

氏 名 (本籍)                    しい            ば            けん            いち  
   椎            葉            健            一

学 位 の 種 類                    医            学            博            士

学 位 記 番 号                    医            第            1 9 8 2            号

学 位 授 与 年 月 日                昭 和 6 3 年    2 月 2 4 日

学 位 授 与 の 要 件                学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                        昭 和 5 4 年    3 月  
   東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目                    Interleukin 2-activated killer cells : genera-  
   tion in collaboration with interferon  $\gamma$  and  
   its suppression in cancer patients.  
   (担癌患者末梢血リンパ球からのインターロイキン  
   2 活性化キラー細胞の誘導と抑制に関する研究)

(主 査)

論 文 審 査 委 員                    教 授 佐 藤 寿 雄            教 授 今 野 多 助

   教 授 菅 村 和 夫

# 論文内容要旨

## <目 的>

ヒト末梢血リンパ球（PBL）を、ヘルパーT細胞由来のリンホカインの一つであるインターロイキン2（IL2）で培養するとNK非感受性の腫瘍細胞株ならびに新鮮な固型癌細胞に対し細胞障害活性を有するLAK細胞（lymphokine activated killer cells）が誘導される。LAK細胞は抗腫瘍免疫におけるエフェクター細胞として重要な役割を果たすと考えられるが、その誘導機構は未知な点が多い。我々は健康人PBLを用いた研究でLAKの前駆細胞がLeu 7-Leu 11<sup>+</sup>のNK細胞であり、その誘導には産生されるインターフェロン $\gamma$ （IFN $\gamma$ ）との共同作用が必須であることを明らかにした。本研究ではIL2とLAKによる養子免疫療法の確立を旨として、消化器癌患者と乳癌患者の末梢血リンパ球をヒトレコンビナントIL2（rIL2）存在下で培養し自家固型癌細胞に対する細胞障害活性の誘導を試み、誘導されたLAK細胞の性状ならびに誘導機構を解析した。

## <方 法>

健康人ならびに担癌患者のヘパリン加末梢血からFicoll-Isopaque比重遠心法によって単核球を分離後、細胞は $1 \times 10^6/ml$ に調整し、通常の実験系ではrIL2 10 V/ml存在下で3日間培養してLAK細胞を誘導した。培地は10%自己血清（AS）加あるいは牛胎児血清（FCS）加RPMI 1640を用いた。培養上清はVSV-WISH細胞系で50%プラーク減少法によりIFN活性を測定した。LAK細胞誘導系にrIFN $\gamma$ またはモノクローナル抗IFN $\gamma$ 抗体を添加しLAK誘導に及ぼす影響を検討した。LAK活性の測定は4時間の<sup>51</sup>Cr release法によった。標的細胞としては新鮮な固型癌細胞と各種継代腫瘍細胞株を用いた。新鮮固型癌から腫瘍細胞浮遊液の調整は酵素処理に加え、Ficoll-Isopaqueならびにpercoll不連続密度勾配による比重遠心法の組合せによる独自の方法を開発した。

## <結果および考察>

消化器癌患者ならびに乳癌患者のPBLをrIL2 10 V/ml存在下で3日間培養するとLAK細胞が誘導され、培養上清中にIFN $\gamma$ 活性が検出された。自家新鮮固型癌細胞または脾癌樹立細胞株PK-1を標的細胞としてLAK活性を測定すると、それぞれ12例中10例または37例中20例に強い細胞障害活性が認められた。誘導されたLAK細胞はNK非感受性の各種継代腫瘍細胞株および自家または他家由来の新鮮固型癌細胞（胃癌・大腸癌・舌癌・乳癌の原発巣と転移リンパ節）

に対し細胞障害活性を示した。しかし正常リンパ球や正常粘膜上皮細胞はLAKに非感受性で、マイトージェンで幼若化させたリンパ芽球は感受性を獲得した。これらの結果は担癌患者のLAK細胞も、健康人と同様、癌細胞やリンパ芽球細胞膜上には発現され、正常細胞膜上には欠如しているか発現の弱いある種の抗原を認識してMHCの拘束を受けることなく非特異的な細胞障害活性を示すものと考えられた。

癌患者のLAK活性と培養上清中のIFN $\gamma$ 活性は健康人に比べ低値を示す症例が多く認められたが、IFN $\gamma$ 活性を測定した34例のうちIFN $\gamma$ 活性が検知されなかった12例ではLAK活性も著明に低下していた。LAK誘導系に抗IFN $\gamma$ 抗体を添加するとLAKの誘導は抑制され、rIFN $\gamma$ を添加するとLAK活性は増強した。これらのことから、rIL2による担癌患者PBLからのLAK細胞誘導はIFN $\gamma$ との共同作用が必須であることが示唆され、特に低LAKと低IFN $\gamma$ 活性の関連が注目された。

