



Title	The development of peritumoral stroma required for IL-12 induced tumor regression depends on the T cell/IFN- $\gamma$ -involving host-tumor interaction
Author(s)	植草, 康浩
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42478">https://hdl.handle.net/11094/42478</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">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	植草 康浩
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 16137 号
学位授与年月日	平成13年3月23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系専攻
学位論文名	The development of peritumoral stroma required for IL-12 induced tumor regression depends on the Tcell/IFN- $\gamma$ -involving host-tumor interaction (IL-12の腫瘍拒絶に関する腫瘍周辺部ストローマのT細胞/インターフェロン $\gamma$ を介した腫瘍-宿主関係による形成)
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明
	(副査) 教授 天野 敦雄 助教授 西村 理行 講師 大倉 正也

## 論文内容の要旨

腫瘍の間質(ストローマ)は、宿主の正常組織と腫瘍細胞の間に形成される結合組織で、さまざまな細胞間基質蛋白や線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージなどから構成されている。また、腫瘍ストローマは、その形成される部位によって腫瘍周辺部ストローマと腫瘍実質部ストローマに分類されている。IL-12(インターロイキン12)は、生体内において炎症などの刺激を受けてマクロファージ、単球、リンパ球、線維芽細胞から分泌されるサイトカインであり、IL-12に対するレセプターを発現するT細胞やナチュラルキラー(NK)細胞、NKT細胞を活性化する。IL-12は腫瘍免疫にも関与しており、IL-12を投与するとその強力な抗腫瘍作用で、各種腫瘍の退縮をみるとが明らかにされている。しかしながら、このIL-12の効果も腫瘍細胞によって異なっており、近交系マウスに形成した各種腫瘍に対するIL-12の効果を検討した結果、腫瘍周辺にストローマを形成する腫瘍系でのみIL-12は抗腫瘍効果を発揮することが明らかになった。したがって、腫瘍周辺部ストローマの形成がIL-12の抗腫瘍効果と関連するものと考えられる。しかしながら、腫瘍周辺部ストローマの形成機構、IL-12にて活性化される免疫細胞がどのようにして抗腫瘍効果を発揮するかについては、明らかにされていない。本研究では、IL-12奏効性である腫瘍系を用いて、1)腫瘍周辺部ストローマ形成に関与するT細胞の同定、2)腫瘍周辺ストローマ形成におけるT細胞除去の影響、3)IL-12にて活性化されたT細胞の腫瘍内浸潤能、4)腫瘍周辺部ストローマにおけるインターフェロン $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )の役割について検討を行った。

## [材料と方法]

腫瘍細胞として、IL-12奏効性のBALB/c由来CSA 1M線維肉腫細胞、B6C3F1由来OV-HM卵巣癌細胞を用いた。腫瘍細胞をそれぞれ同系マウス背部皮下に接種し、担癌マウスとして用いた。生体内からCD4、CD8、NK1.1陽性細胞を除去するため、それぞれの抗原に対するモノクローナル抗体を調製し、あらかじめ腹腔内投与した。抗体投与後に採取した血球の抗表面マーカーを蛍光染色後、フローサイトメーターによる検索を行い、血中に陽性細胞が存在しないことを確認した。リコンビナントIL-12(0.5 $\mu$ g/mouse/回)は連日5回、担癌マウスに腹腔内投与を行った。mRNA発現の程度はRNase protection assay法により検討した。Lymphoid cell migration assayでは、まず、担癌マウスにIL-12を連日5日間投与し、脾細胞を回収し、in vitroにてPKH-26蛍光色素でラベルした。この標識脾細胞を同系担癌マウスをレシピエントとし、尾静脈より移入した。24時間後に腫瘍塊を採取し、凍結切片作成後、蛍光顕微鏡下にて蛍光陽性細胞数をカウントした。検定はt検定にて行った。

