



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1860号
学位記番号	論 第1637号
氏名	石黒 雅江
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	<p>Stimulation of neuronal cells by culture supernatant of T lymphocytes triggered by anti-CD3 mAb followed by propagation in the presence of IL-2 (抗 CD3 抗体によって刺激され、IL-2 存在下増殖したTリンパ球の培養上清による神経細胞の刺激)</p> <p>Microbiol Immunol. 2016 Jan;60(1):47-55</p>
論文審査担当者	<p>主査： 山崎 小百合 副査： 松川 則之, 浅井 清文</p>

[研究の目的]

Lymphokine Activated T cells (LAK-T) 療法は、癌患者の末梢血から分離したリンパ球を抗CD3抗体で刺激し、IL-2存在下で培養し、活性化・増殖した約 1×10^{10} 個の活性化リンパ球を回収し、生理食塩水に浮遊させ、癌患者へ点滴静注する癌免疫治療である。LAK-T療法によって、癌細胞を完全に消滅するのは難しいが、患者のパフォーマンス・ステータス (PS) の改善は大きく、化学療法や放射線療法を受けている患者においてもLAK-T療法によりPS改善がみられる。具体的には身体活動、意欲の向上、食欲の増加、嘔吐抑制などがある。しかし、LAK-T療法によるPS改善のメカニズムはわかっていない。

我々は、これらの改善は活性化リンパ球が産生する物質が中枢神経系へ影響している可能性があると考え、本研究を企画した。

[方法と結果]

活性化リンパ球培養培地中のサイトカインを測定した結果、IL-5, IL-13, GM-CSF, IFN- γ が高濃度で検出された。これらの内、GM-CSFとIFN- γ は血液脳関門を通過できることが報告されている。そこで、GM-CSFに注目し、LAK-T培養上清とリコンビナント・ヒトGM-CSFの中枢神経における細胞新生作用を8週齢のラットを使って観察した。

LAK-T細胞の培養上清を8週令ラットの尾静脈に投与した。その12時間後及び36時間後に5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を腹腔内投与し、48時間後に還流固定し脳を取り出し、パラフィン包埋した。その脳組織切片をEdU染色し、細胞新生を共焦点レーザー顕微鏡で観察・定量した。脳室下帯と海馬歯状回でのDNA複製が、対照として行ったPBS(-)投与群と較べて有意に増加することがDNAに取り込まれたEdUによってわかった。また、リコンビナント・ヒトGM-CSFを8週齢ラットに尾静脈投与した場合も同様に脳室下帯と海馬歯状回でのDNA複製がPBS(-)投与群と較べて有意に増加することが観察された。

さらに、LAK-T培養上清とリコンビナント・ヒトGM-CSF が神経活動の活性化に影響する可能性があることを、細胞内Ca²⁺の変化によって検討した。生後10日から12日のラットの脳を取り出し、海馬を250 μ m厚にスライスし、1日間5%CO₂, 32°Cで培養した後、カルシウムインジケータFluo-8 NWを取り込ませた。そのラット海馬切片にLAK-T培養上清を滴下すると、細胞内Ca²⁺が上昇し、LAK-T培養上清がラット海馬脳神経活動に影響を与えることがわかった。同様に、リコンビナント・ヒトGM-CSFでも細胞内Ca²⁺の上昇が観察され、ラット海馬脳神経に影響を与えることがわかった。

[考察]

癌の患者は鬱状態になっており、その鬱レベルが癌治療効果にも影響しているという報告がある。鬱病患者の脳の一部が委縮しており、抗鬱薬によって脳細胞新生が生じるという報告や、脳梗塞患者の治療過程で神経細胞新生が起こり、GM-CSFがその効果に寄与するという報告もある。

今回の我々の実験の結果は、LAK-T培養上清に含まれる物質が神経細胞新生や中枢神経の活性化に直接、または間接的に関わっていることを示しており、免疫防御機構を規制するサイトカインが神経細胞やグリア細胞に影響をもたらすことを示唆している。

系統発生において、中枢神経系と宿主免疫系は系統発生段階の同じ段階で必要とされたと推測されている。多細胞生物では、中枢神経系は全身が適切に機能するよう調節し、宿主免疫系は生体制御を乱す異常な変異細胞を排除する。排除はTリンパ球系が行う。ゆえに宿主免疫系はTリンパ球に依存している。中枢神経系と宿主免疫系は同時に発達し、ある種のサイトカインとその受容体を共有したと考えられ、GM-CSFとIFN- γ は中枢神経系と宿主免疫系で共有された二つの因子であると考えられることもできる。

我々は、体内に注入された活性化リンパ球から分泌されたGM-CSFやIFN- γ などのサイトカインが中枢神経を刺激し、LAK-T細胞を投与された癌患者のPS向上をもたらしたのではないかと考えた。LAK-T培養上清やGM-CSFに神経細胞新生作用や神経細胞活性化作用があるのならば、癌患者だけでなく、高齢者のPS改善に寄与する可能性があると考えられる。

