

学 位 論 文 題 名

Restoration of interleukin-2 production
in tumor-bearing rats through reducing tumor-derived transforming growth
factor- β by treatment with bleomycin

(ブレオマイシン治療による腫瘍由来の TGF- β の減少を介した担癌ラット IL-2 産生能の改善)

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

癌化学療法剤 (抗癌剤) には直接腫瘍細胞を傷害するだけではなく宿主免疫増強作用を介した治療効果も期待しうる。また、抗癌剤の免疫増強作用は比較的低用量でもたらされるため、骨髄抑制などの副作用を回避することでき、臨床応用も期待される。それら抗癌剤のうちの bleomycin (BLM) は担癌ラットに投与した場合、免疫担当細胞を活性化するサイトカインの産生増強、サブレッサー T 細胞の除去などさまざまな免疫促進効果を示すことが観察されている。しかし、BLM の免疫促進作用の機序は全容は明らかではない。本研究では、免疫抑制因子 TGF- β を産生するラット高転移性肝癌細胞株 cKDH-8/11 担癌ラットを用いて、BLM の腫瘍細胞に対する作用の観点から担癌生体における免疫抑制解除の機序を検討した。

II. 材料と方法

1. 「動物」 北海道大学医学部動物実験施設により供給された 8-12 週齢 WKAH 雌性ラットを用いた。
2. 「腫瘍細胞」 DAB 誘発の可移植性肝細胞癌の培養株 cKDH-8/11 を用いた。
3. 「抗癌剤、サイトカインと抗体」 抗癌剤 bleomycin (BLM) は日本化薬より提供された。リコンビナントヒト (rh) IL-2 は塩野義製薬より供与され、rhTGF- β 1、マウス抗ヒト TGF- β モノクローナル抗体は市販のものを購入して用いた。
4. 「化学療法」 cKDH-8/11 細胞 (10^6 個) を WKAH ラットに皮下移植し、BLM (5mg/kg, i.p.) を 14 日目に一回投与した。
5. 「腫瘍細胞産生の TGF- β 活性の測定—Bioassay 法」 背部皮下に増殖してきた腫瘍を 21 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 tumor-tissue-conditioned medium (TTCM) として使用した。一方、BLM で化学療法を施行した腫瘍組織を BLM-TTCM とした。また、cKDH-8/11 細胞の 48 時間培養上清を tumor-cell-conditioned medium (TCCM) ないし BLM で処理した培養上清を BLM-TCCM とした。各サンプル中の TGF- β 活性を、Mv1Lu 細胞に対する障害活性により測定した。各培養上清中の TGF- β 活性は、非治療群のそれを 100% として、BLM 治療群のそれと比較して表した。
6. 「脾細胞 IL-2 産生能の測定—Bioassay 法」 非治療群、BLM 治療群またコントロールとして正常のラットから脾臓を摘出し、浮遊細胞にした後 Con-A ($10 \mu\text{g/ml}$) 添加培地で 48 時間培養し、培養上清を回収した。各培養上清中の IL-2 の活性はコントロールのそれを 100% として、非治療群また BLM 治療群のそれ

と比較して表した。また、*in vitro* では、rhTGF- β 1、cKDH-8/11細胞の培養上清 TCCM、BLM-TCCM また TCCM + 抗 TGF- β 中和抗体で正常ラットの脾臓を 24 時間処理して、さらに Con-A 添加培地で 48 時間培養し、培養上清を回収した。各培養上清中の IL-2 の活性は未処理のそれを 100% として、各処理のそれと比較して表した。培養上清中の IL-2 の活性を IL-2 依存性細胞株 CTLL-2 を用いて測定した。

7. 「腫瘍細胞の TGF- β 蛋白産生量の測定—Western blot 法」 cKDH-8/11 細胞の破碎抽出液を作製し、5 μ g を 12% SDS-PAGE に電気泳動し、メンブレンにトランスファーして、一次抗体の抗 TGF- β 抗体と 1 時間、また peroxidase で標識された二次抗体と 1 時間反応させた後、ECL 溶液で発色させた。

8. 「腫瘍細胞の TGF- β mRNA の発現—RT-PCR 法」 cKDH-8/11 細胞の RNA を抽出して、逆転写を行ない cDNA を合成し、さらにラット TGF- β および GAPDH の特異的なプライマーの存在下で PCR 法により 1 min, 94°C; 1 min, 60°C; 2 min, 72°C、30 サイクルで DNA を増幅した。PCR サンプルを 1% アガロースに電気泳動し、ethidium bromide で染色させた。

