シンポジウム

呼吸器・消化器領域の扁平上皮癌

細胞分子レベルからの解析

T-cell レベルから

頭頸部扁平上皮癌を認識する細胞障害性T細胞について

安 村 敏

**A Human Cytotoxic T Cell Line with Restricted Specificity for
Squamous Cell Carcinoma**

Satoshi Yasumura, M.D., Ph.D.

Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,

Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama

Human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) lines with specificity restricted for autologous squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) were established from peripheral blood lymphocytes (PBL) obtained from a patient with cancer of the tongue. The CTL lines were CD3⁺CD8⁺CD11b⁻HLA-DR⁺T cell receptors (TCR) α/β^+ . They were tested in 4 h ⁵¹Cr-release assays against SCCHN cell lines (n=11) and a variety of non-squamous human tumors (n=9) and normal (n=5) cell targets. They were found to lyse only autologous tumor (AuTu, PCI-50) and seven allogeneic SCCHN cell lines. Of these tumor cell lines, three cell lines shared a HLA-A2 locus with the AuTu, while the other two lines shared HLA-B44 with AuTu. Lysis of AuTu and the allogeneic SCCHN targets of the established CTL lines appeared to be MHC-class I restricted. The CTL lines proliferated *in vitro* in response to autologous PCI-50 or an allogeneic SCCHN cell line. Analysis of the TCR β chain genes for the CTL and CTL clones indicated that two different CTL populations (V β 6 and V β 2) are able to recognize SCCHN-associated antigen(s) and that V β 6 T cells are HLA-A2-restricted, while V β 2 T cells may be HLA-B44-restricted.

While the growth of PCI-50 cells in culture was significantly inhibited by the supernatants of A-NK cells, those of the CTL line were not growth inhibitory. On the other hand, the lysis of AuTu targets by the CTL line was increased by preincubation of tumor cells with TNF α or IFN γ . These cytokines augmented the expression of HLA-class I, HLA-class II and intercellular adhesion molecule I (ICAM-I) on PCI-50 cells. The CTL incubated in the presence of HLA-A2 SCCHNs but not HLA-A2 gastric carcinoma produced TNF α , IFN γ and GM-CSF.

Key words : cytotoxic T lymphocytes, squamous cell carcinoma of the head and neck, tumor cell lysis, tumor sensitivity to CTL

I. はじめに

ヒト扁平上皮癌の免疫学的特性として、末梢血中のNK (natural killer) 細胞、リンパ節リンパ球、腫瘍浸潤リンパ球に抵抗性であるが、LAK (lymphokine-activated killer) 細胞、A-NK (activated-NK) 細胞などのエフェクター細胞、またはA-NK 細胞上清、サイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-2) に対し感受性が高いこと^{1,2)}、また、活性化抗原の表出、各種サイトカインの誘導により、NK 細胞を活性化させるなどが挙げられる。

一方、扁平上皮癌組織中には比較的多くのリンパ球の浸潤が観察されるが、患者より得られた末梢血リンパ球、リンパ節リンパ球、腫瘍浸潤リンパ球に自己の癌に特異的に反応する細胞障害性T細胞 (CTL) は、これまで認められていなかった³⁾。したがって、癌免疫の中心的役割を果たしているエフェクター細胞は細胞障害性T細胞 (CTL) であると考えられているが、CTL が頭頸部腫瘍においてどのように働いているかは不明な点が多い。

本研究では、ヒト扁平上皮癌に対するCTLの誘導に初めて成功し、CTLによる癌細胞障害機構についての解析を行った^{4,5)}。また、各種サイトカイン、エフェクター細胞上清の扁平上皮癌株に与える成長抑制、CTLに対する感受性の変化を *in vitro* で検討した。

II. 材料および方法

1. ヒト扁平上皮癌株 (PCI-50) の樹立

92歳男性の舌癌患者 (T2N0M0, 病理診断 高分化型扁平上皮癌) の新鮮手術標本を1~2 mm³ に細切後、15% FBS 添加 Eagle の MEM 培地にて培養した。樹立までに4カ月間要した。

