

学 位 論 文 題 名

Enhancement of Lymphokine-Activated Killer
Cell Activity by Fibronectin

(フィブロネクチンによる LAK 細胞活性の増強)

学位論文内容の要旨

目的：細胞外マトリックス蛋白特に (ECM) は細胞間、血管基底膜、細胞表面などに広く分布し、細胞表面のインテグリン受容体と結合することによって細胞の増殖、活性化、発生分化、細胞死などに重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。免疫担当細胞においては、固相化フィブロネクチン (FN) と $\alpha 5 \beta 1 / \alpha 4 \beta 1$ インテグリンあるいはラミニン (LN) と $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンとの結合を介してリンパ球の活性化、増殖が誘導されることが報告されている。さらに、細胞外マトリックス蛋白と接着分子の結合によってそのシグナルがどのように伝達されているのか伝達経路の検討がすすめられている。

一方、LAK細胞はリンパ球をインターロイキン 2 (IL-2) で刺激培養することによってMHC (組織適合抗原複合体) 非拘束性に広範囲の癌細胞を傷害する活性化リンパ球として1982年に報告された。LAK細胞はその腫瘍細胞傷害能が強いこと、標的スペクトラムが広いこと、誘導が比較的容易であることから養子免疫療法のエファクター細胞として用いられている。LAK細胞は、生体内においてはECMなどの種々の生理活性物質によってその活性が制御されていることが予想されるが、これまでLAK細胞活性に与えるECMの影響については報告がない。そこで申請者は、ECMによってLAK細胞活性がどのように調節されているのか、さらに活性調節の機序について検討した。

材料と方法：6～8週齢のC57BL/6マウスより脾細胞を採取し、10%FCS添加RPMI-1640培地に 10^6 /mlに調製後、ヒトリコンビナンインタローキン-2 (rIL-2) を250IU/ml加えて、5%CO₂, 37°Cの条件下で4日間培養した。培養後、固相化FN (10 μ g/ml)、LN (10 μ g/ml)、コラーゲン (COL) (10 μ g/ml) あるいはコントロールのBSA上にて24時間培養して以下の実験に用いた。LAK感受性のマウス線維肉腫細胞株QR-32に対するLAK細胞活性を⁵¹Chrome放出試験にて検討した。LAK細胞と細胞外マトリックス蛋白の接着に参与する接着分子は各種抗 $\beta 1$ インテグリン抗体 (anti- $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ mAb) を用いたFACSscanおよび接着阻止実験にて検討した。2種類の細胞を異なる色素にて標識し、結合した細

胞をFACScanを用いてtwo color analysisで検出するConjugate formation assayにてLAK細胞と標的細胞の結合能を検討した。また抗 $\beta 1$ インテグリン抗体、抗LFA-1抗体を用いてその結合の抑制活性を検討した。LAK細胞のパーフォリン、TNFなどのmRNA発現をRT-PCRにて検討した。

結果：①本実験系において誘導されたLAK細胞は、CD8陽性、CD56陰性のT細胞由来であった。②LAK細胞表面の $\beta 1$ インテグリン分子の発現は、新鮮脾細胞と比べて $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ あるいはvitronectin receptor (VNR)が増加していた。特に、 $\alpha 5$ は新鮮脾細胞表面には検出できないのに対してLAK細胞では顕著に誘導されていた。③LAK細胞の固相化FNへの接着はコントロールBSAへの接着と比べて有意に増強したが、抗 $\alpha 5$ 抗体によって抑制され、 $\alpha 5$ を介してLAK細胞がFNへ接着することが示唆された。④LAK細胞のQR32細胞傷害活性は、固相化FNへの接着によって増強され、この現象は他の細胞外マトリックス蛋白、LN、COLなどに接着することによっても同様に認められた。⑤固相化FNとの接着によって増強されたLAK細胞活性は抗 $\alpha 5$ 抗体によって抑制され、 $\alpha 5$ を介するLAK細胞とFNの相互作用がLAK細胞の活性化に重要な役割を演じていることが示唆された。⑥LAK細胞はECM上で培養した場合でも増殖が促進されず、LAK細胞活性の増強はlytic unitで計算される活性の増強であった。⑦固相化FN上で培養したLAK細胞は標的細胞との結合が増強されていた。この結合の増強は抗 $\alpha 5$ 抗体で抑制されないのに対して抗LFA-1抗体によって抑制された。⑧固相化FN上で培養したLAK細胞表面のLFA-1分子の発現量には変化がなかったことから、 $\alpha 5$ を介したLAK細胞とFNの接着によってLAK細胞表面のLFA-1分子が活性化されることが示唆された。⑨パーフォリンやTNFのmRNA発現量はFNの接着によって変化しなかった。

