



# Growth and Immunogenicity of Human Glioma in Severe Combined Immunodeficiency-human Mice

澤, 秀樹

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1519

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001519>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	さわ 秀 樹 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1031号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成8年3月31日
学位論文題目	Growth and Immunogenicity of Human Glioma in Severe Combined Immunodeficiency-human Mice (SCID-huマウスにおけるヒト神経膠腫の増殖と浸潤リンパ球の解析)
審査委員	主査 教授 玉 木 紀 彦 教授 伊 東 宏 教授 岡 村 均

## 論文内容の要旨

### 1. 目的

従来、腫瘍細胞等の異種細胞の移植系として先天的に胸腺が欠如したヌードマウスが用いられてきた。近年、BosmaらはT細胞・B細胞機能の両者を欠いたマウスを発見し、このマウスはヒト重症複合免疫不全症(severe combined immune deficiency)に類似した症状を呈するためSCIDマウスと命名されている。

SCIDマウスの免疫能に関しては、遺伝子の再構成異常による抗原レセプター発現の欠如からT細胞・B細胞は分化を停止し、この原因遺伝子としてp350から同定されている。このためT細胞・B細胞の機能不全が出現している。一方、抗原提示能、natural killer (NK) 活性には異常はみられていない。

T細胞の欠如したヌードマウスでは異種細胞の生着を阻む因子としてNK活性、antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) 活性があげられるが、SCIDマウスではADCC活性が無いため高率に異種細胞可移植性が期待される。

さらにSCIDマウスではヒトリンパ球が生着することが知られており、そのマウス(SCID-huマウス)では末梢血中にT細胞、免疫グロブリンが認められている。このためSCID-huマウスはヒト腫瘍と免疫系との反応を研究するモデル考えられる。本研究の目的はヒト神経膠腫の免疫応答研究のin vivo系としてSCID-huマウスを確立することである。

### 2. 方法

#### 1) ヒトリンパ球およびヒト脳腫瘍細胞株のSCIDマウスへの移植

ヒト悪性神経膠腫細胞株U-251MG, KNS-42, T-98G, SF-188, A-172を6週齢のSCIDマウス皮下に移植した。さらに4週間後ヒト末梢血から分離したリンパ球を抗asialo GM1抗体とともにSCIDマウス腹腔に移植した。またコントロールとしてリンパ球移植のみのSCIDマウスを作成した。腫瘍細胞が生着したのを確認し、リンパ球移植8週後に脾臓および腫瘍塊を摘出した。

#### 2) ヒト免疫グロブリンの測定

末梢リンパ球移植後1, 3, 4, 5週後に採血し、ELISAにて血清中のヒト免疫グロブリンG (IgG) 濃度を測定した。

### 3) 組織学的・免疫組織化学的検索

摘出した脾臓と腫瘍塊を10%ホルマリンにて固定後、パラフィンに包埋し6  $\mu$ mの切片を作製した。H-E染色にて組織学的に検索した。さらにヒトモノクローナル抗体CD45RO, CD20, CD56を用い生着および浸潤リンパ球をABC法にて免疫組織化学的に検索した。

### 4) フローサイトメトリーによる生着リンパ球の解析

摘出した脾臓から脾細胞を取り出し、脾細胞をPE標識CD4, CD8, CD19を用い染色した。FACS canを用い生着リンパ球を解析した。

## 3. 結果

### 1) SCIDマウスへの脳腫瘍可移植性

移植脳腫瘍細胞株のうちU-251MGとKNS-42がSCIDマウス皮下に生着した。U-251MGでは移植2-3ヶ月後に腫瘍塊を形成し、KNS-42では1-2ヶ月後であった。腫瘍は肉眼的に周囲組織へ浸潤せず、転移も認められなかった。

### 2) ヒトリンパ球生着の検討

摘出した脾臓は著しく肥大、免疫組織学的にはヒトCD20, CD45RO, CD56陽性細胞が認められた。フローサイトメトリーによる解析ではヒトCD4, CD8陽性細胞が約10%, CD19陽性細胞が約30%存在していた。また血中ヒトIgGの産生が認められ、3週後には最大値に達してした。

