

## 論文内容の要旨

報告番号		氏名	田中 祥貴
Ex vivo-expanded highly purified natural killer cells in combination with temozolomide induce antitumor effects in human glioblastoma cells in vitro (高純度 natural killer 細胞及び temozolomide 併用によるヒト膠芽腫細胞に対する抗腫瘍効果の研究)			

### 論文内容の要旨

【目的】Natural killer (NK) 細胞を用いた免疫治療において膠芽腫 (GBM) に対する治療効果が報告されているが、末梢血単核細胞より従来法で得られる NK 細胞、いわゆる LAK (Lymphokine-Activated Killer) はその純度と増幅効率が低いことが臨床応用における障壁の一つとなっていた。我々はこれらの問題を解決した NK 細胞の新規増幅培養法を確立し、GBM 細胞に対する抗腫瘍効果ならびに GBM に対する標準的な抗腫瘍治療薬である Temozolomide (TMZ) との併用効果を検証した。新規増幅培養法で得られた細胞群は Genuine-induced NK cell (GiNK) と命名した。

【方法】GiNK は支持細胞を用いない既知化学組成培地で増幅培養を実施した。GiNK における NK 細胞 (CD3- /CD56+細胞) の純度、増幅倍率、NK 活性、調節性 T 細胞 (Treg: regulatory T cell) の頻度、GiNK に発現する受容体および GBM 細胞株 (GBMC: TMZ 感受性株 U87MG、TMZ 耐性株 T98G、LN-18) に発現する NK 細胞発現受容体に対するリガンドの発現解析を免疫蛍光抗体法を用いて実施した。加えて、GiNK の GBMC に対する抗腫瘍効果ならびにその機序の解析を行った。抗腫瘍効果解析として GiNK と TMZ を用いて各種条件下で GBMC を培養し、生細胞数を算定した。機序解析として apoptosis (annexin-V FITC+ /PI- 細胞の頻度解析) および senescence (SA-β-gal+細胞の頻度解析) 誘導効果解析を行った。

【結果】GiNK は LAK と比較し NK 細胞の頻度、増幅倍率、NK 活性において有意に高く、Treg の出現頻度は有意に低かった。GiNK は解析したすべての GBMC に対して有意な増殖抑制効果を示した。U87MG では GiNK と TMZ 併用群において TMZ の相加効果を認めた。apoptosis 誘導効果解析において、GiNK は解析した GBMC に対して apoptosis 誘導効果を示した。TMZ は U87MG に対して SA-β-gal+ 細胞の有意な増加を示したが、apoptosis 誘導効果の増強は示さなかった。

【考察・結語】臨床応用可能かつ効率的な高純度 NK 細胞の増幅培養法を確立した。GiNK は *in vitro* において TMZ の感受性に関わらず GBMC に対して apoptosis 誘導効果を示し、特に TMZ 感受性株に対しては TMZ 誘導性 senescence による増殖抑制の相加効果を示した。GiNK を用いた免疫治療は GBM に対する有用な免疫療法の一つとなる可能性がある。(1105 文字)