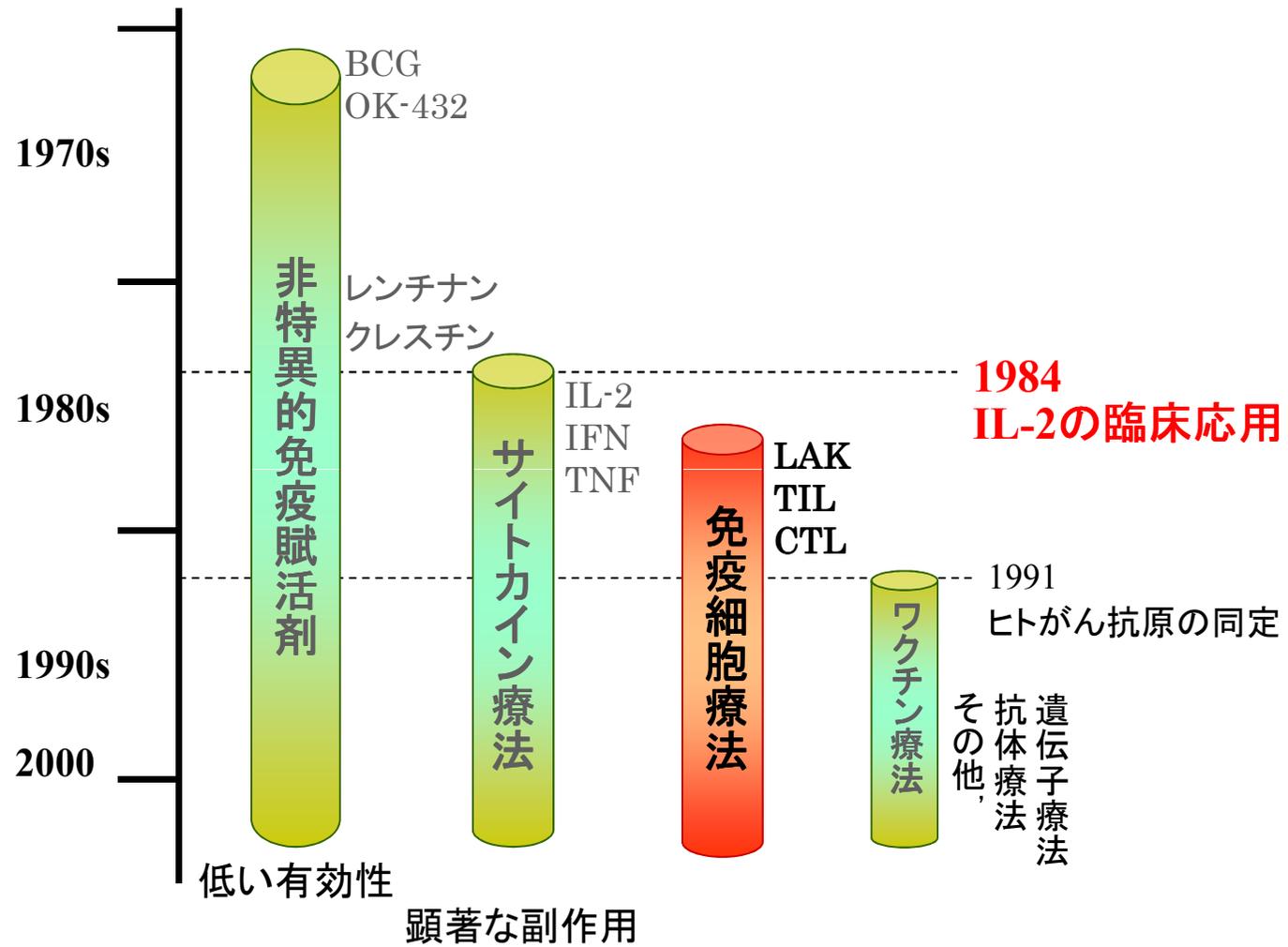
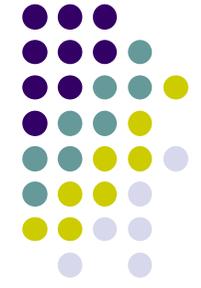




**Studies on adoptive cellular immunotherapy for small animals:
Establishment of novel method for the culture of canine
lymphokine activated killer cells.**

