

氏 名 (本 籍) 伊 藤 史 人 (京都府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 5 7 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Antitumor Reactivity of Anti-CD3/Anti-CD28 Bead Activated Lymphoid Cells: Implications for Cell Therapy in a Murine Model

(抗CD3 抗CD28 磁気抗体を用いた活性化リンパ球の抗腫瘍活性についての研究: マウスモデルでの細胞療法との関連)

審 査 委 員 主 査 教 授 藤 山 佳 秀

副 査 教 授 小 笠 原 一 誠

副 査 教 授 岡 部 英 俊

## 論文内容要旨

*整理番号	459	(ふりがな) 氏名	いとうふみと 伊藤 史人
学位論文題目	Antitumor Reactivity of Anti-CD3/Anti-CD28 Bead-Activated Lymphoid Cells = Implications for Cell Therapy in a Murine Model (抗CD3抗CD28抗体を用いた活性化リンパ種の抗腫瘍活性についての研究: マウスモデルでの細胞療法の関与)		
<p><b>研究の目的</b></p> <p>T細胞において抗原、T細胞受容体であるCD3分子及び共刺激分子であるCD28分子を介する刺激により、T細胞は活性化され抗原特異的免疫反応が誘導される。我々は、マウスに腫瘍を皮下注射した後、第9,10日目に所属リンパ節(TDLN: Tumor Draining Lymph Node)を採取し、in vitroにおいて、固層化抗CD3抗CD28抗体を用いて刺激し、担癌マウスに養子免疫することにより抗腫瘍効果が得られることを報告した。今回我々は遊離型抗CD3抗CD28磁気抗体を用いて固層化抗CD3抗CD28抗体とin vivoにおける抗腫瘍効果を比較するとともに、in vitroでのサイトカイン産生およびIL-2によるサイトカイン療法との相乗効果について研究を行った。</p> <p><b>方法</b></p> <p>腫瘍としてマウス線維芽細胞腫細胞であるMCA205およびMCA207を用いた。MCA205またはMCA207を<math>1 \times 10^6</math>個、腰背部に皮下注射し、第9,10日目に所属リンパ節を採取した。実験により、同マウスから採取した脾臓、免疫されていないリンパ節、脾臓などを用いてリンパ球採取部位についても比較検討を行った。採取したリンパ組織を処理した後、固層化抗CD3抗CD28抗体もしくは遊離型抗CD3抗CD28磁気抗体を用いて刺激した。遊離型抗CD3抗CD28磁気抗体はXcite Therapiesより提供されたものを用いた。リンパ節および脾臓の細胞は抗体による2日間の刺激の後、洗浄、遠心分離した後、細胞をIL-2を含む培地にて3日間培養し、その後の実験に用いた。in vivoの実験として治療開始3日前に腫瘍(MCA205もしくはMCA207)をマウス尾静脈より静注し、肺転移モデルを作成した。肺は14日目から16日目に採取し、転移個数を二重盲検法にて数えた。実験により、IL-2を治療開始日から4日間、計8回腹腔内注射した。実験により、CD4陽性細胞分離の際、MACS磁気システムを用いた。</p> <p><b>結果</b></p> <p>遊離型抗CD3抗CD28磁気抗体による活性化TDLN細胞のサイトカイン(IFN-<math>\gamma</math>, GM-CSF, IL-2, IL-10)産生、および肺転移モデルを用いた抗腫瘍効果を固層化抗CD3抗CD28抗体と比較検討した。前者により活性化されたTDLN細胞は後者により活性化されたTDLN細胞に比し、有意に腫瘍特異的にIFN-<math>\gamma</math>, GM-CSF, IL-2, IL-10などのサイトカイン産生量が増加していた(Fig.1)。肺転移モデルにおいて、前者により活性化されたTDLN細胞は後者により活性化されたTDLN細胞に比し有意に転移を抑制し、その効果は投与された細胞数に依存した(Fig.2)。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

活性化後の細胞表面マーカーについては、遊離型抗 CD3 抗 CD28 磁気抗体により活性化された TDLN 細胞は固層化抗 CD3 抗 CD28 抗体により活性化された TDLN 細胞よりも有意に CD4 陽性細胞が増加していた(Fig.3)。次にこの抗腫瘍効果の差異についても機能を解明するため、それぞれの方法により活性化された後の CD4 陽性細胞の抗腫瘍効果について比較検討を行った。各々の方法にて活性化された CD4 陽性 TDLN 細胞は肺転移を同程度抑制し、両者に有意差を認めなかった(Fig.4)。しかしながらサイトカイン産生量を調べたところ、遊離型抗 CD3 抗 CD28 磁気抗体により活性化された TDLN 細胞は固層化抗 CD3 抗 CD28 抗体により活性化された TDLN 細胞よりも有意に IL-2 を腫瘍特異的に産生していた(Fig.5)。

