

メラノーマ局所に浸潤する制御性 T 細胞と樹状細胞の解析

申請者 名古屋市立大学大学院
医学研究科加齢環境皮膚科学
准教授 山崎小百合

共同研究者 名古屋市立大学大学院
医学研究科加齢環境皮膚科学
教授 森田明理

悪性腫瘍に対する免疫反応は制御性 T 細胞にて抑制されている事が明らかになっている。免疫反応の重要な regulator であるプロフェッショナルな抗原提示細胞である樹状細胞が制御性 T 細胞の増殖誘導に重要な役割を果たしている事を報告してきた。本研究では、メラノーマ局所に浸潤する制御性 T 細胞と樹状細胞の相互関係を明らかにし、メラノーマに対する免疫抑制機構を解除する新しい免疫療法の開発の基礎となるデータを出す事を目標とし、下記の実験を行った。

最初に、C57BL6 マウスの背部に B16 メラノーマを皮下接種し、腫瘍の成長、所属リンパ節、脾臓における制御性 T 細胞の増殖を検討した。制御性 T 細胞は、CD4, CD25, Foxp3 に対する蛍光抗体で染色し Flow cytometry で解析した。B16 メラノーマの成長とともに所属リンパ節、脾臓にて Foxp3+CD25+CD4+制御性 T 細胞の CD4 に対する割合が増える事を確認した。

次に、confocal microscopy を使用して Foxp3+CD25+CD4+制御性 T 細胞、CD11c+樹状細胞を multiple color で観察する条件を設定した。染色条件の設定に時間を要したが、マウスの脾臓、リンパ節、皮膚を使用し、Foxp3+CD25+CD4+制御性 T 細胞、CD11c+樹状細胞をクリアーに染色できる条件を設定した (図 1)。また、皮膚の樹状細胞サブセットを区別するため、Langerin に対する抗体にて染色する条件も決定した (図 2)。現在メラノーマ局所におけるサンプルの観察を進行中である。

図1 リンパ節の抗Foxp3,CD4, CD11c抗体による制御性T細胞と樹状細胞の同定

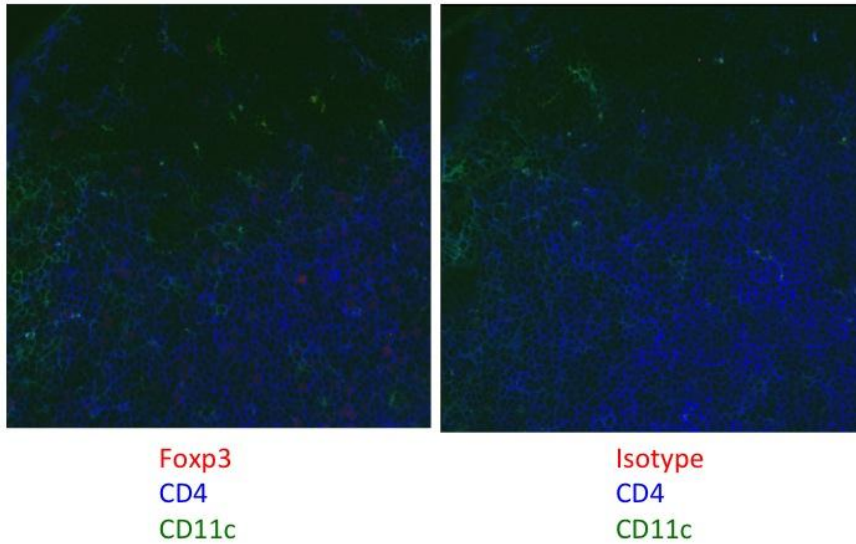
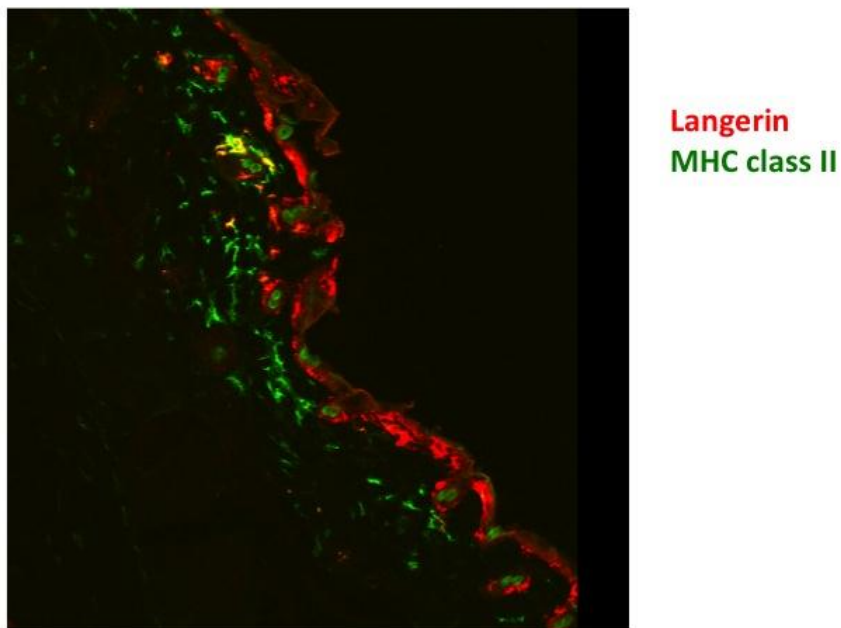


