

氏名	やなぎ 柳	はら 原	かず 一	ひろ 広
学位(専攻分野)	博士(医学)			
学位記番号	医博第2088号			
学位授与の日付	平成11年3月23日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻			
学位論文題目	Activation of human T lymphocytes by ganglioside-containing liposomes (ガングリオシド含有リポソームによるヒトTリンパ球の活性化) (主査)			
論文調査委員	教授 淀井淳司 教授 乾 賢一 教授 藤井信吾			

### 論文内容の要旨

#### [はじめに]

ガングリオシドはシアル酸を含む天然糖脂質で、哺乳類細胞の膜表面に存在し、免疫はもとより細胞増殖や分化誘導の促進や抑制などの種々の重要な機能を発現する。またラットT細胞において、活性化の際に初期の細胞内シグナル伝達物質として非常に重要な役割を果たす細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を、特定のガングリオシド ( $G_{T1b}$ ,  $G_{Q1b}$ ) 含有リポソームが増大させることが最近明らかになった。

本研究ではヒト悪性腫瘍の免疫療法におけるガングリオシド含有リポソームの臨床応用を考え、共焦点レーザー法を用いて、ヒト免疫担当細胞、特にヒトT細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  に対する影響を調べた。

#### [対象と方法]

ガングリオシド含有リポソームはthin film methodで作成し、 $[Ca^{2+}]_i$  観察の際はdipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を、培養の際はegg yolk phosphatidyl-choline (Egg PC) を用いた。その組成は、モル比でDPPC : コレステロール : ガングリオシド=74 : 14 : 12, EggPC : コレステロール : ガングリオシド=62 : 26 : 12とした。蛍光標識は1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-yl, 3-benzoxadiazol-4-yl) を1モル比で加えた。エクストルーダーを用いて、直径 $0.1\mu m$ の均一なリポソーム混濁液を作製し、濃度をリン脂質濃度で $3.7 \times 10^{-4} M$ とした。

末梢血単核細胞 (PBMC) は比重法により得た。T, B,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ 細胞は磁性ビーズを用いたネガティブパンニング法により得た。細胞浮遊液はRPMI/10%FCS中に、Fluo-3-AMで蛍光標識した  $[Ca^{2+}]_i$  を共焦点レーザーを使って反応率を測定する際には  $1 \times 10^7/ml$  とし、リポソーム添加後72時間の細胞増殖をWST-1 assayで観察する際には  $1 \times 10^6/ml$  とした。

反応率 = (蛍光の上昇した細胞) / (同一範囲内に存在する細胞) とした。

統計学的検討はSPSS system for Windowsを用いて統計学的な有意性をanalysis of varianceとScheffe's F検定を用いて評価した。p値が0.05未満の際に有意差ありとした。また数値は平均値±標準偏差で表した。

#### [結果]

ヒトPBMCでは、 $G_{D1a}$ 含有リポソームを加えた後の反応率 ( $9.70 \pm 4.19\%$ ) はNON,  $G_{M3}$ ,  $G_{D1b}$ 含有リポソーム (NON :  $0.99 \pm 0.20\%$ ,  $G_{M3}$  :  $0.27 \pm 0.47\%$ ,  $G_{D1b}$  :  $0.45 \pm 0.42\%$ ) に比べて有意に高く、 $G_{T1b}$ ,  $G_{Q1b}$ 含有リポソーム ( $G_{T1b}$  :  $6.71 \pm 2.15\%$ ,  $G_{Q1b}$  :  $4.52 \pm 3.73\%$ ) でも高かったが、有意ではなかった。

ヒトT細胞単独では、 $G_{D1a}$ ,  $G_{T1b}$ 含有リポソーム ( $G_{D1a}$  :  $37.7 \pm 18.9\%$ ,  $G_{T1b}$  :  $35.6 \pm 5.53\%$ ) で他に比べ有意に高かった (NON :  $2.00 \pm 0.79\%$ ,  $G_{M3}$  :  $1.44 \pm 1.08\%$ ,  $G_{D1b}$  :  $1.10 \pm 1.21\%$ ,  $G_{Q1b}$  :  $4.21 \pm 1.79\%$ )。  $G_{D1a}$  や  $G_{T1b}$ 含有リポソームはT細胞

胞上に付着するが、NON, G<sub>M3</sub>, G<sub>D1b</sub>, G<sub>Q1b</sub>含有リポソームはほとんど付着しないことを蛍光標識リポソームを用いて確認した。

G<sub>T1b</sub>含有リポソーム添加後、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>細胞の反応率(71.2±10.3%)はCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>20</sub><sup>+</sup>細胞に比べて有為が高く、またCD<sub>4</sub><sup>+</sup>細胞の反応率(45.7±15.3%)もCD<sub>20</sub><sup>+</sup>細胞(3.65±1.96%)に比べて有為が高かった。

WST-1 assay法を用いてガングリオシド含有リポソーム添加後のT細胞の増殖について観察したが、本実験条件下ではいずれにおいても有為な増殖促進効果は認めなかった。

#### [結論]

リポソーム脂質二重膜面から外側に突出しているシアル酸基の形が、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇をもたらす誘因として考えられた。またある種の、シアル酸基を認識する受容体が、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>とCD<sub>4</sub><sup>+</sup>の区別無く、ヒトT細胞に存在し、その刺激に関与している可能性がある。また今回のヒトにおける研究の結果は、ラットにおける結果とほぼ一致し、種特異性は顕著ではないと推論できた。

### 論文審査の結果の要旨

悪性腫瘍において糖鎖抗原の発現は重要視されている。代謝拮抗剤を用いた術後補助療法で、肺癌の予後は改善しているが、更なる改善を目指し、糖鎖を用いた免疫療法の導入のためにガングリオシド含有リポソームの臨床応用を考え、ヒトTリンパ球に対する影響を調べた。

12mol%ガングリオシド含有リポソームをthin film methodで作成し、直径0.1 μm, リン脂質濃度で3.7x10<sup>-4</sup>Mとした。ガングリオシドはG<sub>M3</sub>, G<sub>D1a</sub>, G<sub>D1b</sub>, G<sub>T1b</sub>, G<sub>Q1b</sub>を用いた。

末梢血単核細胞(PBMC)は比重法で、各細胞はnegative panning法で得た。populationはCD<sub>20</sub><sup>+</sup>細胞を除き90%以上であり、CD<sub>20</sub><sup>+</sup>細胞は73%であった。共焦点レーザー顕微鏡を用い、G<sub>D1a</sub>, G<sub>T1b</sub>含有リポソームがTリンパ球の膜上に接着すること、およびTリンパ球の細胞内カルシウムイオン濃度を有為上昇させることを確認した。CD<sub>4</sub><sup>+</sup>細胞, CD<sub>8</sub><sup>+</sup>細胞ともに細胞内カルシウム濃度が上昇した。細胞増殖は認めなかったものの、Tリンパ球が何らかのシグナルを受けており、免疫調節機構への作用が考えられ、biomodulatorとしての免疫療法への応用が考えられた。

以上の研究はガングリオシド含有リポソームによるT細胞活性化の解明に貢献し癌免疫療法への応用に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値ありと認める。

なお、本学位申請者は、平成11年1月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。