

学 位 論 文 題 名

活性化リンパ球を用いた犬の腫瘍免疫療法の 臨床応用に関する基礎的研究

学位論文内容の要旨

従来から腫瘍治療法の基本である外科手術、放射線療法および化学療法は小動物において効果的である一方、治療自体が副作用を持つことにより生活の質 (QOL; Quality of life) を低下させることが多い。したがって、副作用の少ない腫瘍の第4の治療法として、免疫療法の必要性が高まっている。

腫瘍罹患症例は重度の免疫抑制状態に陥っていることが多く、そのために腫瘍を排除する能力が低下している。そのような症例では、原発腫瘍を制御しても容易に免疫機能が回復しないことが推察される。免疫を賦活するためには特異的および非特異的な免疫を誘導する必要があるが、T細胞機能が抑制されている腫瘍罹患症例においては特異的免疫の誘導が困難な場合が多い。その場合には、エフェクター細胞を体外で人為的に作製して移入する受動免疫療法が適応となる。受動免疫療法の代表的なものには活性化リンパ球療法があり、一般的に抗 Cluster of differentiation (CD) 3 抗体とインターロイキン (IL; Interleukin)・2によって活性化されたリンパ球を当該症例に繰り返し投与方法である。活性化されたリンパ球の集団には、主に CD3⁺の T細胞とナチュラルキラー (NK; Natural killer) 細胞が含まれ、これらの細胞によって生体内に特異的および非特異的免疫の両者の誘導が可能であるとされている。小動物においても臨床応用され始めているが、リンパ球の最適な培養法、投与方法および評価方法などは未だに確立されていない。

以上のような背景から本論文では、活性化リンパ球療法の実施方法および評価方法について検討し、さらに腫瘍罹患症例に対して臨床応用してその有用性を評価した。

まず、本研究の第1章では、ヒトにおいてNK細胞のマーカーであるとされる CD56 に着目し、健常犬の末梢血中における CD56⁺細胞の動態を調べることを目的とした。定量ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Polymerase chain reaction) 法を用いて犬の主要臓器、末梢血単核球 (PBMC; Peripheral blood mononuclear cell) および刺激培養したリンパ球における CD56 メッセンジャーリボ核酸 (mRNA; messenger ribonucleic acid) 発現量を相対定量したところ、主要臓器では脳において CD56 mRNA 発現量が最も高いことが分かった。また刺激培養したリンパ球では、PBMC に比べて CD56 mRNA 発現量が増加し

た。In situ ハイブリダイゼーション法により PBMC および刺激培養したリンパ球での CD56 mRNA の局在を調べたところ、PBMC ではごくわずかであった CD56 mRNA のシグナルを有する細胞は、刺激培養したリンパ球では増加した。以上のことから、健常犬のリンパ球における CD56 mRNA 発現量および発現細胞数はヒトと比べるとかなり少ないものの、活性化刺激で発現が増加することが判明した。

次いで第 2 章では、犬における活性化リンパ球の繰り返し投与の適応について調べるため、健常犬の PBMC を抗 CD3 抗体と IL-2 を用いて刺激培養し、IL-2 とインターフェロン (IFN ; Interferon) α により再活性化した細胞についてその性状を解析した。その結果、得られた細胞では CD4⁺CD8⁺細胞比および CD4⁺CD8⁺細胞比の増加、細胞傷害能力の上昇および CD56 mRNA 発現量増加が認められ、活性化されたリンパ球であることが判明した。さらに、体外で活性化されたリンパ球を健常犬に繰り返し投与した際の生体反応について調べた結果、PBMC の構成細胞比の変化および血清 IFN- γ 濃度の上昇が認められたため、健常犬において細胞性免疫応答が活性化された可能性が示唆された。また、特に副作用を思われる反応は認められなかった。以上のことから、健常犬において、活性化されたリンパ球の誘導が可能であること、およびその活性化リンパ球を繰り返し投与することにより免疫応答を活性化できることが示唆された。

