

# Selective accumulation of the long term cultured rat A-NK cells into mammary tumor tissues

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 顧, 寿智 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1089">http://hdl.handle.net/10271/1089</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 236号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏名	顧 寿 智		
論文題目	<p>Selective accumulation of the long term cultured rat A-NK cells into mammary tumor tissues                      (長期培養ラット A-NK 細胞の乳癌組織内への選択的な集積)</p>		

博士(医学) 顧 寿 智

## 論文題目

Selective accumulation of the long term cultured rat A-NK cells into mammary tumor tissues  
(長期培養ラット A-NK 細胞の乳癌組織内への選択的な集積)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

腫瘍に対する免疫療法が成立する重要な要件の一つは、抗腫瘍活性を発揮するエフェクター細胞が選択的に腫瘍局所へ集積するかどうかである。長期培養 A-NK (activated and adherent natural killer) 細胞を分離し、癌組織内への集積を増強する機序を解明することは、A-NK 細胞による抗腫瘍活性を癌組織内で効果的に発揮させる上できわめて重要である。この研究において、我々は長期間安定して抗腫瘍性エフェクター活性を発揮する A-NK 細胞を分離し、その形態的性状、膜抗原の表現型、接着分子の発現性、キラー活性などを明らかにし、さらに、この長期培養 A-NK 細胞の自家誘発乳癌組織への選択的到達性を増強させる方法と、その機序を検索した。

### [材料と方法]

1. A-NK 細胞は、Ficoll-Paque で分離した雌 DA/Sic ラット脾細胞を10%牛胎仔血清添加 RPMI-1640培養液で、37℃、5% CO<sub>2</sub>、1,000u/ml recombinant interleukin 2 (rIL-2) 存在下で、8、30、150日間継代培養して準備した。2. 以下の単クローン抗体 (mAb) を使用した: Marl (抗ラットマクロファージ mAb)、Mar 3 (抗貪食分子 mAb)、1F4 (抗 CD 3)、W 3 /25 (抗 CD 4)、OX 6 (抗 Ia)、OX 8 (抗 CD 8)、OX39 (抗 IL-2 R)、AG-1 (抗 asialo GM-1)、WT-1 (抗 LFA-1 $\alpha$ )、WT-3 (抗 LFA-1 $\beta$ )、1A29 (抗 ICAM-1)、HRL-4 (抗 LECAM-1)。3. 各種の mAb を用いて EPICS Profile II、および、間接型アルカリフォスファターゼ免疫組織化学染色法により A-NK 細胞の各膜抗原の表現型と、乳癌組織内への浸潤細胞を解析した。4. A-NK 細胞の形態は光学顕微鏡、および透過型、走査型電子顕微鏡で観察し、さらに染色体型を検討した。5. 雌 DA ラットに7, 12 dimethylbenzanthracene (DMBA) (30mg/kg 体重) を静注して、自家誘発乳癌ラットを作成した。6. 細胞傷害活性は4時間の<sup>51</sup>Cr 遊離試験にて測定した。標的細胞としては、YAC-1、P815、および DMBA 誘発乳癌細胞を用いた。7. 乳癌ラットを次の6群、生食水投与群、FCA (Freund complete adjuvant) 群、FIA (Freund incomplete adjuvant) 群、BCG (bacillus Calmette-Guérin) 群、FCA+BCG 群、FIA + BCG 群に分け、それぞれを乳癌組織の周囲4カ所に皮下注射した。投与後10日目に、0、8、30、150日間培養した<sup>3</sup>H-uridine 標識 A-NK 細胞を各群の担癌ラットに静注した。その後経時的に腫瘍、および各種臓器の放射活性を測定し、さらにオートラジオグラフィーによりその分布と動態を検索した。

### [結 果]

1. 長期培養 A-NK 細胞の特性: 各培養日齢の A-NK 細胞は正常脾細胞とは異なる特異な scatter profile をそれぞれ示した。8日培養以降の A-NK 細胞は大型円形で表面に多数の微絨毛様突起を持ち、不規則な核と電子密度の高い顆粒を有していた。また、正常雌ラットと同じ2倍体核型を示し、マーカー染色体は認められなかった。
2. 膜抗原の発現性の変化: 培養とともに A-NK 細胞の膜抗原表現型に有意の変化がみられた。1A29<sup>+</sup>、

