学位論文題名

癌化学療法後腫瘍組織への養子移入

LAK細胞集積増強の機序

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

LAK細胞は養子免疫療法における新しいエフェクター細胞として期待されたが、臨床応用の結果は満足ゆくものではない。その原因のひとつとして、LAK細胞の腫瘍局所への集積率の低さがある。筆者らのマウスにおける成績によれば、移入した総LAK細胞のうち、腫瘍局所に集積するのは $2.7 \pm 0.5\%$ であり、CTLと比較すると明らかに低い集積率であった。化学療法後の養子移入LAK細胞の腫瘍組織集積率は、7倍以上に増強され、治療効果も集積性に平行して著しく改善された。

本研究では、化学療法後の腫瘍組織へのLAK細胞集積率増強の機序を、腫瘍組織に産生されるLAK細胞に対するchemotactic factorとmigration inhibitory factorの観点より検索した。

II. 材料と方法

1. (動物) C57BL/6雌性マウス8-12週齢。
2. (腫瘍細胞) 3-メチルコランスレン誘発の可移植性マウス線維肉腫BMT-11細胞。
3. (サイトカインと抗体) リコンビナントヒト(rh)IL-2, rhTGF- β 1, チキン抗rhTGF- β 1ポリクローナル抗体。
4. (LAK細胞) C57BL/6マウスの脾細胞を $1,000$ JRU/mlのIL-2添加培養液で5日間培養し障害活性を測定してLAK細胞であることを確認したもの。
5. (腫瘍組織Conditioned medium) マウスの背部皮下にBMT-11細胞を 1×10^6 個移植し、増殖してきた腫瘍を14日目に摘出し細切した後、無血清培地中で24時間培養した上清をconditioned medium(CM)として使用した。また、腫瘍移植10日後にcyclophosphamide(CPM),

bleomycin(BLM), adriamycin(ADM), cisplatinum(CDDP), popleomycin (PEP), mitomycin C(MMC) 等各抗癌剤で化学療法を施行した腫瘍のCMをそれぞれの抗癌剤処理CMとした。

6. (Under agarose migration assay) 1% agaroseゲルにあけた3つの穴の中央にLAK細胞を入れ、両側の穴にそれぞれ上述のCMとコントロールの培地を入れた。3時間後、細胞がそれぞれの方向に移動した距離を測定した。CMに向かって移動した距離からコントロール培地に向かって移動した距離を減じたものをLAK-attractant活性とした。

7. (遊走阻止試験) ガラス製のキャピラリーにLAK細胞を入れ、上述のCMやコントロール培地中に24時間静置して、拡がった面積を測定した。LAK細胞がコントロール培地中において拡がった面積に対する、CMの抑制率(% inhibition)をもってLAK-MIF活性とした。

8. (RT-PCR) 上述の化学療法後4日目の腫瘍組織からRNAを抽出した後、逆転写を行ないcDNAを合成し、さらにIL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1, β -actinの各々に特異的なプライマーの存在下でPCR法によりDNAを増幅した。

III. 結 果

1. (各抗癌剤治療後の腫瘍組織CM中のLAK-attractant活性) 非治療群腫瘍組織のCMはLAK-attractant活性陰性であったが、BLM以外の抗癌剤処理CMはいずれも0.3mm以上の遊走を促し、LAK-attractant活性が陽性であった。

2. (腫瘍組織のTGF- β 1のmRNA発現の化学療法による増強) 非治療腫瘍組織で各種サイトカインのmRNA発現が認められたが、TGF- β 1のmRNAの発現のみが非治療組織では検出されず、CPMによる化学療法後の組織で検出された。

3. (rTGF- β 1のLAK-attractant活性) rhTGF- β 1のLAK-attractant活性を検索したところ、0.01ng/mlから100ng/mlの間の濃度のいずれにおいても0.3mm以上の遊走を促し、LAK-attractant活性を示した。また、新鮮脾細胞に対しては、attractant活性を示さなかった。

4. (CM中のLAK-attractant活性の抗TGF- β 1抗体による中和) 化学療法後のCMに抗TGF- β 1抗体を加えて、LAK-attractant活性を測定したところ、100 μ g/mlの濃度の抗体を加えたものでは約30%に抑制された。