### 3) 腫瘍内浸潤リンパ球の検討

U-251MGでは腫瘍は皮下に局限し、周囲への浸潤は認められなかった。組織学的には紡錘形から楕円形の腫瘍細胞が増生し、壊死も認められた。また、多数のリンパ球が腫瘍内に浸潤していた。免疫組織化学的には多くの部位でCD45RO陽性細胞、所々にCD20陽性細胞、辺縁部にCD56陽性細胞の浸潤がみられた。

KNS-42でも腫瘍は皮下に局限し、周囲への浸潤は認められなかった。腫瘍形成したKNS-42のH-E染色所見では、紡錘形の腫瘍細胞が増生し、一部にリンパ球の浸潤が認められた。しかし、U-251MGに較べリンパ球浸潤の程度は軽度であった。免疫組織化学的には、腫瘍の周辺壊死部でCD45RO陽性細胞の浸潤を認めた。CD20陽性細胞、CD56陽性細胞の浸潤は認められなかった。

## 4. 考察

本研究でヒト悪性神経膠腫細胞株U-251MG, KNS-42はSCIDマウスにおいて皮下腫瘍を形成し、SF-188, A-172, T-98Gは形成しないことが示された。また、腫瘍形成マウスにヒト末梢リンパ球を移植することによりSCID-huマウスが作成でき、SCID-huマウスでは、腫瘍内にリンパ球浸潤が起こりうることを示された。

### 1) 腫瘍下移植性

ヌードマウスは種々のヒト腫瘍形成に利用されてきたが、SCIDマウスはより高度な免疫不全を有するため腫瘍移植に対しより有効性が高いと考えられる。近年、ヒト悪性神経膠腫がSCIDマウスに生着することが報告され、本研究においても5種類の神経膠腫細胞株の中で2種類がSCIDマウスへの移植可能であった。これはSCIDマウスへの移植が移植腫瘍の免疫原性に依存することを示唆している。

SCIDマウスは免疫不全動物であるがNK活性と抗原提示能は正常であり、多くの神経膠種はNK細胞に感受性があることが示されている。今後、さらにNK細胞と悪性神経膠種の相互作用に対する研究が必要と考えられる。

## 2) SCID-hu系

正常ヒト血球成分の移植はSCIDマウスが発見されるまで困難であった。McCuneらによりSCID-huマウスが作成され、末梢血中にヒト成熟B細胞、T細胞が出現し、ヒト免疫グロブリンが産生されることが示された。さらにヒト幹細胞を移植し、ヒトサイトカインにより刺激を行うとマウス骨髄中で分裂、成熟が引き起こされることが示されている。本研究でも同結果が得られており、SCID-hu系がヒト免疫系の再構築モデルとして有用であることが示された。

## 3) 腫瘍内浸潤リンパ球の解析

従来、能は免疫学的聖域と考えられていたが、悪性神経膠種内にリンパ球が浸潤することが認識されてきた。浸潤リンパ球はCD8陽性細胞障害性細胞、マクロファージ、NK前駆細胞から構成されている。浸潤リンパ球はin vitroでは腫瘍特異的細胞障害性を有しているが、in vivoではこの作用は種々の因子により抑制されている。

頭蓋内移植腫瘍および皮下移植腫瘍内浸潤リンパ球の細胞障害性には差は認められないことが報告されており、皮下移植悪性神経膠種は頭蓋内悪性神経膠種と同様の生物学的活性有すると考えられる。本研究ではB細胞、T細胞、NK細胞が腫瘍内に浸潤していたが、移植腫瘍により浸潤リンパ球の構成成分、程度に差が認められた。これは移植腫瘍の免疫原性およびサイトカイン産生能のよると考えられた。また、腫瘍内にB細胞が浸潤しており、B細胞が腫瘍免疫に重要な役割を有していることが示唆された。

