

学 位 論 文 題 名

悪性神経膠腫内浸潤リンパ球の in vitro における Interleukin-2 存在下での  
培養増殖およびその表面マーカーと抗腫瘍活性の解析

学位論文内容の要旨

I 研究目的

IL-2 により活性化されたリンパ球いわゆる LAK cell は、IL-2 と共に悪性脳腫瘍患者に投与される方法で臨床治療が続けられてきたが、この成績は当初期待された程のものではない。この LAK cell に替わるより効果的な移入細胞として、腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）が一部の研究者の新たな期待を集めている。この研究は大脳に発生した malignant astrocytoma から TIL を分離し大量培養増殖を計ることにより、臨床応用の可能性を探ることを目的とした。

II 実験方法

malignant astrocytoma 30例の腫瘍片を細切し、さらに単細胞に分離するため酵素処理を行った。この細胞浮遊液を培養し、付着した glioma 細胞などを除去した。次いで、浮遊細胞を比重分離法にて処理してリンパ球に富む分画を得た。TIL の培養には、10% AB 型血清と recombinant IL-2 (50~2,000 Jurkat units/ml) を加えた基礎培地を用いた。一部の症例では、培養開始後の48時間、OKT 3 単クローン抗体を作用させたのち通常の培養を行った。TIL の細胞表面抗原の解析は、フローサイトメトリーを用いて行った。初代 glioma 細胞あるいは継代確立された細胞株を用いて、三次元腫瘍モデル glioma spheroid を作製した。培養期間は比較的長期として、単なる脆弱な cell aggregate ではなく表面が平滑でかつコンパクトな球体になった spheroid のみを顕微鏡下にて選択した実験に用いた。effector 細胞の腫瘍細胞障害活性は Cr-51遊離試験にて解析した。spheroid を標的にした Cr-51遊離試験では、E : T ratio を 5 : 1 にとり反応時間は48時間までとした。effector リンパ球の spheroid 内部への浸潤能をみるために、spheroid を LAK 細胞あるいは TIL とともに培養した後の継時的に凍結し、切片を作製して免疫組織化学染色を行った。

### Ⅲ 結 果

腫瘍組織内のリンパ球浸潤を組織学的に検索したが、血管周囲のいわゆる lymphocyte cuffing を数多く認めた症例は僅かに 2 例であり、他の症例では僅かな散在性のリンパ球浸潤が存在した。2 例を除き 28 症例では  $3 \times 10^7$  個以下のリンパ球が分離しえたのみであり、2 週間以上の培養増殖後はじめて解析が可能となった。30 例中 24 例の培養において、TIL は 4 週から 8 週の間増殖を示し、18 例では、最終的には  $5 \times 10^8$  から  $5 \times 10^9$  個の TIL を得ることができた。指数関数的なリンパ球の増殖は、約 2 週間から 4 週間維持することができた。 $1 \times 10^7$  個から  $1 \times 10^8$  個への増加は平均 9 日を要した。全ての例においてこの急速な細胞数の増加の後、逆に急速な増殖の停止と次いで細胞数の減少が生じ TIL は徐々に死滅消失した。抗 CD 3 単クローン抗体 (OKT 3) にて刺激処理した培養群では、未処理の IL-2 単独のものと比較して 2 倍から 3 倍数の TIL の増殖がみられ、より多数の TIL を得るという実験目的においては、この抗体処理は明らかな利点を有していた。

増殖期の TIL は、68~98% (mean:  $88 \pm 10\%$ ) の CD 3 陽性 T cell によって構成されていた。CD 4 陽性細胞は 17%~85% (median: 39%) であり、CD 8 陽性細胞は 4%~67% (median: 42%) であった。CD 57 は  $12 \pm 13\%$ 、CD 16 は、 $4 \pm 5\%$ 、CD 56 は  $14 \pm 1\%$  に発現を見た。HLA-DR 抗原は  $88 \pm 9\%$  に検出され、この比は培養期間の延長とともに減少した。IL-2 受容体 (CD 25) は、ばらつきが大きく 2%~88% であり、これは培養初期に明らかに陽性率が高く速やかに減少傾向を辿り、2 週から 3 週以降には 10% 以下となった。

