



In vitro IL-12 treatment of peripheral blood mononuclear cells from patients with leukemia or myelodysplastic syndromes: increase in cytotoxicity and reduction in WT1 gene expression

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-30<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 潘, 峻<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/1196">http://hdl.handle.net/10271/1196</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 343号   | 学位授与年月日 | 平成13年 3月27日 |
| 氏名    | 潘 峻  |         |             |
| 論文題目  | <p>In vitro IL-12 treatment of peripheral blood mononuclear cells from patients with leukemia or myelodysplastic syndromes : increase in cytotoxicity and reduction in WT1 gene expression<br/> (白血病および骨髄異形成症候群患者末梢血単核細胞の <i>in vitro</i> IL12 処理による細胞傷害性の増加と WT1 遺伝子発現量の減少)</p> |         |             |

博士(医学) 潘 峻

## 論文題目

In vitro IL-12 treatment of peripheral blood mononuclear cells from patients with leukemia or myelodysplastic syndromes: increase in cytotoxicity and reduction in WT1 gene expression

(白血病および骨髄異形成症候群患者末梢血単核細胞の *in vitro* IL12処理による細胞傷害性の増加とWT1遺伝子発現量の減少)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

IL-12はNK細胞、CTLの活性の増強およびIFN- $\gamma$ 産生誘導による抗腫瘍効果をもつことが知られており、IL12の投与により皮膚T細胞リンパ腫や転移性腎細胞癌の患者に抗腫瘍効果が認められている。また近年ほとんど全ての白血病細胞でWilms腫瘍遺伝子(WT1)が発現していることが示され、白血病細胞のWT1の発現量は健常人の末梢血単核細胞に比較し約 $10^5$ 倍高く、急性白血病や骨髄異形成症候群(MDS)の予後に逆相関する。WT1mRNAの定量により検出された微小残存病変(MRD)は、特異的なDNAマーカー[PML/RAR $\alpha$ (M3)、AML/ETO(M2)、bcr/abl(CML)]を用いたRT-PCRによって測定されたMRDや、白血病細胞数ともよく相関した。これらの事実から白血病やMDSにおいて、WT1がMRDの新しい指標とみなされている。

本研究では、白血病およびMDSにおける微小残存病変(MRD)の除去に及ぼすIL-12の効果をWT1mRNA発現量を指標にして検討した。

### [患者ならびに方法]

健常人5例、MDS12例(RA3例、RAEB8例、CMML1例)、AML12例(寛解期5例、非寛解期7例)、慢性期CML6例の末梢血単核細胞及びK562細胞にIL-12(100U/mL)を添加し3日間培養した。培養した末梢血単核細胞(エフェクター細胞)とDio染色したK562細胞(ターゲット細胞)の比が10対1または20対1となるように混合し24時間培養し、PI染色を行った。細胞傷害性はK562細胞の死細胞の割合としてフローサイトメトリーで評価した。同時に末梢血単核細胞またはK562細胞から抽出したtotal RNA(1 $\mu$ g)と $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、0コピーのcompetitive RNAを混合した後、競合的RT-PCRを行った。WT1mRNAの発現量をcompetitive RNAから得られたPCRバンドと比較し定量した。

### [結果]

#### 1. IL12による末梢血単核細胞のK562細胞に対する細胞傷害性への影響

30名の患者において、IL12無処理の末梢血単核細胞の細胞傷害性は、エフェクター細胞とターゲット細胞の比が10対1のとき $7.5\% \pm 4.9\%$ (健常人コントロール $13.3\% \pm 4.8\%$ )、20対1のとき $13.4\% \pm 9.3\%$ (健常人コントロール $25.7\% \pm 8.4\%$ )であり、いずれも有意に低下していた( $P=0.019$ 、 $P=0.008$ )。IL12添加3日後には、それぞれ $18.5\% \pm 12.5\%$ 、 $30.7\% \pm 17.8\%$ と有意に増加した( $P=0.0004$ 、 $P=0.0002$ )

#### 2. K562細胞および患者末梢血単核細胞のWT1mRNA発現量に対するIL12の影響

競合的RT-PCRにより定量されたWT1mRNAの発現量は、K562細胞はtotalRNA1 $\mu$ g当たり $10^7$ コピー以上であり、健常人コントロールの末梢血単核細胞では $10^3$ コピー以下であった。IL12 100単位/mlを加え

たK562細胞の培養では、IL12はK562細胞のWT1 mRNA発現量に対し影響は及ぼさなかった。健康人末梢血単核細胞 $5 \times 10^5$ /mlとK562細胞 $5 \times 10^3$ /mlにIL12を加え、混合培養したところ、WT1mRNA発現量はIL12処理によりtotal RNA  $1 \mu\text{g}$ 当たり $10^{4.5}$ コピーから $10^{4.0}$ コピーに減少した。