OX39<sup>+</sup>、OX 8<sup>+</sup>、および OX 6<sup>+</sup>A-NK 細胞の発現率は培養とともに増加したが、以後漸減した。培養開始時高値を示した WT-1<sup>+</sup>、WT-3<sup>+</sup>、1F4<sup>+</sup>、および W3/25<sup>+</sup>A-NK 細胞は培養とも次第に減少した。培養とともに Mar1<sup>+</sup>、Mar3<sup>+</sup>、AG1<sup>+</sup>A-NK 細胞が出現した。HRL-4<sup>+</sup>A-NK 細胞が約20%認められた。150日間培養した後では、接着分子の LFA-1 $\alpha$ 、LFA-1 $\beta$ 、ICAM-1、LECAM-1、と IL-2R は、依然として20%以上の高値を示した。免疫染色でもフローサイトメトリーとはほぼ同様の所見が認められた。

3. in vitro 細胞傷害活性：YAC-1、P815、および DMBA 誘発乳癌細胞に対する細胞傷害活性は、8日培養 A-NK 細胞が最も高く、以後30日、150日培養 A-NK 細胞では次第に低下した。
4. in vivo A-NK 細胞の分布と動態：A-NK 細胞を乳癌ラット、あるいは正常ラットへ静注したところ、投与後3時間で肺に集中的に分布し、ついで、肺の分布が急激に低下するにつれて、肝と脾に集中的に分布した。肺への分布は毛細血管腔内での一時的滞留現象であった。
5. 乳癌組織内への<sup>3</sup>H-uridine 標識 A-NK 細胞の分布：腫瘍周囲へ各種 adjuvant を投与した群では、12、48、72時間後に、FCA+BCG 群、FIA+BCG 群、FIA 群、BCG 群、FCA 群の順で生食水投与群と比べ有意の高い活性が認められた。とくに FCA+BCG 群が最も高値を示した。オートラジオグラフィの所見も、各臓器の放射活性の所見とほぼ一致していた。adjuvant 投与群では A-NK 細胞が腫瘍内、およびその周辺に高率に集積していた。また、腫瘍周囲の結合組織内に、高内皮性細静脈 (HEV) 様血管の新生像、LFA-1<sup>+</sup>リンパ球の浸潤像、および腫瘍細胞膜上への ICAM-1 分子の発現などが認められた。

#### [考察および結論]

我々は、DA/Slc ラットの脾細胞を rIL-2 で活性化し、5ヵ月以上の長期培養で A-NK 細胞を分離することに成功した。特異な形態学的性状、各種膜抗原と接着分子の発現性の変化、腫瘍細胞に対する傷害活性が認められた。各種 adjuvant、とくに FCA+BCG をそれぞれ腫瘍周辺へ投与すると、血管系変化、とくに HEV 様血管の新生が起り、接着分子を介する A-NK 細胞の血管外遊出現象が惹起されて、腫瘍に対する A-NK 細胞による養子免疫療法の抗腫瘍活性を増強する上で、adjuvant 腫瘍周辺への前投与が有用であることが明らかにされた。

### 論文審査の結果の要旨

腫瘍に対する養子免疫療法として、インターロイキン-2 (IL-2) で活性化した LAK (lymphokine activated killer) 細胞を投与する所謂 LAK 療法が多くの担がん患者に試みられてきたが、未だ一定の評価は得られていない。申請者は LAK 細胞よりも抗腫瘍活性が強い A-NK (activated and adherent natural killer) 細胞を長期間安定して培養維持し、これを自家誘発乳がん組織へ選択的に集積させる方法を樹立した。

