

学位論文題名

Antileukemic Effect of Interleukin-2
on Spontaneous Development of Leukemia
after H-2-Compatible Allogeneic Bone
Marrow Transplantation in AKR/J Mice

(AKR/JマウスにおけるH-2一致同種骨髄移植後の
インターロイキン-2投与による自然発症白血病に対する抗白血病効果)

学位論文内容の要旨

目的

AKR/Jマウスは、胸腺由来の白血病を自然発症することが知られている。その発病プロセスには、種々の因子が関与しており、現在までに、AKR/Jマウスの白血病の発症を予防する様々な試みが報告されている。胸腺摘出、白血病発症に抵抗性の遺伝的素因を持つマウスよりの同種骨髄移植、白血病性変化を来たしうる細胞のモノクローナル抗体による除去などにより白血病の発症が予防できることが知られている。一方、最近、インターロイキン-2投与により、H-2一致及び不一致同種骨髄移植後の移植片対宿主効果(GVL効果)が増強されることが報告されてきた。今回の研究では、白血病発症に抵抗性でないC3H/HeJマウスからの同種骨髄移植後に、インターロイキン-2を投与して、AKR/Jマウスの自然発症白血病を予防しえるかどうかについて検討した。

材料および方法

- 1) マウス：H-2の一致したAKR/JとC3H/HeJマウスとを用いた。マウスは、SPF環境下で飼育し、骨髄移植には6-8週令の雄を用いた。
- 2) 骨髄移植：キメラマウスは、AKR/Jマウスに860 cGyのX線照射後、

1 x 10⁷個のC3H/HeJマウスの骨髄細胞を輸注して作製した。

3) インターロイキン-2 (IL-2) 投与：IL-2は、移植直後より1日5,000単位を、7日間、腹腔内に投与し、これを毎月繰り返した。投与期間は、1年間のみ投与する実験群と死ぬまで継続する群とに分けた。コントロール群には、PBSを投与した。

4) マウス脾細胞の調整：in vitro assay 用に、各実験群のマウスより脾臓を摘出し、ガラスホモジェナイザーにて押し潰し、細胞を回収した。サイトカインのmRNAを解析するためには、赤血球をTris-NH₄Clで処理してから用いた。白血病発症後のマウスの白血病細胞も、同様の方法で調整した。

5) キメリズムの検索：キメラマウス脾細胞を、Thy1.2モノクローナル抗体と補体とで処理し、死細胞の割合より検討した。

6) 細胞障害性試験：脾細胞の細胞障害活性は、標的細胞にLAK活性の標的であるP815、NK活性の標的であるYAC1、AKR/JマウスのT細胞性リンパ腫由来のcell lineであるBW5147を用いた。細胞障害活性は⁵¹Cr遊離4時間法にて算定した。

7) マイトジェンおよびIL-2反応性試験：脾細胞を10%牛胎児血清および2 x 10⁻⁵M 2-メルカプトエタノールを添加した培養液に入れ、ConA、PHA、PWM、LPSを各々終濃度10ug/ml、およびIL-2を終濃度1,000単位/mlで2日間培養し、³H-サイミジンの取り込みを6時間法で測定した。白血病細胞のIL-2反応性も同様の方法で検索した。

8) tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) 産成能：脾細胞のTNF-alpha産成能は、脾細胞をLPS10ug/ml存在下で24時間培養後、その培養上清を用いて、LM細胞を標的細胞に用いたMTT法にて測定した。

9) サイトカインmRNA量の解析：脾細胞のinterleukin-1 beta (IL-1 beta)、IL-2、interleukin-4、interleukin-6、TNF-alpha、interferon-gamma (IFN-gamma)のmRNA発現量をRT-PCR法によって検索した。脾細胞よりRNAを抽出し、リバーstransクリプターゼによりcDNAに変換し、PCR法により半定量した。各々のサイトカインに対応するプライマーは、DNAシンセサイザーにて作製した。各サンプルは、25、30、35サイクルの増幅の後、ゲル電気泳動にて解析し、エチジウムブロマイドにより発色させて検討した。