小動物における免疫細胞療法に関する研究:
イヌlymphokine activated killer 細胞の新規培養法の確立

がん免疫療法の歴史

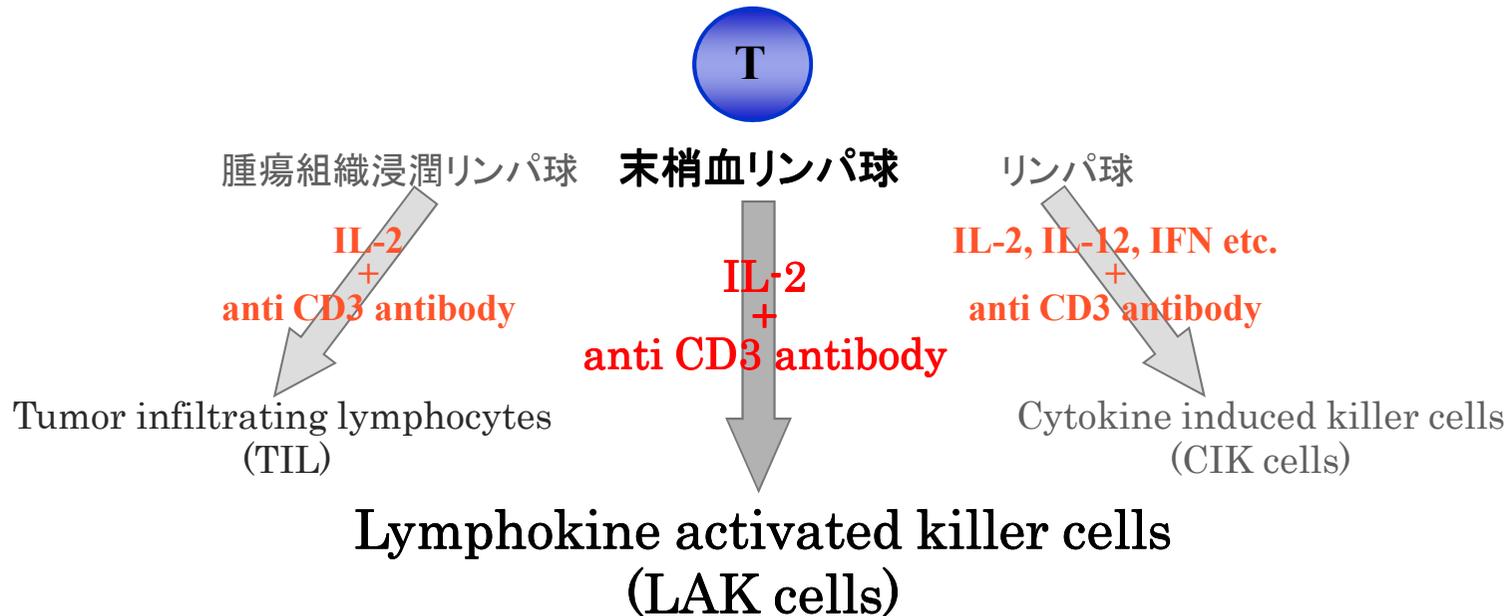


免疫細胞療法

(体外で増殖させた活性化免疫細胞を患者へ移入。)

●非特異的免疫細胞療法

リンパ球をリンフォカインで活性化



活性化されたリンパ球はNK細胞あるいはNKT細胞の特徴を有する。
標的細胞に対してMHC非拘束性の細胞傷害活性を示す。



MHC分子の発現を抑制するがん細胞も標的となる





LAK細胞は*in vitro*において抗腫瘍活性を有する (cell line および fresh tumor)

- colon cancer
- glioma
- myeloma
- melanoma
- lymphoma
- ovarian cancer
- ...etc

