



Title	Establishment of cytotoxic CD4+T cell clones from cancer patients treated by local immunotherapy
Author(s)	長岡, 浩人
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38637">https://hdl.handle.net/11094/38637</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 <sup>なが</sup>長 <sup>おか</sup>岡 <sup>ひろ</sup>浩 <sup>ひと</sup>人

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 8 2 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 5 月 11 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 Establishment of cytotoxic CD 4<sup>+</sup> T cell clones from cancer patients treated by local immunotherapy  
(局所免疫療法によって治療した癌患者からの  
細胞傷害性 CD 4 陽性 T 細胞クローンの樹立)

論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 森 武貞

(副査)  
教 授 濱岡 利之 教 授 平野 俊夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

免疫賦活剤 OK-432を fibrinogen と混合して固形腫瘍の間質に注入すると腫瘍局所に遅延型アレルギー反応が誘発され、所属リンパ節は活性化して強い抗腫瘍効果が得られる (Cancer, 69 : 1992, Jpn. J. Cancer Res.: 1992)。本研究は、この局所免疫反応に関与する T 細胞をクローニングし、本療法の抗腫瘍メカニズムを解析することを目的とした。

### 【方法と結果】

OK432 (5 KE) を 1 ml の aprotinin に溶解し、fibrinogen (80mg) と混合して進行大腸癌患者の原発巣に手術前に注入した。手術時に採取した所属リンパ節リンパ球の表面抗原を調べると、局注後 2 週間以内には CD 4<sup>+</sup> T 細胞の比率が高まっていることがわかった。そこで、この時期の領域リンパ節から T 細胞を分離し、IL-2 の存在下で OK432 による刺激培養 (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) を行なって、CD 4<sup>+</sup> T 細胞を選択的に増殖させた。その CD 4<sup>+</sup> T 細胞から限界希釈法を用いて樹立した T 細胞クローンの表面抗原を flow cytometry 法を用いて調べると、CD 3<sup>+</sup>, CD 4<sup>+</sup>, CD 8<sup>-</sup>, CD 56<sup>-</sup>, Leu 8<sup>-</sup>, WT31<sup>+</sup> (anti-T cell receptor  $\alpha\beta$ ) の細胞表面形質を有し、HLA-DR を高率に発現していることが分かった。また、この T 細胞クローンを OK-432 で刺激すると、濃度依存性に CD25 の発現が誘導された。

この T 細胞クローンの細胞傷害能を C-FDA 法によって測定したところ、K562, Duadi, および自己腫瘍細胞に対し、高い細胞傷害活性を有することが示された。また、T 細胞をマイクロウェーブ照射による迅速固定法と ABC 法を用いた免疫染色で接着因子の発現を調べたところ、標的細胞を傷害している T 細胞の表面には LFA-1 および ICAM-1 が強く発現していることが分かった。また、T 細胞の細胞傷害活性は、抗 LFA-1 および抗 ICAM-1 抗体で不完全ながら阻害され、そのメカニズムには LFA-1 および ICAM-1 による細胞接着が重要な役割をはたしていると推察された。

つぎに、樹立された T 細胞クローンのエフェクター因子を解析するために、各種のサイトカインに対する抗体を

用いて免疫染色を施行したところ、標的細胞に密着してこれを傷害している T 細胞の細胞質に TNF  $\beta$  の存在が確認された。さらに、この T 細胞は、抗 IL-3 および抗 IL-4 抗体により陽性に染色されたが、抗 IL-2、抗 GM-CSF および抗 TNF  $\alpha$  抗体では染色されなかった。これらのことから CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンの細胞傷害性のエフェクター因子の 1 つは TNF  $\beta$  であろうと考えられた。

#### 【総 括】

OK-432 と fibrinogen の混合投与による局所免疫療法で、その抗腫瘍メカニズムを担う免疫担当細胞の中には CD4<sup>+</sup>T 細胞が含まれることが示された。この CD4<sup>+</sup>T 細胞は、ヘルパー T 細胞の表面形質を有し、OK432 の刺激で活性化すると接着性が亢進して、非特異的な腫瘍細胞傷害活性を発揮する。そのエフェクター因子の 1 つは TNF  $\beta$  であろうと考えられた。このような T 細胞がクローニングできたことは、先に述べた非特異的な免疫賦活剤 OK-432 を用いた免疫療法が T 細胞の感作にきわめて有効であることを物語っている。この局所免疫療法は抗原認識機構に重要なマクロファージと CD4<sup>+</sup>T 細胞のポテンシャルを高め非特異的な細胞傷害性を示す抗腫瘍性 CD4<sup>+</sup>T 細胞を誘導し、リンパ球や他の免疫担当細胞の活性化を通して、抗腫瘍免疫を高めたと考えられる。さらにこの T 細胞クローンは局所免疫反応における CD4<sup>+</sup>T 細胞の役割を解析するだけでなく、細胞移入療法に利用できる点でも有用であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、免疫賦活剤 OK-432 と fibrinogen の混合液を用いた局所免疫療法を施行した大腸癌患者の領域リンパ節リンパ球から CD4 陽性 T 細胞をクローニングし、解析したものである。

今回樹立した T 細胞クローンは CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>の表面形質を有しており、IL-3、IL-4 を産生した。一方、細胞間接着分子（ICAM-1、LFA-1）による腫瘍細胞への接着性の亢進により非特異的な腫瘍細胞傷害活性を発揮し、そのエフェクター因子の一つは TNF  $\beta$  であった。

この T 細胞クローンは、局所免疫反応における CD4 陽性 T 細胞のはたす役割の解析のみならず、細胞移入療法への応用の可能性においても免疫療法の研究に資するところが大きく、学位に値するものとする。