

称号及び氏名 博士（獣医学）加藤 正浩

学位授与の日付 平成19年3月31日

論文名 「Studies on adoptive cellular immunotherapy for small animals: Establishment of novel method for the culture of canine lymphokine activated killer cells (小動物における免疫細胞療法に関する研究: イヌ lymphokine activated killer 細胞の新規培養法の確立)」

論文審査委員 主査 児玉 洋
副査 馬場 栄一郎
副査 久保 喜平
副査 渡来 仁

論文要旨

緒言

免疫細胞療法は、活性化した自己のリンパ球を患者本人に戻すことによって腫瘍組織を破壊する、副作用の少ないガン治療法の1つとして期待されている。Lymphokine activated killer cells (LAK細胞) は *in vitro* で抗腫瘍活性を有することから、免疫細胞療法におけるエフェクター細胞として注目されており、ヒトでの臨床試験においてその有効性が示唆されている。一方、小動物を対象とする獣医療においても、新たなガン治療法として免疫細胞療法に興味を持たれている。

LAK細胞は、末梢血から分離したリンパ球をヒト組換え interleukin-2 (rhIL-2) と IL-2 レセプター発現を誘導する抗 CD3 モノクローナル抗体の存在下で培養し、増殖、活性化させることで抗腫瘍活性をもった活性化リンパ球として得ることができる。イヌ末梢血リンパ球 (cPBL) も、rhIL-2 に応答して増殖することが報告されているが、免疫細胞療法を動物に適用するには動物種特異的な抗 CD3 抗体を作製する必要がある、小動物臨床への応用を困難なものとしている。

ヒトやマウスにおいてT細胞マイトジェンとして知られているコンカナバリン A (Con A)

は、cPBLの増殖を誘導する。さらにCon Aは、抗CD3抗体と同様に、ヒトリンパ球におけるIL-2レセプター発現をもたらす。しかしcPBLにおいて、Con AによるIL-2レセプターの発現誘導や、Con AとrhIL-2を用いることによるLAK細胞の誘導については現在まで報告されていない。そこで本研究では、Con AとrhIL-2を用いてcPBLを培養することによって、従来の方法よりも汎用性の高い動物のLAK細胞の新規誘導法を確立し、免疫細胞療法を小動物臨床へ応用することを目的とした。

第1章

Con AおよびrhIL-2によるcPBLの培養

Con AのcPBLに対する増殖効果: Con Aによるリンパ球増殖活性は動物種によってその至適濃度が異なるため、cPBLを種々の濃度のCon Aで刺激した。cPBLは5 µg/mlのCon Aに対して最大の増殖を示し、それ以上の濃度では増殖は低下したことから、5 µg/mlがcPBLの増殖に対するCon Aの至適濃度であると判断した。

Con A刺激に伴うIL-2レセプターの発現: フローサイトメトリー解析により、Con A刺激に伴うcPBL上のIL-2レセプターα鎖(IL-2α)の発現を調べた。Con Aの存在下で5日間培養したcPBLでは、未刺激で培養した場合と比較してIL-2α陽性リンパ球の割合が増加していた。またRT-PCRにより、mRNAレベルでもCon A刺激によってIL-2α発現がcPBLにおいて誘導されていることが確認された。

IL-2レセプターはα、β、γ鎖の3量体で構成されており、このうちβ、γ鎖はリンパ球上に恒常的に発現していると考えられているため、Con A刺激によるIL-2α発現の上昇は、cPBLがIL-2に対する効率的な応答性を獲得したことを意味すると考えられる。

Con AおよびrhIL-2存在下におけるcPBLの培養: 次に、Con A(5 µg/ml)と種々の濃度のrhIL-2による刺激に対するcPBLの応答を調べた。その結果、Con AのcPBLに対する増殖活性はrhIL-2によって濃度依存的に促進された。以上の結果から、cPBLの培養には5 µg/ml ConAと750U/ml rhIL-2による刺激が最適と考えられた。

この条件下でcPBLの大量培養を行ったところ、2週間で約100倍まで増殖させられることが確認され、この方法で臨床応用に十分な数のリンパ球が得られると考えられた。

第2章

培養後のcPBLにおける細胞表現系の解析

Con AとrhIL-2で刺激したcPBLの表現系の変化: Con AとrhIL-2の刺激に伴うcPBLにおけるCD4およびCD8の発現パターンの変化を、フローサイトメトリー解析した。未刺激のcPBLにおいては、CD4+シングルポジティブ(SP)T細胞がCD8+ SP T細胞より高い割合で存在していたのに対し(CD4SP/CD8SP>1.5)、刺激7日後のcPBLについてはCD8+ SP T細胞の割合が高かった(CD4SP/CD8SP<0.3)。また、CD4+ CD8+ダブルポジティブT細胞の割合が増加したのに対し、CD4-CD8-ダブルネガティブT細胞は減少した。

