

## 学位論文題名

腫瘍壞死因子( $TNF-\alpha$ )遺伝子導入LAK細胞による  
ヒトグリオーマ細胞に対する抗腫瘍効果

## 学位論文内容の要旨

## 【緒言】

Lymphokine-activated killer(LAK)細胞は広範な培養あるいは新鮮腫瘍細胞に対して抗腫瘍作用を発現し、悪性グリオーマ患者に対してもLAK細胞の腫瘍内あるいは脳腔内投与が行なわれてきている。一方、近年一部の腫瘍に壞死あるいは腫瘍退縮を引き起こすサイトカインとして腫瘍壞死因子( $TNF-\alpha$ )が注目され、腫瘍細胞に対する直接的な作用だけでなく、natural killer(NK)細胞や cytotoxic T lymphocyte(CTL)の抗腫瘍作用を増強させることができることが報告されている。そこで我々は従来より更に強力な抗腫瘍活性を有するLAK細胞を誘導する目的で、これまで開発を進めてきたリポソーム法を用い LAK細胞への $TNF-\alpha$ 発現ベクターの遺伝子導入を行ない、in vitroにおいてヒトグリオーマ細胞に対する抗腫瘍効果を検討したので報告する。

## 【材料および方法】

- ①材料：標的腫瘍細胞としてヒトグリオーマ細胞株であるU-251-SPを用いた。サイトカインはRecombinant human IL-2、recombinant human  $TNF-\alpha$ および抗ヒト $TNF-\alpha$ モノクロナール抗体を用いた。リポソームの作製には3種の脂質、即ち陽性電荷を有するN-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオセカル)-シード-デシル-D-グリセロキド(TMAG)、ジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を用いた。プラスミドはヒト $TNF-\alpha$ 遺伝子を組み込んだベクターであるpcDVTNF- $\alpha$ 、およびネオマイシン(G418)を不活性化するヌマインホスホテンヌフェラーゼの遺伝子を組み込んだベクターであるpSV2-neoを用いた。
- ②プラスミド包埋リポソームの調製：Szokaらの逆相蒸発法の改良法により行ない、超音波によるDNAの損傷を伴わずプラスミドをリポソームに包埋した。
- ③LAK細胞の調製：健常成人全血よりフィヨールイソパーク比重遠心法にて末梢血リンパ球(PBL)を分離し、IL-2(10U/ml)存在下で5日間培養後、実験に用いた。
- ④LAK細胞への遺伝子導入：LAK細胞に対し、pcDVTNF- $\alpha$ とpSV2-neo、あるいはpSV2-neo単独封入りリポソームを添加し、IL-2(10U/ml)を含む培地で2日間培養し、コトランスクエクションによる遺伝子導入を行なった。
- ⑤ $TNF-\alpha$ の定量：ウサギ抗 $TNF-\alpha$ モノクローナル抗体と酵素標識マウス抗 $TNF-\alpha$ モノクローナル抗体を用いたサンドウイッチ法による酵素免疫測定法により行なった。
- ⑥膜結合型 $TNF-\alpha$ の測定：エフェクター細胞の細胞膜表面に発現する膜結合型 $TNF-\alpha$ を酵素免疫測定法を用い検出した。
- ⑦ $^{51}Cr$ 遊離法による細胞障害試験：neo-LAK細胞および $TNF$ -neo-LAK細胞のLAK活性、およびnatural killer(NK)活性は、標準4時間 $^{51}Cr$ 遊離法にてE/T比50:1、25:1、12.5:1で測定した。
- ⑧グリオーマ細胞に対する細胞障害活性：U-251-SP株を24時間培養後、E/T比5:1でエフェクター細胞を投与し、6時間後および72時間後に鏡検により生存腫瘍細胞数を計測した。エフェクター細胞は $TNF$ -neo-LAK細胞の他に、PBL、遺伝子非包埋リポソーム添加LAK細胞(empty-LAK-cells)、pSV2-neo包埋リポソーム添加LAK細胞(neo-LAK-cells)、 $TNF$ -neo-LAK細胞に加え培養上清中に抗 $TNF-\alpha$ モ

ノクローナル抗体  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  を添加したもの (TNF-neo-LAK cells+Ab)、さらに未処置LAK細胞に TNF- $\alpha$   $10 \text{ U}/\text{ml}$  を添加したもの (LAK cells+exo TNF)について比較した。