## [結果及び考察]

- (1) IL-12奏効系 CSA 1 M 及び OV-HM 腫瘍細胞を同系のマウスに移植して形成された腫瘍の周辺には、腫瘍周辺部ストローマが形成されたが、T細胞を欠失したヌードマウスで形成された CSA 1 M 及び OV-HM 腫瘍では、腫瘍周辺部ストローマは形成されなかった。
- (2) CSA 1 M 及び OV-HM 腫瘍において、CD 4 / CD 8 陽性 T 細胞は、周辺部ストローマに浸潤しており、腫瘍実質部ストローマではほとんどみられなかった。
- (3) CD 4 ならびに CD 8 陽性 T 細胞の腫瘍周辺ストローマ形成における役割を明らかにするため、あらかじめ抗 CD 4 / CD 8 抗体を単独、或いは両方投与して T 細胞を除去したマウスに腫瘍細胞を接種したところ、腫瘍周辺部ストローマの形成は抑制された。抗 NK1.1+ 抗体投与は腫瘍周辺部ストローマには影響を及ぼさなかった。
- (4) 抗 CD 4 抗体および抗 CD 8 抗体を投与したマウス、あるいはヌードマウスに腫瘍を形成させたところ、これら腫瘍周辺部ストローマを欠いた腫瘍は、正常な免疫能を有するマウスと比較して、急速に増殖した。
- (5) IL-12にて活性化された担癌マウスの脾臓細胞を蛍光標識したのち、担癌レシピエントマウスに移入した場合、腫瘍周辺ストローマを介して腫瘍塊へ多數浸潤することができたが、CD 4 と CD 8 を抗体にて除去したマウスやヌードマウスに移植した腫瘍へは、浸潤できなかった。
- (6) T 細胞が産生するサイトカイン IFN- $\gamma$  の腫瘍周辺ストローマ形成への関与をしるため、IFN- $\gamma$  に対する抗体を投与したマウスと IFN- $\gamma$  ノックアウトマウスで腫瘍を形成させたが、腫瘍周辺部ストローマは形成されなかった。
- (7) T 細胞が浸潤している腫瘍塊においては IFN- $\gamma$  mRNA の発現が見られたが、CD 4 抗体および抗 CD 8 抗体投与にて T 細胞をあらかじめ除去しておいたマウスの腫瘍では、IFN- $\gamma$  mRNA は検出されなかった。
- (8) IL-12にて活性化した蛍光標識脾臓細胞は、抗体投与で IFN- $\gamma$  を除去したレシピエントマウスや IFN- $\gamma$  ノックアウトマウスの腫瘍へは、浸潤できなかった。

以上より、腫瘍実質部内ストローマと腫瘍周辺部ストローマとはその性質が異なること、CD 4 / CD 8 陽性 T 細胞及びそれらが腫瘍局所で産生する IFN- $\gamma$  が腫瘍周辺部ストローマの形成と IL-12にて活性化されたリンパ球浸潤において重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、サイトカインであるインターロイキン12 (IL-12) の持つ強い抗腫瘍効果について、その原因を腫瘍周辺部間質（ストローマ）の形成の有無と、そこに浸潤するリンパ球に求め、その形成機構についてどのような細胞成分、サイトカインが関わっているかについて検討したものである。

その結果、腫瘍周辺部ストローマの形成には、宿主側の T 細胞とそれらの産生するインターフェロンガンマが必須な役割を果たしており、腫瘍と宿主の相互作用に基づくものであることが明らかとなった。IL-12の抗腫瘍作用はこの周辺部ストローマの形成を介して発揮される可能性が示された。したがって、腫瘍周辺部ストローマの有無は IL-12が奏効を示すか否かの指標といえる。

現在、IL-12の抗がん剤としての臨床応用が開始されている。本研究結果は、ヒトのがんにおける IL-12による治療が奏効する腫瘍を選別するために、重要な知見を示したものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものであることを認める。