PHAあるいはPWMとrhIL-2で刺激したcPBLの表現系の変化: Con Aと同様、イヌリンパ球に対して増殖刺激活性を有する phytohaemagglutinin (PHA)あるいは pokeweed mitogen (PWM) と rhIL-2 の存在下で培養した cPBL の表現系を調べた。その結果、いずれの場合においても CD4+ CD8+ ダブルポジティブ T 細胞の割合が増加した。CD4SP/CD8SP の値は、PHA 刺激後では刺激前と比べて変化は認められず、PWM 刺激後では有意に上昇した。

第3章

Con A と rhIL-2 刺激下で培養した cPBL の細胞傷害活性

ConA と rhIL-2 刺激によって増殖した cPBL が、ヒト LAK 細胞と同様に MHC 非拘束性の細胞傷害活性を有しているか否かを、ヒトメラノーマ細胞株である MeWo を標的細胞とした細胞傷害反応により調べた。刺激後の cPBL は、未刺激の cPBL と比べて有意に高い細胞傷害活性を示した。また、RT-PCR によって LAK 活性を媒介する細胞融溶解酵素である グランザイム B の mRNA 発現について解析した結果、培養後の cPBL においてその発現が増強された。以上の結果から、Con A と rhIL-2 刺激下で培養した cPBL は、ヒト LAK 細胞と同様、標的細胞に対して MHC 非拘束性の傷害活性を有し、これには グランザイム B が関与していることが示唆され、ConA と rhIL-2 の刺激によってイヌ LAK 細胞が誘導されたと考えられた。

また、*in vitro* において誘導したイヌ LAK 細胞を同一個体に移入した後に、その個体から分離した cPBL の MeWo に対する細胞傷害性を調べた。その結果、イヌ LAK 細胞移入前の cPBL よりも有意に高い細胞傷害活性を示し、イヌ LAK 細胞を移入することによって抗腫瘍効果がもたらされる可能性が示唆された。

第4章

Con A と rhIL-2 によって誘導されたイヌ LAK 細胞による膀胱ガン罹患犬に対する治療効果

血尿および排尿困難によって来院し、膀胱ガンと診断されたイヌ一頭に対して、Con A と rhIL-2 によって誘導したイヌ LAK 細胞を用いて免疫細胞療法を行った。外科的処置によって腫瘍組織を除去した後、1週間毎に6回、その後は約3週間毎にLAK細胞の移入を行った結果、術後7カ月間膀胱内での再発が認められなかった。さらに免疫細胞療法を行うことによって、術後900日以上生存し、イヌの膀胱ガンについて報告されている平均生存日数を大きく上回る結果が得られた。

総括

小動物臨床における免疫細胞療法の実用化を目指して、従来の方法より汎用性の高いイヌ LAK 細胞の誘導方法の確立を試みた。cPBL を Con A と rhIL-2 を用いて培養すること

で以下の結果を得た。

1. Con A 刺激により cPBL 上に IL-2 レセプター α 鎖の発現が誘導された。
2. cPBL は、5 $\mu\text{g/ml}$ の Con A および 750U/ml の rhIL-2 の刺激によって約 100 倍まで増殖し、免疫細胞療法への応用に十分な数のリンパ球を得ることができた。
3. cPBL を Con A および rhIL-2 で刺激すると、CD8 シングルポジティブおよび CD4+CD8+ダブルポジティブ T 細胞の割合が増加した。
4. Con A および rhIL-2 刺激下で培養した cPBL は、ヒト LAK 細胞と同様の MHC 非拘束性細胞傷害活性を示した。
5. Con A および rhIL-2 により誘導されたイヌ LAK 細胞を移入することにより、宿主 cPBL による細胞傷害活性が高められ、抗腫瘍免疫応答の活性化が示唆された。
6. イヌ LAK 細胞を用いた免疫細胞療法を受けた膀胱ガン罹患犬の 1 例において、再発の予防効果や延命効果が示唆された。