### 【結果】

- ① LAK細胞の増殖に及ぼすリポソームの影響： TNF-neo-LAK細胞、neo-LAK細胞、未処置のLAK細胞の3群について、遺伝子導入のLAK細胞増殖に及ぼす影響を比較した結果、3群の増殖曲線に有意差は認められず、リポソーム法による遺伝子導入はLAK細胞の増殖能やIL-2依存性には影響を与えないことが示唆された。
- ② TNF- $\alpha$  遺伝子導入LAK細胞におけるTNF- $\alpha$  の発現： 培養上清中に產生されたTNF- $\alpha$  を測定した結果、遺伝子導入6時間後ではTNF- $\alpha$  產生はTNF-neo-LAK細胞においてのみ認められ、產生量は  $0.34 \pm 0.04$  (mean  $\pm$  SD)  $\text{U}/\text{ml}$  であった。一方、72時間後ではempty-LAK細胞、neo-LAK細胞でも各々  $1.60 \pm 0.18 \text{ U}/\text{ml}$ 、 $1.58 \pm 0.12 \text{ U}/\text{ml}$  とTNF- $\alpha$  の產生はみられたが、TNF-neo-LAK細胞では  $2.30 \pm 0.16 \text{ U}/\text{ml}$  と有意に高値な產生量の増加が認められた。次に膜結合型TNF- $\alpha$  の検出を試みたところ、TNF-neo-LAK細胞においてのみその発現が認められ、PBLや遺伝子非導入LAK細胞およびneo-LAK細胞では検出されなかつた。
- ③ TNF- $\alpha$  遺伝子導入によるNK活性およびLAK活性の変化： 4時間 $^{51}\text{Cr}$ 遊離法を用いて neo-LAK細胞およびTNF-neo-LAK細胞の lytic activity を比較した結果、NK活性においてTNF-neo-LAK細胞での有意の亢進が認められた。
- ④ ヒトグリオーマ細胞に対する抗腫瘍効果： U-251-SP株に対する抗腫瘍効果をエフェクター細胞添加6時間後と72時間後の細胞障害活性で検討した結果、6時間後の細胞障害活性では empty-LAK細胞(23.5%)、neo-LAK細胞(24.0%)に比べ、TNF-neo-LAK細胞では 64.7%と約3倍の活性増強を示した。72時間後の比較では更に顕著な差がみられ、TNF-neo-LAK細胞では empty-LAK細胞あるいは neo-LAK細胞に比べ4倍以上の増殖抑制効果を示した。この活性増強が培養上清中へ產生されたTNF- $\alpha$  に依存しているのか否かを確認するために、未処置のLAK細胞に加え外因性に培養液中にTNF- $\alpha$  ( $10 \text{ U}/\text{ml}$ )を添加した群で抗腫瘍活性を検討したが、このような活性増強は得られなかつた。一方、TNF-neo-LAK細胞におけるこの活性増強は培養上清中へ抗TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体を添加した群では顕著に抑制された。

### 【考察】

今回の実験において、我々はTNF- $\alpha$  遺伝子を導入したLAK細胞を調製し、内因性に產生されるTNF- $\alpha$  の効果について検討を加えた。遺伝子導入後、有意な量のTNF- $\alpha$  が培養上清中およびLAK細胞膜表面に同定され、同時にこれらの細胞の抗腫瘍活性の増強が得られた。特にNK活性の増強がU-251-SPヒトグリオーマ細胞株でみとめられた。未処置のLAK細胞と外因性に培養上清にTNF- $\alpha$  を加えた群ではこの抗腫瘍活性増強は得られず、活性増強は単に培養上清中へのTNF- $\alpha$  產生量の増加に起因するのではないかことが判明した。一方、TNF- $\alpha$  遺伝子導入LAK細胞に抗TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体を加えた中和実験ではその抗腫瘍活性は無処置のLAK細胞と同レベルまで減弱した。これらの結果はTNF- $\alpha$  遺伝子導入LAK細胞における細胞障害活性増強の主要な機序が培養上清中に分泌されるTNF- $\alpha$  による作用よりもLAK細胞膜表面に発現する膜結合型TNF- $\alpha$  の作用に強く依存していることを示唆しており、抗体の添加により膜結合型TNF- $\alpha$  が中和された結果、活性増強が喪失したものと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 阿部 弘  
副査教授 武市 紀年  
副査教授 葛巻 遼

## 学位論文題名

### 腫瘍壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) 遺伝子導入 LAK 細胞による ヒトグリオーマ細胞に対する抗腫瘍効果

#### 【緒言】

近年注目されているLAK療法あるいはTIL療法の治療成績は必ずしも満足できるものではない。そこで我々は従来より更に強力な抗腫瘍活性を有するLAK細胞を誘導する目的で、リポソーム法を用い LAK細胞へのTNF- $\alpha$ 発現ベクターの遺伝子導入を行ないin vitroにおいてヒトグリオーマ細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。

