

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 (本籍) | 大 津 敦 ^{あつし} |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 医 第 2 4 5 3 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 4 年 9 月 9 日 |
| 学 位 授 与 の 条 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当 |
| 最 終 学 歴 | 昭 和 58 年 3 月 25 日 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業 |
| 学 位 論 文 題 目 | 抗 癌 剤 耐 性 細 胞 に 対 す る Lymphokine activated killer (LAK) 細 胞 の 効 果 に 関 す る 基 礎 的 検 討 |

(主 査)

| | | |
|-------------|-------------|-----------|
| 論 文 審 査 委 員 | 教 授 豊 田 隆 謙 | 教 授 久 道 茂 |
| | 教 授 菅 村 和 夫 | |

論文内容要旨

Lymphokine activated killer (LAK) 細胞は、末梢血リンパ球 (PBL) を、interleukin 2 (IL-2) の存在下に *in vitro* で培養することにより誘導され、極めて広範囲の腫瘍細胞に細胞傷害性を発揮する。最近の遺伝子工学の進歩により、recombinant IL-2が量産化されたことにより、LAK細胞を用いた養子免疫療法が臨床応用され、一部の悪性腫瘍でその有効性が報告された。一方悪性腫瘍に対する化学療法を行う上で、腫瘍細胞の抗癌剤耐性機構の発現は臨床的に極めて大きな障壁となる。最近、その薬剤耐性の克服に関し様々な試みがなされており、その中で、免疫療法も一つの可能性を有するものとして期待されている。本実験では、抗癌剤耐性細胞に対する免疫療法の可能性を探る基礎的検討を目的として、*in vitro*でのLAK細胞の抗癌剤耐性細胞に対する抗腫瘍効果、さらに抗癌剤とLAK細胞の併用効果についても検討した。

実験の対象は、ヒト肺腺癌細胞由来のPC-9、PC-14およびそれらのシスプラチン (CDDP) 耐性株であるPC-9/CDDP、PC-14/CDDP、ヒト骨髄性白血病細胞由来のK-562およびそのアドリアマイシン (ADM) 耐性株で多剤耐性を示すK-562/ADMを用いた。これらを標的細胞として健常人から採取したPBLおよびLAK細胞の抗腫瘍効果を検討した。PBLとLAK細胞の抗腫瘍活性の測定に際しては、effectorとtargetの比 (E/T ratio) を3段階に調整し、その細胞障害性をcolony assayにて検討した。また、LAK細胞と抗癌剤の併用効果の検討は以下の2つの方法で実験を行った。第一の実験は、腫瘍細胞をCDDPまたはADMに1時間接触させた後、LAK細胞を加え5時間incubationとした。一方第二の実験では、腫瘍細胞を抗癌剤とLAK細胞と一緒に5時間、第一の実験と同じ抗癌剤濃度、E/T ratioで接触させた後、colony assayでの抗腫瘍活性の測定に供した。さらに、第二の実験系においては、E/T ratioを一定にしたままで抗癌剤の濃度を変え、dose-response curveを作成した。

各腫瘍細胞に対するPBLおよびLAK細胞単独のcolony形成の抑制率の測定では、いずれの細胞においても、PBLに比し、LAK細胞の方で細胞障害性が増強された結果となった。また、PC-9/CDDPでは、親株のPC-9に比べ、PBLおよびLAK細胞のいずれに対してもすべてのE/T ratioにおいて有意に ($P < 0.01$) 感受性が高かった。次に、LAK細胞と抗癌剤の併用効果の検討を抗癌剤1時間接触後LAK細胞と5時間incubation、および抗癌剤とLAK細胞の同時5時間incubationの2通りの方法で行った。PC-14とPC-14/CDDPの両者において、LAK細胞とCDDPの同時投与群でLAK細胞単独、CDDP単独のいずれと比較しても有意な ($P < 0.05$) 抗腫瘍効果の増強が見られた。また、この併用はPC-14、PC-14/CDDPに対し相乗効果があると判定された。他の細胞においては併用による相乗効果は得られなかったが、抗癌剤またはLAK細胞単独

のうち高い抗腫瘍効果を示すいずれか一方の効果と同等であった。さらに、LAK細胞のE/T ratioを一定にした際のPC-14, PC-14/CDDPに対するCDDPのdose response curveを作成したが、いずれの細胞およびCDDP濃度においても、CDDPとLAK細胞併用群の方が、各々の単独投与群に比べ高いcolony抑制率を示した。

今回の実験では免疫学的アプローチによる耐性克服の可能性を探る基礎的検討としてLAK細胞を用いた*in vitro*での検討を行った。本実験においては、CDDP耐性細胞のうちPC-9/CDDPで親株のPC-9に比べ、PBL, LAK細胞のいずれに対しても高い感受性を示した。文献的にLAK細胞が抗癌剤の多剤耐性因子を発現しているヒト大腸癌細胞に対し細胞障害性を発揮したことが報告されているが、今回の実験でも同様のLAK細胞の効果を追認した。しかし本実験ではCDDP耐性のヒト肺腺癌細胞を対象とした点、またPC-9/CDDPで親株に比べ著明な感受性の増加が認められた点など注目に値すると思われた。また、他の耐性株(PC-14/CDDP, K-562/ADM)に対しても、LAK細胞は親株とほぼ同等の細胞障害性を示しており、即ち抗癌剤に対する獲得耐性を得た後もLAK細胞の効果に変化はないことが示唆される。次に、抗癌剤とLAK細胞の併用効果の検討を行った。今回は、両者を併用した実際的な治療法の可能性を追求する目的から、実験方法は抗癌剤投与後LAK細胞投与または両者同時投与で行った。PC-14およびPC-14/CDDPにおいて一部の濃度設定で相乗効果が認められており、また、CDDPの各濃度においても併用群の方がおのおの単独群よりも高い効果を得た。さらに、他の細胞においては相乗効果は得られなかったものの抗癌剤の存在でLAK細胞の効果の減少は見られなかった。以上の結果から、両者の併用療法の可能性も示唆されたものと思われる。

審査結果の要旨

抗癌多剤耐性細胞にたいする抗腫瘍効果について *in vitro* で colony assay 法を用いて研究をおこなった。対象とした腫瘍細胞培養株はヒト非小細胞肺癌由来の PC-9, PC-14 およびシスプラチン (CDDP) 耐性株である PC-9/CDDP, PC-14/CDDP を用いた。さらにアドリアマイシン (ADM) 耐性株で多剤耐性機構を発現している K-562/ADM を使用した。

抗腫瘍効果はインターロイキン-2 で活性化した LAK 細胞 (Lymphokine activated killer 細胞) を使い, LAK 細胞単独と抗癌剤との併用をおこない抗腫瘍活性を測定した。

結果は末梢リンパ球および LAK 細胞は PC-9/CDDP にたいして著明な抗腫瘍活性が増強した。しかし PC-14/CDDP と K-562/ADM にたいしてはリンパ球, LAK 細胞ともに抗腫瘍活性は親株と同程度であり, 薬剤耐性細胞に LAK 細胞の効果がなかった。LAK 細胞と抗癌剤 CDDP との併用により抗腫瘍効果がみとめられたので, 多剤耐性細胞にたして抗癌剤を併用し, LAK 細胞が有効な治療法となりうることをしめた。

現在 LAK 細胞より TIL が *in vivo* で効果がある点についての追及はおこなっておらず, 今後の課題である。抗癌剤多剤耐性細胞の問題は難問のひとつであるが, 治療法の開発をめざした本研究は新しい道を開くものであり, 学位論文に値する。