

学位論文題名

遺伝子組換え型ヒト・インターロイキン-2の  
マウスにおける抗腫瘍作用の形態学的研究  
—特に大型顆粒細胞を中心にして—

学位論文内容の要旨

インターロイキン-2 (IL-2)はT細胞から産生される分子量約15,000の蛋白質で、リンホカインの一種である。近年、遺伝子工学技術の発達により、ヒトIL-2の complementary DNAが単離され、遺伝子組み換え型ヒトIL-2(rIL-2)の大量生産が実現した。このrIL-2は人の悪性腫瘍の治療に試みられ、現在までに腎癌、黒色腫および血管内皮腫に対し臨床的な治療効果が認められている。しかし、その作用機序は解明されていない。

本研究では rIL-2の抗腫瘍作用の機序を解明するために、正常マウス、腫瘍移植マウス、および腫瘍移植ヌードマウスにおけるrIL-2の作用を形態学的に検索した。この中で、特にrIL-2投与によってマウスの組織に出現する大型顆粒細胞に注目して研究を行った。

第1章では、マウスの移植腫瘍であるColon 26結腸癌(腫瘍)に対する、rIL-2の抗腫瘍作用を組織学的に検索した。実験はColon 26腫瘍を雌のBALB/cマウスに皮下移植し、腫瘍移植7日後からマウスにrIL-2を、1日1回、2-10日間にわたり、筋肉内投与して行った。また、遺伝子組換え型ヒト・インターフェロン- $\alpha$ A/D(rIFN- $\alpha$ A/D)を、単独あるいはrIL-2と併用投与し、それらの抗腫瘍作用も検索した。腫瘍移植マウスは薬剤の投与開始2、6、10および14日後に剖検し、腫瘍を組織学的に検索した。

rIL-2 または rIFN- $\alpha$ A/D を単独投与したマウスの腫瘍の発育は、投与6日後以降(薬剤投与14日後まで観察)に抑制され、rIL-2 と rIFN- $\alpha$ A/D を併用投与したマウスの腫瘍の発育は停止した。組織学的には、投与日数に比例して、各薬剤投与群の腫瘍組織の壊死が拡大し、同時に直径15-30 $\mu$ m の大型顆粒細胞の浸潤が多く認められた。両者の程度は併用投与群においてより顕著であった。大型顆粒細胞の出現状況は、腫瘍重量の減少と良く相関し、この細胞の抗腫瘍作用への関与が示唆された。大型顆粒細胞は、好酸性で過ヨウ素酸シッフ(PAS)陽性の円形顆粒を細胞質内に多数有し、免疫組織化学的には、T細胞の分化抗原であるThy-1陽性、Lyt-1およびLyt-2陰性、B細胞の分化抗原であるIgG陰性を示した。この細胞は超微形態学的には、高電子密度の円形顆粒と発達したゴルジ装置ならびに粗面小胞体を持っていた。これらの表面抗原の性状および超微構造の特徴は、IL-2を含む培養液で継代されている大顆粒リンパ球様細胞と酷似していた。この大型顆粒細胞は、胸腺細胞以後の分化段階のT細胞に存在するLyt-1およびLyt-2陰性を示したので、natural killer(NK)細胞由来のlymphokine activated killer(LAK)細胞と考えられた。

第II章では、大型顆粒細胞の由来を検討するために、ヌードマウスにマウスの血管内皮腫由来の培養細胞株D14を移植し、rIL-2の抗腫瘍作用を組織学的に検索した。実験はD14細胞を雌のBALB/c由来ヌードマウスに皮下移植し、rIL-2を1日1回、腫瘍移植28日後から35日間にわたり、腫瘍周辺部皮下に投与して行った。マウスは薬剤の投与開始35日後に剖検し、腫瘍、脾臓および骨髄を組織学的に検索した。

rIL-2を投与したマウスの腫瘍の発育は、薬剤の投与開始12日後から抑制され、剖検時の腫瘍重量は対照群の約1/4であった。組織学的には、rIL-2を投与したマウスの腫瘍組織内に、Thy-1陽性の大型顆粒細胞と核崩壊を示す腫瘍細胞が増数していた。大型顆粒細胞の表面抗原性状、組織学的特徴および超微形態学的特徴は、第I章で示した大型顆粒細胞のそれと一致していた。大型顆粒細胞には、NK細胞マ

カーの一つである asialo GM1 陽性を示唆する所見も認められた。

rIL-2 を投与した腫瘍移植マウスの脾臓には、大小不同の Thy-1 陽性細胞の顕著な増加がみられ、少数の大型顆粒細胞も認められた。

以上のように、腫瘍の増殖が rIL-2 の皮下投与により抑制され、腫瘍組織には第 I 章でみられたと同一の大型顆粒細胞、すなわち LAK 様細胞の浸潤が認められた。特に、大型顆粒細胞が腫瘍細胞の崩壊に重要な役割を演じている所見が注目された。この細胞反応はヌードマウスで生じたことから、大型顆粒細胞は NK 細胞に由来する細胞と考えられた。