比較的多数の TIL が分離しえた 1 症例にて培養前の TIL の活性をみたが、有意な腫瘍細胞障害性を示さず、IL-2 との培養によりはじめて活性が誘導された。この TIL は、標的細胞である K562・Jurkat・Daudi 細胞・melanoma 初代培養細胞・アロ glioma・自己 glioma 細胞に対しての一定の傾向を有する事なく活性を発揮した。この細胞障害活性は、抹消血リンパ球から誘導した LAK cell と極めて近似したものであり、自己腫瘍細胞のみに対する特異的活性は全く認められず、NK 感受性である標的細胞に最も強い活性を示すものが多かった。多くの TIL は、5 週間以上の培養を行うとその増殖能とともに抗腫瘍活性をも失った。同一患者から誘導した TIL と LAK cell の活性を 5 症例において比較したが、活性の強さは常に LAK cell が優る傾向にあった。TIL と glioma を同時に混合培養し顕微鏡下に観察を行っても、ほとんどの症例で腫瘍細胞は容易には死滅せず、多くの例で一部の腫瘍細胞は TIL と共にそのまま生存して増殖するに至った。

TIL のアロ glioma spheroid 障害活性は、同一患者より誘導した LAK cell に比較して有意

に低値であった。免疫組織化学染色による解析では、培養12時間までに TIL の spheroid 内への明らかな侵入は認めなかった。その後も TIL の spheroid 内部への浸潤は非常に僅かであり、spheroid の破壊像は常に外側表面からであり、内部がその変化に先行して壊死像を呈することはなかった。TIL と LAK cell の spheroid 内部への浸潤能に有意な差異はなく、僅かに侵入した effector 細胞は、CD 8 あるいは CD 4 陽性の T cell であった。

#### IV 考 察

TIL が in vivo マウスモデルで治療実験において LAK cell に優る条件として、以下の事項が推論指摘されている。IL-2 存在下にて増殖させた TIL は cytotoxic T-cell であり、自己の腫瘍細胞に対して LAK cell より強い障害活性を発揮し、それは自己腫瘍細胞特異的である。これらの情報を参考として今回の研究を進めた。組織学的に glioma 組織内へ浸潤する単核球の相対的な数量は、他臓器癌のそれに比較して著しく少数である。これは in vitro での IL-2 に依存する培養増殖によってえられる最終的な TIL の産生数にもそのまま影響し、例えば Topalian らは肺癌などの他臓器癌組織より中央値  $2 \times 10^{10}$  個を誘導しているが、今回の結果では glioma からは中央値にして  $2 \times 10^9$  個の TIL が獲られたにすぎない。増殖しつつある TIL の 90% 程度は CD 3 陽性細胞であり、CD 8 陽性の cytotoxic T cell を含有していたが、自己 glioma 細胞に対していかなる特異的あるいは選択的な細胞障害活性も示さなかった。この非特異的活性は質的に LAK cell のそれに類似したものであり、かつ強度の点から LAK cell の示した活性に劣った。LAK cell 臨床効果が低迷する理由の一つに、ヒト頭蓋内に局所投与された LAK cell が脳腫瘍組織内へ積極的に浸潤せず、投与された腔内に留まり、あるいは髄腔内へと拡散するためであるという指摘もある。TIL は T cell 主体のリンパ球集団であるため LAK cell に優る腫瘍組織内への浸潤能を期待したが、予想に反して spheroid 内への浸入能はこれも極めて低いものであった。

#### V 結 論

glioma-derived TIL は、in vitro にて増殖可能であるが、養子免疫療法の移入細胞としては、抹消血より比較的容易に誘導増殖させることができる LAK cell に優るものではなかった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 皆 川 知 紀

I 研究目的：IL-2により活性化されたリンパ球いわゆるLAK cellは、IL-2と共に悪性脳腫瘍患者に投与される方法で臨床治験が続けられてきたが、この成績は当初期待された程のものではない。このLAK cellに替わるより効果的な移入細胞として、腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)が一部の研究者の新たな期待を集めている。この研究は脳に発生した malignant astrocytoma から TIL を分離し大量培養増殖を計ることにより、臨床応用の可能性を探ることを目的とした。

