

博士(医学) 牧山 裕顕

学位論文題名

臨床応用を目指した  $\alpha$ -GalCer + IL-2 刺激単核球培養における最適培地と培養バッグ素材の確立

学位論文内容の要旨

緒言

海綿から抽出された糖脂質である  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) は, CD1d 上に強く発現され, 特異的に V $\alpha$  24 陽性 NKT 細胞の増殖に寄与し、抗腫瘍効果を発揮する。また,  $\alpha$ -GalCer と IL-2 によって刺激された単核球は, NK 細胞や NKT 細胞, T リンパ球に誘導され, TH-1 反応を介して樹上細胞を刺激することも知られている。本研究では  $\alpha$ -GalCer と IL-2 で刺激して増殖させた細胞を臨床に応用するため, 適切な培地と培養素材の組み合わせについて検討した。

材料と方法

モノクローナル抗体およびフローサイトメトリーを用いた表面マーカーの解析

この実験では, CD3 陽性 CD8 陽性細胞を CD8 T 細胞, CD3 陰性 CD16 陽性 CD56 陽性細胞を NK 細胞, CD3 陽性 V $\alpha$  24 陽性 CD161 陽性細胞を NKT 細胞と定義した。

培養上清中のサイトカイン濃度の測定

培養上清中のサイトカイン濃度は, human Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA), FACScan, CellQuest を用いて測定した。

K562 と Daudi を用いた細胞障害活性試験

標的細胞を用いる際には, 同仁化学研究所の Calcein AM を 10 mg/ml の使用し, 細胞障害活性試験に使用した。Calcein AM でラベルされた標的細胞と培養細胞は, 共に 96 ウェルプレート (COASTER 3696, CORNING, NY) に置かれ, 湿度 100%, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C に設定されたインキュベーター内で 4 時間反応させた後, ミネルバテック社のテラスキャン VPC を用いて解析した。

培地と培養バッグ素材の選択

新規に開発されたものも含め 14 の培地と, 15 種類の異なったバッグ素材について検討した。

細胞と血清の準備

インフォームドコンセント後に書面で同意書が得られた健常人および腎細胞癌患者より末梢血を採取した。採取した末梢血を遠心分離し, 上清と細胞成分に分けた。回収した上清は非動化して使用した。細胞成分については lymphoceil を用いて単核球を回収した。

培地の選択:

最初は, 14 種類の培地を比較検討した。次段階の実験では, 上位 5 種類の培地について, 総細胞数, NKT 細胞数の他に T 細胞, NK 細胞数も算出し, 加えて培養上清中の IFN- $\gamma$  の濃度と細胞障害活性について比較検討し, 最終的に 2 つの培地を最終候補として選択した。

バッグ素材の選択

最初の実験では, シャーレの内部にバッグ素材を取り付け, その素材の中で培養を開始した。次に 2 つの素材を培養バッグの候補として作成し、Tcell expansion bag と比較検討した。

## IL-2 の至適投与方法の検討

この実験では、投与方法を2群に分け、培養期間中8日目もしくは9日目に投与する方法と、3日ごとに投与する方法について比較検討した。

## 新規培養システムによる健常人検体と担癌患者検体での細胞増殖効率の比較

新規培養培地と培養バッグの組み合わせ候補をしづり、それらの培養効率について比較した。次に、最終的に決定した培養システムにおいて、担癌患者検体と健常人検体での細胞増殖効率について比較検討した。

## 結果

### KBMN070 と KBM306 が細胞増殖効率に優れていた。

最初の検討では、KBM300, KBM230, X-VIVO 15 が総細胞数で優れた増殖効果を示し、KBMN070 と KBM306 が NKT 細胞の増殖効果に優れていることを示した。最終的に KBM306 と KBMN070 が各種細胞の培養効率が良く、サイトカイン産生能も優れていた。

### FR10NC が至適培養バッグとして選択された

最初の実験で、ほぼ全てのバッグ素材において親水コーティングをしなかった素材が優れた培養効果を示した。T cell Expansion bag と新規バッグでは、総細胞数と NK 細胞数、サイトカイン産生能に関して、いずれも既存バッグよりも優れているという結果になった。以上の結果と、F10NC が扱いやすい素材で出来ていることから、最終的に F10NC を至適培養バッグとして用いることとした。

