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

サイトカインレベルから
頭頸部扁平上皮癌培養細胞より産生される物質の研究

平 林 秀 樹

**A Study of the Soluble Factors Derived from Human Squamous Cell
Carcinoma of the Head and Neck Cell Lines**

Hideki Hirabayashi, M.D.

Department of Broncho-Esophagology, Dokkyo University School of Medicine, Tochigi

Human solid tumors are capable of producing factors that suppress the host immune system and facilitate tumor growth. On the other hand, squamous cell carcinomas of the head and neck (SCCHN) cell lines (PCI-1) have been reported capable of activating human NK cells upon short co-incubation *in vitro* and expression of mRNA for cytokines.

The purposes of this study were to test the supernatants (SN) of human squamous cell carcinomas of the head and neck cell lines (PCI-50) for the presence of soluble factors capable of inducing activation and proliferation of human immune cells.

The SN of PCI-50 induced and significantly sustained proliferation of human PBL as well as NK and CD4⁺T cells in culture. Purified human NK or CD4⁺T cells cultured in the presence of SN plus IL2 (120 IU/ml) had significantly higher anti-tumor cytotoxicity than that mediated by NK or CD4⁺T cells culture in AIM-V medium plus IL2. SN promoted expression of the following activations on NK and CD4⁺T cells: CD25, HLA-DR, CD54, CD71, and CD69. When SN was fractionated by Amicon filtration into >30 kDa and <30 kDa fractions, the growth and cytotoxicity-promoting activities were consistently detectable in the >30 kDa fraction.

Our results indicate that cultured SN of SCCHN cell lines contain a soluble factor(s) capable of activating NK and CD4⁺T cells and of promoting the growth and anti-tumor cytotoxicity of these lymphocyte subsets *in vitro*.

Key words : squamous cell carcinoma, soluble factor, immune cell

固形癌より, transforming growth factor beta¹⁾, prostaglandin E2²⁾, p15E glycoprotein³⁾などの免疫抑制成分の産生が報告され, 癌の局

所浸潤, および遠隔転移を促していることが推察されてきた。またこれら癌周囲の免疫抑制は, 原発部位だけでなく頸部リンパ節転移の皮膜外浸潤とも関連すると考えられ, 頭頸部悪性腫瘍の予後に大いに関連していると考えられる^{4,5)}。

獨協医科大学気管食道科学教室

別刷請求: 〒321-02 栃木県下都賀郡壬生町大字北
小林880

獨協医科大学気管食道科 平林秀樹

最近, 頭頸部扁平上皮癌培養細胞株 (PCI-1)

が末梢血より採取されたNK cellの抗腫瘍活性の上昇, 種々のサイトカインのmRNAの発現の亢進が報告された⁶⁾。さらにわれわれは, 頭頸部扁平上皮癌の自己癌に対し特異的対応し, MHC class I束縛性のcytotoxic T cell line (CTL)の末梢血からの樹立に成功し, これを報告した⁷⁾。これらの観察より, 頭頸部扁平上皮癌培養細胞株から何らかの免疫活性物質が産生されていることがうかがわれた。

I. 方 法

1. 細胞上清液の調整

舌癌より樹立された扁平上皮癌培養細胞株 (PCI-50) を無血清培地 (Gibco AIM-V) にて24時間培養し, その細胞上清液を採取し, 遠沈後, 0.5 μ m のフィルターを通し細胞成分を除去し, これをPCI-50上清とした。

2. 免疫エフェクター細胞の採取

正常ボランティアより採取された末梢血よりFicoll-Hypaqueを用いた比重法にて単核球を取り出し, 洗浄後, ナイロンウールおよびプラスチック固着法にて単球およびBリンパ球を除去した。これを末梢血リンパ球 (PBL) とした。さらにPBLに抗CD3 (T細胞) 抗体または抗CD56 (NK細胞) 抗体をそれぞれ0°Cにて30分間吸着させた後, IgGマウス付加磁力ビーズにてT細胞, NK細胞を除去した。NK細胞群, T細胞群はFACScanにてその純度を検定し, それぞれ90%以上であった。

3. 細胞分裂能試験

PBL, NK細胞群およびT細胞群 (5×10^6 /well) は, PCI-50上清またはコントロールのAIM-V培地にIL-2 (120 IU/ml) を加える群と除いた群に分け, それぞれ9日間培養後96穴のU底プレートに移し (5×10^4 /well), ^3H -thymidine (1 mCi/well, 20 Ci/mmol) を加え, 18時間培養後Skatron cell harvesterにて細胞を採取し, ベーターカウンターにて測定した。