第 3 章では、第 2 章で検討した活性化リンパ球の繰り返し投与を、北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院に来院した悪性腫瘍罹患犬 10 症例に対して補助療法として実施した。腫瘍罹患症例においても 14 日間の培養により、活性化されたリンパ球の誘導が可能であった。それら活性化されたリンパ球を当該症例に繰り返し投与した結果、PBMC の細胞増殖率の上昇、末梢血 CD4⁺CD8⁺細胞比および CD4⁺CD8⁺細胞比の増加、血清 IFN- γ 濃度の上昇および一般状態が改善した症例が認められた。投与期間中の症例犬の QOL は比較的良く保たれ、副作用は認められず、飼い主の印象も良好であった。そのため、活性化リンパ球療法は免疫能の抑制による QOL の低下が起り得る腫瘍罹患犬に対する補助療法として十分適応可能で、かつ有効性が期待できるものと考えられた。

以上の結果により、犬の末梢血には CD56⁺細胞が存在し、その細胞はリンパ球に対する活性化刺激により増加することが判明した。そのため、犬における CD56 の相対定量法は活性化リンパ球誘導指標の一つとしての有用性が示唆された。また、PBMC を抗 CD3 抗体と IL-2 を用いて 14 日間培養し、IL-2 と IFN- α により再活性化する方法により、健常犬、腫瘍罹患犬ともに活性化リンパ球の誘導が可能であった。その活性化リンパ球を繰り返し投与する治療法である活性化リンパ球療法は、腫瘍による免疫抑制状態に陥っていると推察される小動物においても免疫能を改善できる可能性があり、十分適応可能で有用な治療法の一つであろうと考えられた。また末梢血の CD4⁺CD8⁺細胞および CD4⁺CD8⁺細胞の構成比や IFN- γ 濃度を測定することでこの治療法に対する反応が評価できる可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	藤 永	徹
副 査	教 授	稲 葉	睦
副 査	准教授	田 島	誉 士
副 査	准教授	奥 村	正 裕

学 位 論 文 題 名

活性化リンパ球を用いた犬の腫瘍免疫療法の 臨床応用に関する基礎的研究

動物の腫瘍に対する現行の治療法である外科手術、化学療法および放射線療法は効果的である一方、治療自体が侵襲的で副作用を伴うことが多い。そこで申請者は、ヒトにおいて副作用が少ないとされる活性化リンパ球療法を腫瘍罹患犬に適応することを目的として、その有用性について基礎的に検討した。

ヒトの非特異的免疫担当細胞である NK 細胞の主要マーカーとされる CD56 mRNA の犬での発現をリアルタイム PCR 法によって相対定量した結果、刺激培養したリンパ球では末梢血単核球に比べて CD56 mRNA 発現量が増加した。また、同様に CD56 シグナルを有する細胞の増加が *in situ* ハイブリダイゼーション法により確認された。以上のことから、犬の NK 細胞の一部には CD56 mRNA が発現しているものと考えられた。次いで、犬の末梢血単核球を抗 CD3 抗体、IL-2 および IFN- α を用いて 14 日間培養したところ、リンパ球が活性化されることが判明した。さらに、それらの細胞を健常犬に繰り返し投与したところ、末梢血単核球の構成細胞比の変化および血清 IFN- γ 濃度の上昇が認められ、*in vivo* において細胞性免疫応答の活性化が引き起こされる可能性が示唆された。そこで、この活性化リンパ球を繰り返し投与する活性化リンパ球療法を本研究科附属動物病院に来院した悪性腫瘍罹患犬 10 症例に補助療法として実施した。その結果、健常犬と同様にリンパ球数の増加とその構成細胞比の変化および血清 IFN- γ 濃度の上昇などがみられた。さらに、実施期間中の症例の QOL(生活の質)は良好に保たれ、飼い主の印象も良好であった。

以上のとおり、活性化リンパ球療法は免疫抑制下にある悪性腫瘍罹患犬に対して十分適応可能で、かつ有用な治療法の一つとなり得る可能性を明らかにした。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者星野有希氏の博士論文は、北海道大学大学院

獣医学研究科規程第 6 条の規程による本研究科の行う博士論文の審査に合格と認めた。