

学 位 論 文 題 名

Immunoregulatory cytokine production by tumor-bearing
rat spleen cells and its modulation by bleomycin.

（担癌ラット脾細胞による免疫制御サイトカイン産生と
ブレオマイシンによるその修飾）

学位論文内容の要旨

目 的

担癌宿主の免疫反応性の低下は、癌細胞の持続的増殖の促進要因として問題になる。筆者は抗癌剤 bleomycin (BLM) が、正常ラット脾細胞のインターロイキン 2 (IL-2)、インターロイキン 6 (IL-6)、インターフェロン (IFN)、腫瘍壊死因子 (TNF) などの免疫制御サイトカイン産生能を増強することを明らかにした。そこでこの研究では、担癌宿主における免疫反応の低下の原因を、免疫制御サイトカイン産生能の観点から検討した。すなわち、筆者はマイトゲン刺激正常ラット脾細胞を対照として、ラット脾細胞の免疫制御サイトカイン産生能の担癌経過に伴う変化を観察し、さらに、BLM 投与が担癌ラット脾細胞のサイトカイン産生能を改善するか否かを検討した。

材料および方法

1) 動物：北海道大学医学部動物実験施設より供給された10～12週令の WKAH ラットを用いた。

2) 担癌モデル：WKAH ラットに同系可移植性線維肉腫 KMT-17細胞 (1×10^5) を皮下移植して担癌宿主モデルとした。

3) 薬剤と試薬：日本化薬(東京)より供給された bleomycin (BLM) を PBS に溶解し、ラットには担癌の 8 日目に 5 mg/kg を 1 回 i. p. 投与した。細胞培養には、10% 熱不活化胎仔牛血清 (Filtron, Australia), sodium pyruvate, L-glutamine および 2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 培地 (RPMI 培地) を用いた。3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5

-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma M - 2128) は 5 mg/ml の濃度に PBS に溶解して用いた。

4) 脾細胞のサイトカイン産生能：正常ラットおよび KMT-17 腫瘍移植後 5, 8, 10, 12, 14 日目の非治療担癌ラット, また BLM 治療担癌ラットの脾細胞を無菌的に調製し, concanavalin A (Con A, $1.0 \mu\text{g/ml}$) あるいは lipopolysaccharide (LPS, $0.1 \mu\text{g/ml}$) を添加した RPMI 培地にて 20 時間培養し, 回収した上清に産生されるサイトカイン活性を bioassay にて測定した。

5) サイトカイン活性の測定：Con A 刺激脾細胞上清が, IL-2 依存性 CTLL-2 細胞の増殖を 50% 支持する希釈倍数の逆数をそれぞれのサンプルの IL-2 活性とした。同様に, LPS 刺激脾細胞の上清が IL-6 依存性 MH-60 細胞の増殖を 50% 支持するのに必要な濃度を 1 単位とし, サンプル中の IL-6 活性を計算した。ヒトリコンビナント IL-2 および IL-6 をそれぞれのサイトカイン測定の陽性対照として用いた。これらの assay に必要な増殖細胞数の計測には, MTT-assay を適用した。また LPS 刺激上清中の tumor necrosis factor (TNF) 活性は, ヒト TNF による細胞傷害性を標準とし, TNF 感受性の L-929 細胞を用いて測定した。すなわち, 2 倍段階希釈したサンプルを actinomycin D 共存下で L-929 細胞に 24 時間作用させ, 生存細胞を crystal violet で染色し, 細胞の増殖を 50% 抑制する濃度を 1 単位として TNF 活性を計算した。

6) 脾細胞の Con A 反応性：脾細胞を Con A で 72 時間培養し, 最後の 18 時間 ^3H -thymidine でパルス標識した。細胞をグラスファイバーフィルター紙にて回収して, シンチレーションスペクトロスコープにて測定し, thymidine の取り込みを算定し, 脾細胞の増殖反応を検討した。

7) 腫瘍組織の病理組織学的検索：担癌の 13 日目の非治療腫瘍組織および 8 日目から 5 日間連日 BLM (5 mg/kg/day) で治療した腫瘍組織の HE 標本作製し, 病理組織学的に比較検討した。