考案：本研究によって、インテグリン $\alpha 5$ を介したLAK細胞とFNの接着によってLAK細胞活性が増強されることが示された。さらに他の細胞外マトリックス蛋白、LN、COLなどに接着することによっても同様にLAK細胞活性が増強された。この結果は、adherent LAKの活性がnon-adherent LAKの活性より高いとの報告と合わせると、接着して定着することがLAK細胞活性化にとって重要であることを示唆している。さらにLAK細胞が生体内においても細胞外マトリックス蛋白によって活性化される可能性を示しており、固相化FNとの接着後に検出されるLAK活性こそin vivoにおけるLAK細胞の抗腫瘍活性を反映していると考えられる。

固相化FNとの接着によってLAK細胞活性が増強されるその機序については、パーフォリンやTNFのmRNA発現量と標的細胞との結合能の変化を検討した。すでに $\beta 1$ インテグリンを介したシグナルにより、リンパ球のパーフォリン、サイトカイン産生が増強されることが報告されているが、本研究ではパーフォリンやTNFのmRNA発現量はFNの接着によって変化しなかった。むしろインテグリン $\alpha 5$ を介したLAK細胞とFNの接着によって伝達されるシグナルがLAK細胞を活性化し、さらにLFA-1分子の活性化をもたらすことが示唆された。以上の結果は、LAK細胞とFNの接着によるLAK細胞活性の増強がLFA-1分子の活性化による標的細胞との結合増強によるものと考えられた。LFA-1はインテグリン $\beta 2$ ファミリーに属し、抗

LFA-1抗体でLAK細胞による標的細胞の傷害が抑制されることが報告されており、標的細胞との接着に重要な役割を果たしている接着分子と考えられる。本研究でも抗LFA-1抗体でLAK細胞と標的細胞の結合が阻害され、標的細胞との接着に重要な役割を果たしていることが確認された。

以上、LAK細胞とFNの接着によってLAK細胞活性が増強されること、その機序はLFA-1分子の活性化を介してLAK細胞の標的細胞との結合が増強するためであることを明らかにした。今後、この成績に基づいて養子免疫療法への応用について更に検討していきたいと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Enhancement of Lymphokine-Activated Killer Cell Activity by Fibronectin

(フィブロネクチンによる LAK 細胞活性の増強)

細胞外マトリックス蛋白は、細胞間、血管基底膜、細胞表面などに広く分布し、細胞表面のインテグリン受容体と結合することにより細胞増殖、活性化、発生分化、細胞死等に重要な役割を果たしている。免疫担当細胞においては、固相化フィブロネクチン (FN) やラミニンとの結合を介して、リンパ球の活性化や増殖を誘導するとの報告がなされてきた。LAK細胞は正常リンパ球をインターロイキン2 (IL-2) で刺激培養することによりMHC (主要組織適合性抗原複合体) 非拘束性にナチュラルキラー (NK) 感受性のみならず、NK抵抗性の腫瘍細胞を傷害し、腫瘍患者に対する養子免疫療法のエフェクター細胞として用いられてきた。さらに、近年LAK細胞が種々のインテグリン分子を発現することが判明してきた。本研究では、LAK細胞を生体内に投与した場合、腫瘍組織中に存在する細胞外マトリックス蛋白と結合することにより、その機能が、どのように制御されるか検討した。申請者は、マウス脾臓細胞をIL-2存在で刺激培養して作成したLAK細胞はCD8陽性、CD4陰性、CD56陰性であり、新鮮脾臓細胞に比し、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ の $\beta 1$ インテグリンあるいは、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンの発現が増強していることを示した。とくに $\alpha 5$ は新鮮脾臓細胞では検出されなかった。LAK細胞はFNに強い接着を示し、この接着は $\alpha 5$ インテグリンに対する抗体で抑制された。固相化FNに接着することによりLAK細胞は、腫瘍細胞に対して強い細胞傷害活性を示した。更に、腫瘍細胞とLAK細胞との結合も、固相化FNに接着することにより増強し、この結合はLFA-1分子の活性化を介していることを明らかにした。

審査にあったて、副査の小林教授より、adhesion をlodgingとspreadingを区別しているか、固相化FNではなく、ビーズにFNをコートしてLAK細胞を刺激すると、細胞傷害活性はどうなるか、インテグリンの発現が変化しないのにインテグリンを介する刺激が増強するのはどうしてか、副査の小池教授より、腫瘍化すると、FNの産生が低下するのか、LAK細胞の細胞傷害活性の増強と標的細胞との結合に関与する受容体が異なるのは、一般的か、予想外か、主査の上出教授より、細胞傷害活性のアッセイにFNをいれると、

LAK細胞の細胞傷害活性はどうなるか、守内教授より、FNはどの種由来か、他の種由来のFNを用いても同様の結果が期待できるか等の質問があったが、申請者はいずれの質問に対しても明快な回答をなした。

本論文は、強い傷害活性を示すLAK細胞を誘導する方法の開発とその機序を明らかにしたものであり、癌の養子免疫療法に応用可能な貴重な情報を提供するものである。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。