

氏 名 (本 籍)	石 垣 宏 仁 (三重県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 2 8 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 8 年 9 月 1 3 日
学 位 論 文 題 目	Preparation and Functional Analysis of Tumor-Infiltrating Stroma Cells Using Bone Marrow Chimera Mice  (骨髄キメラマウスを用いた腫瘍浸潤間質細胞の分離と解析)
審 査 委 員	主 査 教 授 大 久 保 岩 男  副 査 教 授 木 村 博  副 査 教 授 田 中 俊 宏

## 論文内容要旨

*整理番号	533	(ふりがな) 氏名	いしがき ひろひと 石垣 宏仁
学位論文題目	Preparation and Functional Analysis of Tumor-Infiltrating Stroma Cells Using Bone Marrow Chimera Mice (骨髄キメラマウスを用いた腫瘍浸潤間質細胞の分離と解析)		
<p><b>【目的】</b> 腫瘍浸潤間質細胞 (Tumor-Infiltrating Stroma Cells, TISC) は、腫瘍と同様に腫瘍環境下での免疫抑制の一因を担っていると考えられてきた。しかし、TISC は腫瘍内に含有される割合が少なく分離が難しいために、今まで詳しく解析されてこなかった。また、腫瘍環境下での免疫抑制を担っているとされている Immature myeloid cells (ImC) や reguratory T cells (Treg) 等の研究の多くが、腫瘍の所属リンパ節や脾臓を用いて行われている。今回我々は、腫瘍そのものから TISC を分離しその解析を行った。</p> <p><b>【方法】</b> 1) どのような細胞が腫瘍内に浸潤しているか調べるために、B6.Thy1.1 マウスに Thy1.2 陽性 EG7 tumor cell line を皮下注射し担癌マウスを作成した。腫瘍径が 1cm 程に達したところで、腫瘍を回収しホモジェナイズした。抗 Thy1.2 抗体、抗 CD4 抗体、補体を用いて腫瘍成分を除去した後、フローサイトメーターを用いて Thy1.2 陰性分画を解析した。2) TISC を単離する目的で、B6 のバックグラウンドをもつ GFP トランスジェニックマウス (GFP Tg) に EG7 を皮下注射し担癌モデルを作成した。1) と同様に TISC を分離し、GFP 陽性細胞をフローサイトメーターにて解析した。3) TISC に骨髄由来細胞が含まれるかどうかを調べるために、GFP Tg マウスの骨髄 (Bone marrow, BM) 細胞を B6 マウスに移植した BM キメラマウス[GFP Tg→B6]を作成した。[GFP Tg→B6]マウスに EG7 を皮下注射して担癌モデルを作成し、前述の通り TISC を分離した。フローサイトメーターを用いて GFP 陽性細胞の存在を確認した。4) TISC の各分画の機能を解析するために、担癌 GFP Tg マウス・担癌[GFP Tg→B6]マウスより TISC の各細胞群をセルソーターを用いて単離した。それぞれの分画の上清の TGF-beta 及び IL-10 の産生を ELISA 法で測定した。また B6 の脾臓を用いた細胞増殖試験に添加することで細胞増殖抑制作用があるかを調べた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

**【結果】**

1) TISC 中にはマクロファージと思われる F4/80<sup>+</sup>cell はほとんど存在せず、F4/80<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>cell と Gr-1<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>cell が存在していた。以前より言われている腫瘍関連マクロファージ (TAM) はほとんど存在しないことが判った。2) TISC は CD11b<sup>+</sup>cell と CD11b<sup>-</sup>cell に分類された。CD11b<sup>+</sup>cell の多くは Gr-1<sup>+</sup>/Ly6c<sup>+</sup>で、以前より報告されている ImC を多く含む分画であると考えられた。3) 2) の結果で見られた CD11b<sup>+</sup>cell は骨髄由来の分画と非骨髄由来の分画に分類されることが判った。骨髄由来の分画である CD11b<sup>+</sup>cell は、ImC であると考えられた。また2) の結果で見られた CD11b<sup>-</sup>cell は非骨髄由来の分画であると考えられた。つまり TISC は三つの分画からなっていた。骨髄由来の ImC、非骨髄由来の CD11b<sup>+</sup>cell と CD11b<sup>-</sup>cell である。このうち非骨髄由来の細胞は、線維芽細胞や血管関連細胞などの腫瘍周辺の細胞ではないかと考えられた。4) 1) で分離した EG7 を含む TISC は、免疫抑制性のサイトカインである TGF-beta を大量に産生していたが、IL-10 はわずかししか産生していなかった。また EG7 腫瘍はいずれのサイトカインも産生しなかった。この EG7 の残存する TISC は B6 の脾臓の増殖反応を抑制し、この抑制は抗 TGF-beta 抗体/抗 IL-10 抗体を用いても解除できなかった。一方で担癌 GFP Tg マウスよりセルソーターを用いて単離した TISC は、細胞増殖試験を抑制しなかったが、EG7 と数日間培養した後には抑制効果を示した。また EG7 単独では細胞増殖試験を抑制しなかった。次に TISC の三つの細胞群をそれぞれセルソーターを用いて分離し、それぞれについて ELISA と細胞増殖抑制試験を行った。三群のうち ImC のみが TGF-beta と IL-10 を産生していたが、各群とも細胞増殖試験を抑制しなかった。TISC は三つの細胞群が協力しあって、腫瘍存在下で宿主の免疫応答を抑制することが示唆された。

**【考察】**

腫瘍そのものと同様に、腫瘍間質細胞は宿主の免疫を抑制すると考えられてきた。しかしそのメカニズムは未だ不明な点が多い。今回我々は、TISC は三つの細胞群より構成されており、これらの各群が互いに影響を及ぼしあい、腫瘍存在下に宿主の免疫を抑制する可能性を示した。なかでも ImC は多くの報告で CD8 陽性 Tcell に対し、cell-to-cell contact によって抑制機能を持つとされてきたが、今回の我々の実験では ImC そのものはむしろ細胞増殖反応を促進する働きがあることが示された。以前からの報告では、ImC は脾臓やリンパ節より単離されており、腫瘍内部に浸潤した ImC は機能が違う可能性があると考えられた。

**【結語】**

TISC には三つの細胞群存在し、各群が協力しあって腫瘍存在下で宿主の免疫応答を抑制することが示唆された。

### 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	533	氏名	石垣 宏仁
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>本研究は腫瘍局所に浸潤した腫瘍浸潤間質細胞 (TISC) を単離し、その機能を解析したものである。</p> <p>TISC は三つの細胞群から構成されており、それらは骨髄由来の Immature myeloid cell (ImC)、非骨髄由来の CD11b<sup>+</sup>cell と CD11b<sup>-</sup>cell であった。また TISC は TGF-<math>\beta</math> と IL-10 を産生した。TISC は腫瘍存在下でのみリンパ球増殖反応を抑制し、この抑制は抗 TGF-<math>\beta</math> 抗体/抗 IL-10 抗体を用いても解除できなかった。TISC の三つの細胞群は単独では細胞増殖を抑制しなかったが、三つの細胞群が同時に存在する時のみ抑制した。以上より TISC は三つの細胞群より構成されており、これらが腫瘍存在下に宿主の免疫を抑制する可能性が示唆された。</p> <p>このように本研究は腫瘍局所内に浸潤している細胞群について重要な知見を与えたものであり、博士 (医学) の学位論文に値するものである。</p> <p>尚、本学位申請者は平成 18 年 8 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められた。</p> <p style="text-align: right;">(平成 18 年 9 月 4 日)</p>			