5. (TGF- β 1のLAKの細胞障害活性に対する影響) TGF- β 1がLAK細胞の細胞障害活性に与える影響を、4時間⁵¹Cr遊離試験にて測定したところ、0.01ng/mlから10ng/mlの濃度までのいずれにおいても細胞障害活性に影響を与えなかった。

6. (各抗癌剤治療後の腫瘍組織培養上清中のLAK-MIF活性) BLMを除いたいずれの抗癌剤治療後のCMもLAK-MIF活性を示した。明らかにLAK-MIF活性を示すCPM治療後のCMも、新鮮脾細胞に対しては有意なMIF活性を示さず、多形核白血球に対しては逆にその random migrationを促進させた。

7. (LAK-MIFの分子量) 化学療法後のCMを3kDa以下と以上のフラクションに分けて、LAK-MIF活性を検索したところ、3kDa以下のフラクションがLAK-MIF活性を示した。

IV. 考 察

筆者らは以前より、癌化学療法とLAK養子免疫療法を併用することで相乗的な治療効果を上げることができ、併用効果の機構として、癌化学療法後の腫瘍組織へのLAK細胞集積率が上昇することを報告して来た。今回、集積率上昇の機序の解析を行なったところ、LAKの集積率を上昇させる2つの因子の存在が明らかとなった。LAK-attractant活性を示すTGF- β ₁と、LAK-MIFの2種のサイトカインが化学療法後の腫瘍組織に産生されており、この2つの因子の働きで、LAK細胞の腫瘍局所への集積率は上昇していると推察された。

LAK-attractantについては、今回その1種がTGF- β ₁であることを明らかにすることができた。一方、LAK-MIF活性を示すサイトカインの同定はできなかったが、その分子量が3kDa以下でTGF- β ₁のそれとは異なることから、同一物質でないことは明らかである。LAK-attractantとLAK-MIFは、それぞれLAK細胞を引き寄せて、なおかつ留めておくという二段階にわたるLAK細胞の腫瘍組織抑留機構に働くものと考えられた。

V. 結 語

1. 癌化学療法後の腫瘍組織に初めて産生されるようになるTGF- β ₁がLAK-attractant活性を示すことを明らかにした。
2. TGF- β ₁はエフェクター段階ではLAK細胞の癌細胞障害性を抑制しなかった。
3. 癌化学療法後の腫瘍組織中には、分子量3kDa以下の、TGF- β ₁とは異なるLAK-MIFが産生されることを明らかにした。
4. 癌化学療法後腫瘍組織にLAK細胞の集積が増強される機序として、腫瘍局所におけるTGF- β ₁とLAK-MIFの産生が明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

癌化学療法後腫瘍組織への養子移入

LAK 細胞集積増強の機序

LAK細胞は養子免疫療法における新しいエフェクター細胞として期待されたが、臨床応用の結果は満足ゆくものではない。その原因のひとつとして、LAK細胞の腫瘍局所への集積率の低さがある。申請者らのマウスにおける実験成績は、腫瘍組織への養子移入LAK細胞の集積率は化学療法により7倍以上に増強され、治療効果も集積性に平行して著しく改善されることを示している。そこで申請者は、化学療法後の腫瘍組織へのLAK細胞集積率増強の機序を、腫瘍組織に産生されるLAK細胞に対するchemotactic factorと、migration inhibitory factorの観点より検索した。

実験には、C57BL/6マウスの脾細胞を1,000IRU/mlのIL-2添加培養液で5日間培養し、障害活性を測定して確認したLAK細胞を用いた。C57BL/6マウスの背部皮下に、可移植性マウス線維肉腫BMT-11細胞を 1×10^6 個移植し、増殖してきた腫瘍を14日目に摘出し細切した後、無血清培地中で24時間培養した上清を、conditioned medium(CM)として使用した。また、腫瘍移植10日後に各種抗癌剤で化学療法を施行した腫瘍のCMを、それぞれの抗癌剤治療CMとして用いた。LAK細胞に対する、CM中のchemotactic活性(LAK-attractant活性)は、under agarose migration assayを用いて測定した。上述の化学療法後4日目の腫瘍組織からRNAを抽出した後、IL-1 α 、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ 、TGF- β 1、 β -actinの各々に特異的なプライマーの存在下でRT-PCR法によりDNAを増幅した。また、TGF- β 1中和抗体によるCM中のLAK-attractant活性抑制実験を試みた。TGF- β 1のLAK細胞のeffector phaseにおける細胞障害活性に対

