでなく、上流相である DC に働き、その成熟を促進し、免疫刺激能を著しく増強することが明らかとなった。

第2節 イヌ単球由来 DC の抗腫瘍活性に対する IFN γ の影響

最近、ヒト単球由来 DC は、Th1 免疫系を活性化するのみならず、「キラーDC」として、直接、腫瘍細胞を傷害することが明らかとなった。そこで、本節では、イヌ単球由来 DC について、そのキラーDC 活性に対する IFN γ の影響を検討するとともにその機序について調べた。

前節と同様の方法で得たイヌ単球由来未成熟 DC をイヌ甲状腺癌の細胞株である CTAC 細胞あるいはイヌ骨肉腫の細胞株である D-17 細胞とともに、イヌ IFN γ を含んだ培養液中で 2 日間培養した。未成熟 DC と腫瘍細胞との接触を阻止するために 1.0 μm の有孔培養皿を用いた共培養も行った。腫瘍細胞の増殖能およびアポトーシスを評価するとともに、アポトーシスを誘導するサイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) α および TNF 関連アポトーシス誘導因子 (TRAIL) の mRNA の DC における発現を PCR 法によって測定した。

その結果、ヒト単球由来 DC と同様、イヌ単球由来 DC は、イヌ腫瘍細胞株の増殖を抑制し、その抑制効果は IFN γ によって著しく高められた。その抑制効果は、DC と腫瘍細胞との直接的な接触を妨げてもみられ、IFN γ によって高められることから、液性因子の関与が考えられた。また、DC と共培養した腫瘍細胞中には、アポトーシスに陥った細胞が有意に増加し、共培養に IFN γ を加えることによってさらに著しい増加を示した。さらに、DC において、TNF α および TRAIL の mRNA の発現が IFN γ によって有意に増加することも判明した。

以上の結果から、IFN γ は DC による腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導能を著しく増強することが明らかとなった。

第 2 章 樹状細胞の腫瘍治療効果に対する IFN γ の影響

前章で得られたイヌ単球由来 DC に対する IFN γ の影響に関する基礎知見をもとに、本章では、イヌにおいて自然発症した腫瘍に対して DC を用いて免疫治療を行い、その治療効果に対する IFN γ の影響を検討した。

完全処置として以下の処置を行った：腫瘍自然発症犬から末梢血を採取し、そこから分離した単球をイヌ GM-CSF および IL-4 とともに 7 日間培養して DC に分化誘導した。得られた DC を組換え型イヌ IFN γ (1 万単位/Kg) とともに腫瘍組織内に注入し、その 2 日および 5 日後に同量の IFN γ のみを腫瘍組織内に注入した。これを 1 サイクルとして 7 日毎に 8 サイクル以上繰り返した。また、DC によるワクチン効果の検証を目的として、DC の回収前に Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を培養に添加して DC に取り込ませた。

現在までに、A 皮脂腺上皮腫 1 例、B 線維肉腫 1 例、C 乳腺管癌 4 例および D 直腸癌 1 例の計 7 例について治療を完了し、このうち C の 3 例および D の計 4 例について完全奏功を、A、B および C の 1 例の計 3 例について部分奏功を得た。A については、初め DC のみを 7 日毎に腫瘍組織内に 6 回 (42 日間) 注入したが、腫瘍の縮小が認められなかった。そこで、完全処置を開始したところ、8 サイクル終了後には、10%以下に縮小した。B については、手術による腫瘍の減容積の後、IFN γ のみ (1 万単位/Kg、週 3 回) によって治療を行ったが、10 日後にはほぼ手術前の大きさまで腫瘍が増殖した。そこで、完全処置を開始したところ、8 サイクル終了後には、腫瘍組織のほとんどが壊死組織となった。また、上記 7 例の他に、乳腺管癌の 1 例を DC のみ (7 日毎、4 回) で、2 例を IFN γ のみ (1 万単位/Kg、週 3 回、14 日間) によって治療を行ったが、いずれも腫瘍細胞の増殖を抑制することはできなかった。完全処置の治療効果に DC による腫瘍抗原の提示と免疫細胞の活性化が関与しているかどうかを検証するために、末梢血リンパ球の反応を調

べたところ、治療前にはほとんどみられなかった腫瘍抗原（ライセート）および KLH に対するリンパ球の増殖反応が、8 サイクルの治療後には著しく有意に亢進していた。

