伝染性単核症患者リンパ球の上咽頭癌雑種細胞に対する 特異的細胞傷害性について

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：梅田良三教授）

古川 俊，上 出 文 博，池 田 千 維 子，坂 下 英 雄，梅 田 良 三

CYTOTOXIC EFFECTOR CELLS SPECIFIC FOR EPSTEIN-BARR NUCLEAR
ANTIGEN POSITIVE NASOPHARYNGEAL HYBRID CELLS ARE PRESENT
IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

MITSURU FURUKAWA M.D., MICHIMIRO KAMIDE M.D., CHIHIKO IKEDA M.D.,
HIDEO SAKASITA M.D. and RYOZO UMEDA M.D.

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa

Peripheral lymphoid cells, from 3 cases of acute infectious mononucleosis (IM) and 2 cases of healthy individuals, were tested in a colony inhibition assay for cytotoxic activity against two cell lines that did or did not carry the Epstein-Barr virus (EBV) genome, A2L/AH and Ad cells respectively. T-lymphocyte fraction of IM was specifically cytotoxic for EBV-genome carrying cells and the residual lymphocyte fraction had high ADCC but low NK activity compared to the normal donors. When the A2L/AH cells which were forced to enter the EBV-cycle by n-butyrate treatment used as target cells, B-cell enriched fraction showed increased cytotoxic effect that was more remarkable in NK activity than ADCC in normal donors. These results were considered to be useful for possible specific immuno-therapy in nasopharyngeal carcinoma.

Key words: 伝染性単核症，細胞傷害性活性，上咽頭癌細胞，
特異的免疫療法

A 91—1831—51369

はじめに

伝染性単核症 (IM) はバーキットリンパ腫 (BL) や上咽頭癌 (NPC) 発癌に密接な関係を有する Epstein-Barr ウィルス (EBV) がその原因ウィルスである¹⁾ばかりでなく，EBV の感染標的細胞が B リンパ球であり，その感染細胞に対して生体が顕著な免疫学的防御機構を発揮し治癒に至らしめることから，BL や NPC の発癌機構を考えると興味深い疾患としてもユニークな存在である。EBV 感染によって EBV 関連核内抗原 (EBNA) の遺伝子発現を受けた感染リンパ球は，不死化し EBNA 保有細胞として血中を流動する。しかしながら EBV のそのほかの遺伝子発現による抗原性のために，それらを認識した免疫担当細胞によって

捕獲され死滅する運命にある。すなわち流血中の EBNA 保有細胞の無制限の増殖は，生体の免疫能によって阻止される。このことから本症は一過性白血病とよばれている。近年の分子生物学的研究は EBV の遺伝子地図のほぼ全貌を明らかにし，EBV の遺伝的情報を解読している²⁾。免疫担当細胞が認識する抗原をコードする遺伝子の解読もなされている³⁾。ところで Svedmyr ら⁴⁾ は IM 患者リンパ球中に EBV・トランスフォーム B リンパ球に対して特異的な細胞傷害性を持つ T リンパ球の存在を示し，IM が白血化せず一過性に治癒する理由に挙げている。このことは同じく，EBV ゲノムを有する上皮系細胞である上咽頭癌細胞に対しても，癌特異的細胞傷害能を持つ宿主の免疫学

的防御機構が存在し、担癌過程あるいは、治療における予後に大きな影響をもたらすことを示唆している。上咽頭癌患者における免疫能の低下はすでに言われていることであり、非特異的免疫療法による治療成績の向上も示されている⁵⁾。そこで今回われわれは、NPCの治療における免疫療法の有用性を基礎的に証明するために、上咽頭癌モデル細胞を用いて調べることにした。ヒト上咽頭癌細胞に対する特異的細胞傷害が存在するか否か、あるとすればそれに関与する免疫担当細胞の種類は何か、また傷害性に優劣が存在するか否かなどIM患者由来リンパ球や正常人由来リンパ球を用いて検討を加えた。