10) 生存率の算定：連日マウスを観察し、死亡した場合は解剖して、白血病死かどうかを確認した。生存曲線の算定には、カプラン-マイヤー法

を用いた。

結果

1) キメリズムの検索：臨床的には移植片対宿主反応を認めなかったが、キメリズムの検索では約50%のドナー由来の細胞が認められた。

2) IL-2投与の抗腫瘍効果に与える影響：IL-2を投与されたキメラマウスの脾細胞は、コントロールに比較して、より強い細胞障害活性がP815、YAC1、BW5147のそれぞれの細胞に対して認められた。

3) IL-2投与のマイトゲンおよびIL-2反応性に与える影響：PWM、LPS、IL-2刺激に対する反応性は、IL-2投与群において亢進していた。

4) 白血病細胞のIL-2反応性に与えるIL-2投与の影響：正常AKR/Jマウスの脾細胞はIL-2に濃度依存性に反応するが、白血病細胞はIL-2への反応性が失われていた。この変化は、IL-2投与群とコントロール群とで差がなかった。

5) IL-2投与のTNF-alpha産成能に与える影響：LPSにより刺激された脾細胞のTNF-alpha産成能は、IL-2投与群で亢進していた。

6) サイトカインのmRNA発現に対するIL-2投与の影響：IL-2投与キメラマウスの脾細胞では、検索したサイトカインの中では、IL-1beta、TNF-alpha、IFN-gammaのmRNAの発現量が、コントロール群に比較して増加していた。

7) 同種骨髄移植およびIL-2投与の自然発症白血病予防効果：IL-2を死ぬまで投与した群では、生存率の上昇、および60%に白血病の発病が予防された。一方、1年間のみIL-2を投与した群では、コントロール群に比較して、明らかな生存率の改善を認めず、全例白血病死であった。

考察

今回の研究では、IL-2を長期間投与した同種キメラマウスでのみ、生存率の改善と部分的な白血病の発病阻止が観察された。1年間のみIL-2を投与したキメラマウスでは、明らかな白血病発症阻止効果は認められなかった。抗腫瘍効果の機序としては、非特異的細胞障害活性の亢進と、抗腫瘍性サイトカインの増強がその主体と考えられた。一方、キメリズムの検索結果

から、ドナー由来の細胞が主体となったGVL効果が、IL-2の長期間投与で持続的に維持されたためと推測された。今回の研究では、AKR/Jマウスの60%にのみ白血病発症を阻止しえたが、IL-2の投与方法を工夫することにより、完全なる阻止も可能であると考えられた。さらに、今後の研究によって、より詳細な抗白血病効果の機序が明らかにされると考えられるが、今回の研究の試みから、今後の白血病における骨髄移植後の再発予防に新しい展望をもたらす可能性のあることが示唆された。

結語

同種骨髄移植と移植後長期間に亘るIL-2投与により、AKR/Jマウスの白血病発症が部分的に阻止された。この抗腫瘍効果には、GVL効果の増強による可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 細 川 眞澄男

学位論文題名

Antileukemic Effect of Interleukin-2 on Spontaneous Development of Leukemia after H-2-Compatible Allogeneic Bone Marrow Transplantation in AKR/J Mice

(AKR/J マウスにおけるH-2一致同種骨髄移植後の
インターロイキン-2投与による自然発症白血病に対する抗白血病効果)

I、研究目的

AKR/Jマウスは高頻度に白血病を自然発症し、現在までに、発症を予防する様々な試みが報告されている。一方、インターロイキン-2(IL-2)は、同種骨髄移植後の移植片対白血病効果(graft-versus-leukemia:GVL効果)を増強することが報告されている。今回の研究では、C3H/HeJマウスからの同種骨髄移植後のIL-2の長期間歇投与が、AKR/Jマウスの白血病発症を抑制するかどうかについて検討した。