III. 結 果

1. 「担癌ラットの脾細胞の IL-2 産生能の経時的変化」 cKDH-8/11 担癌ラットの脾細胞の IL-2 産生能は、担癌早期（1—2 週間）にはピークにむしろ増強していたが、担癌中期（3—4 週間）以降にはコントロールの約 50% 以下と急激に抑制された。

2. 「BLM 治療による IL-2 産生能の回復」 非治療群の担癌ラット 21 日目の脾細胞の IL-2 産生能は正常コントロールの約 35% で有意に抑制されたが BLM 投与により治療群脾細胞の IL-2 産生能は正常の 80% に回復した。

3. 「BLM 治療による抗腫瘍効果」 皮下移植された腫瘍は、非治療群では進行的に増殖したが、担癌 14 日目の BLM 投与により一時的にはあるが退縮し、またラットの生存期間が非治療群に比較して有意に延長した。

4. 「BLM 処理による腫瘍組織中 TGF- β 産生の抑制」 担癌 21 日目の腫瘍組織の培養上清（TTCM）中の TGF- β 量は約 10 ng/ml であったが、BLM-TTCM 中の TGF- β 産生量はその約 30% で顕著に減少した。

5. 「培養 cKDH-8/11 細胞の TGF- β 産生能に対する BLM の影響」 BLM 前処理した cKDH-8/11 細胞の培養上清（BLM-TCCM）中の TGF- β の活性、また蛋白量と mRNA 発現は、未処理の cKDH-8/11 細胞のそれらと比較して有意に抑制された。

6. 「cKDH-8/11 細胞産生 TGF- β による脾細胞 IL-2 産生能に対する影響」 cKDH-8/11 細胞の培養上清（TCCM）で処理された正常ラット脾細胞の IL-2 産生能は rhTGF- β で処理した場合と同様に抑制されたが、抗 TGF- β 中和抗体を加えるとこの抑制は部分的に解除された。これに対し、BLM 前処理した cKDH-8/11 細胞の培養上清（BLM-TCCM）処理で正常脾細胞の IL-2 産生能は抑制されなかった。

IV. 考 察

我々は以前より抗癌剤 bleomycin (BLM) を担癌生体に低用量投与すると抗腫瘍免疫が増強されることを報告してきた。今回、TGF- β 高産生肝癌 cKDH-8/11 細胞を用いて BLM の腫瘍細胞側に対する作用の解析を行ったところ、BLM は腫瘍細胞の TGF- β 産生を抑制することが明らかになった。腫瘍細胞由来の TGF- β が、T 細胞の増殖、分化および活性化する上で重要なサイトカインである IL-2 産生の抑制を介して免疫抑制因子として働くことが今回の実験モデルで証明された。一方、低用量 BLM 処理により腫瘍細胞からの TGF- β 産生が *in vitro*、*in vivo* において減少することが明らかにされた。免疫抑制因子 TGF- β 産生量を抑制することによって、IL-2 産生能の抑制が軽減された。こうした免疫抑制の解除が腫瘍の一時的に退縮や生存期間の延長をもたらした可能性が考えられた。以上の結果から BLM の低用量治療は Biological Response Modifier (BRM) としての抗腫瘍効果も有すると考えられた。

V. 結 語

1. ラット肝細胞癌 KDH-8 細胞が免疫抑制因子 TGF- β を産生していることを明らかにした。
2. 低用量 BLM 治療が腫瘍細胞由来の TGF- β 産生を抑制することを明らかにした。
3. BLM は TGF- β 産生を抑制することによって、担癌脾細胞の IL-2 産生能を回復させ、抗腫瘍免疫効果を増強させることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Restoration of interleukin-2 production in tumor-bearing rats through reducing tumor-derived transforming growth factor- β by treatment with bleomycin

(ブレオマイシン治療による腫瘍由来の TGF- β の減少を介した担癌ラット IL-2 産生能の改善)

担癌患者ではしばしば免疫能の低下が観察される。これらの免疫能低下は癌患者の易感染性の原因となるばかりでなく癌治療効果の発現を減弱する要因となっており、特に、宿主の癌細胞に対する免疫応答性を利用する免疫療法においては効果発現の妨げになる。申請者は担癌宿主における免疫応答性の低下が癌化学療法剤（抗癌剤）投与で改善できることに注目しその作用機作の解析を試みた。すなわち、抗癌剤bleomycin (BLM) を担癌ラットへ投与した場合、免疫担当細胞を活性化するサイトカイン産生の増強、サプレッサーT細胞の除去、エフェクター活性の増強などさまざまな免疫促進効果を示すことが観察されている。しかし、BLMの免疫促進作用の機序は完全には明らかになっていない。本研究では、担癌ラットにおけるインターロイキン2 (IL-2) 産生能の低下の原因とBLM投与によるその改善の機序を検討した。

