

氏 名 山 本 依 志 子
学 位 の 種 類 博 士 (医 学)
学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 5 6 号
学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 0 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目 Analysis of splenic Gr-1^{int} immature myeloid cells in tumor-bearing mice
(担 癌 マウス にお ける 脾 臓 内 GR-1^{int} の 未 熟 ミエロイド 細胞 の 機 能 解 析)

審 査 委 員 主 査 教 授 藤 山 佳 秀
副 査 教 授 岡 部 英 俊
副 査 教 授 清 水 猛 史

論文内容要旨

*整理番号	360	しめい 氏名	やまもと よしこ 山本 依志子
学位論文題目	Analysis of splenic Gr-1 ^{int} immature myeloid cells in tumor-bearing mice (担癌マウスにおける脾臓内 Gr-1 ^{int} 未熟ミエロイド細胞の機能解析)		
<p>【目的】 癌は宿主の免疫機構に打ち勝って増殖し、宿主を死に至らせる。悪性腫瘍細胞の免疫監視機構からの逃避にはTGF-βやIL-10などの抑制性サイトカインやCD4⁺CD25⁺の調節性T細胞などの、いくつかのメカニズムが存在するが、CD11b⁺Gr-1⁺の表面マーカを持つ未熟ミエロイド細胞 (Immature myeloid cells : ImC) はその一つとして機能していると考えられている。腫瘍細胞を攻撃するT細胞の機能をこの細胞群がどのように抑制しているのかということに関しては、NOやIL-10、PGE₂、TGF-βなどの液性因子や、reactive oxygen species (ROS) によりT細胞上の鎖の発現を抑制して直接T細胞の増殖を抑える、などの機構が提唱されている。一方、ImCとされる細胞群が不均一なため、ImCの免疫抑制機構の解析は難しく、メカニズムははっきりと分かっていない。そこで、今回はImC中の表面抗原であるGr-1の発現量に着目して細胞群を分離し、その機能を解析した。</p> <p>【方法】 C57/BL6またはBalb/cマウスの皮下にさまざまな腫瘍細胞を移入し、腫瘍径が1cmくらいになった時点で担癌マウスから脾臓を取り出した。脾細胞中のCD11b⁺Gr-1⁺の細胞を染色し、その割合をフローサイトメーターで解析した。さらに、脾細胞はMACSビーズでCD11b⁺細胞を分離した後、CD11b⁺Gr-1^{hi}、CD11b⁺Gr-1^{int}の細胞群をソーティングした。おのおのの細胞群はCD3抗体で刺激したT細胞と共培養を行い、共培養したT細胞の細胞内サイトカインを染色し、フローサイトメーターで解析した。次にソーティングしたCD11b⁺Gr-1^{hi}、CD11b⁺Gr-1^{int}の細胞群をGM-CSF存在下で7日間培養し、表面抗原を染色、解析した。分化させた細胞群についても、同様にCD3抗体で刺激したT細胞と共培養し、細胞内サイトカインの染色、T細胞増殖試験を行った。さらにImCの培養上清でもT細胞増殖試験を行った。</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。

(続 紙)

【結果】

担癌マウスの脾臓内未熟ミエロイド細胞 (ImC) はマウスの系統、腫瘍細胞の違いに関わらず、増加を認めた。担癌マウスの脾臓から取り出したばかりのImCはGr-1^{int}分画のみが、CD8⁺T細胞のIFN- γ の産生を抑制した。さらにGM-CSF存在下で7日間培養したところ、Gr-1^{hi}の分画からはCD11c⁺F4/80⁻の細胞が、Gr-1^{int}の分画からはCD11c⁺F4/80⁺の細胞が分化した。分化したGr-1^{hi}、Gr-1^{int}の細胞群においては両者ともにCD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞のIFN- γ の産生を抑制した。さらに分化したGr-1^{hi}、Gr-1^{int}の細胞群ではGr-1^{int}細胞群のみが、T細胞の増殖を抑制した。分化させたGr-1^{int}の培養上清を用いても、T細胞の増殖抑制は認められた。また、分化したGr-1^{int}の細胞表面にはPDL1の発現が上がっているにも関わらず、抗PDL1抗体にて細胞表面のPDL1をブロックしてもT細胞の増殖抑制は解除されなかった。

【考察】

担癌マウス内では未熟ミエロイド細胞が増加しており、その細胞群はT細胞の機能、特に細胞性免疫を抑制するように働いていることが明らかになった。今回は未熟ミエロイド細胞のさらなる機能解析のためにGr-1の発現量により2つの細胞分画に分けて実験を行ったが、今回の結果より、Gr-1^{hi}でなくGr-1^{int}の分画が抑制機能を主に担っていると考えられた。分化させたGr-1^{int}のImCはT細胞のサイトカイン産生能、T細胞の増殖も抑制することが判明し、それはcell to cell contactでなく、液性因子によるものであることが分かった。しかし、Gr-1^{int}の分画をGM-CSFで分化させた細胞には、CD11c⁺F4/80⁺の細胞群が現れるとはいえ、2/3がGr-1⁺CD11c⁺F4/80⁻の細胞になってしまうことを考えると、Gr-1の発現量だけではImCの不均一性の問題は完全に解決できていないものと考えられた。また、in vitroでGM-CSF存在下で分化させて抑制能を評価したが、生体内では実際どのように分化しているかは未だ解析できていない。また、分化したGr-1^{int}の細胞群の表面抗原はCD11b⁺Gr-1⁺CD11c⁺F4/80⁺CD86^{lo}MHCclassII^{hi}となり、アナジを誘導する抗原提示細胞の表面抗原に類似していた。従って、さらなる抗原提示細胞としての機能を解析する必要があると考えられた。

結論：CD11b⁺Gr-1⁺の表面抗原を持つ未熟ミエロイド細胞は、Gr-1^{int}の分画においてより強くT細胞の機能を抑制する。Gr-1^{int}の細胞分画はGM-CSFによりさらにT細胞の増殖抑制能を獲得し、その機能は細胞同士の接触によるものではなく、液性因子によるものであることが示された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	360	氏名	山本 依志子
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>未熟ミエロイド細胞は、担癌個体における腫瘍細胞が免疫監視機構から逃れるメカニズムに関わるとされるが、未熟ミエロイド細胞とされる細胞群が不均一なこともあり、その抑制機構の詳細は未だ解明されていない。</p> <p>本研究は、未熟ミエロイド細胞を表面抗原である Gr-1 の発現の強さにより、Gr-1^{hi} と Gr-1^{int} に分画し、各々の T 細胞のサイトカイン産生と増殖に及ぼす作用から抑制機構を検討したものである。</p> <p>その結果、以下のことが判明した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 未熟ミエロイド細胞は担癌個体の体内で増加する。 2) 脾臓から単離したばかりの未熟ミエロイド細胞のうち Gr-1^{int} の分画は T 細胞のサイトカイン産生を抑制する。 3) 未熟ミエロイド細胞を GM-CSF で分化させると、Gr-1^{int} の細胞群は CD11c⁺F4/80⁺ の細胞に分化し、T 細胞のサイトカイン産生さらには T 細胞の増殖を抑制する。 4) その抑制機構は cell to cell contact による direct inhibition ではなく、液性因子を介するものである。 <p>以上のことより、担癌個体の宿主免疫抑制機構に関わるメカニズムを解明したもので、今後の癌免疫治療に有益な情報をもたらす論文であり、よって博士(医学)の称号を授与するに値する。</p>			
(平成 20 年 2 月 15 日)			