



Title	IL-12による腫瘍局所へのT細胞浸潤の増強
Author(s)	梅原, 一成
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40814
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

氏 名 うめ 梅 はら 原 かず 一 なり 成

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 1 3 7 8 3 号

学 位 授 与 年 月 日 平成10年3月25日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

歯学研究科歯学臨床専攻

学 位 論 文 名 IL-12による腫瘍局所へのT細胞浸潤の増強

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 作 田 正義

(副査)
教 授 浜 田 茂幸 講 師 村 上 伸也 講 師 岩 本 資己

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

IL-12は感染抵抗性の増強、免疫不全症の改善のみならず、強力な抗腫瘍効果を有することが明らかになっている。この抗腫瘍効果については、IL-12が担癌状態で抑制された抗腫瘍T細胞の機能を改善すること、担癌マウスT細胞の腫瘍局所への浸潤能を増強することが報告されており、また、このT細胞の腫瘍内への浸潤にはVLA-4/VCAM-1及びLFA-1/ICAM-1といったリンパ球/血管内皮細胞表面に発現している接着分子の相互作用を介していることが報告されている。しかし、IL-12によるT細胞の腫瘍内浸潤の増強が生じる過程で、T細胞上の接着分子がどのように変化しているかは、詳細な検討は行われていない。本研究では、IL-12投与前後の種々の担癌マウス（2種類のIL-12奏効腫瘍モデルと2種類のIL-12非奏効腫瘍モデル）における、末梢リンパ組織及び腫瘍組織内に浸潤しているT細胞の接着分子の発現の違いについて検討を行った。

【方法】

(1)担癌マウスの作成及びリンパ組織細胞浮遊液の調製

CSA1M, OV-HM, Meth A, MCH-1-A1腫瘍細胞を同系マウス皮下に移植し担癌マウスを作成した。担癌3-4週よりrIL-12 0.5 μ gを3回腹腔内投与した後、マウスより脾臓を摘出した。これらの組織から得た細胞浮遊液から、Tris-HClを用いて赤血球の除去を行った細胞浮遊液を実験に使用した。

(2)腫瘍塊に含まれる細胞浮遊液の調製

上記の担癌マウスより腫瘍塊を切除し、鉗、メスを用いて1mm角程度に細切した後、collagenase 200Unit/mlを含む20% FCS添加RPMI1640培地中で4時間酵素処理を行った。ナイロンメッシュにて濾過後、腫瘍塊に含まれる細胞の浮遊液を作成した。濾過細胞浮遊液からdebris及び死細胞を除去するために、20% Ficoll-PBSの上に細胞浮遊液を重ねし、2000rpmで20分間遠心した。遠心後、Ficollと細胞浮遊液との間の層から、腫瘍細胞、リンパ系細胞等を含む生細胞を回収（debris、死細胞は20% Ficoll-PBSの層よりも下に沈殿する）し、これを腫瘍塊の生細胞浮遊液とした。

(3)フローサイトメーターを用いたT細胞表面抗原の解析

蛍光標識されたモノクローナル抗体を用いて脾臓及び腫瘍塊の細胞を標識した後、フローサイトメーターを用いて細胞浮遊液中に含まれるT細胞表面の接着分子及び活性化マーカーの発現を解析した。

(4) VLA - 4, LFA - 1 とリガンドとの相互作用を阻害したときの T 細胞浸潤の解析

IL - 12 奏効腫瘍系の担癌マウス脾臓 T 細胞の腫瘍内浸潤能を比較するために in vivo lymphoid cell migration assay を用いて検討を行った。ドナーとなるマウスの脾細胞を蛍光色素 PKH - 26GL にてラベルした。レシピエントとなる無治療担癌マウスに尾静脈から蛍光標識細胞を移入した。一定時間後に腫瘍塊を切除し、凍結切片を作成後、腫瘍塊内に浸潤した標識細胞数を蛍光顕微鏡下にてカウントした。蛍光標識細胞移入 12 時間前に、レシピエントとなる無治療担癌マウスに抗 VCAM - 1 抗体、抗 ICAM - 1 抗体の混合物を投与する群とコントロール抗体を投与する群を作成し比較を行った。

