



The Phenotypic and Functional Changes of Rat Kupffer Cells Cultured with Interleukin-2

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井上, 知 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1452

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	医博論第 175号	学位授与年月日	平成 6年 3月 8日
氏 名	井 上 知		
論文題目	The Phenotypic and Functional Changes of Rat Kupffer Cells Cultured with Interleukin - 2 (IL-2 培養ラットクッパー細胞の膜抗原表現型と機能の変化)		

医学博士 井上 知

論文題目

The Phenotypic and Functional Changes of Rat Kupffer Cells Cultured with Interleukin-2

(IL-2 培養ラットクッパー細胞の膜抗原表現型と機能の変化)

論文の内容の要旨

近年、担癌患者に対する免疫療法として interleukin-2 (IL-2) 単独投与、あるいは lymphokine activated killer 細胞による養子移入免疫療法との IL-2 併用投与がよく試行されている。いずれも有効例が確認されているが、比較的高濃度の IL-2 を長期間投与する際に生じる副作用として、肝障害、好酸球増多症および vascular leak syndrome などが報告されており、その中でも特に肝障害が IL-2 免疫療法を行う際の dose limiting factor になると考えられている。また、実験動物において IL-2 を長期間投与した際にも同様の所見がみられることが報告されている。本研究では IL-2 の肝臓に対する影響を明らかにする目的で、肝臓類洞内に存在し肝内の局所免疫機能に密接に関係する細胞である Kupffer 細胞 (KC) に着目し、in vitro 系における IL-2 の KC に与える影響を、膜抗原表現型の変化、貪食能および antigen presenting cell (APC) 活性などの変化の面から検討した。

近交系 WKAH/Hkm (RT1^k) 雄ラットの肝より collagenase 灌流法、および低速遠沈法によって実質細胞と非実質細胞を準備した。非実質細胞を 37°C、18 時間培養し非付着細胞を除去したのち、付着細胞分画について内因性 peroxidase、および非特異性 esterase 活性の検索を行い KC の純度を確認した。KC を種々の濃度のヒト・リコンビナント IL-2 (10^2 、 10^3 、 10^4 U/ml) とともに 0、6、24、48 時間まで経時的に培養した。なお、無添加で培養したものを対照 KC とした。各培養時点で単クローン抗体を用いた免疫組織化学染色 (Mar 3 : 抗マクロファージ、OX 6 : 抗 Ia、OX 42 : 抗 iC3b レセプター)、ラテックス粒子 (直径 0.81 および 2 μ m) 貪食能、Fc (γ) レセプター、および補体レセプター依存性貪食能を検討し、陽性率をそれぞれ算出した。APC 活性は、リンパ節細胞の非付着細胞分画 (2×10^5 個) に IL-2 とともに 24 時間培養した KC (2×10^4 個) を加え混合し、ConA (5 μ g/ml)、indomethacin (Indo) あるいは prostaglandin E₂ (PGE₂) [いずれも最終濃度 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-8} M] を加え 37°C、48 時間培養し、さらに ³H-thymidine (0.4 μ Ci/well) を加え 37°C、18 時間培養したのち、液体シンチレーションカウンターでその放射活性を測定することによって検討した。

得られた所見は次のとおりである。

- 1) IL-2 処置 KC における OX 6 陽性細胞数は、対照と比べ IL-2 用量依存性に増加し、IL-2 10^4 U/ml 添加後 48 時間で最も高値を示した。OX 42 陽性細胞数も用量依存性の増加を示し、IL-2 10^4 U/ml 添加 6 時間後に急激な増加を示した。
- 2) 非免疫貪食能に関しては、0.81 μ m と 2 μ m のいずれのラテックス粒子摂取の場合とも、IL-2 10^4 U/ml の添加で対照と比べて貪食細胞数の増加がみられた。
- 3) 免疫貪食能に関しては、Fc (γ) レセプターを介する貪食は対照と比べると貪食細胞数の増加は

みられるものの、高濃度 (10^4 U/ml) の添加でも最高20%程度で低値を示した。それに対し、補体系レセプターを介した貧食は、経時的に貧食細胞数の用量依存性増加を示し、(IL-2 10^4) U/ml 添加後48時間で50%程度となり、Fc (γ) レセプターを介した貧食よりもはるかに優勢であった。

4) Indo、あるいは、PGE₂ 非存在下における KC の APC 活性は、KC を IL-2 で処置することにより有意に増加した。Indo 存在下では、 10^{-6} M で IL-2 処理 KC の APC 活性は無処置 KC のものと同程度であったが、 10^{-7} 、 10^{-8} M と Indo の濃度が低下するにつれて APC 活性が回復し、有意差がみられた。PGE₂ 存在下では、 10^{-6} と 10^{-7} M で APC 活性の低下が、無処置 KC、および IL-2 処置 KC のいずれにおいてもみられた。しかし、 10^{-8} M では回復傾向にあり、無処置 KC との間に有意差がみられた。