↔ 自身の組織に対しては傷害性を示さない

臨床試験においても再発予防や延命効果が明らかにされている

小動物臨床への応用

ペットでがんの発生が増加 → LAK療法への関心が高まる

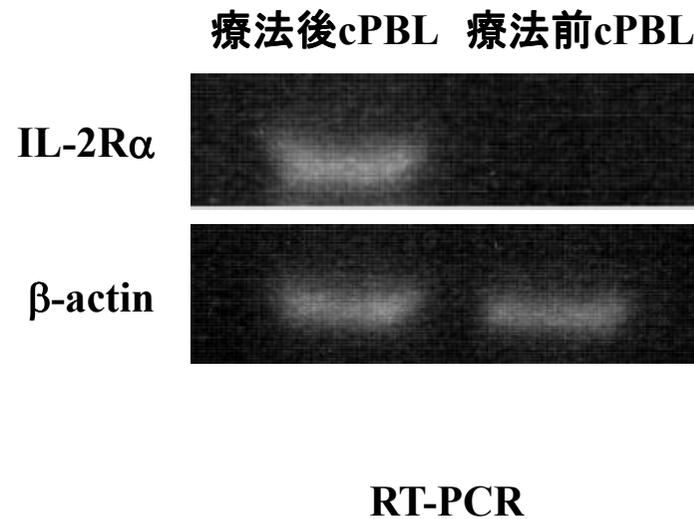
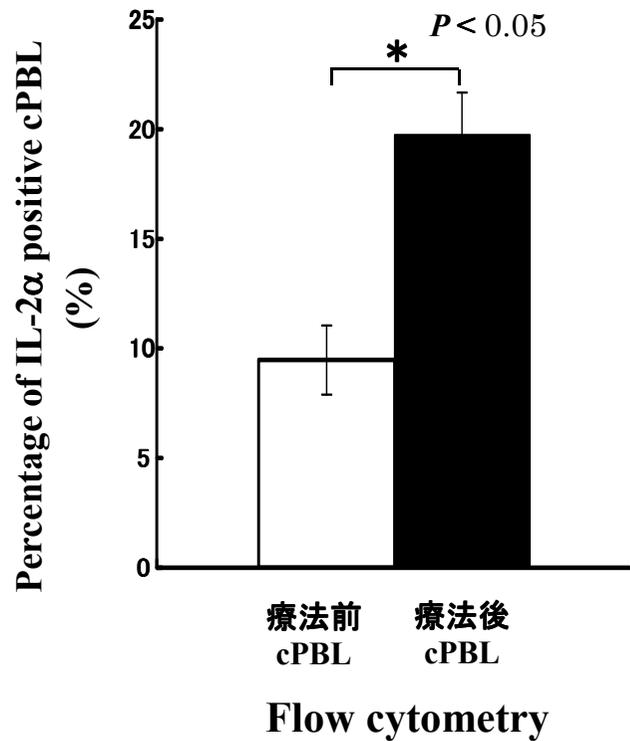
- ・臨床応用には大量のLAK細胞が必要

↓ (IL-2レセプターの発現を誘導する抗CD3抗体とrhIL-2によって培養)

- ・動物種特異的な抗CD3抗体の作製が必要

目的

汎用性の高いイヌLAK細胞の培養法を確立し、免疫細胞療法を小動物へ応用する



AcT療法によるIL-2Rα鎖の発現

IL-2レセプターはα, β, γ鎖の3量体で形成
 α鎖: 活性化時にのみ発現
 β, γ鎖: 恒常的に発現



AcT療法に伴うIL-2Rα鎖の発現



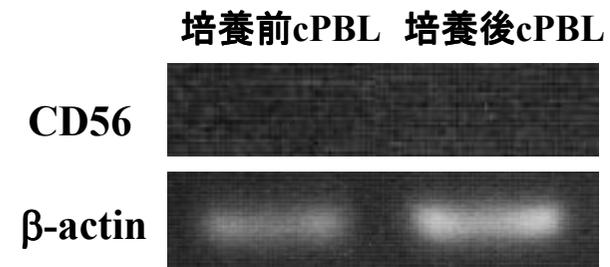
cPBLはIL-2に対する応答性を獲得

ヒト, マウスにおけるLAK細胞は, NK細胞 (CD3-CD56+CD4-CD8-), NKT細胞 (CD3+CD56+CD4+/-CD8+/-) から構成。

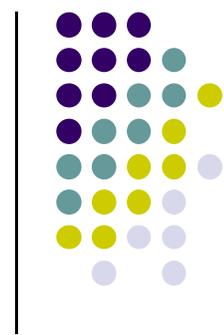


Dog		表現系の変化 (%)				CD4 SP / CD8 SP
		DN	CD4 SP	CD8 SP	DP	
1	Pre-culture	25	40	18	17	2.2
	Post-culture	1	12	44	43	0.27
2	Pre-culture	30	35	23	12	1.5
	Post-culture	3	12	49	36	0.24
3	Pre-culture	25	42	26	7	1.6
	Post-culture	3	7	26	64	0.27