## IL-2 の至適添加方法の検討

結果的に、各細胞数における IL-2 の添加方法での増殖効率に有意差は出なかったものの、IFN- $\gamma$  の産生能では IL-2 を3日毎に添加する投与方法で産生量が増えるという結果となった。

## 新規培養システムの培地および培養バッグの決定

KBMN070+F10NC の組み合わせは、細胞障害活性については両者間で明らかな違いは認められなかつたが、NK 総細胞数、CD8T 細胞数と IFN- $\gamma$  の産生能で優位な結果を示したので、 $\alpha$ GalCer+IL-2 刺激単核球の培養システムには KBMN070+FR10NC を選択した。

## 腎細胞癌患者検体での培養細胞の増殖効率

新規培養システムで培養した場合、総細胞数、CD8T 細胞の増殖効率は健常人とほぼ同様の結果が得られることが証明された。また、担癌患者においては NK 細胞の増殖効率が健常人ボランティアよりも優れていた。しかし、NKT 細胞の増殖効率は、担癌患者では健常人ボランティアと比較して増えにくいことが示唆された。培養上清中の IFN- $\gamma$  および K562 に対する細胞障害活性については、有意な差は認められなかつた。

## 考察

本研究では、細胞治療を臨床へ応用する際に、その基本となる至適培養システムを確立することを試みた。至適培養システムを確立するにあたって、検討項目を統一し、培養後各細胞数、サイトカイン濃度、細胞障害活性という多面的な観点で培養システムを確立した。次に用いる培地、バッグ素材についての安全性について検討し、倍地については動物由来蛋白を用いないこと、バッグ素材に関しては臨床使用が可能な素材を用いるという点にこだわった。そうして臨床応用に際して安全と証明できる培養システムを確立するよう努め、最終的にその培養システムが健常人だけでなく、目標としている担癌患者検体でも遜色ない結果を出せるかどうかを確認した。

この研究によって細胞増殖効率は、培地やバッグ素材、培養条件などによって非常に影響を受けるということが確認された。

患者検体での実験は、NKT 細胞の増殖効率を除いてほぼ健常人ボランティアと同様の培養効率を示した。NKT 細胞の増殖効率が健常人に比べて低かった原因是、NK 細胞優位に増える場合と NKT 細胞が優位に増える場合があるという可能性が示唆された。NKT 細胞が増えなかつた理由としては、そもそも担癌患者の末梢血単核球から得られた単核球は、 $\alpha$ GalCer に対する *in vitro* での反応性が乏しいという可能性も示唆された。現時点では、両方の可能性があるが、仮に担癌患者において NKT 細胞が増殖しにくくとしても、G-CSF を事前に投与した単核球を用いることで、NKT 細胞が莫大に増えることが証明されており、臨床

応用に際しては適時今までの研究結果を組み合わせて行うことも検討中である。

#### 結語

$\alpha$  GalCer と IL-2 を用いて単核球を刺激培養する受動免疫療法の至適培養システムを確立した。そしてこの結果を踏まえ、近い将来に腎細胞癌患者に対する第 1 相臨床試験を計画する予定である。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 浅香正博  
副査教授 武藏学  
副査教授 田中伸哉  
副査教授 高岡晃教