(5) VLA - 4, LFA - 1 とリガンドとの相互作用の阻害した時の腫瘍拒絶の解析

CSA 1 M 担癌マウスに対し IL - 12 を $0.25 \mu\text{g}/\text{回}$ 、隔日 4 回腹腔内投与した。IL - 12 投与前日より、抗 VCAM - 1 抗体と抗 ICAM - 1 抗体の混合（各 $1 \text{mg}/\text{回}$ ）または正常ラット IgG 抗体（各 $2 \text{mg}/\text{回}$ ）を 2 週間で 4 回投与した。

【結果】

(1) IL - 12 により拒絶が生じる腫瘍系、(CSA 1 M, OV - HM) の担癌マウスの脾臓 T 細胞は IL - 12 治療を行う前から一部が、LFA - 1, VLA - 4 発現を増強させており、IL - 12 治療を行うことによって、それらの細胞の割合は、特に CD 8 陽性 T 細胞分画において若干の増加を認めた。しかし IL - 12 が奏効しない腫瘍系 (MethA, MCH - 1 - A 1) の担癌マウスの脾臓 T 細胞においては、IL - 12 治療の有無に関わらず、前述の接着分子の発現の増強は認められなかった。(2) LFA - 1, VLA - 4 発現を増強させていた担癌マウスの脾臓 T 細胞の大部分に、リンパ球活性化マーカー (CD25, CD69) の発現が認められた。(3) 脾臓 T 細胞において接着分子の発現増強を認める IL - 12 奏効腫瘍系では、腫瘍細胞、リンパ系細胞などを含む腫瘍塊細胞 5×10^5 個あたりに含まれる CD 4, CD 8 T 細胞数は IL - 12 治療により著しく増加した。しかし、IL - 12 非奏効腫瘍系では、IL - 12 治療を行っても腫瘍内浸潤 T 細胞はほとんど認められなかった。(4) これら腫瘍塊浸潤 T 細胞と脾臓 T 細胞上の VLA - 4 / LFA - 1 の発現を比較すると、腫瘍塊に浸潤しているほぼ全ての T 細胞は、脾臓 T 細胞と比して接着分子の発現を著しく増強していた。更にそれらはリンパ球活性化マーカーである CD25 と CD69 が強陽性であった。(5) 蛍光標識細胞移入 12 時間前にレシピエントに対して抗 VCAM - 1 抗体、抗 ICAM - 1 抗体の混合物を投与すると、コントロール抗体を投与した群で認められる移入細胞の腫瘍内浸潤の増強は抑制された。(6) IL - 12 投与を行った CSA 1 M に対して抗 VCAM - 1 抗体、抗 ICAM - 1 抗体の混合物を投与すると、腫瘍の完全退縮は抑制された。

【考察】

これらの結果より、IL - 12 投与による腫瘍局所への T 細胞浸潤の増強には、IL - 12 投与を行う前から脾臓 T 細胞に VLA - 4^{int} LFA - 1^{int} 活性化 T 細胞の細胞分画が誘導される必要があることが示された。また、IL - 12 による腫瘍局所への T 細胞浸潤を増強するいくつかの機構に、IL - 12 が VLA - 4^{int} LFA - 1^{int} の細胞を増加させる機構が含まれていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、種々の担癌マウスを用いて脾臓および腫瘍組織内に浸潤している T 細胞の接着分子の発現に影響する Interleukin - 12 (IL - 12) の作用について検討したものである。その結果、IL - 12 投与による腫瘍局所への T 細胞浸潤の増強には、IL - 12 投与を行う前から脾臓 T 細胞に、VLA - 4, LFA - 1 の発現を中等度に増強させた活性化 T 細胞 (VLA - 4^{int} LFA - 1^{int} T 細胞) の細胞分画が誘導される必要があることが明らかになった。また、IL - 12 による腫瘍局所への T 細胞浸潤を増強させる機構の一つに、IL - 12 が VLA - 4^{int} LFA - 1^{int} T 細胞を増加させる機構が含まれることが示唆された。

以上のことは、腫瘍免疫機構の解明、さらには癌治療への免疫療法導入に重要な知見を与えるものであり、博士 (歯学) の学位請求に値するものと認める。