The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://hdl.handle.net/11094/40413
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 5 】

氏　　名	勝本善弘（かつもと よしひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12613　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+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+ 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 髙井新一郎

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+ 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fibrinogen80 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FACScan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$CD3^+$，$CD4^+/CD8^-$，$Leu8^-$，$TCR\alpha\beta^+$，$CD45RO^+$ 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+ killer T細胞は，IFN-γ，TNF-α，TNF-β，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+ 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+ killer T細胞のIFN-γ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+ Tリンパ球を誘導することができた。

3．誘導されたCD4+ 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+ 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+ T細胞が選択的に誘導されてきた。この誘導されたCD4+ 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-γ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+ 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+ 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。