II 実験方法：malignant astrocytoma 30例を処理しリンパ球に富む分画を得た。TILの培養には、10% AB型血清と recombinant IL-2を加えた基礎培地を用いた。TILの細胞表面抗原の解析は、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。glioma細胞を用いて、三次元腫瘍モデル glioma spheroid を作製した。effector細胞の腫瘍細胞障害活性はCr-51遊離試験にて解析した。spheroid内部への浸潤能をみるために、spheroidをLAK細胞あるいはTILとともに培養した後に継時的に凍結し、切片を作製して免疫組織化学染色を行った。

III 結 果：腫瘍組織内のリンパ球浸潤を組織学的に検索したが、著明な浸潤を認めた症例は僅かに2例であり、他の症例では僅かな散在性にリンパ球が存在した。30例中24例の培養において、TILは4週から8週の間増殖を示し、18例では、最終的には $5 \times 10^8$ から $5 \times 10^9$ 個のTILを得ることができた。指数関数的リンパ球の増殖は、約2週間から4週間維持することができた。全ての例においてこの急速な細胞数の増加の後、逆に急速な増殖の停止と次いで細胞数の減少が生じTILは徐々に死滅消失した。増殖期のTILは68%~98% (mean:  $88 \pm 10\%$ )のCD3陽性T cellによって構成されている。CD4陽性細胞は17%~85% (median: 39%)であり、CD8陽性細胞は4%~67% (median: 42%)であった。CD57は $12 \pm 13\%$ 、CD16は $4 \pm 5\%$ 、CD56は $14 \pm 1\%$ に発現を見た。HLA-DR抗原は $88 \pm 9\%$ に検出され、この比は培養期間の延長とともに減少した。IL-2受容体(CD25)は、ばらつきが大きく2%~88%であり、これは培養初期に明らかに陽性率が高く速やかに減少傾向を辿り、2週から3週以降には10%以下となった。比較的多数のTILが分離した1症例にて培養前のTILの活性をみたが、有意な腫瘍細胞障

害性を示さず、IL-2との培養によりはじめて活性が誘導された。このTILは、標的細胞である種々のアロ腫瘍細胞・アロ glioma 細胞・自己 glioma 細胞に対して一定の傾向を有する事なく活性を発揮した。この細胞障害活性は、抹消血リンパ球から誘導したLAK cellと極めて近似したものであり、自己腫瘍細胞のみに対する特異的活性は全く認められず、NK感受性である標的細胞に最も強い活性を示すものが多かった。同一患者から誘導したTILとLAK cellの活性を5症例において比較したが、活性の強さは常にLAK cellが優る傾向にあった。TILの glioma spheroid 障害活性は、同一患者より誘導したLAK cellに比較して有意に低値であった。免疫組織化学染色による解析では、培養12時間までにTILの spheroid 内への明らかな侵入は認めなかった。その後もTILの spheroid 内部への浸潤は非常に僅かであり、spheroidの破壊像は常に外側表面からであり、内部がその変化に先行して壊死像を呈することはなかった。TILとLAK cellの spheroid 内部の浸潤能に有意な差異はなく、僅かに侵入した effector 細胞は、CD8あるいはCD4陽性のT cellであった。

IV 考 察：TILが治療実験においてLAK cellに優る条件として、以下の事項が推論指摘されている。IL-2存在下にて増殖させたTILはcytotoxic T-cellであり、自己の腫瘍細胞に対してLAK cellより強い障害活性を発揮し、それは自己腫瘍細胞特異的である。これらの情報を参考として今回の研究を進めた。組織学的に glioma 組織内へ浸潤する単核球の相対的な数量は、他臓器癌のそれに比較して著しく少数であり、in vitroでの培養増殖の結果、gliomaからは中央値にして $2 \times 10^9$ 個のTILが獲られたにすぎない。増殖しつつあるTILの90%程度はCD3陽性細胞であり、CD8陽性のT cellを含有していたが、自己 glioma 細胞に対していかなる特異的あるいは選択的な細胞障害活性も示さなかった。この非特異的活性は質的にLAK cellのそれに類似したものであり、かつ強度の点からはLAK cellの示した活性に劣った。TILはT cell主体のリンパ球集団であるためLAK cellに優る腫瘍組織内への浸潤能を期待したが、予想に反して spheroid 内への侵入能は極めて低いものであった。

V 結 論：glioma-derived TILは、in vitroにて増殖可能であるが、養子免疫療法の移入細胞としては、抹消血より比較的容易に誘導増殖させることのできるLAK cellに優るものではなかった。