GM-CSFは骨髄系細胞の生存を促進し、分化や増殖を引き起こす強い造血因子であり、中枢神経障害においては骨髄系の顆粒球やマクロファージと近似するミクログリアに作用して神経細胞活性化作用を発揮する可能性がある。ならば、GM-CSFと同様にLAK-T培養上清は、アルツハイマー病などの痴呆症治療の1つとなる可能性が示されたのかもしれない。

また、GM-CSFやLAK-T培養上清が運動神経を取り囲んでいるグリア細胞を刺激することによって、筋委縮性側索硬化症 (ALS) 患者の運動ニューロン機能改善をもたらすことも期待できる

可能性もあると考えられる。

LAK-T培養上清に含まれるサイトカインの内、GM-CSFが中枢神経に作用することが、本研究で示されたが、他にも多くのサイトカインが含まれており、さらなる研究が必要である。今後、活性化リンパ球から分泌される多くの物質の分析・解析を進め、中枢神経系細胞への効果を検証し、新たな治療法の提案に繋げていきたいと考えている。

論文審査の結果の要旨

【研究の目的】

Lymphokine Activated T cells (LAK-T) 療法は、癌患者の末梢血から分離したリンパ球を抗 CD3 抗体で刺激し、IL-2 存在下で培養し、活性化・増殖した活性化リンパ球を回収し、癌患者へ点滴静注する癌免疫治療である。LAK-T 療法によって、癌細胞を完全に消滅するのは難しいが、患者のパフォーマンス・ステータス (PS) の改善は大きく、化学療法や放射線療法を受けている患者においても LAK-T 療法により PS 改善がみられる。具体的には身体活動、意欲の向上、食欲の増加、嘔吐抑制などがある。しかし、LAK-T 療法による PS 改善のメカニズムは不明であり、著者らは、これらの改善は活性化リンパ球が産生する物質が中枢神経系へ影響している可能性があると考え、本研究を企画した。

【方法と結果】

LAK-T 細胞の培養上清中のサイトカインを測定したところ、IL-5, IL-13, GM-CSF, IFN- γ が高濃度で検出された。この培養上清を 8 週齢のラットに尾静脈から投与し、その脳組織切片を EdU 染色し、細胞新生を共焦点レーザー顕微鏡で観察・定量した。側脳室下帯と海馬歯状回での DNA 合成が対照と較べて有意に増加することが判明した。また、リコンビナント・ヒト GM-CSF を投与した場合も同様に DNA 合成が有意に増加することが観察された。さらに、LAK-T 培養上清をラット海馬切片に滴下すると、細胞内 Ca²⁺が上昇することを共焦点顕微鏡で観察し、LAK-T 培養上清がラット海馬細胞に影響を与えることがわかった。同様に、リコンビナント・ヒト GM-CSF でも細胞内 Ca²⁺の上昇が観察され、ラット海馬細胞に影響を与えることがわかった。

【考察】

本研究の結果は、LAK-T 培養上清に含まれる物質が神経細胞新生や中枢神経の活性化に直接、または間接的に関わっていることを示しており、サイトカイン等が神経細胞やグリア細胞に影響をもたらすことを示唆している。この結果から、体内に注入された活性化リンパ球から分泌された GM-CSF や IFN- γ などのサイトカインが中枢神経を刺激し、LAK-T 細胞を投与された癌患者の PS 向上をもたらしたのではないかと推測された。LAK-T 培養上清や GM-CSF に神経細胞新生作用や神経細胞活性化作用があるのならば、癌患者だけでなく、高齢者の PS 改善に寄与する可能性があると考えられた。

【審査の内容】

約 15 分間の発表の後に、主査の山崎教授からは、LAK-T 療法を受けた患者が元気になったというエビデンスはあるのか、培養初期の細胞濃度はどのくらいにしたか、など 12 項目、第一副査の松川教授からは、CD3 を固相化する意味は、Edu 染色の原理について、など 12 項目の質問がなされた。第二副査の浅井教授からは、多能性幹細胞と組織幹細胞の違いは、など 3 項目の質問がなされた。一部返答に窮することもあったがおおむね満足できる回答があり、学位論文の主旨を十分理解するとともに、大学院博士課程修了者と同等の学力を備えているものと考えられた。本論文は、LAK-T 療法によりパフォーマンス・ステータス (PS) の改善が見られるが、LAK-T 細胞から産生されるサイトカインによる神経系細胞の新生や神経活動の活性化が、その要因の一つである可能性を初めて示したものである。よって本論文の筆頭著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 山崎 小百合 副査 松川 則之、浅井 清文