KC を IL-2 とともに培養すると、Ia 抗原など各種の膜抗原表現型が変化し、さらに異物貧食能、および APC 活性が増強した。これらの所見から、この Ia 抗原を発現した活性化 KC は、外因性並びに内因性 IL-2 とともに肝類洞内でリンパ球に作用し、その肝実質への浸潤と活性化あるいは増殖を促すとともに、肝実質細胞に対しては遅延的刺激シグナルを送り、肝細胞変性を惹起することが考えられ、IL-2 によって Kupffer 細胞が長期間活性化されることが、長期間の IL-2 投与による肝障害誘発に深く関係する可能性が示唆された

論文審査の結果の要旨

T 細胞より分泌される interleukin-2 (IL-2) は組換え DNA 技術より作られ、癌に対する免疫療法の1つとして患者に、単独ないしは LAK 細胞の養子移入免疫療法との併用によって試行されてきた。この療法は IL-2 の長期投与を必要とし、そのために肝障害、好酸球増多症、血管の漏れ症候群 vascular leak syndrome などの副作用が報告された。そして肝障害がこの療法の dose limiting factor となっている。またラットでも同じ副作用が見られる。

申請者はラット肝での免疫応答の中心が Kupffer 細胞 (KC) であることに着目、近交系 WKAH/Hkm (RT1^A) 雄の KC が in vivo で IL-2 に高い感受性を示すことを確かめた。そこで、この KC を分離し、KC を培養する際に IL-2 を加え、各種の変化を検索し、肝障害の本質に迫ろうとした。

主要な研究方法、結果と特徴は次のとおりである。

KC は肝よりコラゲナーゼ灌流法、および低速遠沈法にて非実質細胞を集め、培養することによって付着細胞分画を得、KC 純度を内因性 peroxidase、非特異性 esterase 活性陽性頻度で確認して用いた。

1. KC を IL-2 と共に培養すると、MHC クラス II 抗原 (Ia) と補体第 3 成分のレセプター (iC3b レセプター) は、KC 膜上に表現されていなかったものが表現されるようになり、添加 IL-2 量と培養時間に依存して増加し、最適条件が存在した。マクロファージの特異的細胞膜抗原 Mar 3 と、IgG レセプターの Fc (γ) レセプターは、培養初期より陽性で、IL-2 添加の影響は受けなかった。

2. KC の貧食能をテラックス粒子を用いた非免疫貧食と、抗原・抗体複合体 (EA) および抗原・抗体・補体 (EAC) を用いた免疫貧食によって検討したところ、IL-2 (10^4 U/ml) の添加で、貧食細胞数の増加が見られた。

3. KC にリンパ球を加え混合培養をおこない、KC のリンパ球活性化作用を検討したところ、KC を IL-2 で処置するとリンパ球の活性化を有意に増強した。ところが、消炎薬であるインドメタシン、プロスタグランジン E₂ を加えると、リンパ球の活性化を有意に抑制することがわかった。

以上より、IL-2はKCを活性化し、さらに肝類洞内でリンパ球にも作用し得ることが予想できた。上記の結果より、IL-2の長期投与は肝実質細胞に対して遷延的刺激のシグナルを送り、肝細胞に変性（傷害）を惹起すると考えられた。

委員はこの論文審査の過程、および終了後に、次のように質疑・試問をおこなった。

1. γ IL-2の副作用として、甲状腺機能不全はおきないか
2. 抗IL-2抗体は長期投与の際、産出されてこないか
3. KCは墨汁を取り込むか
4. KCはIL-2レセプターを、膜表面にどの程度発現しているのか、抗IL-2 R抗体で染色可能か、KCの何%がIL-2陽性か
5. EAC作成の際、抗体としてIgMを用いたか
6. IL-2に対する抗体を実験系に入れたらどうなるか
7. IL-2を注射すると発熱するがその理由は
8. IL-2を注射すると肺水腫がおこるのはどうしてか
9. 血管肉腫へ局所注射すると効果があり、NK細胞が出現して増殖するが、その理由は
10. IL-2の肝障害で肝類洞内に浸潤してくる細胞は
11. 研究の目的をこれだけの実験では達成していないが、TNF α とかIL-1などの細胞傷害性サイトカインを検索したか

これらに対する申請者の応答は概ね適切であり、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 吉 田 孝 人

副査 教授 白 澤 春 之 副査 教授 瀧 川 雅 浩

副査 助教授 中 村 達 副査 講師 伊 藤 光 泰