II、材料及び方法

- 1) キメラマウスの作製: 6-8週齢の雄のAKR/Jマウスに860cGyの放射線照射後、C3H/HeJマウスの骨髄細胞 1×10^7 個を輸注して作製した。
- 2) IL-2の投与方法: IL-2は、1日1回5,000単位を、月初めの1週間腹腔内に投与した。生存率の検索では、投与期間は、1年間のみ投与する群と、生存期間中投与を継続する群とを設定した。対照群には、PBSを投与した。
- 3) マウス脾細胞の調整: 各群のマウスより、脾臓を摘出し、ホモジェナイザーにて押し潰し、細胞を回収しin vitroの検索に用いた。
- 4) キメリズムの検索: 抗Thy1.2抗体と補体で処理し、死細胞の割合より検討した。
- 5) 細胞障害性試験: 標的細胞にはLAK活性に感受性のP815、NK活性に感受性のYAC1、AKR/JマウスのT細胞性リンパ腫由来のBW5147を用い、 ^{51}Cr 遊離4時間法にて算定した。

6) マイトジェン及びIL-2反応性：ConA、PHA、PWM、LPSを終濃度10 μ g/ml、及びIL-2を1,000単位/mlで2日間培養し、³H-TdRの取り込みを6時間法で測定した。

7) tumor necrosis factor-alpha(TNF-alpha)産生能：LPS10 μ g/ml存在下で24時間、培養後の上清を用いて、LM細胞を標的細胞にしたMTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)法にて測定した。

8) サイトカインmRNA量の解析：脾細胞をTris-NH₄Clで処理後、mRNAを抽出し、interleukin-1 beta(IL-1 beta)、IL-2、interleukin-4、interleukin-6、TNF-alpha、interferon-gamma (IFN-gamma)のmRNA発現量をreverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)法により検索した。

10) 生存曲線の算定：死亡日を記録し、白血病死の有無は解剖して確認した。生存曲線の算定は、 Kaplan-Meier法を用いた。

III、結果

1) キメリズムの検索：キメラマウス脾細胞の約50%は、ドナー由来であった。

2) IL-2投与の抗腫瘍効果に及ぼす影響：P815、YAC1、BW5147に対する障害活性は、いずれも亢進していた。

3) IL-2投与のマイトゲン及びIL-2反応性に及ぼす影響：PWM、LPS、IL-2に対する反応性が亢進していた。

4) 白血病細胞のIL-2反応性：キメラマウスの白血病細胞は、IL-2投与群、対照群ともIL-2への反応性が喪失していた。

5) IL-2投与のTNF-alpha産生能に及ぼす影響：LPS刺激後の脾細胞のTNF-alpha産生能は、IL-2投与群で亢進していた。

6) IL-2投与のサイトカインmRNA発現に及ぼす影響：IL-1 beta、TNF-alpha、IFN-gammaのmRNAの発現量が増加していた。

7) 白血病発症抑制効果：IL-2を生存期間中継続して投与した群では、60%に白血病の発症を阻止でき、生存期間の延長が認められた。一方、1年間のみIL-2を投与した群と対照群では、全例白血病を発症して、死亡した。

IV、考察及び結語

1) AKR/Jマウスに対して、C3H/HeJマウスからの同種骨髄移植及びIL-2の長期間歇投与により、白血病の自然発症を部分的に阻止しえた。

2) in vitroの脾細胞を用いた解析では、IL-2投与群において、非特異的細胞障害活性の亢進、LPS、PWM、IL-2に対する反応性の亢進、TNF-alpha産生能の増強、IL-1 beta、IFN-gamma、TNF-alphaのmRNAの発現の増強を認めた。

3) 白血病細胞のIL-2反応性は、IL-2投与群と対照群のいずれでも喪失しており、腫瘍細胞に対するIL-2の直接的影響は認められなかった。

4) 白血病発症を抑制する機序の主体は、GVL効果に関連した抗腫瘍活性の増強と考えられ、骨髄移植及びIL-2の投与方法を工夫することにより、発症の完全阻止も期待し

得ることが示唆された。

以上の結果、AKR/Jマウスの白血病発症抑制に対し、同種骨髄移植後、長期間のIL-2投与が有効であり、その機序の主体がGVL効果の増強であることが示唆された。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。