4. 細胞障害性試験

NK細胞群およびT細胞群 (5×10^6 /well) は, PCI-50上清またはコントロールのAIM-V培地にIL-2 (120 IU/ml) を加える群と除いた群に分け, それぞれ9日間培養後4時間の ^{51}Cr -

release assayにて測定した。標的細胞はK562を用い, ^{51}Cr (5 mCi/ml) でラベルした。E:T率を12:1から1.5:1とした。4時間, 37°Cにて培養後上清を採取し, ベーターカウンターにて測定した。

5. エフェクター細胞の表面マーカーの検索

FACScanのtwo-color analysisを用いて検索した。モノクローナル抗体はBecton Dickinson社のLeu 4 (anti-CD3), Leu 2a (anti-CD8), Leu 3a (anti-CD4), Leu 19 (anti-CD56), anti-IL-2R- α (anti-CD25), anti-HLA/DR, Leu 23 (anti-CD69), Endogen社のp75IL-2R- β chain, AMAC社のICAM-I (anti-CD54), transferin receptor (anti-CD71) を用いた。

II. 結 果

1. PCI-50上清の免疫エフェクター細胞の分裂能への影響

PBLをPCI-50上清中で9日間培養するとコントロールの無血清培地 (AIM-V) に比べ分裂能が有意に上昇していた ($P < 0.05$)。また, 低濃度のIL-2 (120 IU/ml) を加えると相乗効果が表れた (Table 1)。

NK細胞群においては, 培養液のみでは9日目には死滅するが, PCI-50上清では ^3H -thymidineの取り込みを認める。さらにIL-2を加えると, NK細胞は ^3H -thymidineの取り込みを認めるだけでなく, PCI-50上清との相乗効果も認めた。T細胞群にも同様の現象が観察され, IL-2による相乗効果も認められた (Table 2, 3)。

2. 細胞障害性に対するPCI-50上清の影響

NK細胞は培養液のみでは9日間生存しないが, PCI-50上清中では9日目でもある程度の細胞障害性を示した。さらにIL-2を加えた観察では, NK細胞はPCI-50上清との併用により明らかな相乗効果を認めた (Table 4)。また, T細胞に対してもNK細胞と同様の影響が認められ, PCI-50上清が加わると明らかにT細胞の細胞障害性は増強された (Table 5)。

3. 細胞表面マーカーの検索

PBLを培養液とPCI-50上清で培養後, その表面マーカーを検索した。PCI-50上清にて培養

Table 1 Effects of supernatant of PCI-50 cells on proliferation of normal human PBL^a

No. of experiment	³ H-thymidine uptake (CPM±SD)			
	AIM-V	PCI-50SN ^c	AIM-V + IL2 120 IU/ml	PCI-50SN + IL2 120 IU/ml
1	ND ^b	4,610±792	20,308±3,711	23,729±3,028
2	1,825±1,215	25,580±678	97,502±15,894	88,275±6,780
3	9,934±2,081	25,138±1,523	4,595±847	8,414±2,243
4	525±83	1,199±376		
5	1,518±576	14,017±901		

^aPBL were purified as described in Materials and Methods were incubated in AIM-V medium or PCI-50SN in the presence or absence of IL-2 (120 IU/ml) for 9 days.

^bND, not determined, because PBL did not survive for 9 days in AIM-V medium alone.

^cIn compared to PBL cultured in AIM-V used as control, PBL cultured in the presence of PCI-50SN showed significant ($P<0.05$) higher proliferation.

Table 2 Effects of PCI-50SN on proliferation of NK cells^a

No. of experiment	³ H-thymidine uptake (CPM±SD)			
	AIM-V	PCI-50SN	AIM-V + IL2 120 IU/ml	PCI-50SN + IL2 120 IU/ml
1			2,762±121	36,514±564
2			33,087±560	45,047±870
3			2,559±170	7,249±68
4	ND ^b	13,106±498	22,146±1,147	77,652±1,441
5	ND	17,901±692	35,809±2,496	31,584±1,029
6	ND	3,398±135	14,825±2,129	31,827±4,129

^aNK cells purified as described in Materials and Methods were incubated in AIM-V medium or PCI-50SN in the presence or absence of IL-2 (120 IU/ml) for 9 days. NK cells were transferred in 96 U-bottomed plates (5×10^4 /well) and labeled with 1 μ Ci of [³H]thymidine. Eighteen hours later cells were harvested.

^bND, not determined because NK cells did not survive for 9 days in AIM-V medium.