本研究により得られた成果は、イヌのがん治療や、その他感染症の治療に有用な手段を提供するものと期待される。

審査結果の要旨

免疫細胞療法は、活性化した自己のリンパ球を患者本人に戻すことによって腫瘍組織を破壊するガン治療法である。Lymphokine activated killer cells (LAK 細胞) は *in vitro* で抗腫瘍活性を発揮し、免疫細胞療法における有望なエフェクター細胞である。ヒト LAK 細胞は、末梢血リンパ球をヒト組換え interleukin-2 (rhIL-2) と IL-2 レセプター発現を誘導する抗 CD3 モノクローナル抗体の存在下で培養し、増殖、活性化させることで、抗腫瘍活性をもった活性化リンパ球として得られる。イヌ末梢血リンパ球 (cPBL) も rhIL-2 の刺激により増殖するが、動物で LAK 療法を実施するためには、種特異的な抗 CD3 抗体の作製も必要である。しかし、それぞれの動物種において特異的抗 CD3 モノクローナル抗体を作製するには、多大な時間と労力を要する。一方、T 細胞マイトジェンであるコンカナバリン A (Con A) は、非特異的に PBL を増殖させる。さらに Con A は、抗 CD3 抗体と同様、ヒトリンパ球における IL-2 レセプター発現を促進させる。しかし cPBL において、Con A による IL-2 レセプターの発現誘導や、Con A と rhIL-2 を用いることによる LAK 細胞の誘導については、現在まで試みられたことはない。本研究では、Con A と rhIL-2 の存在下で cPBL を培養することにより、従来の方法よりも汎用性の高い小動物の LAK 細胞の新規誘導法を確立し、免疫細胞療法を小動物臨床へ応用することを目的とした。

第 1 章でまず、Con A および rhIL-2 存在下における cPBL の培養条件を検討し、IL-2 レ

セプターの発現を観察した。cPBL を種々の濃度の Con A で刺激して培養したところ、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で最大の増殖を示した。また、Con A 存在下で培養した cPBL においては、未刺激で培養した PBL と比べ、IL-2 レセプター α 鎖陽性リンパ球の割合が増加した。また RT-PCR により、mRNA レベルでも Con A 刺激により IL-2 α 発現が誘導されることが確認された。次に、Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と種々の濃度の rhIL-2 刺激に対する cPBL の応答を調べ、cPBL の培養には 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A と 750U/ml rhIL-2 による刺激が最適と結論した。この条件下で cPBL の大量培養を行ったところ、2 週間で約 150 倍まで増殖し、この方法で臨床応用に十分な数のリンパ球が得られると判断した。

第 2 章において、Con A と rhIL-2 存在下で培養後した cPBL の細胞表現型を解析した。cPBL における CD4 および CD8 の発現パターンの変化を、フローサイトメトリー解析したところ、未刺激の cPBL においては、CD4+シングルポジティブ (SP) T 細胞が CD8+ SP T 細胞より高い割合で存在したのに対し (CD4+SP/CD8+SP>1.5)、刺激 7 日後の cPBL においては、CD8+ SP T 細胞の割合が高かった (CD4+SP/CD8+SP<0.3)。また、CD4+CD8+ダブルポジティブ T 細胞の割合が増加したのに対し、CD4-CD8-ダブルネガティブ T 細胞は減少した。

第 3 章において、ConA と rhIL-2 刺激により増殖した cPBL の MHC 非拘束性細胞傷害活性を、ヒトメラノーマ細胞株 MeWo を標的細胞とした細胞傷害反応により測定した。刺激後の cPBL は未刺激 cPBL と比べ、有意に高い細胞傷害活性を示した。また、LAK 活性を媒介する細胞融溶解酵素であるグランザイム B の mRNA 発現を RT-PCR により解析すると、培養後の cPBL においてその発現が増強された。以上の結果から、Con A と rhIL-2 刺激下で培養した cPBL において、イヌ LAK 細胞が誘導されたものと結論された。さらに、*in vitro* で誘導したイヌ LAK 細胞を同一個体に移入した後に、その個体から分離した cPBL の MeWo 細胞傷害性を調べたところ、イヌ LAK 細胞移入前の cPBL よりも有意に高い細胞傷害活性を示した。これらの結果から、LAK 細胞の移入がイヌにおいて抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

第 4 章では、本研究で確立した方法で誘導したイヌ LAK 細胞を用い、腫瘍に対する治療効果を検討した。膀胱ガンと診断されたイヌ一頭に対して、外科的処置によって腫瘍組織を除去した後、1 週間ごとに 6 回、その後は約 3 週間ごとに LAK 細胞の移入治療を行ったところ、術後 7 カ月間膀胱内での再発が認められなかった。患犬は術後 900 日以上生存し、これまでイヌの膀胱ガンについて報告されている平均生存日数を大きく上回った。

このように、申請者は *in vitro* でイヌの LAK 細胞を大量に増殖させることに成功し、この LAK 細胞を用いるイヌ腫瘍の免疫細胞療法を確立した。その成果は獣医腫瘍学、獣医臨床科学ならびに獣医免疫学の発展に大きく貢献するものである。よって、最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。