

# 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト肝リンパ球の $\alpha$ -glycosylceramides による抗腫瘍細胞傷害活性

指導教官 名川弘一

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 石原聡一郎

## 背景

糖脂質の一種である $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) や $\alpha$ -glucosylceramide ( $\alpha$ -GlcCer) などの $\alpha$ -glycosylceramides (AGC) はマウスの様々な癌モデル、特に大腸癌肝転移モデルで、NKT 細胞と呼ばれる特殊なリンパ球集団の活性化を介する抗腫瘍免疫を誘導することが示されており、ヒト癌治療、特に転移性肝癌の免疫療法への応用が期待されている。マウス NKT 細胞はレクチン型 NK 受容体である NKR-P1C (NK1.1) を発現する T 細胞で、肝や骨髄に特異的に集積しているリンパ球である。マウス NKT 細胞は、特異的に発現している V $\alpha$ 14 T 細胞受容体 (TCR) を介し、抗原提示細胞上の CD1d 分子に提示された AGC により選択的に活性化する。活性化した NKT 細胞は、様々なサイトカインを産生し、また強い抗腫瘍細胞傷害活性を発揮することが示されているが、AGC による抗

腫瘍免疫の正確な機序は不明な点が多く、またヒトにおいてもマウス同様に抗腫瘍免疫が誘導されるかどうかは十分検討されていない。

ヒト末梢血中にはマウス V $\alpha$ 14 TCR の相同物である V $\alpha$ 24 TCR を発現し、また、マウス NKR-P1C の類似物である NKR-P1A を発現した T 細胞が、極めて少数であるが存在する。これらの細胞はマウス NKT 細胞と同様に V $\alpha$ 24 TCR-CD1d 拘束性に AGC によって特異的に活性化することが示されている。しかしながら、これらのマウス NKT 細胞に対応する細胞集団がマウス同様にヒト肝へ集積しているかどうかについてはいまだ十分解析されていない。

本研究の目的は、(1) ヒト肝リンパ球 (HL) における NKR-P1A<sup>+</sup> T 細胞の phenotype と機能を解析し、(2) AGC により HL の抗腫瘍細胞傷害活性の増強がみられるかを *in vitro* で検証することである。

## 方法

(1) まず、ヒト肝切除標本（大腸癌肝転移 4 例、胃癌肝転移 1 例、原発性肝細胞癌 1 例および健常ドナー肝 1 例）の正常部肝組織から単核球を分離し、フローサイトメトリーによる phenotype の解析を行い、患者末梢血単核球と比較した。抗腫瘍細胞傷害活性は、HL 中の T 細胞 (HT) を NKR-P1A<sup>+</sup> 細胞と NKR-P1A<sup>-</sup> 細胞に分けて、4 時間 <sup>51</sup>Cr 放出法により測定・比較した。サイトカイン産生能は、phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) および ionomycin で活性化し、HT および健常人末梢血 T 細胞 (PBT) による腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン-4 (IL-4) およびインターロイキン-2 (IL-2) の産生を細胞内染色法で染色、フローサイトメトリーで測定・比較した。

(2) 次に、4 例の肝癌切除標本（症例 1；原発性肝細胞癌、症例 2；胃癌肝転移、

症例 3 および症例 4 ; 大腸癌肝転移) から得られた肝単核球を AGC ( $\alpha$ -GlcCer または $\alpha$ -GalCer) あるいは vehicle のみ (0.1% dimethylsulfoxide; DMSO) と共に 7 日間培養し、抗腫瘍細胞傷害活性および培養細胞中における V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞の割合を測定した。抗腫瘍細胞傷害活性における直接のエフェクター細胞を同定する為に、培養肝リンパ球を CD3、V $\alpha$ 24 TCR および CD56 について陽性細胞と陰性細胞に分離し、それぞれの抗腫瘍細胞傷害活性を測定・比較した。また、AGC による抗腫瘍細胞傷害活性増強効果における CD1d 分子および V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞の関与を調べるために、特異的抗 CD1d および V $\alpha$ 24 TCR 抗体による阻害実験を行った。

## 結果

(1) HL 中における NKR-P1A<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> 細胞の割合は  $33.2 \pm 7.4\%$  で、末梢血リンパ球中における  $3.6 \pm 2.0\%$  より有意に高値であった。HNT の  $80.2 \pm 11.1\%$  が CD8<sup>+</sup> 細胞であった。HNT 中における V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞の割合は、 $0.4 \pm 0.5\%$  と非常に低率であった。また、 $89.9 \pm 9.6\%$  もの HNT が活性化マーカーである CD69 を発現していた。

HNT は種々の腫瘍細胞株に対し、HCT よりも強い細胞傷害活性を示した。また、活性化 HT は活性化 PBT よりも強い TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  産生能を示した。両者は IL-2 産生能においてほぼ同等で、IL-4 の産生はほとんどみられなかった。

(2) 肝単核球の抗腫瘍細胞傷害活性は、全症例で AGC ( $\alpha$ -GlcCer >  $\alpha$ -GalCer) によって増強した。全症例で V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞は AGC によって著明に増殖したが、症例 3 では $\alpha$ -GlcCer による V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞の増殖はみられなかった ( $\alpha$ -GalCer による増殖はみられた)。

$\alpha$ -GlcCer と共に培養した HL 中の CD3<sup>-</sup> 細胞は CD3<sup>+</sup> 細胞よりも著明に強い抗腫瘍細胞傷害活性を示した。また、CD56<sup>+</sup> 細胞は CD56<sup>-</sup> 細胞よりも著明に強い抗腫瘍細胞傷害活性を示した。V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞にはほとんど抗腫瘍細胞傷害活性がみられなかった。

抗 CD1d 抗体を培養中に添加すると、 $\alpha$ -GlcCer による抗腫瘍細胞傷害活性増強および V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞増殖の両方が阻害された。一方、抗 V $\alpha$ 24 TCR 抗体は、 $\alpha$ -GlcCer による V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞増殖を完全に阻害したが、抗腫瘍細胞傷害活性増強には影響を与えなかった。

## 総括

(1)の結果から、ヒト肝には NKR-P1A<sup>+</sup> T 細胞の特異的かつ著明な集積が認められたが、HNT の大多数は CD8<sup>+</sup> 細胞で、V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞の頻度は非常に低く、phenotype において HNT とマウス NKT 細胞は大きく異なっていた。しかし、(2)の結果から AGC は HL の抗腫瘍細胞傷害活性を増強した。直接のエフェクター細胞は CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK 細胞で、V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞ではなかった。また、症例 3 の HL で  $\alpha$ -GlcCer は V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞を増殖させなかったが、抗腫瘍細胞傷害活性を増強したという結果と、CD1d および V $\alpha$ 24 TCR の阻害実験の結果から、AGC によるヒト肝 CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK 細胞の活性化において、V $\alpha$ 24 TCR<sup>+</sup> 細胞を必要としない経路の存在が示唆された。

以上から、AGC はヒト肝 CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK 細胞の抗腫瘍細胞傷害活性を増強することにより、マウス癌モデルと同様にヒト肝癌（原発性および転移性）に治療的効果をもたらす可能性が示された。