SCID-huマウスにおいて移植リンパ球がヒト生体内と同様に反応することが示され、SCID-huマウスがヒト悪性神経膠種研究の重要な系となりうると考えられた。さらに免疫療法の治療効果判定にも有用と考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

●近年、BosmaらはT細胞・B細胞機能の両者を欠いたマウスを発見し、このマウスはヒト重症複合免疫不全症 (severe combined immune deficiency) に類似した症状を呈するためSCIDマウスと命名されている。SCIDマウスはT細胞、B細胞機能を欠いているが、抗原提示能、natural killer (NK) 活性には異常はみられず、antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) 活性が無いため高率に異種細胞可移植性が期待される。さらにSCIDマウスではヒトリンパ球が生着することが知られており、そのマウス (SCID-huマウス) では末梢血中にT細胞、免疫グロブリンが認められている。このためSCID-huマウスはヒト腫瘍と免疫系との反応を研究するモデルと考えられる。本研究の目的はSCID-huマウスを用いて、ヒト神経膠腫の免疫応答研究のin vivo系を確立することである。

●方法：ヒトリンパ球およびヒト脳腫瘍細胞株のSCIDマウスへの移植は次のように行った。ヒト悪性神経膠腫細胞株U-251MG, KNS-42, T-98G, SF-188, A-172を6週齢のSCIDマウス皮下に移植、さらに4週間後ヒト末梢血から分離したリンパ球を抗asialo GM1抗体とともにSCIDマウス腹腔に移植した。またコントロールとしてリンパ球移植のみのSCIDマウスを作成した。腫瘍細胞が生着したのを確認し、リンパ球移植8週後に脾臓および腫瘍塊を摘出した。摘出した脾臓と腫瘍塊をH-E染

色にて組織学的に検索し、さらにヒトモノクローナル抗体CD45RO, CD20, CD56を用い生着および浸潤リンパ球をABC法にて免疫組織化学的に検索した。

●結果：

1) SCIDマウスへの脳腫瘍可移植性については、移植脳腫瘍細胞株のうちU-251MGとKNS-42がSCIDマウス皮下に生着した。腫瘍は肉眼的に周囲組織へ浸潤せず、転移も認められなかった。

2) 腫瘍内浸潤リンパ球の検討を行うと、U-251MG生着腫瘍では多数のリンパ球が腫瘍内に浸潤し、CD45RO陽性細胞、CD20陽性細胞、CD56陽性細胞の浸潤がみられた。KNS-42生着腫瘍でもリンパ球の浸潤が認められたが、U-251MGに較べリンパ球浸潤の程度は軽度であり、CD45RO陽性細胞の浸潤のみであった。

●考察：本研究において5種類の神経膠種細胞株の中で2種類がSCIDマウスへの移植が可能であった。これはSCIDマウスへの移植が移植腫瘍の免疫原性に依存することが示唆された。

移植悪性神経膠種は頭蓋内悪性神経膠種と同様の生物学的活性有すると考えられ、本研究ではB細胞、T細胞、NK細胞が腫瘍内に浸潤していたが、移植腫瘍により浸潤リンパ球の構成成分、程度に差が認められた。これは移植腫瘍の免疫原性およびサイトカイン産生能によると考えられた。また、腫瘍内にB細胞が浸潤しており、B細胞が腫瘍免疫に重要な役割を有していることが示唆された。

SCID-huマウスにおいてヒト生体内と同様に免疫応答が行われていることが示され、SCID-huマウスがヒト悪性神経膠種研究の重要な系となりうると考えられた。

本研究は、SCID-huマウスをもちいてヒト悪性神経膠腫の腫瘍可移植性と腫瘍内浸潤リンパ球について研究したものであるが、従来ほとんどなかった生きた動物でより臨床に近い悪性神経膠腫細胞に関する実験が検定できる優れた実験系を確立すると共に、脳腫瘍の免疫機構の解明について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。