する影響は、NK細胞抵抗性のBMT-11細胞を標的細胞とした、4時間⁵¹Cr release assay中にrecombinant human (rh) TGF- β ₁を加えることで検討した。一方、LAK細胞に対するCM中のmigration inhibitory活性(LAK-MIF活性)は、ガラス製の毛細管を用いた遊走阻止試験を用いて測定した。

非治療群腫瘍組織のCMは、LAK-attractant活性が陰性であったが、BLM以外の抗癌剤治療CMはいずれもLAK-attractant活性が陽性であった。抗癌剤治療及び、非治療腫瘍組織で各種サイトカインのmRNA発現が認められたが、TGF- β ₁の発現のみが非治療組織では検出されず、化学療法後の組織で検出された。また、抗癌剤治療CM中にはTGF- β ₁活性が検出され、抗癌剤治療CMのLAK-attractant活性は、100 μ g/mlの濃度の抗TGF- β ₁抗体により約30%に抑制された。rhTGF- β ₁は、0.01ng/mlから100ng/mlの間の濃度のいずれにおいてもLAK-attractant活性を示した。TGF- β ₁は0.01ng/mlから10ng/mlの濃度までのいずれにおいても、effector phaseにおけるLAK細胞の細胞障害活性に影響を与えなかった。上記LAK-attractant活性陽性の抗癌剤治療CMは、全てLAK-MIF活性も陽性であった。このLAK-MIF活性はLAK-attractant活性と異なり、3kDa以下のフラクシオンに検出された。

以上の実験成績より、癌化学療法後の腫瘍組織に産生され、LAK細胞の集積率を上昇させる2つの因子の存在が明らかとなった。LAK-attractant活性を示すTGF- β ₁と、LAK-MIFの2種のサイトカインが化学療法後の腫瘍組織に産生されており、この2つの因子の働きで、LAK細胞の腫瘍局所への集積率は上昇していると推察された。

LAK-attractant活性を示すサイトカインについては、今回その1種がTGF- β ₁であることを明らかにすることができた。一方、LAK-MIF活性を示すサイトカインの同定はできなかったが、その分子量が3kDa以下でTGF- β ₁のそれとは異なることから、同一物質でないことは明らかである。LAK-attractantとLAK-MIFは、それぞれLAK細胞を引き寄せて、なおかつ留めておくという二段階にわたる、LAK細胞の腫瘍組織抑留機構に働くものと考えられた。

口頭発表にあたって、西教授より、移入LAK細胞の腫瘍以外の臓器への集積状況、皆川教授より、LAK-MIFとTGF- β ₁とが同一物質でないとする理由、化学療法でTGF- β ₁が産生される機序、LAK-attractantとLAK-MIFの産生細胞の同定など、柿沼教授より、抗human TGF- β ₁抗体がmurine TGF- β ₁を中和できるのか否か、RT-PCRによってmRNAの発現が確認された腫瘍組織中のTGF- β ₁活性について、抗TGF- β ₁中和抗体のdoseの検討など、小林教授から

TGF- β 1と一般のchemoattractantの分子量の相違点などの質問があったが、申請者は4年間の研究の実績を踏まえて適切な応答をなした。

西教授、皆川教授には個別に審査を受け、申請者の当該分野に関する幅広い知識を含めた関連事項についての質問を戴き、合格と判定された。

以上、本研究は、癌に対する養子免疫療法としてLAK細胞を用いる場合の、化学療法併用の意義を積極的に支持するものであり、癌治療にとって示唆に富む成果を含むものと考えられる。よって、博士（医学）の学位に相当すると判定した。