以上の結果から、IFN γ を自己の DC とともに投与することにより、生体内における抗腫瘍免疫反応を賦活、増強し、それによって自然発症した腫瘍を退縮させ得ることが示唆された。

総括

イヌ単球由来 DC の免疫活性に対する IFN γ の影響について検討し、IFN γ と DC を用いて腫瘍罹患動物への治療を行い、以下のことを明らかにした。

1. IFN γ は単球由来 DC の成熟および免疫活性化能を著しく亢進する。
2. 単球由来 DC はアポトーシスの誘導を含む機序によって腫瘍細胞の増殖を抑制する機能を持ち、一方、IFN γ はそれを著しく増強する。
3. IFN γ は生体内 (*in vivo*) において免疫治療への障害となる生体内での DC の活性低下を防ぎ、抗腫瘍活性をさらに増強して、自然発症した腫瘍を退縮させる。

以上、本研究の結果から、DC と IFN γ を用いたイヌ腫瘍の免疫治療は有効な治療法となり得ることが示唆された。今後、これらの技術がヒトにおける臨床試験へ応用できるものと期待される。

審査結果の要旨

現在、腫瘍に対する治療法としては、外科療法・放射線療法・化学療法が主流となっている。手術や放射線治療では、免疫力を維持しながら、局所の癌細胞を除くことができるが、取り残しや転移で癌が再発することもある。一方、化学療法では、全身の癌細胞に作用し得るが、免疫力の抑制や副作用などの深刻なダメージを生じる場合が多く、いずれも満足のいく治療法とはいえ、新規治療法の開発が望まれている。

近年、生体内に本来備わっている腫瘍排除に関わる免疫を利用して治療を行う癌免疫治療が安全で副作用のない方法として期待されている。この治療法は、腫瘍細胞に対する傷害・排除機能を持つ細胞傷害性 T 細胞 (CTL) やナチュラルキラー細胞などの T ヘルパータイプ 1 (Th1) 免疫を活性化させることを目的としている。

樹状細胞 (DC) は最も強力な抗原提示細胞であり、種々の抗原を取り込み、細胞性免疫および体液性免疫を開始させることのできる細胞で、腫瘍免疫の開始に必須の細胞である。DC を体外で末梢血単球などから分化誘導し、腫瘍抗原を提示させて再び体内に戻すことによって腫瘍免疫を賦活できることが期待できる。一方、インターフェロンガンマ (IFN γ) は Th1 免疫系を著しく活性化し、腫瘍に対する免疫反応を増強するサイトカインとされているが、DC の成熟および活性化に影響を及ぼすか否かは未だ明らかでない。

そこで本研究では、*in vitro* においてイヌ単球由来 DC の成熟、免疫活性化能、および抗腫瘍活性に対する IFN γ の影響、および IFN γ とイヌ樹状細胞を併用するイヌ癌免疫療法について検討し、以下の成果を得た。

1. $\text{IFN}\gamma$ は CTL などの Th1 免疫系細胞を活性化させるだけでなく、その上流に位置する DC にも働き、その成熟および免疫活性化能を著しく亢進することが明らかになった。
2. 単球由来 DC は腫瘍壊死因子 α などによるアポトーシスの誘導を含む機序によって腫瘍細胞を傷害し、一方、 $\text{IFN}\gamma$ は DC の腫瘍細胞に対する傷害作用を著しく増強することが明らかになった。
3. 悪性腫瘍自然発症犬において、自己の単球由来 DC を $\text{IFN}\gamma$ とともに腫瘍組織内に反復投与することにより、従来、免疫治療への障害となっていた *in vivo* での DC の活性低下を防ぎ、抗腫瘍免疫反応をさらに増強して、腫瘍を退縮させ得ることが明らかになった。

以上のように本研究では、 $\text{IFN}\gamma$ を用いてイヌ単球由来 DC の成熟および免疫活性化能を著しく亢進させる方法を開発するとともに、*in vitro* で単球由来 DC の抗腫瘍活性に及ぼす $\text{IFN}\gamma$ の影響を明らかにし、得られた基礎的知見をもとに、悪性腫瘍自然発症犬への DC と $\text{IFN}\gamma$ を併用した細胞免疫療法の結果、本法が有効な治療法となり得ることを実証した。本研究の成果に基づく DC と $\text{IFN}\gamma$ を併用した細胞免疫療法の開発は、獣医学の発展のみならず、ヒトの臨床応用にもつながるものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。