

氏 名 (本籍) にし むら たか し
 西 村 孝 司

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 252 号

学位授与年月日 昭和 60 年 12 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 腫瘍免疫への応用を目的としたinterleukin
 2 並びに同活性化 T 細胞の免疫分子論的
 研究

(主 査)

論文審査委員 教授 橋 本 嘉 幸 教授 鶴 藤 丞

教授 鈴 木 康 男

論 文 内 容 要 旨

Interleukin 2 (IL2) はConcanavalin A (Con A) 等の抗原刺激により helper T 細胞から産生される可溶性因子であり, その産生 kinetics は種によって異なる。Con A に対して高い応答性を示すマウス脾細胞においては, Con A 刺激 24 時間以後に活発な IL 2 の吸収が始まり, 48 時間後の培養上清中には IL 2 活性は検出できない。これに対し, Con A に比較的不応答性のラットの系においては, 培養上清中の IL 2 活性は 48 時間後にピークに達し, それ以後に IL 2 の吸収が活発となる。

同種白血病細胞 RADA I に対する特異的 killer T 細胞は IL 2 の存在下で培養することによって約 8 ヶ月にわたり cytotoxicity を失うことなく長期継代維持することができた。しかし, 同系腫瘍 BMC 2 に対する killer T 細胞は約 20 日でその活性を失い, IL 2 の存在下でもさほど長く培養することはできなかつた。In vitro で IL 2 の存在下で分裂増殖させた killer T 細胞は in vivo においても強い抗腫瘍活性を示し, IL 2 が癌免疫法へ応用可能であることが強く示唆された。

Con A 刺激ラット脾細胞培養上清より得た IL 2 を硫酸分画で濃縮し, さらに Sephaoyl S-200 で精製することにより, ラット IL 2 は分子量 22,000~26,000 のタンパク質であることが証明された。精製した IL 2 は, マウス脾細胞やリンパ節細胞に対して mitogenic 効果を示し, この効果は α -methyl mannoside の添加によって阻害されないことや, recombinant IL 2 を用いても同様な効果が観察されることから, 混在する Con A 等の影響ではなく, IL 2 そのものの効果であると考えられる。脾細胞やリンパ節細胞と異なり, 末分画胸腺細胞は IL 2 に対して強い応答性を示さない。しかし, 胸腺細胞を Percoll 不連続密度勾配で Fr 1, Fr 2, Fr 3 の三分画に分離することにより, 低比重の Fr 1 の胸腺 T 細胞亜群が IL 2 の刺激に反応して分裂増殖することが明らかとなった。

Fr 1 の胸腺 T 細胞亜群は $Ly 1^+, 2^-, PNA^-$ の細胞群から成り, Con A, IL 2 のいずれの刺激に対しても強い応答性を示した。これに対して Fr 2, Fr 3 の胸腺細胞はいずれも $Ly 1^-, 2^+, PNA^+$ の細胞表面マーカーを有し, IL 2 単独, Con A 単独の刺激では分裂増殖を示さなかつた。しかし, IL 2 と Con A の両者で刺激した場合には, Fr 1 の細胞と同様に, Fr 2 の細胞も高い応答性を示した。Fr 3 の胸腺細胞は Con A, IL 2, および両者のいずれの刺激に対しても応答性を示さず, in vitro で培養することによって他の細胞群よりも早期に死滅することが明らかとなった。従って, 末梢リンパ球は Fr 1 又は Fr 2 のいずれかの胸腺細胞亜群から導入され, Fr 3 の胸腺細胞は胸腺内で死滅する細胞群であると考えられる。

IL 2 は T 細胞増殖活性の他に, 各種の癌細胞に対して cytotoxicity を示す lymphokine-act-

ivated killer (LAK) 細胞を誘導する作用もあることが示された。LAK細胞は細胞表面マーカーから判断すれば Thy1, 2⁺, Ly2⁺, asialo GM₁⁻ の killer T細胞と同様の細胞であるが以下の点で killer T細胞とは異なる。