臨床検体では、6例のCMLで、平均WT1mRNA発現量はIL12処理によりtotal RNA  $1 \mu\text{g}$ 当たり $10^{4.8}$ コピーから $10^{4.2}$ コピーに減少した( $p=0.04$ )。12例のMDSで、同様に $10^{5.4}$ コピーから $10^{4.8}$ コピーに減少した( $p=0.008$ )。また完全寛解にある5例のAMLで、同様に $10^{5.0}$ コピーから $10^{4.2}$ コピーに減少した( $P=0.04$ )。

しかし、非寛解状態にある7例のAMLでは、IL12処理でWT1mRNA発現量が減少したのは2例であり、他の5例は変化しなかった。

#### [考察および結論]

本研究では、IL12処理によりMRDを含む患者末梢血単核細胞のWT1遺伝子の発現量は減少し、健康人末梢血単核細胞とK562細胞の混合培養においてもWT1遺伝子の発現量は減少した。また、健康人末梢血単核細胞および患者末梢血単核細胞の細胞傷害性は増加した。これらの結果、IL12処理によって白血病患者のMRDを減少させ得る事が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

ヒトの白血病および骨髄異形性症候群(MDS)においては、治療後の微小残存病変(MRD)の存否がきわめて重要である。

申請者は、単球、B細胞、抗原提示細胞などから産生されるIL-12に注目し、それによって活性化された白血病患者の末梢血単核細胞の白血病のMRDに及ぼす影響について、in vitro系においてWilms腫瘍遺伝子(WT1)の発現量を指標にして解析した。

単核細胞の細胞傷害活性は、健康人(5例)、MDS(12例)、AML(12例)、慢性期CML(6例)の末梢血から単離した単核細胞のK562細胞に対する細胞傷害性を、フローサイトメトリーによって評価している。また、WT1mRNAの発現量は、単核細胞およびK562細胞から抽出したtotal RNA( $1 \mu\text{g}$ )と、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、0コピーのcompetitive RNAを混合し競合的RT-PCRを行い、WT1mRNA発現量をcompetitive RNAから得られたPCRバンドと比較定量することによって測定している。

材料並びに方法に関しては、その研究目的に対しほぼ適切であると判断された。

次に得られた結果に対し、審査委員会は次のような点を評価した。

1. 健康人の末梢血単核細胞のK562細胞傷害活性は、IL-12添加後3日目に有意に増加した。それは、IL-12 100U/mlが至適濃度であった。次に30名の白血病及びMDS患者の末梢血単核細胞のK562細胞傷害活性をみると、IL-12添加により有意に増加した。
2. 競合的RT-PCRにより定量されたWT1mRNAの発現量は、健康人単核細胞ではIL-12処理によりtotal RNA  $1 \mu\text{g}$ あたりの $10^{4.5}$ コピーから $10^{4.0}$ コピーに減少した。一方、患者の末梢血単核細胞のWT1mRNAの発現量は病状により変化がみられた。

CMLとMDSでは、 $10^{4.8}$ コピーから $10^{4.2}$ コピーに、 $10^{5.4}$ コピーから $10^{4.8}$ コピーにそれぞれ減少した。完全寛解のAMLでは $10^{5.0}$ コピーから $10^{4.2}$ コピーに減少したにもかかわらず、非完全寛解7例では5例において変化が見られなかった。

以上のことから申請者は、MRDを含む白血病患者の末梢血単核細胞は、IL-12で処理することによりWT1遺伝子の発現量が減少し、K562細胞傷害性が増加させ得ると結論した。

この所見に対し審査委員会では、白血病やMDS微小残存病変(MRD)に対するIL-12のin vivo投与による抑制効果の可能性を示唆する基礎的研究であると、高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) K562細胞以外の細胞をtargetとして用いたか。
- 2) 用いた末梢血単核細胞の細胞組成は。
- 3) 健康人及び患者の末梢血よりリンパ球、単球、好中球等を単離し、それぞれのIL-12反応性、細胞障害性、WT1mRNA発現量を検索したか。
- 4) 健康人と患者の末梢血単核細胞はIL-12用量依存性に同様のK562細胞障害性を示すか。
- 5) 白血病患者及びMDS患者の単核細胞の細胞障害性にバラツキが見られる原因は何か。
- 6) non CRとCRの患者の末梢血単核細胞中に占める芽球の割合。

これらの質問に対する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判定した。

|         |    |    |    |          |
|---------|----|----|----|----------|
| 論文審査担当者 | 主査 | 山下 | 昭  |          |
|         | 副査 | 大橋 | 京一 | 副査 今野 弘之 |