

(別紙様式第3号)

# 論 文 要 旨

## 論文題目

Tumor-derived Heat Shock Protein70-pulsed Dendritic Cells Elicit  
Tumor-specific Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) and Tumor Immunity

(腫瘍由来 Hsp70 と樹状細胞を用いた腫瘍特異的 CTL の誘導と免疫療法への応用)

氏 名 上田剛生 (雷)

自己の腫瘍より得られた熱ショックタンパク質 (H s p) をワクチンすると、その H s p が単離された腫瘍に特異的な免疫応答を誘導できる。H s p による免疫効果は抗原提示細胞の存在 (A P C) に完全に依存しており、最近その A P C 上の H s p 受容体が同定された。本研究では骨髄由来の樹状細胞 (D C) が H s p - ペプチド複合体を取り込み、ペプチドを M H C - C l a s s I へ提示することを示す。加えて、腫瘍由来 H s p をパルスした D C を免疫することで複数の抗原ペプチドに対する強いキラー T 細胞 (C T L) の誘導が可能であった。①腫瘍由来 H s p 結合ペプチドの D C によるクロスプレゼンテーション：マウス P 8 1 5 細胞より精製した H s p 7 0 を D C にパルスした後 P 8 1 5 抗原ペプチド特異的 C T L と共培養し、C T L の I F N -  $\gamma$  の産生量を測定した。その結果、腫瘍由来 H s p 7 0 をパルスした D C は特異的 C T L に認識された。②腫瘍由来 H s p 7 0 をパル

スしたDCの免疫によるCTLの誘導：マウスに腫瘍由来HSP70をパルスしたDCを免疫しCTLの誘導を評価した。その結果P815細胞およびその抗原ペプチド（P815A）に対する傷害活性を有するCTLが誘導された。さらにP815由来の別の抗原ペプチド（P815E）も、誘導されたCTL lineに認識された。③腫瘍由来Hsp70をパルスしたDCの免疫による腫瘍の増殖抑制：P815細胞を移植したマウスに対し皮下にP815由来Hsp70をパルスしたDCを4回免疫した結果、有意な抗腫瘍効果を認めた。次にその誘導された免疫細胞の同定のため、マウスのCD4、CD8T細胞を特異的な抗体の腹腔内投与によりそれぞれdepleteした。その結果CD8T細胞のdepleteにより抗腫瘍効果が完全に失われた。④腫瘍由来Hsp70の取り込みとMHC-Class Iへの提示経路：Hsp70を介した抗原の処理と提示について検討

した。Alexa 488 でラベルした P815 由来 Hsp70 を DC に加えて培養した後固定し、細胞内小器官を Alexa 594 で標識してレーザー顕微鏡で観察した。その結果 DC に取り込まれた Hsp70 はエンドソームにのみ認められ、ライソソームや小胞体にはみられなかった。また Hsp70 は 4°C では細胞表面のみにみられ、37°C で細胞内へ取り込まれることから温度依存性のエンドサイトーシスによることが示唆された。次に Class I への提示に TAP 分子が必要か否かを WT と TAP<sup>-/-</sup> マウス由来の DC を用いて検討した。その結果 TAP<sup>-/-</sup> マウスの DC では CTL に認識されなかったことから Hsp70 を介する抗原提示機構は TAP 依存性であることが示された。以上より本研究では Hsp70 を介した DC による腫瘍特異的 CTL の効率的なクロスプライミングが可能であることが示され、癌患者における新しい免疫療法開発の可能性を示唆している。

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	上田剛生
論文審査委員	平成 16 年 2 月 25 日		
	主査教授	荻谷 研一	印
	副査教授	吉井 興志彦	印
	副査教授	澤いづみ	印
(論文題目)			
Tumor-derived Heat Shock Protein70-pulsed Dendritic Cells Elicit Tumor-specific Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) and Tumor Immunity			
(論文審査結果の要旨)			
上記の論文に対し、研究目的、研究内容、研究成果と学術的意義等について審査し、次の結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
自己の腫瘍より得られた熱ショックタンパク質 (H s p) をワクチンすると、その H s p が単離された腫瘍に特異的な免疫応答を誘導できる。H s p による免疫効果は抗原提示細胞 (A P C) の存在に完全に依存しており、最近その A P C 上の H s p 受容体が同定された。本研究では骨髄由来の樹状細胞 (D C) が H s p -ペプチド複合体を取り込み、ペプチドを M H C - C l a s s I へ提示することを示す。加えて、腫瘍由来 H s p をパルスした D C を免疫することで複数の抗原ペプチドに対する強いキラー T 細胞 (C T L) の誘導が可能であるか検討した。			
2. 研究内容			
①腫瘍由来 H s p 結合ペプチドの D C によるクロスプレゼンテーション：マウス P 8 1 5 細胞より精製した H s p 7 0 を D C にパルスした後 P 8 1 5 抗原ペプチド特異的 C T L と共培養し、C T L の I F N - $\gamma$ の産生量を測定した。その結果、腫瘍由来 H s p 7 0 をパルスした D C は特異的 C T L に認識された。②腫瘍由来 H s p 7 0 をパルスした D C の免疫による C T L の誘導：マウスに腫瘍由来 H S P 7 0 をパルスした D C を免疫し C T L の誘導を評価した。その結果 P 8 1 5 細胞およびその抗原ペプチド (P 8 1 5 A、P 8 1 5 E) に対する傷害活性を有す			

- 備考 1 用紙の規格は、A4 とし縦にして左横書とすること。  
2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。  
3 \*印は記入しないこと。

るCTLが誘導された。③腫瘍由来Hsp70をパルスしたDCの免疫による腫瘍の増殖抑制：P815細胞を移植したマウスに対し皮下にP815由来Hsp70をパルスしたDCを4回免疫した結果、有意な抗腫瘍効果を認めた。次にマウスのCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T細胞を特異的な抗体の腹腔内投与によりそれぞれdepleteした。その結果CD8<sup>+</sup>T細胞のdepleteにより抗腫瘍効果が完全に失われた。④腫瘍由来Hsp70の取り込みとMHC-Class Iへの提示経路：Alexa488でラベルしたP815由来Hsp70をDCに加えて培養した後固定し、レーザー顕微鏡で観察した。その結果DCに取り込まれたHsp70はエンドソームにのみ認められた。またHsp70は4℃では細胞表面のみにみられ、37℃で細胞内へ取り込まれることから温度依存性のエンドサイトーシスによることが示唆された。次にClass Iへの提示に抗原のプロセッシングに関連する輸送体(TAP)分子が必要か否かを野生型とTAP<sup>-/-</sup>マウス由来のDCを用いて検討した。その結果、Hsp70を介する抗原提示機構はTAP依存性であることが示された。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究はHsp70を介したDCによる腫瘍特異的CTLの効率的な誘導が可能であることを明らかにした初めての論文であり、癌患者における新しい免疫療法開発の可能性を示唆していることから、その研究成果は高く評価されるものである。

よって、本論文は学位授与に十分に値すると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
  - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。