次に担癌患者のLAK誘導の抑制の原因を検討するため、自己血清存在下でのLAK誘導を試み、同時に健康人LAK誘導系に対する担癌患者血清の影響を調べた。その結果、担癌患者血清中にはrIL2によるLAK細胞誘導を抑制する因子が存在することが判明した。これに基づき担癌患者は以下の3つのグループに分類された。グループ1(G1)は血清中の抑制因子は存在せず、ASまたはFCSいずれの存在下でも健康人と同じ程度の高いLAK活性とIFN $\gamma$ 産生が誘導された。グループ2(G2)は血清中にLAK細胞誘導の抑制因子が存在し、AS存在下で誘導されたLAK活性ならびにIFN $\gamma$ 活性は健康人に比べ明らかに低下していた。しかしASをFCSに替えるかAS存在下でもrIFN $\gamma$ の添加あるいは高単位のIL2を添加して培養すると抑制が解除された。グループ3(G3)は血清中に抑制因子が存在しLAK活性IFN $\gamma$ 活性ともに低値を示した。FCS存在下での培養、rIFN $\gamma$ 添加、高単位のrIL2を添加してもLAK活性の増強が認められず、IL2反応細胞の機能異常または量的減少の可能性が示唆された。

以上の結果からrIL2-rIFN $\gamma$ -LAK細胞による抗癌養子免疫療法を確立し、臨床応用を行なうには、in vitroならびにin vivoにおける有効なエフェクター細胞の生成とともに担癌生体の抑制機構の解除が課題となった。本研究で呈示したグループ分類は、臨床病期分類との相関がみられ、IL2-LAK療法施行時の重要な免疫学的指標になるものと考えられた。

## 審査結果の要旨

ヘルパーT細胞由来のリンホカインの一つであるインターロイキン2 (IL2) 存在下にリンパ球を培養すると、NK非感受性の腫瘍細胞に対し細胞障害活性を有するLAK細胞 (lymphokine activated killer cells) が誘導され、その抗腫瘍効果が期待されている。in vitroで誘導したLAK細胞を担癌生体に移入する養子免疫療法やIL2の in vivo投与による癌治療を飛躍的に発展させるには、LAK細胞の誘導機構の解明が重要であり、特に担癌生体での詳細な検討が要求される。著者らは既に健康人末梢血リンパ球を用いた研究においてLAKの前駆細胞の一つがNK細胞であり、その誘導にはIL2と産生されるインターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) の共同作用が必須であることを解明している。その成果に基づき、本論文はこれまでに報告の少ない消化器癌患者と乳癌患者の末梢血リンパ球からレコンビナントIL2 (rIL2) を用いてLAK細胞の誘導を試み、誘導されたLAK細胞の性状とその誘導機構について解析している。

著者らの実験系において特記すべきことは、標的細胞として自己の新鮮分離固型癌細胞を用いたことと、誘導機構の解析にあたって内因性に誘導されるIFN $\gamma$ の作用に着目した点である。結果は、自己の新鮮固型癌細胞に対する細胞障害活性の誘導を試みた12例のうち10例で、膀胱癌樹立細胞株を標的細胞として細胞障害活性を測定した37例中20例で明らかなLAK細胞の誘導を認めた。腺癌を中心とした各種消化器癌細胞ならびに乳癌細胞がLAKに感受性を示すことが明らかとなり、正常リンパ球や正常粘膜上皮細胞は非感受性であることも証明された。これら担癌患者のLAK細胞誘導系では、健康人と同様産生されるIFN $\gamma$ が必須の役割を果たすことが証明され、IL2とIFN $\gamma$ の共同作用が認められた。さらに担癌患者のLAK細胞誘導能と培養上清中に検出されるIFN $\gamma$ 活性は健康人に比し低値を示す傾向にあり、IFN $\gamma$ 産生の低下とLAK誘導能の低下が密接に関連することが示唆された。これら担癌患者におけるLAK細胞誘導の抑制機構を検討した結果、進行癌患者では血清中に抑制因子が存在することが明らかとなり、rIFN $\gamma$ の添加または高単位のrIL2添加により抑制の解除が可能であった。臨床病期の一層進行した一部の症例では血清中の抑制因子の存在に加えリンパ球の機能異常が疑われ、rIFN $\gamma$ 添加や高単位rIL2の添加にてもLAK活性の増強は誘導されなかった。これらの結果を基に作製された担癌患者のグループ分類はIL2-LAK療法の適応と効果判定に有用な免疫学的指標を与えるものと考えられた。

本論文は担癌患者の末梢血リンパ球を用いて、独創的な観点よりLAK細胞誘導機構を解析し、担癌生体の免疫学的特性としての抑制機構についても新しい知見を得ている。IL2-LAK細胞を用いた抗癌療法の確立に多くの示唆と学問的根拠を与える秀れた論文である。従って本研究は学位授与に値するものと認める。