したPBLは、CD4⁺HLA-DR⁺の細胞が6±3%から35±12%増加し、また培養液の群と比べるとCD3-CD56⁺の細胞も有意に認められた。つまり一般にヘルパーT細胞、NK細胞と呼ばれている細胞群が有意に認められた。

さらに、NK細胞の活性化マーカーであるCD25、HLA-DR、CD54、CD71、CD69は、そ

れぞれ7±8%、9±4%、42±21%、18±20%、26±23%であったが、PCI-50上清で培養すると、71±20%、86±6%、92±3%、79±3%、65±11%と、すべてにおいてPCI-50上清はその発現を有意に増加させた。同様の現象はT細胞に対しても確認された。

Table 3 Effects of supernatant of PCI-50 cells on proliferation of normal human T cells^a

No. of experiment	³ H-thymidine uptake (CPM±SD)			
	AIM-V	PCI-50SN ^c	AIM-V + IL2 120 IU/ml	PCI-50SN + IL2 120 IU/ml ^d
1	ND ^b	26,640±1,608	46,294±885	56,418±2,332
2	6,977±550	14,428±803	25,582±1,571	37,210±1,607
3	568±133	16,945±482		
4	431±96	3,449±286		
5	2,394±168	6,012±113		
6	895±83	5,672±500		
7	518±137	2,628±246	19,836±6,183	39,985±4,837

^aT cells were purified as described in Materials and Methods and incubated in AIM-V medium or PCI-50SN in the presence or absence of IL-2 (120 IU/ml) for 9 days.

^bND; not determined because T cells did not survive for 9 days in AIM-V medium.

^cIn compared to T cells cultured in AIM-V used as control, T cells cultured in the presence of PCI-50SN showed significant ($P<0.05$) higher proliferation.

^dIn compared to T cells cultured in AIM-V plus IL-2, T cells cultured in the presence of PCI-50SN plus IL-2 showed significant ($P<0.05$) higher proliferation.

Table 4 Effects of PCI-50SN on cytotoxicity of human purified NK cell^a

	No. of experiment	AIM-V	PCI-50SN	AIM-V + IL2 120 IU/ml	PCI-50SN + IL2 120 IU/ml
K562 (NK activity)	1			1,035	4,339
	2			1,637	4,573
	3			660	1,506
	4	ND	162	2,353	8,447
	5	ND	664	2,890	5,690
	6	ND	15	2,365	6,503
mean±SD				1,823±862	5,176±2,334 ^b

^aNK cells were purified as described in Materials and Methods were incubated in AIM-V medium or PCI-50SN in the presence or absence of IL-2 (120 IU/ml) for 9 days, then washed and tested in a 4 h ⁵¹Cr release assay. The data showed lytic units (LU₂₀/10⁷ effector cells).

^bSignificantly increased (at $P<0.01$) as compared to the NK cell cultured in AIM-V medium in the presence of IL-2 (120 IU/ml).

ND; not determined, because NK cells did not survive for 9 days in culture.

4. アミコンフィルターを用いた PCI-50上清の分離によるリンパ球分裂能および細胞障害性への影響

アミコンフィルターを用いた PCI-50上清を、分子量30 kDa 以上と30 kDa 以下に分け、PBL に対する分裂能および細胞障害性を検索

Table 5 Effects of PCI-50SN on cytotoxicity of human enriched T cell^a

	No. of experiment	AIM-V	PCI-50SN	AIM-V + IL2 120 IU/ml	PCI-50SN + IL2 120 IU/ml
K562 (NK activity)	1	ND ^b	10	482	696
	2	25	113	87	732
	3	19	357		
	4	0	34		
	5	19	397		
	6	0	48		
		11 ± 12	160 ± 173		

^aT cells were purified as described in Materials and Methods and incubated in AIM-V medium or PCI-50SN in the presence or absence of IL-2 (120 IU/ml) for 9 days, then washed and tested in 4 h ⁵¹Cr release assays. The data are lytic units (LU₂₀/10⁷ effector cells).

^bND; not determined, because T cells did not survive for 9 days in culture.