2. 末梢血リンパ球の分離とPCI-50に対するCTLの誘導

患者の末梢血の採取を術前、術後18カ月、20カ月に行った。末梢血より Ficoll-Hypaque 法にてリンパ球 (PBL) を分取し、Interleukin 2 (IL2 300 IU/ml), Interleukin 4 (IL4 300 U/ml), PHA-P (5 μ g/ml) を混じた AIM-V 培地で2週間培養した。その後、リンパ球と viable monolayer PCI-50細胞をL:T比 5:1と

し、混合培養をIL2 (300 IU/ml), IL4 (300 U/ml) の存在下で開始した。培養リンパ球の数、表面マーカー、細胞障害活性を経時的にモニターした。

3. 細胞障害活性試験

PCI-1, -2, -4A, -4B, -13, -14, -23, -30, -34, -38 (非自己扁平上皮癌), PCI-50 (自己扁平上皮癌), K562 (赤白血病細胞), Daudi (B細胞リンパ腫), LP, SW (胆管細胞癌), HR (胃癌), 正常線維芽細胞 (n=2), 正常ケラチノサイト (n=3) を標的細胞として用いた。標的細胞を Na₂⁵¹CrO₄ で標識し、96穴V型プレートにE:T比25:1~3:1となるようエフェクター細胞と標的細胞 (1000細胞/well) を添加後、1000 rpm で5分間遠心した。4時間後上清に含まれるクロムの放射活性をベーターカウンターで測定し、細胞障害活性を計算した。細胞障害活性は細胞障害活性単位 (lytic unit: LU) で表した。1 LU は1000個の標的細胞の20%を傷害するのに必要なエフェクター細胞数と定義し、10 M エフェクター細胞に存在する単位数を計算した。

4. Blocking Test

CTLの細胞障害機序を調べるため、4時間クロム遊離試験前にCTLまたは標的細胞を各種抗体で処理し、細胞障害活性の抑制率を求めた。

5. PCI-50細胞の成長に及ぼすサイトカインまたはエフェクター細胞培養上清の影響

96穴平板底プレートでサイトカインまたはエフェクター細胞培養上清存在下にPCI-50細胞 (5000個/well) を3日間培養し、MTT法にて細胞増殖能を測定した。

6. フローサイトメトリーによる表面抗原の解析

CTLに対して、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD11b抗体、抗CD56抗体、抗TCR α/β 抗体で、PCI-50に対して抗ICAM-1抗体、抗HLAクラスI抗体、抗DR抗体を用いて染色し、FACScanにて表面抗原の解析を行った。

7. 抗原誘導性CTL増殖反応

CTLを照射した癌細胞とともに3日間培養した後、16時間のトリチウムサイミジンの取り

込みを計測した。

III 結 果

舌癌患者からの手術標本より、扁平上皮癌株 (PCI-50) を樹立した。この扁平上皮癌株は、ヌードマウスにおいて腫瘍原性を示し、また NK 細胞に抵抗性であった (9 ± 4 LU) が、ANK 細胞に高い感受性を示した (2369 ± 580 LU)。PCI-50 を患者リンパ球とともに、IL-2 と IL-4 の存在下に培養し、経時的に、CTL の細

胞障害活性を測定した。その結果、培養開始後 6 週目より PCI-50 に対する特異的な細胞障害活性が誘導され、10 週で最高値に達した (1125 LU)。それとともに、 $CD3^+CD4^-CD8^+CD11\beta^+$ HLA-DR⁺TCR (α/β)⁺ の CTL に一致する表面抗原を示す細胞が主体を占め (図 1), その後、18 週までこの活性が維持された。また同様の方法で、術後 2 年にわたり再発のない患者のリンパ球から繰り返し CTL は誘導され、自己の癌を認識する CTL は腫瘍の摘出後も長く末梢血

図 1 PCI-50 に対する CTL の誘導
(A) K562 細胞, Daudi 細胞, PCI-50 細胞に対する末梢血リンパ球の細胞障害活性の変化。末梢血リンパ球は、IL2, IL4 の存在下で、PCI-50 細胞と L : T 比 5 : 1 で混合培養された。(B) 同時に測定された末梢血リンパ球の表面マーカーの変化。