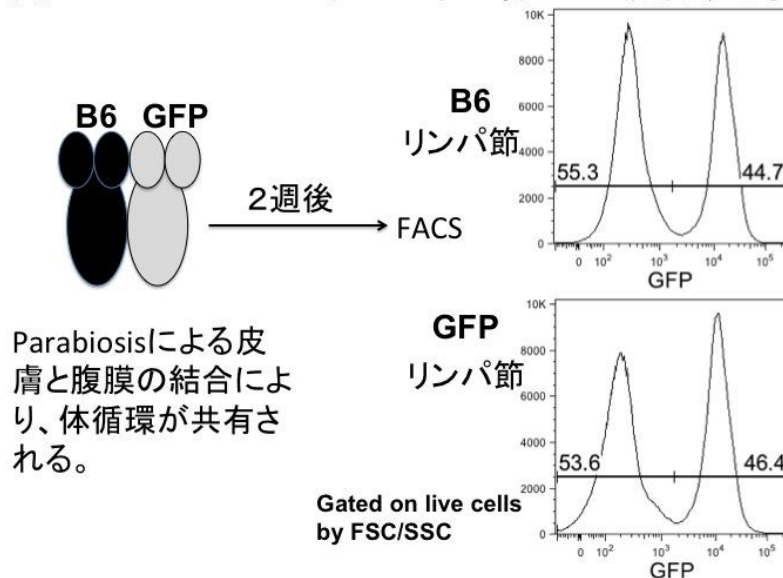
図2 皮膚のランゲリン陽性樹状細胞の同定



制御性T細胞と樹状細胞の turn over を観察するため、正常マウスにおけるマウスの腹膜と皮膚を縫合する事で2個体の体循環を共有させる parabiosis の系をセットした。GFP

C57BL6 マウスと wild type C57BL6 マウスを parabiosis し、リンパ節、脾臓の GFP+、GFP- 細胞の割合を flow cytometer で解析した。2週間で約50%細胞のキメラになる事が確認できた(図3)。この系を使用し、メラノーマ接種時の制御性T細胞と樹状細胞の turn over の観察を行いつつある。

図3 Parabiosisでリンパ球は約50%混合する。



また、CD11c+樹状細胞の増殖を誘導する成長因子 FLT3ligand を発現する B16melanoma の株 (Flt3-B16) を搬入し、マウス肝炎ウイルス、マイコプラズマ、センダイウイルスのPCRを行い、陰性である事を確認した。予備実験にて、マウスの背部に接種1-2週後、脾臓が拡大し、10倍近くの樹状細胞が採取される事

を確認した。通常の B16 メラノーマと Flt3-B16 メラノーマにおいてメラノーマ局所に浸潤する 制御性 T 細胞と樹状細胞の turn over の解析を行うため、CD45.1B6 マウスを大阪大学より搬入した。B16メラノーマを CD45.1B6 マウスの背部に接種した腫瘍を回収し、CD45.1をマーカーとしてメラノーマ細胞と宿主からの浸潤細胞を区別し、MACS gentle homogenizer を使用し酵素処理の上、浸潤制御性 T 細胞、樹状細胞を回収する条件を現在設定しつつある。

研究実績報告書