

学位論文題名

癌化学療法により腫瘍局所に産生される
LAK 遊走阻止因子の精製・性状

学位論文内容の要旨

【目的】

リンホカイン活性化キラー (LAK) 細胞は、interleukin-2 (IL-2)で活性化された抗腫瘍エフェクターのことである。LAK細胞は、NK細胞に抵抗性を示す腫瘍細胞をも傷害するため、当初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、臨床応用の結果は必ずしも満足ゆくものではない。その原因の1つとして移入LAK細胞の腫瘍局所への集積率の低さが指摘された。

細川らは、マウスの実験腫瘍を用い、癌化学療法併用により養子移入LAK細胞の腫瘍組織集積率は増強され、治療効果も著しく改善されることを明らかにした。そして、LAK細胞集積性増強の機序として、化学療法後の腫瘍組織にLAK細胞を引き寄せるLAK-attractantとLAK細胞を局所にとどめるLAK遊走阻止因子(LAK-MIF)が産生されることが明らかになった。その後、TGF- β が、LAK-attractantのひとつであることが明らかになったが、LAK-MIFの同定はなされていない。

本研究では、LAK-MIFの同定を最終目標に、その性状を検討し、精製を試みた。

【材料と方法】

1 動物

C57BL/6 雌性マウスをSPFの条件下で飼育し、実験には8～12週令のマウスを用いた。

2 腫瘍細胞

C57BL/6マウスの3-メチルコラントレン (MCA) 誘発線維肉腫BMT-11、3LL肺癌、およびB16BL6メラノーマの培養株細胞を用いた。

3 LAK細胞の調製

正常マウスの脾細胞を1000JRU/mlのヒトリコンビナント・インターロイキン2 (hrIL-2) を含むRPMI1640+10%FCS培地で、37°C、5%CO₂の条件

下で5日間培養した。回収した細胞の抗腫瘍傷害活性をNK細胞抵抗性のBMT-11細胞を標的としての4時間クロム (^{51}Cr) 遊離試験で測定した。

4 Conditioned mediumの採取

BMT-11細胞 (10^6 個) をマウス右背部皮下移植し、平均腫瘍径が5mmになる移植後10日目にcyclophosphamide (CPM) 150mg/kgを尾静脈内投与し、その4日後腫瘍組織を無菌的に摘出した。腫瘍組織を細切後、血清非添加のRPMI1640培地中に 10^6 個/mlの密度になるよう調整し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で24時間培養し、その上清をconditioned medium (CPM-CM)として採取した。同様に、CPM非治療群の腫瘍のconditioned mediumを(Non-treated CM)とした。

5 遊走阻止試験

ガラス製のキャピラリーに、あらかじめ 2×10^7 個/mlに調製されたLAK細胞を詰め込み、RPMI1640培地中に静置して 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下で24時間培養した後、キャピラリーから扇形に拡がって移動した範囲をOHPで紙に投影して切り取り、その重量を測定することで遊走面積を推測した。上記CPM-CMあるいはNon-treated CMを添加した場合のLAK細胞の遊走面積の非添加の場合のそれに対する抑制率 (%Inhibition) をもってLAK-MIF活性とした。

6 LAK-MIFの精製

1) ゲル濾過クロマトグラフィー

Superdex Peptide HR 10/30 (ファルマシア社) のカラムを用いて0.25M NaClを含む 0.02Mリン酸緩衝液(pH7.2) で平衡化した。試料を添加後、平衡化緩衝液を流して活性分画を得た。

2) 逆相クロマトグラフィー

TSK-ODS-80Ts (東ソー) のカラムを用いて、0.1% TFAで平衡化した。試料を添加後、0.1% TFAを含む80%アセトニトリル溶液の直線濃度勾配により活性分画を得た。

7 質量分析

質量分析にはMALDI/TOFMS Voyager (日本パーセプティブ社) を用いて分子量を求めた。

【結果】

1 LAK-MIF 活性

1) LAK-MIF 活性は、% Inhibition で表すと、Non-treated CM 添加では 10% 以下であったが、CPM-CM 原液添加では、約 90% であった。また、8 倍に希釈した CPM-CM 添加でも LAK-MIF 活性が陽性と判定される 20% 以上の抑制率を示した。しかし、CPM-CM はマウスの新鮮脾細胞あるいは好中球の遊走能を全く抑制しなかった。

2) LAK-MIF 活性は CPM 治療 BMT-11 の CM のみならず、CPM 以外の数種の抗癌剤治療 BMT-11 の CM にも、また CPM 治療 3LL および B16BL6 の CPM-CM にも検出された。

2 LAK-MIF の性状

CPM-CM の LAK-MIF 活性は、熱処理 (95°C5 分、56°C30 分) に対しても、また、酸(HCl,pH2.0)、 およびアルカリ(NaOH, pH12.0)処理に対しても極めて安定であった。また、CPM-CM 中の LAK-MIF 活性は、トリプシン処理しても低下しなかった。

3 LAK-MIF の分離・精製

1) LAK-MIF 活性は、CPM-CM の分子ふるい (アミコン) の 3kDa 以下の画分に検出され、3kDa 以上の画分には全く検出されなかった。

2) ゲル濾過では、1350Da 以下と 843Da 以下の 2 つの画分に LAK-MIF 活性のピークを認めた。これら活性画分のうち低分子の方をさらに逆相クロマトグラフィーで最終分離し、当初総活性の 3.8% が回収できた。