結 果

1) 担癌ラット脾細胞のサイトカイン産生：

担癌ラットでは, IL-2 の産生能が腫瘍移植の 5 日後の腫瘍がようやく触知可能になる時期に, 既に, 正常ラットの 50% に抑制され, 8 日目には検出限界ぎりぎりとなる。その後, 10 日目には一時的に回復するが, 腫瘍の増大に伴って再び徐々に低下し, 14 日目には強く抑制された。これら IL-2 の産生能の低下は BLM 投与によって, 担癌の 14 日目にもほぼ正常レベルまで回復した。同様に, IL-6, TNF 産生能も担癌によって著しく抑制されるが, BLM 投与によ

て、正常レベルに回復することが明らかになった。

2) Con A 反応性：

脾細胞の Con A ($1.0 \mu\text{g/ml}$) 刺激による増殖反応は、担癌によって正常の50%以下に低下し、BLM 治療によっても正常レベルには回復しない。このことは、Con A 刺激脾細胞の IL-2 産生能が BLM 治療によって回復する機序を単に Con A 反応性回復だけでは説明できないことを示唆する。

3) 腫瘍組織の病理組織学的検討：

非治療腫瘍では腫瘍細胞の旺盛な増殖を示す核分裂像が高頻度に認められ、リンパ球の浸潤をほとんど認めないが、BLM 治療腫瘍では強いリンパ系細胞の浸潤と線維化が観察された。これらの組織像から、BLM 治療には宿主介在性の免疫学的効果が関与していることが示唆された。

考 察

担癌宿主の免疫能の低下の原因として、免疫制御サイトカイン産生能低下を実験的に証明し、これを改善するために、抗癌剤 bleomycin (BLM) 投与が有効であることを示した。担癌状態におけるサイトカイン産生の低下を補うために、リコンビナントサイトカインを外部から投与する試みがサイトカイン療法として提唱された。しかし、その効果は期待したほどではなく、根本的には、内因性サイトカイン産生能の改善を促す有効な治療法の開発が望まれている。筆者は、既に BLM 投与が正常ラット脾細胞のサイトカイン産生能を増強することを明らかにしてきたが、今回の実験成績は、BLM が担癌宿主においても、低下したサイトカイン産生能をほぼ正常レベルまで回復することを示している。これらの結果と当研究室の既報の成績から、BLM による癌治療効果には、サイトカイン産生増強を背景とした免疫エフェクターの活性化による宿主介在効果が関与していることが強く示唆される。それは、また、病理組織学的に BLM 治療腫瘍組織に強いリンパ系細胞の浸潤が観察されたことから支持される。

現時点では、免疫制御サイトカイン産生能回復における BLM の作用機序は明らかにされていないが、少なくとも単にマイトゲン反応性を高めているだけでない。担癌宿主におけるサイトカイン産生の抑制には、ヘルパー T リンパ球の機能不全のほか、癌細胞や担癌状態での宿主細胞が産生する prostaglandin E_2 (PGE_2), transforming growth factor (TGF) $-\beta$ が関与することが報告されている。BLM がこれら PGE_2 , TGF $-\beta$ の産生や働きを阻害している可能性が推察される。

結 語

1) 担癌ラット脾細胞の IL-2, IL-6 および TNF などのサイトカイン産生能が, 腫瘍増殖に伴って抑制されることを明らかにした。

2) 抗癌剤 bleomycin を腫瘍移植 8 日目に投与することによって, 担癌ラットで抑制されるサイトカイン産生能がほぼ正常レベルに回復することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 武 市 紀 年

副 査 教 授 吉 木 敬

担癌宿主の免疫反応性の低下は, 感染症に対する抵抗性を減弱させるばかりでなく, 癌細胞の持続的増殖を助ける要因としても問題になる。そこで申請者は, 担癌宿主における免疫反応の低下の原因を, 担癌ラット脾細胞の免疫制御サイトカイン産生能の観点から検索し, 抗癌剤 bleomycin (BLM) 投与がこれを改善するか否かを検討した。