図 2 誘導された CTL の各種細胞に対する抗腫瘍活性

に存在することが証明された。

この CTL は自己の扁平上皮癌 (PCI-50) のみならず他の HLA-A2, または B44 を共有する扁平上皮癌株を傷害したが, 非扁平上皮癌細胞な

表 1 CTL の HLA-A2 または B44 陽性ヒト扁平上皮癌細胞に対する細胞障害活性

	4-h ⁵¹ Cr-release assay (mean LU)	
	10 weeks culture	16 weeks culture
HLA-A2 ⁺ targets		
AuTu (PCI-50)	1125	386
PCI-13	1421	786
PCI-30	49	ND
PCI-38	50	0
HLA-A2 ⁻ B44 ⁺ targets		
PCI-4A	47	ND
PCI-4B	300	412
PCI-23	0	ND
HLA-A2 ⁻ B44 ⁻ targets		
PCI-34	0	ND

らびに正常細胞は傷害しなかった (図 2, 表 1)。さらに, CTL の細胞障害活性は, 抗クラス I 抗体, 抗 HLA-A2 抗体, 抗体 HLA-B 抗体, 抗 CD3 抗体, 抗 CD8 抗体, 抗 TCR 抗体により阻害され, これらの細胞障害活性は MHC-Class I 拘束性であることが示された (表 2)。

PCI-50 を TNF α , IFN γ もしくはその両者で 3 日間前処置することにより, CTL の PCI-50 に対する細胞障害活性は有意に増強したが (コントロール 853 $\pm$ 31 LU, TNF α 処理群 1096 $\pm$ 130 LU, IFN γ 処理群 1624 $\pm$ 219 LU, TNF α + IFN γ 処理群 1266 $\pm$ 254 LU), これは サイトカインによる癌細胞表面上の MHC-Class I ならびに ICAM-I 表出の増強によるものと考えられた。

また, CTL の増殖能は PCI-50 ならびに PCI-1 の抗原刺激で増強したが, 胃癌細胞株またはケラチノサイトには反応しなかった。CTL はこれらの特異的増殖反応とともに, サイトカイン (TNF α , IFN γ と GM-CSF) を産生した⁵⁾。一方, PCI-50 は CTL 培養上清と IFN γ に抵抗性であったが, IL2 と IFN γ の併用, また高濃度の

表 2 CTL ならびに V β 6 陽性 CTL クローンの細胞障害活性への各種抗体による blocking 効果

	Bulk CTL			Clone 14 (V β 6 ⁺)		
	PCI-4B (A2 ⁺ B44 ⁺)	PCI-13 (A2 ⁺ B44 ⁻)	PCI-50 (A2 ⁺ B44 ⁺)	PCI-4B (A2 ⁺ B44 ⁺)	PCI-13 (A2 ⁺ B44 ⁻)	PCI-50 (A2 ⁺ B44 ⁺)
Medium	22 $\pm$ 1	50 $\pm$ 1	51 $\pm$ 1	— 2	32 $\pm$ 2	35 $\pm$ 3
IgG ₁ control	21 $\pm$ 3 (5) ²	46 $\pm$ 2 (8)	51 $\pm$ 6 (0.4)	ND	29 $\pm$ 1 (8)	32 $\pm$ 1 (9)
Anti-CD3	3 $\pm$ 2 [*] (87)	8 $\pm$ 1 [*] (84)	3 $\pm$ 3 [*] (94)	ND	3 $\pm$ 1 [*] (90)	7 $\pm$ 1 [*] (82)
Anti-CD8	5 $\pm$ 3 [*] (77)	17 $\pm$ 6 [*] (65)	5 $\pm$ 2 [*] (90)	ND	12 $\pm$ 1 [*] (62)	6 $\pm$ 2 [*] (82)
Anti-MHC-class I	9 $\pm$ 3 [*] (59)	11 $\pm$ 2 [*] (78)	13 $\pm$ 4 [*] (74)	ND	10 $\pm$ 1 [*] (68)	13 $\pm$ 2 [*] (62)
MA2.1 (Anti-MHC-A2)	19 $\pm$ 3 (19)	22 $\pm$ 1 [*] (56)	23 $\pm$ 6 [*] (55)	ND	14 $\pm$ 1 [*] (55)	8 $\pm$ 1 [*] (78)
BB7.2 (Anti-MHC-A2)	21 $\pm$ 3 (3)	18 $\pm$ 4 [*] (65)	25 $\pm$ 2 [*] (51)	ND	14 $\pm$ 3 [*] (57)	11 $\pm$ 3 [*] (68)

