

学位論文題名

インターロイキン-2を用いたイヌ末梢血リンパ球に
おける抗腫瘍活性の誘導に関する研究

学位論文内容の要旨

インターロイキン-2 (IL-2) を用いてイヌ末梢血リンパ球 (PBL) における抗腫瘍活性を誘導するため、イヌPBLからのIL-2産生を誘導し、イヌIL-2の生物化学的性状を解析した。次いで、イヌIL-2または遺伝子組換え型ヒトIL-2を用いてイヌPBLの長期培養を試みた。さらに、IL-2誘導細胞の抗腫瘍効果についてイヌ可移植性性器肉腫 (CTVS) 細胞を用いて検討した。

1. イヌPBLからのIL-2の産生法とその生物化学的性状

1) イヌIL-2の産生

IL-2産生を誘導するため、イヌPBLをフィットヘマグルチニンP (PHA) またはコンカナバリンA (ConA) で刺激した。PHAで刺激したPBLの培養上清にはIL-2依存性マウスCTLL-2細胞の増殖によって検出される生物学的活性が見出され、これをイヌIL-2活性とした。もっとも高いIL-2活性は 2×10^6 個/mlのPBLを $10 \mu\text{g/ml}$ のPHAで 38°C 、48時間刺激した際の上清中に検出された。ConA刺激ではPBLからのIL-2産生は誘導されなかった。

2) イヌIL-2のT細胞増殖活性

イヌIL-2はマウスCTLL-2細胞のほか、イヌとウマのPBLに増殖活性を示したが、ヒトとウシのPBLにほとんど活性を示さなかった。

3) イヌIL-2の理化学的性状

イヌIL-2は 65°C 15分以上の熱処理、pH 4以下の酸処理、pH 10以上のアルカリ処理および0.01%トリプシン処理によってその活性は有意に低下した。PHAで刺激したPBLの培養上清をゲル濾過後、IL-2活性は分子量約31,000に相当する画分に検出された。

2. IL-2を用いたイヌPBLの長期培養法の検討

1) イヌPBLの長期培養

イヌIL-2またはヒトIL-2存在下、PBLは2週間以内に死滅した。一方、PHAで刺激したPBLをIL-2存在下で培養すると、2~3日間隔で継

代が可能となった。この細胞の増殖はPHA刺激とIL-2存在下培養によって30日以上維持することができた。イヌPBLの長期培養においてイヌIL-2およびヒトIL-2の有用性に相違は認められなかった。

2) IL-2レセプター発現とIL-2消費の消長

PHA刺激はIL-2誘導細胞のIL-2レセプター発現を増強した。この発現は刺激後7~10日で衰退しはじめ、PHAの再刺激によってIL-2レセプターは速やかに再誘導された。このことから、IL-2レセプターの誘導のためのPHA刺激は継代3代毎に繰り返した。IL-2誘導細胞によるIL-2消費の推移はIL-2レセプター発現の消長とよく一致した。

3) 培養細胞の組成、形態および表現型

培養前のイヌPBLに対するリンパ球比率は80%程度であったが、継代5代目には培養細胞はリンパ球のみによって構成されていた。これらのリンパ球はおもに小さいし中リンパ球からなり、一部にリンパ芽球も観察された。IL-2で誘導したリンパ球のほとんどは胸腺関連抗原を発現しており、T細胞由来と考えられた。

3. IL-2誘導細胞のCTVSに対する抗腫瘍効果

1) リンパ球の抗腫瘍活性

未感作PBLおよびCTVS感作PBLからヒトIL-2で誘導したリンパ球とともにCTVS細胞に抗腫瘍活性を示した。この活性は抗イヌ胸腺細胞家兎血清(ATS)の添加によって阻害された。感作PBL自身もCTVS細胞に抗腫瘍活性を示したが、この活性はATSまたは抗主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)クラスII分子マウス単クローン性抗体の添加によって阻害された。

2) 担CTVS犬からの抗腫瘍リンパ球の誘導

担CTVS犬由来PBLはCTVS細胞に抗腫瘍活性を示さなかった。このPBLをPHA刺激後IL-2存在下で培養すると、培養開始後おおむね2週目から抗腫瘍活性が検出された。この活性は2週間以上持続した。IL-2存在下培養リンパ球の抗腫瘍活性はATSの添加により阻害された。このことから、IL-2で活性化されたリンパ球はMHC非拘束性T細胞由来のリンホカイン活性化キラー(LAK)細胞の範疇に属すると考えられた。

以上の結果から、イヌIL-2の至適産生条件と性状の一部が明らかとなった。イヌPBLの長期培養にはIL-2の存在だけでなく、早期消退するIL-2レセプターの再発現のためにPHA刺激が不可欠であることが判明した。イヌPBLの長期培養に同種IL-2のかわりにヒトIL-2の利用が可能であった。IL-2で誘導したリンパ球はCTVS細胞に抗腫瘍活性を示した。本研究によってイヌPBLの長期培養法が確立され、LAK細胞の量産が可能となった。このLAK細胞をイヌの腫瘍免疫療法に応用できる可能性が示唆される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	藤永	徹
副査	教授	板倉	智敏
副査	教授	小沼	操
副査	助教授	黒澤	努 (大阪大学)

学位論文題名

インターロイキン-2を用いたイヌ末梢血リンパ球に おける抗腫瘍活性の誘導に関する研究

イヌのインターロイキン(IL)-2についてはこれまでほとんど検討されていなかったが、申請者はイヌ末梢血リンパ球(PBL)からIL-2産生を誘導し、その性状を解析した上で、IL-2を用いてイヌPBLの長期培養に初めて成功した。さらに、IL-2誘導細胞の抗腫瘍効果について検討し、得られた新知見についてまとめた。

IL-2活性はIL-2依存細胞を用いた生物活性により検出されたが、イヌIL-2の至適産生は 2×10^6 個/mlのPBLを $10 \mu\text{g/ml}$ のフィトヘマグルチニンP (PHA)で48時間刺激した際に観察された。イヌIL-2は 65°C 15分以上の熱処理、pH 4以下の酸処理、pH 10以上のアルカリ処理およびトリプシン処理によって失活した。また、イヌIL-2の分子量は約31,000であった。

PHA刺激PBLはイヌまたはヒトのいずれのIL-2存在下で培養しても、2~3日間隔で継代培養が可能となったが、さらなる長期培養には継代3代毎にPHA刺激が必要であり、この方法によりほぼ純粋なT細胞が得られた。PHAの間歇的刺激が不可欠な理由は、PHA刺激により培養PBL膜上に発現したIL-2レセプターが7~10日目で消退することによるものと考えられた。

PBLからIL-2で誘導されるT細胞はイヌ可移植性性器肉腫細胞に抗腫瘍活性を示した。この活性は抗イヌ胸腺細胞家兎血清の添加によって阻害されたが、抗主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)クラスII分子マウス単クローン性抗体の添加では阻害されなかった。このことから、IL-2で活性化されるリンパ球はMHC非拘束性T細胞由来のリンホカイン活性化キラー細胞と考えられた。

以上の通り、申請者はイヌIL-2およびこれに関連する腫瘍免疫学に重要な基礎的知見を示した。よって、審査員一同は水野信哉氏が博士(獣医学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。