第 I 章および第 II 章で、大型顆粒細胞が NK 細胞由来の LAK 細胞である可能性が強く示唆されたことから、第 III 章では、抗原感作を行っていない正常マウスに rIL-2 を投与し、大型顆粒細胞の出現の有無について検討した。実験は雌の BALB/c マウスの腹部皮下に、rIL-2 を 1 日 1 回、10 日間連続投与して行った。また、同様のマウスの背部皮下に rIL-2 を 6 日間徐放投与した。

rIL-2 を皮下投与したマウスの脾臓および投与部皮下組織には、少数ではあるが大型顆粒細胞が認められた。一方、rIL-2 を皮下に徐放投与したマウスの脾臓、骨髄および投与部皮下組織には、多数の大型顆粒細胞が認められた。投与部皮下組織にはリンパ様細胞の浸潤も認められた。これらの大型顆粒細胞は、第 I 章および II 章の実験でみられた大型顆粒細胞と同一の形態的特徴を示した。

以上のように、抗原感作を行っていない無処置マウスに rIL-2 を投与しても、脾臓、骨髄および投与部皮下組織に大型顆粒細胞の出現することが確認された。また、この出現には、体内における rIL-2 濃度の維持が重要であることが示唆された。

第 IV 章では、大型顆粒細胞の細胞傷害活性について、2 種の腫瘍細胞を用いて検討した。実験は rIL-2 の徐放投与 7 日後にマウスを屠殺し、脾臓細胞を採取して行った。最初に、採取した脾臓細胞の表面抗原性状をフローサイトメトリーにより解析した。この結果、rIL-2 を徐放投与したマウスからの脾臓細胞には、Thy-1 陽性の大型細胞が増

数していたが、Lyt-1、Lyt-2 およびIgG 夫々の陽性細胞には変動はなかった。一方、同一の脾臓細胞中にはLyt-1、Lyt-2 およびIgG 夫々の陰性大型細胞が増数し、それらの比率は、Thy-1 陽性の大型細胞の比率とほぼ同一であった。したがって、Thy-1 陽性の大型細胞は、Lyt-1、Lyt-2 およびIgG 陰性とみなされた。この脾臓細胞からThy-1 陽性の大型細胞を分離した結果、その多くが大型顆粒細胞の形態を示していた。次に、rIL-2 を徐放投与したマウスの脾臓細胞の細胞傷害活性を、 $^{51}\text{Cr}$ で標識したYAC-1 細胞ならびにMeth-A細胞を標的細胞に用いて検索した。rIL-2 を徐放投与したマウスの脾臓細胞は両標的細胞に対し強い傷害活性を示した。また、分離したThy-1 陽性の大型細胞は、Meth-A細胞に対し、分離前の脾臓細胞より強い細胞傷害活性を示した。

以上の研究から、rIL-2 を腫瘍移植マウスに投与した結果、NK細胞由来のLAK細胞と考えられる大型顆粒細胞が腫瘍組織内に誘導され、この細胞が抗腫瘍作用に大きく関与していることが示された。また、rIL-2 を無処置の正常マウスに投与した場合においても、大型顆粒細胞は出現し、この細胞は非特異的な強い細胞傷害活性を持っていることが示された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 板 倉 智 敏  
副 査 教 授 杉 村 誠  
副 査 教 授 佐 藤 文 昭  
副 査 教 授 小 沼 操

### 学位論文題名

## 遺伝子組換え型ヒト・インターロイキン-2の マウスにおける抗腫瘍作用の形態学的研究 —特に大型顆粒細胞を中心にして—

遺伝子工学技術の発達により大量に生産されるようになったヒトのインターロイキン-2 (rIL-2)には、抗腫瘍性のあることが指摘されている。申請者は、マウスの実験的腫瘍に対する rIL-2 の抗腫瘍作用を形態学的に調べ、本論文をまとめた。

最初に、rIL-2 の抗腫瘍性を、マウスの移植腫瘍である colon26 結腸癌について検索した。抗腫瘍性は rIL-2 の投与日数と共に現れ、形態学的には腫瘍組織の壊死で示された。壊死組織には、好酸性の大型顆粒を有する直径 15-30 $\mu$ m の細胞浸潤が特に注目された。この細胞は、免疫組織化学的並びに超微形態学的に解析した結果、natural killer(NK) 細胞由来の lymphokine activated killer (LAK) 細胞と考えられた。

次に、マウスの血管内皮腫由来の培養細胞株 D14 をヌードマウスに移植し、これに対する rIL-2 の抗腫瘍性を検索した。その結果、抗腫瘍性がみられ、組織学的には前記の大型顆粒細胞が腫瘍細胞の崩壊に重要な役割を演じている像が所見された。このように大型顆粒細胞反応がヌードマウスにおいても生じたことから、この細胞は NK 細胞由来と考えられた。

さらに、抗原感作を行っていない無処置マウスに rIL-2 を投与した結果、

脾臓、骨髄、rIL-2 投与部皮下組織に大型顆粒細胞が出現した。また、rIL-2 を徐放投与したマウスから脾臓細胞を採取し、これより大型顆粒細胞が分離できた。この分離細胞は、 $^{51}\text{Cr}$  で標識したマウスリンパ腫由来の YAC-1 細胞と、マウス線維肉腫由来の Meth-A 細胞に対し強い細胞傷害活性を示した。

以上のように、申請者は rIL-2 の抗腫瘍効果について、NK 細胞由来の LAK 細胞と考えられる大型顆粒細胞の出現を指摘し、この細胞の非特異的な強い細胞傷害性を明らかにした。この成果は、rIL-2 の作用機序の解明に大きく貢献する。よって審査員一同は、佐倉 康文 氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。