#### [材料と方法]

1) A-NK 細胞は雌 DA/Slc ラット脾細胞より、Ficoll-Paque 比重遠心法でリンパ球を分離、IL-2 存在下で2、3日培養後、付着性細胞を回収することによって得た。そして、これを IL-2 存在下で更に~150日間継代培養した。2) A-NK 細胞の形態は光学顕微鏡、および透過型、走査型電子顕微鏡で観察し、さらに染色体型を検討した。3) A-NK 細胞の膜抗原の表現型および A-NK 細胞、および

乳がん組織に発現している接着分子は単クローン抗体を用い、EPICS Profile II、および免疫組織化学染色で解析した。4) 自家誘発乳がんラットは7、12dimethylbenzanthracene (DMBA) (30mg/kg 体重) を静注することにより作成した。5) この DMBA 誘発乳がん細胞、および YAC-1、P815細胞を標的細胞とした A-NK 細胞の細胞傷害活性は<sup>51</sup>Cr 遊離試験で測定した。6) 乳がんラットの乳がん組織の周囲4ヶ所に、i) 生食水、ii) FCA (Freund's complete adjuvant)、iii) FIA (Freund's incomplete adjuvant)、iv) BCG (bacille de Calmette et Guérin)、v) FCA+BCG、vi) FIA+BCG の何れかを皮下注射し、投与後10日目に<sup>3</sup>H-uridine 標識 A-NK 細胞を静注した。その後、経時的に腫瘍、および各種臓器の放射活性を測定すること、およびオートラジオグラフィーにより、A-NK 細胞の分布と動態を解析した。

### [結 果]

1) A-NK 細胞は培養とともにその形態と表面抗体に変化を示した。すなわち、培養により、大型で微絨毛様突起を持ち、電子密度の高い顆粒を有する細胞となった。また、検索された多数の細胞表面抗原は変化を示したものの、LFA-1 などの接着分子は150日培養後も十分強く発現していた。2) A-NK 細胞の自家誘発乳がん細胞などに対する細胞傷害活性は8日間培養のものが最も高かったが、150日間培養のものでも有意に高値を示した。3) A-NK 細胞を腫瘍組織内へ集積させる目的で、A-NK 細胞投与前に各種アジュバントを乳がんラットの腫瘍周囲に注射したところ、いずれのアジュバンドも効果を示したが、特に FCA+BCG が最も効果的であった。この場合、腫瘍周囲の結合織内に高内皮性細静脈 (HEV) 様血管の新生像と LFA-1 陽性リンパ球の浸潤像、および腫瘍細胞上の ICAM-1 の発現が認められた。

### [考 察]

申請者はこれらの結果より、腫瘍周囲にアジュバント (特に FCA+BCG) を投与することにより誘導された HEV 様血管の新生、および腫瘍細胞上の ICAM-1 の発現が LFA-1 陽性の長期培養 A-NK 細胞を腫瘍組織に集積させると推察した。腫瘍周囲へのアジュバントの前投与と A-NK 細胞の組み合わせは、担がん患者に対する養子免疫療法で抗腫瘍効果を高める方略として試みる価値がある。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) この方法で実際に腫瘍を退縮できるか
- 2) 8日培養よりも細胞傷害活性がおちる150日間培養 A-NK 細胞を投与した理由
- 3) A-NK 細胞が培養とともに表面抗原の発現性に变化を示す理由
- 4) A-NK 細胞が培養初期に CD 3 分子の強い発現を示す理由
- 5) A-NK 細胞はパーフォリンを持っているか
- 6) FCA はそれ自身結核菌抗原を含んでいるが、これと BCG を併用する理由
- 7) アジュバントによる HEV 様血管の新生および ICAM-1 発現のメカニズム
- 8) アジュバントによる ICAM-1 の発現は腫瘍細胞だけに認められたか
- 9) ICAM-1 と LFA-1 の相互作用が A-NK 細胞の腫瘍細胞への接着に機能しているという根拠は
- 10) LFA-1 は細胞質内に認められるか
- 11) HEV はどのような組織に認められるか
- 12) HEV が A-NK 細胞を集める機序
- 13) ラット脾細胞が乳がん細胞に対し有意の細胞傷害活性を示すのは何故か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士 (医学) の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 小 出 幸 夫

副査 教授 筒 井 祥 博 副査 教授 馬 場 正 三