逆相クロマトグラフィーにより分離して LAK-MIF を、TOF-MS にて質量分析をした結果、分子量は 658Da であることを決定した。

【考察】

LAK 遊走阻止因子 (LAK-MIF) は、cyclophosphamide (CPM) のみならず、数種の抗癌剤による治療で腫瘍組織に誘導された。また特定の腫瘍のみでなく、3 系の腫瘍で化学療法後に LAK-MIF の産生が確認された。このことは、化学療法後の LAK-MIF 産生がかなり一般的な現象であることを示唆している。一方、LAK-MIF は新鮮脾細胞や好中球の遊走を阻止しなかったことから、IL-2 によって活性化されたリンパ球に特異的に作用すると推察された。

この LAK-MIF は、分子量 658Dalton の低分子物質であり、熱処理、酸・アルカリ処理、およびトリプシン処理いずれにも極めて安定であることが明らかとなった。このことは、LAK-MIF が、タンパク質であり、MIF の中で最初に同定されたマクロファージ遊走阻止因子とは異なることを示している。

申請者は、以上の成績から、LAK-MIF がオリゴペプチドである可能を想定し、アミノ酸分析も試みたが、現時点では確定的な成績を得ていない。今後は、NMR を用いての構造解析などを行い、LAK-MIF の本態を明らかにすることが必要である。

【結語】

マウスの実験腫瘍を用い、化学療法後の腫瘍組織に産生される LAK 遊走阻止因子が、熱処理、酸・アルカリ処理、およびトリプシン処理に対して安定であり、その分子量は 658Dalton の低分子物質であることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博
副 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

癌化学療法により腫瘍局所に産生される LAK 遊走阻止因子の精製・性状

審査は審査担当者4名全員が一堂に会して行われた。まず、論文提出者に研究内容の説明を求めた。

研究の概要は以下の通りである。

リンホカイン活性化キラー (LAK) 細胞は、interleukin-2 (IL-2)で活性化された抗腫瘍エフェクターのことである。LAK細胞は、NK細胞に抵抗性を示す腫瘍細胞をも傷害するため、当初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、臨床応用の結果は必ずしも満足ゆくものではない。その原因の1つとして移入LAK細胞の腫瘍局所への集積率の低さが指摘された。

細川らは、マウスの実験腫瘍を用い、癌化学療法併用により養子移入LAK細胞の腫瘍組織集積率は増強され、治療効果も著しく改善されることを明らかにした。そして、LAK細胞集積性増強の機序として、化学療法後の腫瘍組織にLAK細胞を引き寄せるLAK-attractantとLAK細胞を局所にとどめるLAK遊走阻止因子(LAK-MIF)が産生されることが明らかになった。その後、TGF- β が、LAK-attractantのひとつであることが明らかになったが、LAK-MIFの同定はなされていない。

本研究ではLAK-MIFの同定を最終目標に、その性状を検討し精製を試みた。

【方法・結果】

C57BL/6マウスの線維肉腫BMT-11細胞 1×10^6 個を背部皮下移植し、移植後10日目に化学療法(cyclophosphamide, CPM)を行い、その4日後に腫瘍を摘出し無血清培地で24時間培養した上清をCPM-CMとし、化学療法を施行しない群の上清をNon-treated CMとした。MIF活性はglass tube法で検索した。LAK細胞は、正常脾細胞をIL-2添加培地で5日間培養して調製した。

1 LAK-MIF活性

1) LAK-MIF活性は、% Inhibitionで表すと、Non-treated CM添加では10%以下であったが、CPM-CM原液添加では、約90%であった。また、8倍に希釈したCPM-CM添加でもLAK-MIF活性が陽性と判定される20%以上の抑制率を示した。しかし、CPM-CMはマウスの新鮮脾細胞あるいは好中球の遊走能を全く抑制しなかった。

2) LAK-MIF活性は、CPM治療BMT-11のCMのみならず、CPM治療マウス肺癌細胞3LLおよびメラノーマ細胞B16BL6のCPM-CMにも検出された。

2 LAK-MIFの性状

CPM-CMのLAK-MIF活性は、熱処理 (95℃5分、56℃30分)に対しても、また、酸(HCl,pH2.0)、およびアルカリ(NaOH, pH12.0)処理に対しても極めて安定であった。また、CPM-CM中のLAK-MIF活性は、トリプシン処理しても失われなかった。

3 LAK-MIFの分離・精製

1) LAK-MIF活性は、CPM-CMの分子ふるい (アミコン) の3kDa以下の画分に検出され、3kDa以上の画分には全く検出されなかった。

2) ゲル濾過では、1350Da以下と843Da以下の2つの画分にLAK-MIF活性のピークを認めた。これら活性画分のうち低分子の方をさらに逆相クロマトグラフィーで最終分離し、当初総活性の3.8%が回収できた。

逆相クロマトグラフィーにより分離してLAK-MIFを、TOF-MSにて質量分析をした結果、分子量は658Daであることを決定した。

【結語】

マウスの実験腫瘍を用い、化学療法後の腫瘍組織に産生されるLAK遊走阻止因子が、熱処理、酸・アルカリ処理、およびトリプシン処理に対して安定であり、その分子量は658Daltonの低分子物質であることを明らかにした。

以上が提出論文の概要である。

続いて、口頭による試問が行われた。

まず、研究方法に関する詳細、とくに、その精製法について質問された。また、この精製された物質が、分子量や性状などから、どのようなものが推測されるか。さらに、今後、この物質の同定にはどのような方法が考えられるかなど、本研究の発展性についても、種々質問された。

これらの質問に対して論文提出者はきわめて明快に回答し、本研究について、その意味を十分理解すると共に、関連領域についても広い学識を有していることが確認された。また、本研究の今後の発展性およびその成果がおおいに期待されることが高く評価された。

以上より、本論文提出者は博士 (歯学) の学位授与に値するものと判定された。