#### 【材料および方法】

①材料：標的腫瘍細胞としてヒトグリオーマ細胞株であるU-251-SPを用いた。リポソームの作製には3種の脂質、TMAG、DLPC、DOPEをモル比1:2:2の組成で用いた。プラスミドはヒトTNF- $\alpha$ 遺伝子を組み込んだpcDVTNF- $\alpha$ 、およびネオマイシン耐性トランスフェラーゼの遺伝子を組み込んだpSV2-neoを用いた。②プラスミド包埋リポソームの調製：Szokaらの逆相蒸発法の改良法により行ない、超音波によるDNAの損傷を伴わずプラスミドをリポソームに包埋した。③LAK細胞の調製：健常成人全血より末梢血リンパ球（PBL）を分離し、IL-2(10 U/ml)存在下で5日間培養後、実験に用いた。④LAK細胞への遺伝子導入：LAK細胞 $1 \times 10^6$ 個に対し、pcDVTNF- $\alpha$ とpSV2-neo両者を封入したリポソームを15 n mol/ml添加し、IL-2(10 U/ml)を含む培地で2日間培養し、コトランスクエクションによる遺伝子導入を行なった。さらに、培養液をネオマイシン 400  $\mu$ g/mlを含む培地に替え12日間培養を継続した。⑤TNF- $\alpha$ の定量：培養上清中のTNF- $\alpha$ の定量は抗ヒトTNF- $\alpha$ モノクロナール抗体を用いたELISAで行なった。膜結合型TNF- $\alpha$ の検出はペルオキシダーゼ標識抗TNF- $\alpha$ 抗体用いて行なった。⑥細胞障害試験：標準4時間 $^{51}$ Cr遊離法を用いてneo-LAK細胞およびTNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞のDaudi細胞を標的としたLAK活性、およびK-562細胞を標的としたNK活性を測定した。脳腫瘍細胞に対する増殖抑制効果はヒトグリオーマ細胞U251-SP株を用い生存腫瘍細胞数を計数し、評価した。

## 【結 果】

①TNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞、neo-LAK細胞、未処置のLAK細胞の3群について、遺伝子導入のLAK細胞増殖に及ぼす影響を比較したが、各々の増殖曲線に有意差は認められず、リポソーム法による遺伝子導入はLAK細胞の増殖能やIL-2依存性には影響を与えないことが示された。②培養上清中に產生されたTNF- $\alpha$ を測定した結果、遺伝子導入6時間後ではTNF- $\alpha$ 产生はTNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞においてのみ認められ、产生量は $0.34 \pm 0.04$  U/mlであった。一方、72時間後ではempty-LAK細胞、neo-LAK細胞でも各々 $1.60 \pm 0.18$  U/ml、 $1.58 \pm 0.12$  U/mlとTNF- $\alpha$ の产生はみられたが、TNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞では $2.30 \pm 0.16$  U/mlと有意に高値な产生量の増加が認められた。次に膜結合型TNF- $\alpha$ の検出を試みたところ、遺伝子導入48時間後ではTNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞においてのみその発現が検出できた。③4時間 $^{51}\text{Cr}$ 遊離法を用いてneo-LAK細胞およびTNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞のlytic activityを比較した結果、K-562細胞を標的としたNK活性においてTNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞での有意の亢進が認められた。④U251-SP株に対しエフェクター細胞添加6時間後の細胞障害活性ではempty-LAK細胞(23.5%)、neo-LAK細胞(24.0%)に比べ、TNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞では64.7%と約3倍の活性増強を示した。72時間後の比較では更に顕著な差がみられ、TNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞ではempty-LAK細胞あるいはneo-LAK細胞に比べ4倍以上の増殖抑制効果を示した。未処置のLAK細胞に加え外因性に培養液中にTNF- $\alpha$ (10 U/ml)を添加した群ではこのような抗腫瘍活性増強は得られず、また、培養上清中へ抗TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体を添加したところTNF- $\alpha$ -neo-LAK細胞の活性増強は顕著に抑制された。

## 【考 察】

TNF- $\alpha$ 遺伝子を導入したLAK細胞を調製し、内因性に產生されるTNF- $\alpha$ の効果について検討を加えた結果、遺伝子導入後、有意な量のTNF- $\alpha$ が培養上清中およびLAK細胞膜表面に同定され、同時にこれらの細胞の抗腫瘍活性の増強が得られた。未処置のLAK細胞と外因性に培養上清中にTNF- $\alpha$ を加えた群ではこの抗腫瘍活性増強は得られず、一方、TNF- $\alpha$ 遺伝子導入LAK細胞に抗TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体を加えた中和実験ではその抗腫瘍活性は無処置のLAK細胞と同レベルまで減弱した。これらの結果はTNF- $\alpha$ 遺伝子導入LAK細胞における細胞障害活性増強の主要な機序が培養上清中に分泌されるTNF- $\alpha$ による作用よりもLAK細胞膜表面に発現する膜結合型TNF- $\alpha$ の作用に強く依存していることを示唆するものと考えられた。