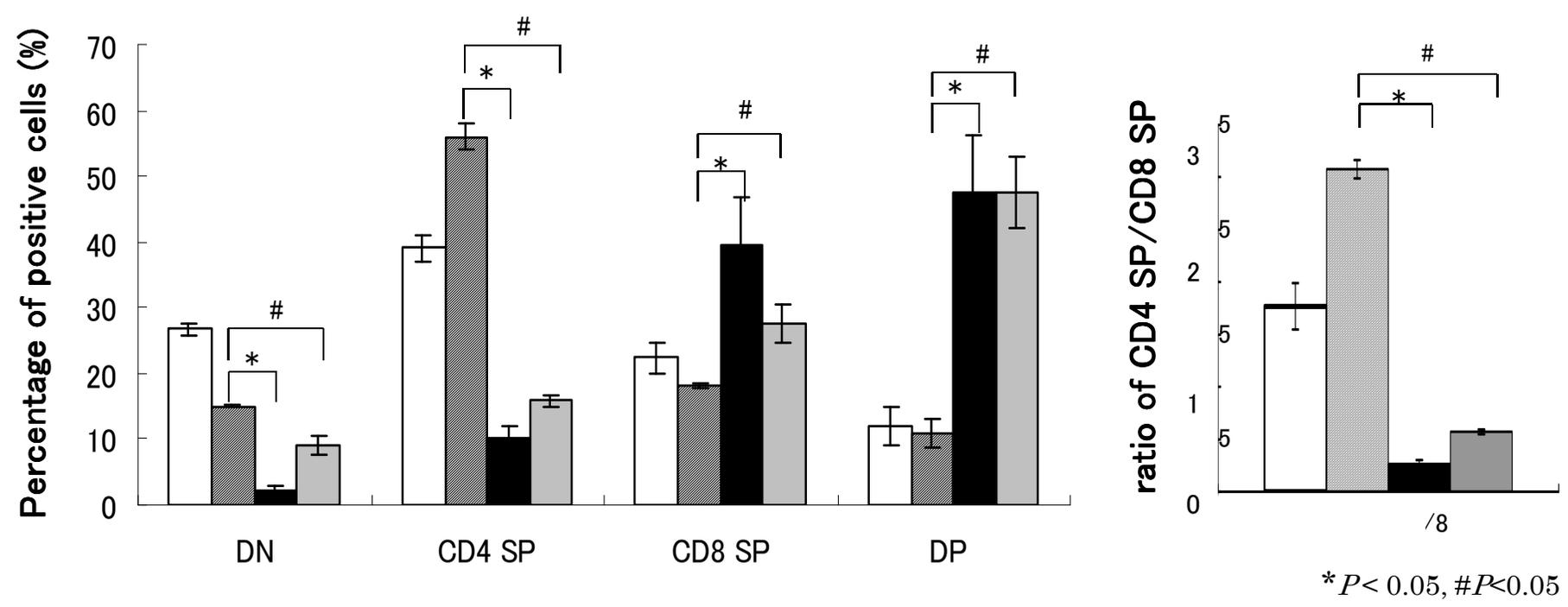
DN, CD4-CD8- double negative;
 CD4 SP, CD4+ single positive;
 CD8 SP, CD8+ single positive;
 DP, CD4+CD8+ double positive.



培養後cPBLのCD56 mRNA発現



□ 培養前
 ▨ 5日培養後 (療法前)
 ■ 7日培養後 (AcT療法後)
 ▩ 11日培養後 (AcT療法後)



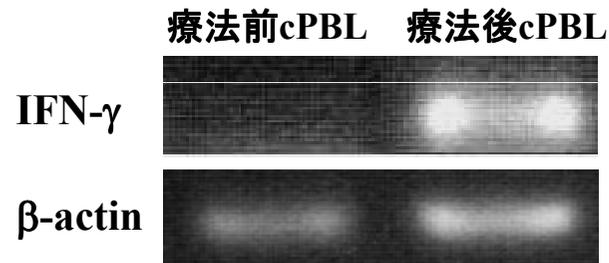
AcT療法によるcPBL培養後の細胞表現系の変化

AcT療法での培養後cPBLの表現系変化

- ・いずれの場合もCD4+CD8+double positiveリンパ球の割合が増加

胸腺外 (末梢血中) CD4+CD8+ double positiveリンパ球
(ヒト)