- 1) LAK細胞は IL2 刺激 2 日後に誘導され、killer T細胞の産生 kinetics よりも早い。
- 2) Killer T細胞は特異的な cytotoxicity を示すが、LAK細胞は幅広い特異性を示す。
- 3) Killer T細胞産生においてはマクロファージの存在が不可欠であるが、LAK細胞誘導においてはマクロファージは不必要である。

脾細胞を IL2 で刺激することにより IFN- γ の産生が促がされ、IFN の産生と LAK細胞の産生との間には相関関係があり、killer T細胞誘導の場合と同様に、LAK細胞の誘導初期に IFN- γ が重要な役割を演じていると思われる。

LAK細胞の誘導は脾細胞からのみならず、マウスメチルコラントレン誘発肉腫 BMC2、及びヒト胃癌内に浸潤したリンパ球からも可能であった。腫瘍内リンパ球から誘導した LAK細胞は脾細胞から誘導した LAK細胞と同様に、T細胞マーカー（ヒト：OKT3⁺, OKT8⁺, マウス：Thy1, 2⁺, Ly2⁺）を有した large granula lymphocyte (LGL) であった。また、この LAK細胞は脾細胞から誘導した LAK細胞よりも強い cytotoxicity を示し、in vivo においても強い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。

LAK細胞は膜表面上の何らかの分子で数多くの癌細胞を認識し、破壊するものと思われるが、筆者は、LAK細胞に強く反応し、かつ LAK活性を阻害しうるモノクローナル抗体、KBA を作製し、LAK細胞の癌細胞破壊機構について検討した。LAK細胞の cytotoxicity assay 際に KBA抗体を添加することにより、LAK細胞と癌細胞との結合が阻害され、LAK活性が強く抑制されることにより、KBA抗体は LAK細胞の癌細胞認識部位に関連した分子に対するモノクローナル抗体であると考えられる。KBA抗体で認識される分子は正常リンパ系細胞にもわずかながら存在するが、リンパ球を IL2 で活性化することによって、さらに増強誘導されることにより筆者はこの抗原を lymphokine-activated cell-associated (LAA) 抗原と名づけた。LAA 抗原は分子量約 180K と 95 K の 2 つの subunit からなる分子から構成され、KBA抗体は LAK 活性発現のみならず、T細胞の種々の免疫応答を抑制することから、LAA 抗原は T細胞の活性化においても重要な分子であると考えられる。

IL2 は種々の免疫調節作用を有し、癌等の治療に有用であると思われる。しかし、実際にこの応用が可能であるか否かについて検討するためには、まず、IL2 が in vivo においても in vitro と同様の作用を示すか否かを確かめなければいけない。筆者は、IL2 依存的で強い cytotoxicity を有した LAK細胞と可溶性因子のみの通過が可能な millipore diffusion chamber の特性を生かした新しい in vivo IL2 活性の測定方法を開発し、IL2 の in vivo 効果につ

いて検討した。その結果、以下の点が明らかとなった。

- 1) IL2の *in vivo* 投与により、濃度依存的にLAK細胞の *viability*が維持された。
- 2) IL2の *in vivo* 投与によりLAK細胞の *cytotoxicity* も *in vivo* で維持することができた。
- 3) IL2の *in vivo* 効果発現のためには、IL2の1回投与よりも浸透圧ポンプからの徐放的投与が有効である。

In vivo 投与されたIL2はS.C.投与8時間後には血中から消失してしまう。しかし、浸透圧ポンプから同量のIL2を徐放的に投与した場合には、投与後96時間後においても血中IL2活性を確認することができた。これらの結果から、IL2は *in vivo* においても抗腫瘍活性を有したエフェクター細胞の *cytotoxicity* や *viability* を維持できることが証明され、IL2の *in vivo* への応用のためには投与方法の工夫が必要であることが示された。

徐放的IL2の投与により、新しい癌の免疫療法が可能であるか否かについて、まずLAK細胞との併用による *local adoptive immunotherapy* モデルを作製し検討した。LAK細胞はIL2に対する依存性が高いため、*in vivo* に移入後、直ちに死滅し、LAK細胞単独投与ではE14担癌マウスの治療は困難である。またIL2の頻回投与とLAK細胞との併用によっても良好な治療結果を得ることはできなかった。しかし、浸透圧ポンプからの徐放的IL2の投与とLAK細胞との併用により、有意な延命効果が認められ、30%のマウスは完全治癒した。

