

氏 名 (本籍)	玉 川 紀 之 (愛知県)
学 位 の 種 類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 560 号
学位授与日付	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Interleukin-2 activated microglia engulf tumor infiltrating T cells in the central nervous system
審 査 委 員	(主査) 教授 坂 井 昇 (副査) 教授 近 藤 直 実 教授 高 見 剛

### 論文内容の要旨

腫瘍免疫において、サイトカインを用いた中枢神経系での腫瘍内浸潤Tリンパ球 (TIL) の活性化は広く行われ、解析も進んでいる。しかし、サイトカイン療法の多くは、in vitroでは高度な反応を促せるが、in vivoでは期待されるほど活性化を促せないという報告が多い。その理由として、腫瘍内浸潤Tリンパ球のanergyによる無応答性、活性化誘導細胞死 (activation induced T cell death: AICD) が主に提唱されている。一方、腫瘍環境下でのTリンパ球と他の免疫担当細胞の相互連関に関する報告は少なく、ことに中枢神経系における細胞相互連関を記載した報告は非常に少ない。そこで、申請者はTリンパ球の活性化作用の明らかなInterleukin-2 (IL-2) の遺伝子導入細胞を作製し、頭蓋内接種モデルを用いてIL-2導入の効果判定とTILの解析を行った。

#### 方法

- 1) マウスよりIL-2のmRNAを単離し、RT-PCR法にてIL-2 cDNAを増幅後最終的にpcDNA3.1 vectorに組み入れ大腸菌へ形質導入した。次に、マウス大腸癌細胞株MCA38にリポフェクション法で遺伝子導入し、限界希釈法にてIL-2遺伝子導入株MCA/IL-2を得た。対照として空のベクターを導入したMCA/mockを作製し実験に用いた。
- 2) MCA/mock(対照群)、MCA/IL-2(IL-2治療群)をC57BL/6(B6)マウスの頭蓋内へ定量的に接種し、マウス脳内に腫瘍を作製した。腫瘍接種後12日に頭蓋内より腫瘍を摘出、重量を測定し、また腫瘍よりTILを単離し、その数を測定した。
- 3) 単離したTILに対して、flowcytometryにて膜表面の活性化抗原であるCD25、CD69の発現を解析した。
- 4) real time RT-PCR法にてCD4陽性TILはIL-4とIFN  $\gamma$ 、CD8陽性TILはIFN  $\gamma$ とTNF  $\alpha$ を半定量的に解析した。
- 5) 各群のTILのアポトーシスをAnnexin Vの陽性率として flowcytometryを用いて解析した。
- 6) 腫瘍よりF4/80陽性細胞を単離後、total RNAを単離精製して、Titan<sup>®</sup> one step RT-PCR法にてF4/80陽性細胞内のCD8b mRNAの存在の有無を解析した。
- 7) 頭蓋内腫瘍MCA/IL-2の組織切片を用い、FITC標識CD8bとPE標識F4/80の蛍光2重染色を行うことによりCD8陽性TILとF4/80陽性細胞の局在と分布を検討した。

## 結果

- ① 腫瘍接種12日後の腫瘍重量はIL-2治療群が対照群に比べ明らかに小さく、また腫瘍重量あたりのTIL数も明らかにIL-2治療群において増加していた。
- ② 組織切片を用いたCD8bとF4/80の2重染色において腫瘍組織内では非常に多数のCD11b陽性細胞が存在し、CD8b陽性細胞とF4/80陽性細胞は多数接触していた。
- ③ 各群のTILのCD25、CD69の陽性細胞率はCD4陽性TILでは差はなく、CD8陽性TILではむしろIL-2治療群で低下した。また、real time RT-PCR法を用いたTILのサイトカインの発現量の解析でもCD4陽性TILのサイトカイン発現量に差はなく、IL-2治療群のCD8陽性TILでは対照群よりサイトカイン発現量が低下した。
- ④ 各群のTILのアポトーシスは、CD4陽性TILでは差はなかったが、IL-2治療群のCD8陽性TILでは対照群と比較し明らかに陽性率が上昇した。
- ⑤ 各群からの腫瘍内浸潤F4/80陽性細胞内にCD8b mRNAが確認でき、IL-2治療群にて対照群からの腫瘍内浸潤F4/80陽性細胞より多くのCD8b mRNAが存在する傾向があった。

## 考察

これまで多くのIL-2腫瘍免疫療法の解析により、IL-2による治療の有効性が明らかになっているが、いずれにおいても生体内での腫瘍の完全な拒絶に至らない例が多く、本研究においても同様の結果となった。本研究で、IL-2療法によってTIL数は増加するものの、その活性化はむしろ抑制されていることが示された。また近年IL-2はT細胞の活性化のみならずアポトーシスを誘導することも知られており、本研究では生体内のCD8陽性TILのアポトーシスがIL-2により強く誘導された。また、腫瘍組織内では非常に多数のF4/80陽性細胞が存在し、IL-2治療下でマクロファージ・マイクログリア系細胞では発現していないCD8bmRNAがF4/80陽性細胞内に認められることとあわせて考えると、IL-2治療により多数のリンパ球が腫瘍内に誘導される反面、IL-2がAICDによるT細胞の細胞死を誘導し、腫瘍内の活性化マクロファージ・グリア系細胞によって速やかに除去される可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 玉川 紀之は、IL-2を使った中枢神経系での腫瘍免疫をTILの活性の点から解析し、腫瘍内では、IL-2がT細胞の浸潤数を増加させる反面、アポトーシスも同時に誘導し、さらにはT細胞のみならずマクロファージ・マイクログリアを強く浸潤増殖させ、アポトーシスに陥ったT細胞を速やかに貪食することを明らかにした。本研究の成果は、中枢神経系での腫瘍免疫治療に新しい知見をもたらし、脳神経外科学、神経腫瘍学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Interleukin-2 activated microglia engulf tumor infiltrating T cells in the central nervous system  
International Journal of Molecular Medicine : 2004 (in press)