した。3回の繰り返し実験においても、常に分子量30 kDa以上で、明らかにPBLの分裂能も細胞障害性も増強することが確認された。

III. 考 察

癌の発育を考えたとき、癌より何らかの免疫抑制物質が放出されることにより、リンパ球やマクロファージ等の抗腫瘍作用を抑えることにより、癌自身の発育に都合がよいと考えられてきた⁶⁻¹¹⁾。頭頸部扁平上皮癌でもこれらを裏付ける報告がなされている。Strasnickら¹²⁾は、分子量75 kDaの可溶性物質がLAK活性を抑制すると報告しており、また免疫抑制作用のあるプロスタグランジンE₂²¹⁾やp15Eプロテイン³⁾を産生して腫瘍周囲の免疫能を抑制しているとの報告がある。

しかしながらこれらの報告に反して、癌より産生される物質にて免疫の活性化が起こっていることが近年報告されてきた。Packardら¹³⁾は、ヒトmelanoma cell lineより可溶性のT細胞分裂促進物質の産生を報告している。またRabinowich⁶⁾は、頭頸部扁平上皮癌とNK細胞を混合培養することにより、NK細胞内にいくつかのサイトカインのmRNAの増強を確認し、さらにNK細胞の分裂能、抗腫瘍性の増強を示した。

またわれわれは、自己の頭頸部扁平上皮癌に

特異的対応する細胞障害性T細胞群を、PBLと癌培養株との混合培養により誘導し、その特性を報告した⁷⁾。

以上から頭頸部扁平上皮癌より産生される何らかの免疫活性物質が、癌細胞周囲の免疫能を活性化していることが考えられた。

今回の結果より、頭頸部扁平上皮癌培養細胞は免疫系を抑制するだけでなく、活性化する物質も産生していることが証明された。このことは、生体内でも癌周囲では癌に対する免疫系の活性化と不活性化が、同時に行われていることを意味するものである。将来の癌治療に向けて、これらのメカニズムを解明させることにより、有効で副作用のない治療の開発に大いに貢献するものとする。

IV. ま と め

今回われわれは舌癌より樹立された扁平上皮癌培養細胞株(PCI-50)の培養上清液がPBL, CD4⁺ cell, NK cellの分裂能を上昇させ、さらに⁵¹Crを用いた細胞障害性の検索でもこれを有意に増強させた。またCD4⁺ cell, NK cellの表面マーカーであるCD25, HLA-DR, CD71, CD69の発現を増加させた。アミコンフィルターを用いての部分精製にて、これらの現象が分子量30 kDa以上の溶液にて起こることが確認された。

文 献

- 1) Bodmer, S., Strommer, K., Frei, K., et al. : Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. *J. Immunol.*, 143 : 3222-3229, 1989.
- 2) Johnson, J.T., Rabin, B.S., Wagner, R.L., et al. : Prostaglandin E2 of the upper aerodigestive tract. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 96 : 213-216, 1987.
- 3) Gottlieb, R.A., Kleinerman, E.S., Lennarz, W. J., et al. : Inhibition of protein kinase C by a peptide conjugate homologous to a domain of the retroviral protein p15E. *J. Immunol.*, 145 : 2566-2570, 1990.
- 4) Johnson, J.T., Myers, E.N., Barnes, L., et al. : Cervical lymph node metastasis. *Arch. Otolaryngol.*, 111 : 534-537, 1985.
- 5) Hirabayashi, H., Koshii, K., Hinohara, T., et al. : Extracapsular spread of squamous cell carcinoma in neck lymph nodes : prognostic factor of laryngeal cancer. *Laryngoscope*, 101 : 502-506, 1991.
- 6) Rabinowich, H., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., et al. : Role of cytokines in the adoptive immunotherapy of an experimental model of human head and neck cancer by human IL-2-activated natural killer cells. *J. Immunol.*, 149 : 340-349, 1992.
- 7) Yasumura, S., Hirabayashi, H., Whiteside, T. L., 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.
- 8) Kuppnier, M.C., Hamon, M., Bodmer, S., et al. : The glioblastoma-derived T-cell suppressor factor/transforming growth factor beta inhibits the generation of lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Int. J. Cancer*, 42 : 562-567, 1988.
- 9) Roth, J.A., Grimm, E.A., Gupta, R.K., et al. : Immunoregulatory factors derived from human tumors. I. Immunologic and biochemical characterization of factors that suppress lymphocyte proliferation and cytotoxic responses *in vitro*. *J. Immunol.*, 128 : 1955-1961, 1982.
- 10) Cianciolo, G., Copeland, T.D., Snyderman, R., et al. : Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of retroviruses. *Science*, 230 : 453-455, 1985.
- 11) Tada, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., et al. : Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J. Immunol.*, 146 : 1077-1082, 1991.
- 12) Strasnick, B., Lagos, N., Mickel, R.A., et al. : Suppression of lymphocyte-activated killer cell cytotoxicity by a soluble factor produced by squamous tumors of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 103 : 537-549, 1990.
- 13) Packard, B.S. : Mitogenic stimulation of human tumor-infiltrating lymphocytes by secreted factor(s) from human tumor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87 : 4058-4062, 1990.