さらに、徐放的IL2の投与が *systemic adoptive chemoimmunotherapy* モデルにおいても増強効果を示すか否かを、MBL-2を用いた治療系を確立して検討した。MBL-2で免疫したC57BL/6マウスの脾細胞(IM-spl)は *in vitro* においてはMBL-2に対する *cytotoxicity* を示さないが、*in vivo* においては *cyclophosphamide* (CY)との併用で強い抗腫瘍活性を示す。この治療系における *in vivo* エフェクター細胞はThy1, 2⁺, Ly1⁺, Ly2⁺のkiller T前駆細胞であると思われ、*in vivo* に移入されたkiller T前駆細胞が腫瘍局所でkiller T細胞に分化し、MBL-2を破壊するものと思われる。IM-spl, 2×10⁷個以上の移入によってはCYとの併用による抗腫瘍効果が期待できるが、10⁷個のIM-splの移入では、含まれるkiller T前駆細胞の数が少なく十分な治療成果を得ることはできなかった。しかし、この系においても、10⁷個のIM-splと徐放的IL2の投与を併用することによって、顕著な治癒率の増加が認められた。従って、徐放的IL2の投与によって、*in vivo* 移入された抗腫瘍エフェクターのクローンの拡大が可能であることが強く示唆された。

また、IL2はB16腫瘍内に単独投与した場合に強い抗腫瘍効果を示すことより、IL2は *in vivo* においても、担癌宿主の抗腫瘍エフェクター細胞を直接的に活性化できることが推定された。

以上のことから、IL2は投与方法によっては、局所的及び全身的な癌の免疫療法へ応用可能であることが強く示唆された。現在、遺伝子組み換え技術の発展により、IL2の大量生産も既に可能となっていることから、今後、IL2徐放剤等を開発することによってIL2に近い将来必ずや、癌等の治療薬として有用なものになると信ずる。

審査結果の要旨

リンパ球の刺激により放出されるインターロイキン2 (IL2)はリンパ球の分化, 増殖並びにキラー活性の賦与などの生物活性をもっている。本研究ではまずIL2産生の動態を種々の面から検討し最も効率のよいIL2条件を設定した。次に作成したIL2を用いた同種抗原に対するキラーT細胞の長期培養に成功し, その抗原特異性について検討した(第2章)。

次いで部分精製を行ったIL2を用いそのリンパ系細胞に対する分裂刺激作用を検討した。その結果, リンパ節, 脾臓においてはIL2刺激により分裂するT細胞群が豊富であるが, 胸腺にはそのような細胞は極めて少ないことが見出された。そこで胸腺細胞を比重により分画し, 各分画におけるIL2応答性について検索した。その結果, 大部分の胸腺細胞はIL2に対して応答しないが, 低比重画分の細胞は末梢リンパ球と同様にIL2刺激により分裂するという胸腺におけるリンパ球の分化を考える上で興味ある知恵を得ている(第3, 4章)。

次にIL2によって誘導されるキラー細胞(LAK)に関する一連の研究が行われ, LAKにはいくつものタイプがあることが, 表面抗原の解析により明らかにされた。さらにLAKに対するモノクローナル抗体が作成され, LAKには固有の抗原が表現されていること, その抗原に対する抗体添加によりLAK活性が抑制されること, この抗原系は非特異的なキラー活性を示すNK細胞やマクロファージにも表現されていることが明らかにされ, この抗原はこれらの細胞の標的細胞認識部位である確立が高いことが示唆された(第5, 6章)。

以上の知見に基づき, IL2で誘導したLAKを用いての癌治療モデルについての検討が行われ, LAK移入と共にIL2を徐放的に供与すると移植癌細胞に対する治療効果が認められるとの有用な知見が提供された(第7, 8章)。

以上の研究はIL2の免疫応答における役割とそれによって誘導されたLAKの性格, 並びにこれらの知見に基づいた癌治療モデルの確立など基礎的にもまた応用の面でも重要な資料を提供するもので, 博士論文として充分評価し得るものとする。