- ・がん患者やウイルス感染時に上昇
- ・CD8+リンパ球と同等の細胞傷害活性
- ・抗腫瘍活性を示すインターフェロン- γ を産生



培養後 (AcT療法) cPBLのIFN- γ mRNA発現

- ・AcT療法  CD8+リンパ球が増殖



AcT療法で培養したcPBLの細胞傷害活性



MHC非拘束性細胞傷害活性



AcT療法で培養したcPBL

細胞傷害性試験

- ターゲット細胞：MeWo (ヒトメラノーマ細胞株: MHC class I (-), II (-))
- エフェクター細胞：
 - cPBLの培養後 (AcT療法), 浮遊細胞を回収し洗浄
 - 新鮮末梢血リンパ球 (ネガティブコントロール)

培養プレートでMeWoを4時間インキュベート

MeWoが付着した各well中へ, エフェクター細胞をE:T ratio = 33:1の割合で加える

16時間培養後, MeWoの生存率を求め, 細胞傷害性を評価



1: MeWoのみ

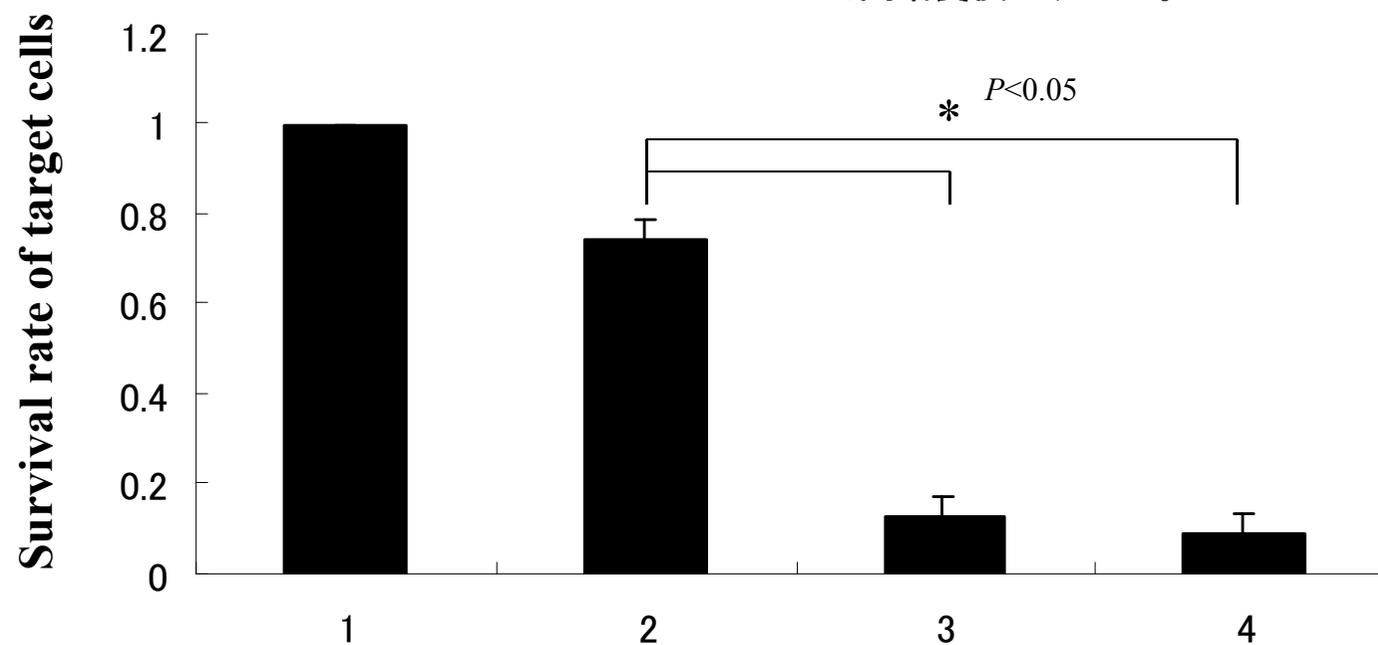
2: MeWo + 新鮮末梢血リンパ球

3: MeWo +AcT療法で

7日間培養後のリンパ球

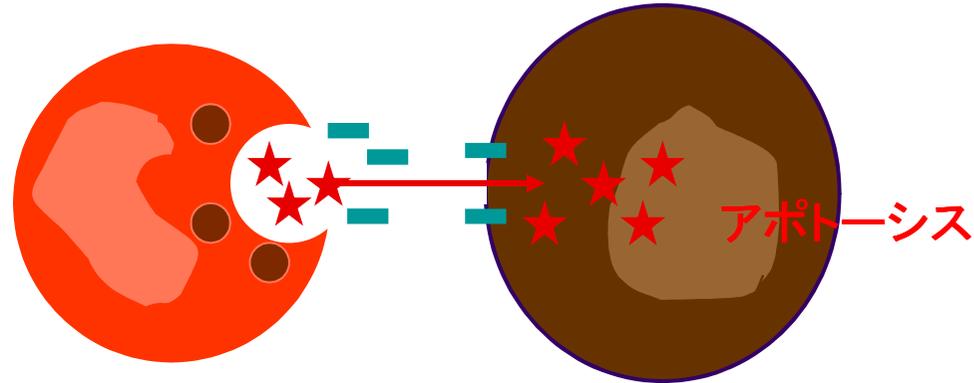
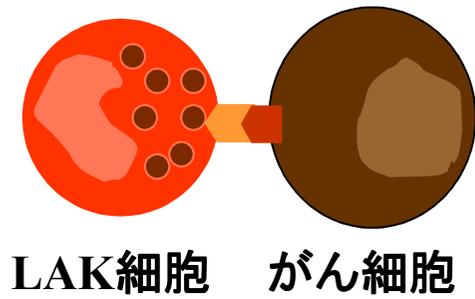
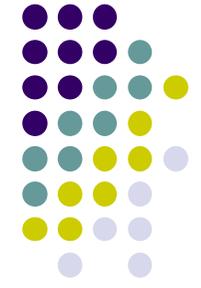
4: MeWo +AcT療法で

11日間培養後のリンパ球



培養後のcPBLによるMHC非拘束性細胞傷害反応

LAK細胞による細胞傷害機構



— パーフォリン ★ グランザイムB (GrB)