次にリンパ球採取部位についての検討を行った。Fig.6A,B に示すように、担癌マウスより第 9 もしくは 10 日目に採取した所属リンパ節、脾臓はそれぞれ非担癌マウスの同部位から採取したリンパ節、脾臓と比べ、抗体による活性化後、*in vitro* での放射線照射された腫瘍細胞との共培養において有意に IFN- $\gamma$  を産生した。また Fig.7A, B に示すように肺転移モデルにおいても抗腫瘍効果に有意差を認めた。また、同じ担癌マウスから TDLN、脾臓を採取し、抗体を用いて活性化した後、肺転移モデルにて抗腫瘍効果を比較検討したところ、活性化 TDLN 細胞は有意に活性化脾細胞よりも肺転移を抑制した(Fig.8)。以上から TDLN 細胞が遊離型抗 CD3 抗 CD28 磁気抗体を用いて活性化するリンパ球として最も優れていると考えられた。

最後に活性化 TDLN 細胞と IL-2 との相乗効果について検討した。Fig.9 に示すように比較的多量の活性化 TDLN を用いた場合、IL-2 がなくとも腫瘍を抑制するのに対し、少量の TDLN の場合は IL-2 による相乗効果が投与量に依存して認められた。2,500 IU/ml において TDLN 単独と比較し有意差が認められた。

#### 考察

我々は TDLN を用いて *in vitro* でも効果的な活性化方法について比較検討し報告してきた。その結果、1)固層化抗 CD3 抗体よりも固層化抗 CD3 抗 CD28 抗体を用いた方が抗腫瘍効果が認められること、2)固層化抗 CD3 抗 CD28 抗体により活性化された後の TDLN 細胞には CD4 陽性細胞が多く含まれること、3)CD4 陽性 TDLN 細胞は CD8 陽性 TDLN 細胞よりも抗腫瘍効果を有することも以前報告した。今回、遊離型抗 CD3 抗 CD28 磁気抗体を用いて活性化することによりさらに CD4 陽性細胞の割合が増加し、より高い抗腫瘍効果が得られた。CD4 陽性細胞は養子免疫療法において非常に重要であることが示唆された。

#### 結論

今回我々は開発した遊離型抗 CD3 抗 CD28 磁気結合抗体を用いて固相化抗 CD3 抗 CD28 抗体と抗腫瘍効果を比較し、前者により活性化された TDLN は後者により活性化された TDLN よりも抗腫瘍効果を有し、腫瘍特異的にサイトカインを産生した。抗腫瘍効果は量的な CD4 陽性細胞数の相違および IL-2 産生能の相違(質的)によるものと考えられた。腫瘍所属リンパ節から採取し、活性化したリンパ球はそうでないリンパ節から得られたリンパ球や脾臓と比較して抗腫瘍効果を持つと考えられた。比較的少量の IL-2 により相乗効果が得られることが判明した。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	459	氏名	伊藤 史人
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>癌免疫療法は癌治療戦略の一つとして期待されているが、これまでのところその効果は限定され、治療効果を規定する分子細胞機構の解明による治療成績の向上が待望される。本研究は、マウスに線維芽細胞腫株 MCA207 あるいは MCA205 を移植して感作した所属リンパ節の Tリンパ球を、独自に考案した Bead 固相化 anti-CD3/anti-CD28 を用いて活性化することにより、in vitro および in vivo で<sup>癌</sup>腫瘍効果が増強されることを見出したものである。また、その機序には腫瘍特異的な IFN-<math>\gamma</math> や IL-2 等のサイトカイン産生とともに、CD4<sup>+</sup> T cell の割合の増加が関与していることを明らかにした。さらに、MHC Class II を発現していない腫瘍に対しても、CD4<sup>+</sup> T cell が IL-2 産生を介して CD8<sup>+</sup> effector T cell を誘導することにより、間接的に<sup>癌</sup>腫瘍効果を増強していることを示唆した。</p> <p>このように、本研究は癌に対する養子免疫療法の新たな手法を開発したものであり、博士 (医学) の学位論文に値する。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 16 年 2 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 16 年 2 月 20 日)			