



Title	Analysis of cytotoxic activity of the CD4+ T lymphocytes generated by local immunotherapy
Author(s)	勝本, 善弘
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40413">https://hdl.handle.net/11094/40413</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	かつ 勝 もと 本 よし 善 ひろ 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 1 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 5 月 9 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	Analysis of cytotoxic activity of the CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes generated by local immunotherapy (局所免疫療法により誘導された細胞傷害性 CD4 <sup>+</sup> T リンパ球の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門田 守人 (副査) 教 授 濱岡 利之 教 授 高井新一郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目的〕

免疫賦活剤 OK-432 を fibrinogen と混合 (OK/fbg) して腫瘍内投与することで、その抗腫瘍作用を著しく増強させることができる。

本研究は、OK/fbg による局所免疫療法を施行した甲状腺癌組織に浸潤するリンパ球 (TIL) から細胞傷害性 CD4<sup>+</sup>T 細胞を誘導し、その細胞表面抗原、分泌サイトカイン、細胞傷害活性の解析を行ない、細胞傷害活性に関与する接着分子などを解析してその抗腫瘍メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 〔方法〕

1. OK-432 5 KE を aprotinin 1 ml (1000KIE) で溶解した後、ヒト fibrinogen 80 mg と混合し、甲状腺癌患者の手術約一週間前に腫瘍内投与を行なった。手術的に切除された腫瘍より腫瘍浸潤リンパ球を分離し、IL-2 1000 U/ml 存在下に OK-432 0.05 KE/ml で刺激し killer T 細胞を誘導した。対照群として非局注群より同様の条件で killer T 細胞を誘導した。
2. 細胞表面抗原の解析を FACSscan にて、培養上清中のサイトカインの測定を ELISA にて行ない、各種腫瘍細胞株 (K562, DAUDI, 甲状腺乳頭腺癌細胞株; NPA, 及び甲状腺未分化癌細胞株; KOA-2, K119) に対する細胞傷害活性の解析を CFDA 法にて行なった。
3. 誘導された killer T 細胞をそれぞれ細胞表面抗原に対する中和抗体 (anti-TCR $\alpha\beta$ , anti-CD2, anti-LFA-1, anti-ICAM-1) にて前処理を行った後、細胞傷害活性及び細胞接合率を測定しその阻害率を見た。
4. 細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体 (anti-CD3, anti-LFA-1, anti-ICAM-1) を 96-well, 平底プレートに固相化し、killer T 細胞を 24 時間刺激培養して、その上清のサイトカインを ELISA にて測定した。

コントロールとして非特異的 IgG をおいた。

### 〔結果〕

1. OK/fbg 局注療法群の腫瘍浸潤リンパ球では非局注群に比して HLA-DR, CD25, ICAM-1 の発現率が有意に高

く、K562, DAUDI に対する細胞傷害活性も高かった。

2. この腫瘍浸潤リンパ球を IL-2, OK-432 存在下に約 4 週間培養すると、表面抗原が CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, Leu8<sup>-</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> で HLA-DR, CD25, LFA-1, ICAM-1 の発現率の高い T 細胞が誘導され、K562, DAUDI, NPA, KOA-2, K119 に対して panbroad な細胞傷害活性を示した。

この CD4<sup>+</sup> killer T 細胞は、IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6 を分泌したが、IL-4 は分泌しなかった。

3. 中和抗体を用いての細胞傷害活性阻害実験で CD4<sup>+</sup> killer T 細胞は anti-TCR $\alpha\beta$ , anti-CD2 抗体によっては阻害を受けず、anti-LFA-1, anti-ICAM-1 抗体により阻害を受けた。特に DAUDI に対する細胞傷害活性は anti-ICAM-1 抗体でのみ阻害を受けたが、anti-ICAM-1 抗体は細胞接合率を阻害しなかった。
4. CD4<sup>+</sup> killer T 細胞の IFN- $\gamma$  分泌は anti-CD3 固相化抗体のみならず anti-ICAM-1 固相化抗体による刺激により増強された。

[総括]

1. OK/fbg の局注療法により甲状腺癌組織に浸潤するリンパ球は活性化され、高い NK 活性及び LAK 活性を示した。
2. この腫瘍浸潤リンパ球より高率に細胞傷害性 CD4<sup>+</sup> T リンパ球を誘導することができた。
3. 誘導された CD4<sup>+</sup> T 細胞は Th1 の helper/killer T cell で、種々の腫瘍細胞株に対して細胞傷害活性を示した。
4. この CD4<sup>+</sup> killer T 細胞において ICAM-1 は細胞傷害活性に関与する重要な分子であり、細胞間接合のみならず signal transduction に関わる分子であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

OK-432 を fibrinogen と混合して腫瘍内に投与することにより、その抗腫瘍効果が著明に増強する事を報告してきた。

本研究は、甲状腺癌患者の腫瘍内に OK-432/fibrinogen を投与し、その局所における浸潤リンパ球の characterization とその抗腫瘍効果のメカニズムの解析を行ったものである。

OK-432/fibrinogen 局注療法は腫瘍組織に強い炎症細胞の浸潤を惹起し、腫瘍浸潤リンパ球は活性化を受け、その細胞傷害性が増強した。このリンパ球を IL-2 存在下に OK-432 で、刺激培養することにより、CD4<sup>+</sup> T 細胞が選択的に誘導されてきた。この誘導された CD4<sup>+</sup> T 細胞は Th1 型のサイトカイン分泌能を有し、MHC 非拘束性に種々の腫瘍細胞株に対して細胞傷害活性を持つリンパ球であった。また、この T 細胞の細胞傷害性において接着分子である ICAM-1 は IFN- $\gamma$  の分泌を up regulation する分子であると考えられた。

抗腫瘍免疫において、CD4<sup>+</sup> T リンパ球の役割はいまだ不明な点も残されている。本研究は細胞傷害性 CD4<sup>+</sup> T リンパ球の標的細胞傷害機構において重要な示唆を与えており、学位に値するものと考えられる。