実験は同系肝癌KDH-8を移植されたWKAHラットを担癌モデルとして行われた。担癌の14日目に低用量BLM (5mg/kg, i.p., 1回) 投与した場合の治療効果とラットの免疫能におよぼす影響を検討した。免疫能の指標は脾細胞をin vitroでのconcanavalin A(Con A)刺激した際に産生されるIL-2活性すなわち脾トリリンパ球のIL-2産生能により検討した。また、腫瘍組織、および培養腫瘍細胞により産生される因子の正常ラット脾細胞のIL-2産生能に及ぼす影響を検討し、その結果から推定された免疫抑制因子TGF- β を、bioassayによる活性、RT-PCR法による遺伝子発現およびWestern blotting法による蛋白のレベルで検討した。その結果、低用量のBLMもある程度の治療効果をもたらすことが明らかになった。すなわち、皮下移植された腫瘍は、非治療群ラットでは進行的に増殖したが、BLM投与により一時的にはあるが退縮し、また非治療群に比較して、ラットの生存期間が有意に延長し、死亡時の肺に見られる転移結節が有意

に減少した。次に、免疫学的検討では、KDH-8肝癌ラットの脾細胞のIL-2産生能は、肝癌早期（1－2週間）にはむしろ正常ラット脾細胞に比べ増強していたが、肝癌中期（3－4週間）以降には急激に低下し正常の30%以下となり、肝癌6週目にはほぼ完全に抑制された。一方、肝癌14日目に1回BLM投与されたラットの脾細胞のIL-2産生能は21日目にも正常の80%までに回復していた。これら肝癌における免疫能の低下とBLMによる改善の機序の検索の成果として、腫瘍細胞の培養上清(TCCM)が正常ラット脾細胞のIL-2産生能を抑制すること、BLM(10 μ g/ml,6時間)処理腫瘍細胞の培養上清(BLM-TCCM)は抑制作用を示さないこと、上記TCCMのIL-2産生能の対する抑制作用は反応系に抗TGF- β 抗体添加すると減弱することなどが明かになった。これら成績から、KDH-8腫瘍細胞がTリンパ球のIL-2産生能を抑制するサイトカインTGF- β を産生すると推定された。そこで、ラットに増殖している腫瘍組織におけるTGF- β 産生を検討したところ、非治療腫瘍組織にTGF- β が産生されていることおよびTGF- β の主たる産生細胞が腫瘍細胞であることを、in vitroで純培養されたKDH-8細胞を用いて確認した。また、in vivo、in vitroで増殖している腫瘍細胞のTGF- β 産生はそれぞれBLMによって抑制されることが活性、遺伝子発現、蛋白の各レベルで確認された。

以上の成績は1)ラット肝癌KDH-8細胞が免疫抑制因子TGF- β を産生している、2)低用量BLM治療が腫瘍細胞由来のTGF- β 産生を抑制する、3)BLMは腫瘍細胞のTGF- β 産生を抑制することによって、脾Tリンパ球のIL-2産生能を回復させ、抗腫瘍免疫効果を増強させることなどを示している。本研究は、ラット癌細胞をモデルとして、腫瘍細胞が産生する免疫抑制因子TGF- β が肝癌宿主の免疫応答性の低下の要因になっていることを明かにし、低用量の抗癌剤BLMが腫瘍細胞のTGF- β 産生を選択的に抑制することを介して肝癌宿主の免疫応答を改善することを明らかにした点、また、BLMの宿主免疫改善効果の機序の一端を解明した点などの新知見を含むものと評価される。

公開發表に引き続き、副査加藤教授から、BLMの作用機作、投与タイミング、投与量の問題、KDH-8細胞以外の腫瘍細胞での検討、研究成果の臨床応用の可能性などについて、副査小野江教授から、肝癌初期にIL-2産生能が上昇する理由、IL-2産生能だけを免疫応答の指標にしたことの、IL-2産生能の検索にCon A刺激だけを用いていることのおよびIL-2活性のアッセイにCTLL-2細胞を用いることの問題点および腫瘍細胞がTGF- β 以外の免疫抑制因子を産生している可能性などの指摘と質問があり、主査小池からは、なぜ抗癌剤BLMおよびIL-2とTGF- β に着目したのか、また、BLM以外の抗癌剤での検討についての質問があったが、申請者はほぼ適確な解答および討論をなし得た。

審査員一同は、これらの成果および関連知識を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。