## 学位論文題名

### 臨床応用を目指した $\alpha$ -GalCer + IL-2 刺激単核球培養における最適培地と培養バッグ素材の確立

海綿から抽出された糖脂質である  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) は、CD1d 上に強く発現され、特異的に V $\alpha$ 24 陽性 NKT 細胞の増殖に寄与し、抗腫瘍効果を発揮する。また、 $\alpha$ -GalCer と IL-2 によって刺激された単核球は、NK 細胞や NKT 細胞、T リンパ球に誘導され、Th-1 反応を介して樹上細胞を刺激することも知られている。本研究では  $\alpha$ -GalCer と IL-2 で刺激して増殖させた細胞を臨床に応用するための、安全で適切な培地と培養素材の組み合わせについて検討した。この実験では、培養効率の指標として、培養後細胞増殖数、フローサイトメトリーを用いた細胞成分解析、培養後上清中に含まれるサイトカイン濃度（主にインターフェロン- $\gamma$ ）、そして K562, Daudi を用いた細胞障害活性という、複数の見地から比較検討するという手法をとった。培地と培養素材の選択過程においては、最終的に培地とバッグ素材の組み合わせ候補をしぼり、それらの培養効率について比較した。次に、最終的に決定した培養システムにおいて、担癌患者検体と健常人検体での細胞増殖効率について比較検討した。実験結果としては、健常人を用いたデータにより、最終的に KBMN070 と CB-F10NC の組み合わせが最も培養効率が良いという結論に至り、その結果を用いた担癌患者検体でのデータでは、総細胞数、CD8T 細胞の増殖効率は健常人とほぼ同様の結果が得られることが証明された。また、担癌患者においては NK 細胞の増殖効率が健常人ボランティアよりも優れていた。しかし、NKT 細胞の増殖効率は、担癌患者では増殖が認められるが、健常人ボランティアと比較して増えにくい可能性があることが示唆された。この実験では、臨床応用に際して安全と証明できる培養システムを確立するよう努め、最終的にその培養システムが健常人だけでなく、目標としている担癌患者検体でも遜色ない結果を出せるかどうかを確認した。この研究によって細胞増殖効率は、培地やバッグ素材、培養条件などによって非常に影響を受けるということ、さらに、健常人で決定されたこの培養システムが担癌患者検体でも有効であることが確認された。

公開発表後、副査の田中伸哉教授からは、NKT 細胞の、検体別における培養後細胞数のばらつきについて、担癌患者検体での NKT 細胞の実数はどの様な結果だったのか、担癌患者検体では実際に NKT 細胞が増えにくいのか、細胞障害活性を行うにあたって、固形癌の細胞株はなぜ使わなかったのはなぜか、腎細胞癌患者検体の病理学的特徴についての質問があった。それに対して申請者は、NKT 細胞の培養効率は、健常人でも、担癌患者でもある程度の変動があり、その変動は、担癌状態であることが影響している可能性と、さらに NK 細胞と NKT 細胞の増殖効率が逆相関の関係にあることを原因として挙げた。更に細胞

障害活性に用いた細胞株の選択根拠は NK 細胞に対する感受性の有無で選択したこと、腎細胞患者の転移箇所について述べた。

続いて副査の高岡晃教教授からは、 $\alpha$  GalCer は担癌患者で根本的に増えることが確認されたのか、また、培地そのものの違いについて成分による比較等は行ったのか、という質問があった。申請者は、担癌患者検体での NKT 増殖における特徴ならびに培地成分の中でのインスリンの影響を具体例に挙げて説明をした。

副査の武藏学教授から、NKT 細胞の増殖規定因子をもっと突き詰めて研究するべきではなかったか、親水性コーティングを施すことの意義はなんだったのか、最後に養子免疫療法で NKT 細胞を投与した場合に、何らかの因子によって阻害され、効果が得られない可能性はないのかという質問があった。それに対し演者は素材の親水性の有無が増殖要因として不可欠であったこと、NKT 細胞を生体に投与した場合の可能性について説明をした。

主査の浅香正博教授から、このような実験データを集める傾向というのは他の細胞治療にも広がっていく可能性があるのか、この実験で得られたデータを下に培地やバッギング素材は企業化されるのか、臨床試験はいつごろ始まるのかという質問がなされ、それに対して申請者は生物由来製剤を今後臨床で使用していくにあたって検討しなければならない過程や、研究の方向性について説明した。

この論文は  $\alpha$  GalCer と IL-2 を用いた養子免疫療法の基礎実験データを示したもので、すでにこの論文データを下に第 I 相臨床試験が予定されているなど、今後の発展が期待される。

以上の経緯より、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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充分な資格を有するものと判定した。