療法後cPBL 療法前cPBL

GrB



β -actin



AcT療法で培養したcPBLにおけるGrB mRNAの発現

AcT療法で培養されたcPBL

MHC非拘束性の細胞傷害活性
グランザイム Bの発現

≒ヒトLAK活性

||

AcT療法によってcPBLからイヌLAK細胞が誘導された

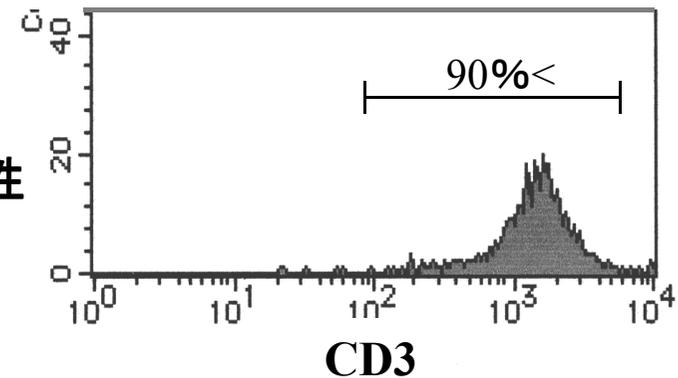


MHC非拘束性細胞傷害能を有するヒトリンパ球

||

NKG2D陽性 { NK細胞
NKT細胞
 $\gamma\delta$ T細胞
(一部の)
CD8 T細胞

培養後cPBLは
90%以上がCD3陽性



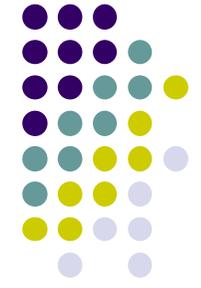
採血→cPBLの分離→培養 (AcT療法) →移入

1週間毎に4 or 5 times

2日後

cPBLを採取

細胞傷害性試験



1: MeWoのみ

2: MeWo + LAK細胞移入前の新鮮cPBL

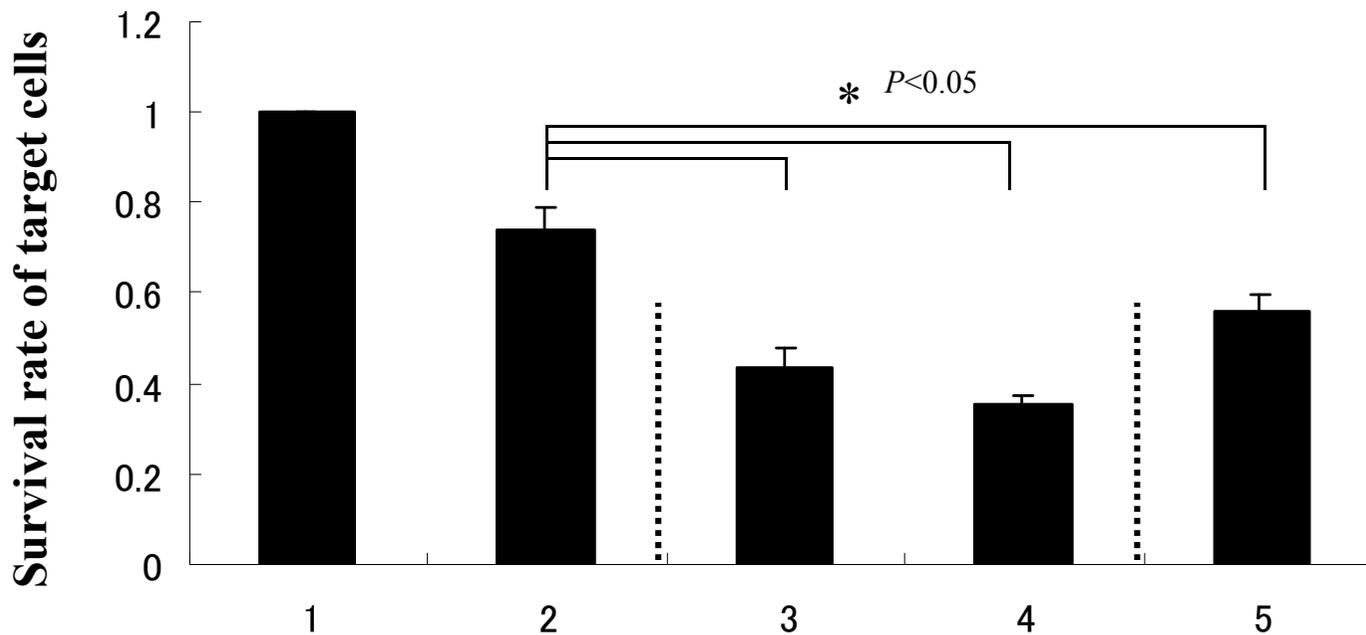
3: MeWo + LAK細胞, 4回移入後の新鮮cPBL

4: MeWo + LAK細胞, 5回移入後の新鮮cPBL

Dog 1

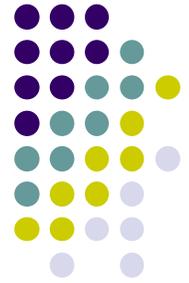
Dog 2

5: MeWo + LAK細胞, 4回移入後の新鮮cPBL



イヌLAK細胞移入後の新鮮cPBLによるMHC非拘束性細胞傷害反応

イヌLAK細胞を用いた免疫細胞療法による イヌ膀胱がんに対する治療効果



イヌ膀胱ガン

●発生率は0.5%~2%。近年発生数は漸増。

●膀胱三角部に好発。

➡ 外科的治療による切除が困難

●診断時には粘膜深部まで浸潤していることが多い。

➡ 再発や転移の危険性が非常に高い

外科的切除のみによる治療: 平均生存期間: 86日 (3~397日)

(J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 1994)

●化学療法に対する反応性に乏しい。 高い確率で副作用を伴う。

・ドキシソルビシン/シクロフォスファミドの併用

➡ 平均生存期間: 259日 (62~485日)

(J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 1994)

・シスプラチン/ピロキシカムの併用

➡ 平均生存期間: 246日 (46~800日)

(Cancer Chemother. Pharmacol. 2000)