4 時間クロム遊離試験前に CTL または標的細胞を各種抗体で処理し, E:T 比 12:1 で細胞障害活性の抑制率を求めた。表の値は, 1 LU は 1000 個の標的細胞の 20% を傷害するのに必要なエフェクター細胞数と定義し, 10 M エフェクター細胞に存在する単位数を 3 回行った実験の平均値と標準偏差で示す。

*コントロールとの比較で P < 0.01。

TNF α , ANK 培養上清により増殖が有意に抑制された⁴⁾。

CTL のクローニングと定量的 PCR 法による解析により, 癌を傷害する CTL は特定の V β 領域 (V β 2, V β 6) を用いていることが明らかになった。さらに, V β 6陽性 CTL は HLA-A2 を持つ扁平上皮癌のみを傷害し, また抗 HLA-A2 抗体でその細胞障害活性が抑制されたため, V β 2陽性 CTL が HLA-B44 を共有するものを傷害すると推測された (表 2)。

IV. 考 察

これらの研究より, PCI-50 に対する CTL の誘導には癌細胞の持続的な抗原刺激, さらに IL-2 と IL-4 などの T 細胞増殖因子が必要であり, 自己の癌を認識する CTL の前駆細胞が腫瘍摘出後も長期間にわたり末梢血に存在することが証明された。また, サイトカインが, 癌細胞表面の ICAM-1 やクラス I の発現を増強させ, CTL の抗腫瘍活性を高めることより, CTL とサイトカインの併用療法が扁平上皮癌の治療に有用であることが示された。さらに, CTL は PCI-50 のみならず, 他の扁平上皮癌株を傷害することより, CTL に認識される癌特異抗原が, 扁平上皮癌に共通して発現していることが示唆された。

最近, CTL によって認識される悪性黒色腫に発現する癌特異抗原が同定され⁶⁾, それを用いた癌ワクチンの臨床応用がアメリカで計画されている。将来的には同様に扁平上皮癌に対するワクチン治療の可能性が考えられ, 現在 CTL クローンの認識するペプチドの同定が進行中である。

V. ま と め

ヒト扁平上皮癌を認識する CTL を誘導し, その解析を行った。このエフェクター細胞は ANK 細胞と比較して, 特異的な抗腫瘍活性が

強く, サイトカインとともに癌免疫療法に有用であると思われる。また少なくとも一部の宿主で癌特異抗原は認識されていると考えられ, それに対する CTL precursor が長く末梢血中に存在していることが示された。今後, より詳細に癌認識機構が解明され, より特異的かつ効果的な癌免疫療法の確立が期待される。

本論文の要旨は第46回日本気管食道科学会 (1994年10月, 宇都宮) において発表した。

文 献

- 1) Heo, D.S., Snyderman, C., Gollin, S.M., et al.: Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.*, 49: 5167-5175, 1989.
- 2) Rabinowich, H., Vitolo, D., Altarac, S., et al.: The role of cytokines in the adoptive immunotherapy in an experimental model of human head and neck cancer by human IL2-activated NK cells. *J. Immunol.*, 149: 340-349, 1992.
- 3) Letessier, E. M., Heo, D. S., Okarma, T., et al.: Enrichment in tumor-reactive CD8⁺ lymphocytes by positive selection from the blood and lymph nodes of patients with head and neck cancer. *Cancer Res.*, 51: 3891-3899, 1991.
- 4) Yasumura, S., Hirabayashi, H., Schwartz, R., et al.: Human cytotoxic T-cell lines with restricted specificity for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.*, 53: 1461-1468, 1993.
- 5) Yasumura, S., Weidmann, E., Hirabayashi, H., et al.: HLA restriction and T-cell receptor V β gene expression of cytotoxic T lymphocytes reactive with human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int. J. Cancer*, 57: 297-305, 1994.
- 6) Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., et al.: Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 180: 347-352, 1994.