実験は, 北海道大学医学部動物実験施設より供給された10~12週令の WKAH ラットに同系可移植性線維肉腫 KMT-17細胞 (1×10^5) を皮下移植して担癌宿主モデルとして施行した。BLM を PBS に溶解し, ラットには担癌の 8 日目に 5 mg/kg を 1 回 i. p. 投与した。正常ラットおよび KMT-17腫瘍移植後 5, 8, 10, 12, 14 日目の非治療担癌ラット, BLM 投与担癌ラットの脾細胞を無菌的に調製し, concanavalin A (Con A) あるいは lipopolysaccharide (LPS) を添加した RPMI 培地にて 20 時間培養し, 回収した上清に産生されるサイトカイン活性を bioassay にて測定した。

その結果, 担癌ラットでは, IL-2 の産生能が腫瘍移植の 5 日後の腫瘍がようやく触知可能になる時期に, 既に, 正常ラットの 50% に抑制され, 8 日目には検出限界ぎりぎりに低下し, その後, 10 日目には一時的に回復するが, 腫瘍の増大に伴って再び徐々に低下し, 14 日目には強く抑制された。これら IL-2 の産生能の低下は BLM 投与によって, 担癌の 14 日目にもほぼ正常レベルまで回復した。同様に, IL-6, TNF 産生能も担癌によって著しく抑制されるが, BLM 投与によって, 正常レベルに回復することが明らかになった。さらに脾細胞の Con A 刺

激による増殖反応を検討した結果、担癌によって、正常の50%以下に低下し、IL-2産生能の低下の機序の一部を説明できたが、BLM治療によっても正常レベルには回復しなかったことにより、サイトカイン産生能がBLM投与によって回復する機序は単にCon A反応性だけでは説明できなかった。また、BLM治療腫瘍では強いリンパ系細胞の浸潤と線維化を観察した。

以上の研究成果は、担癌宿主の免疫能の低下の原因として、免疫制御サイトカイン産生能低下を実証したものであり、これを改善するために、抗癌剤 bleomycin (BLM) 投与が有効であることを示唆している。近年、担癌状態におけるサイトカイン産生の低下を補うために、リコンビナントサイトカインを外部から投与する試みがサイトカイン療法として提唱された。しかし、その効果は期待したほどではなく、根本的には、内因性サイトカイン産生能の改善を促す有効な治療法の開発が望まれる。申請者は、既に BLM 投与が正常ラット脾細胞のサイトカイン産生能を増強することを明らかにしてきたが、今回の実験成績により、担癌宿主においても、BLM が低下したサイトカイン産生能をほぼ正常レベルまで回復させることを示した。また、病理組織学的に BLM 治療腫瘍組織に強いリンパ系細胞の浸潤も観察している。これらの結果と当研究室の既報の成績から、BLM による癌治療効果には、サイトカイン産生増強を背景とした免疫エフェクターの活性化による宿主介在効果が関与していることが強く示唆される。

現時点では、免疫制御サイトカイン産生能回復における BLM の作用機序は明らかにされていないが、少なくとも単にマイトゲン反応性を高めているだけでない。担癌宿主におけるサイトカイン産生の抑制に関与するヘルパーTリンパ球の機能不全のほか、癌細胞や担癌状態での宿主細胞が産生する prostaglandin E_2 (PGE_2), transforming growth factor (TGF) - β などの免疫抑制因子の産生や働きを BLM が阻害している可能性を推察した。

論文発表に際し、武市教授、吉木教授、斎藤(和)教授、牧田教授より、BLM の投与量、脾細胞サブセットへの影響、サイトカイン産生能を増強する抗癌剤の化学構造の特徴の有無、Biological response modifiers (BRM) によるサイトカイン産生能増強と BLM によるそれとの比較、ほかの腫瘍系での検討の有無、試験管内での BLM の効果、BLM の臨床的副作用である肺線維症と免疫増強との関係などについて質問があったが、申請者は妥当な応答をなし得た。また、武市教授、吉木教授に個別審査をいただき、それぞれ合格と判定された。

以上、本研究は担癌宿主における免疫能の低下を免疫メディエーターであるサイトカイン産生能の低下から把握することにより、これを改善するために、いわゆる BRM でなく癌細胞直接傷害活性も示す抗癌剤 bleomycin が有効であることを示したものであり、今後の癌治療の新たな進展に大きな示唆を与えるものとして博士(医学)の学位に相当するものと判定した。