患畜

スコッチテリア。メス，7才。

血尿を主訴として来院。

- ・血液学的検査—異常なし
- ・尿沈査—赤血球，リンパ球が多数存在
- ・X線検査—結石様の陰影は認められず
- ・超音波検査—膀胱内に腫瘤が存在

治療および経過

10日間の抗生剤投与

↓

血尿止まらず
排尿困難

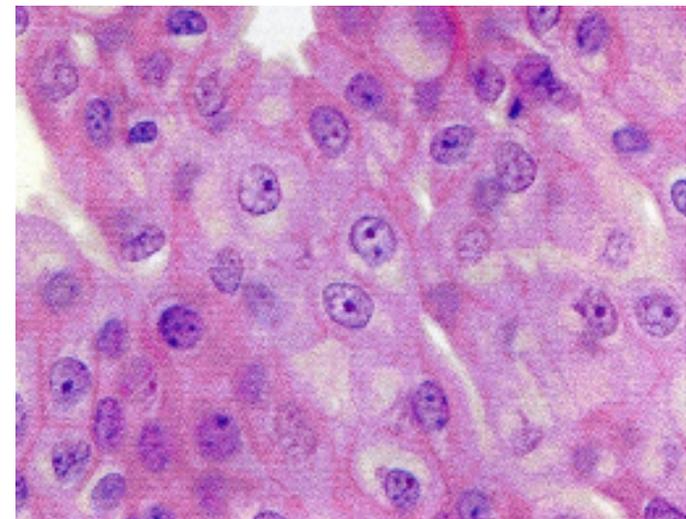
↓

開腹し，腫瘤を切除

診断

移行上皮がん

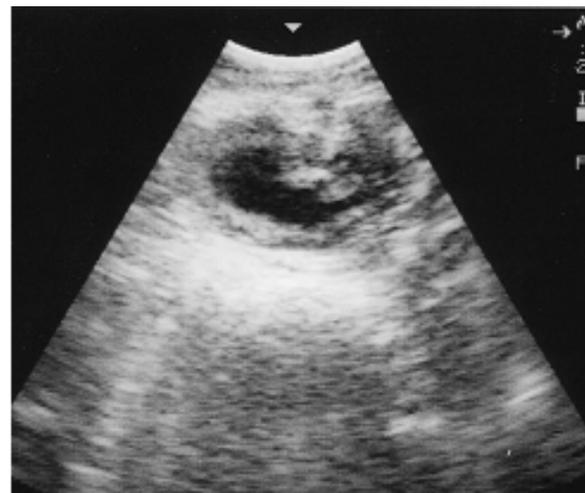
膀胱三角部に存在。Staging: T2N0M0



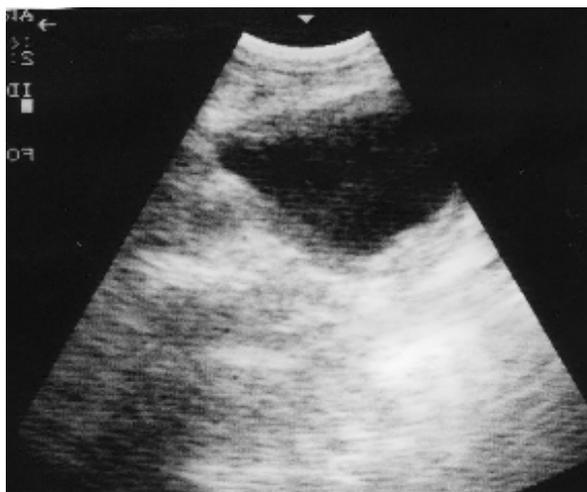
術後, 1週間毎に計6回LAK細胞を移入。
その後は3週間毎に移入。 術前



術後30日目



術後45日目



術後7ヵ月後



膀胱のエコー像

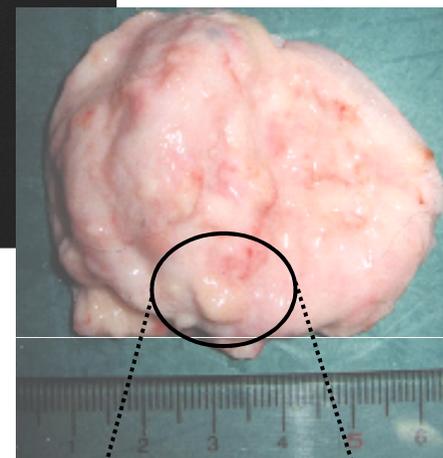
術後8ヵ月後



術後18ヵ月後



死後
(術後30ヵ月後)



膀胱のエコー像

術後, 903日間生存。

生存期間中, 排尿困難や他の腫瘍性疾患を疑う症状は認められなかった。

死因

肺水腫による呼吸困難
(病理検査では肺胞水腫の所見)

肺組織に腫瘍性細胞の存在は確認されなかった。