材料と方法

1) 標的細胞: EBV ゲノムを保有する上咽頭癌モデル細胞, A2L/AH は細胞融合によって樹立された上皮性細胞である⁶⁾。これを標的細胞として用い、10%胎児牛血清 (FCS) 添加 Eagle's minimum essential medium (EF-10) で培養した。対照細胞は EBNA 陰性の上咽頭由来上皮系細胞, Ad を用いた。それらは5～6日毎に継代培養された。

2) リンパ球: 臨床的に IM と確定診断された患者、および EBV 抗体陽性健康成人の末梢血から Ficoll-Isopaque を用いた比重遠心法によってリンパ浮遊液を採取した⁷⁾。これを静置培養することで壁に付着した細胞を除きリンパ球を得た。T細胞は 1.5% neuramidase 処理ヒツジ赤血球 (SRBC) とのロゼット形成と比重遠心法とを組み合わせた方法で、まず界面から分離した B 細胞群を除き、管底に生じたペレットに 0.83% NH₄Cl-Tris を加えて SRBC を溶血させた後、洗浄を経て T 細胞を得た⁸⁾。

3. 抗体: EBV 抗体陽性及び陰性健康正常人血清を非働化して使用した。

4) 細胞傷害性: 標的細胞が単層培養系で壁に張り付いて増殖することを利用して、trypsinization 後の単一細胞 (5×10³/0.2ml, MEM 液) と effector 細胞のリンパ球 (2.5×10⁵/0.2ml, PBS 液または、1/10希釈 EBV-抗体陽性血清 0.2ml) を試験管内で混合し、時々静かに攪拌しながら、37°C、5時間反応させた後、細胞を PBS で洗浄後、EF-10、5ml に再浮遊し、これを培養 dish (60×15mm) に撒き、5%炭酸ガス下に培養した。3時間後、液交換を行い、浮遊する細胞を除去し以後、肉眼的細胞コロニーが観察できるまで7～10日間、途中1～2回液交換を行い、培養を継続した。形

成されたコロニーはギムザ染色後、任意の 1cm² の区域内のコロニー数を肉眼的にカウントした。数値は各々 3dish の平均値で示した。細胞傷害性はコロニー形成抑制率として表し effector 細胞非添加時のコロニー数に対する比率から次式で求めた。colony inhibition rate = (1-No. of colonies in test/No. of colonies in control) × 100

細胞傷害は、effector に T 細胞分画を用いた時は T 細胞性傷害として Tc 活性、B 細胞分画と EBV 抗体血清存在下では、抗体依存性細胞傷害としての ADCC 活性、同じく EBV 抗体非存在下での傷害性は NK 活性として表した。

図1 EBV ゲノム陽性細胞 (A2L/AH) に対する IM 患者 (IM-1～3) および健康人リンパ球 (IM-1*, NH-2) による細胞傷害性 (□ ADCC, ▨ NK, ▩ Tc (*本文参照))

図2 EBV ゲノム陰性細胞 (Ad) に対する IM 患者 (IM-1～3) および健康人リンパ球 (IM-1*, NH-2) による細胞傷害性 (□ ADCC, ▨ NK, ▩ Tc (*本文参照))

図3 n-butyrate 処理 A2L/AH 細胞に対する健康人リンパ球 (NH 3~5) による細胞傷害性 □ ADCC ▨ NK ▤ Tc

結 果

I. EBV ゲノム陽性上皮系細胞 (A2L/AH) に対する IM 患者及び健康正常人 (抗 EBV 抗体価陽性) リンパ球による細胞傷害性

臨床的に IM と確定診断された患者 3 名と EBV 抗体価陽性健康正常人 2 名 (内、1 名は前者の IM 患者と同一人であり、IM 発症後 1 年を経過した健康正常人; IM-1*) の末梢血リンパ球を effector 細胞に用いた時の各種細胞傷害性は、EBV ゲノム陽性上皮系細胞に対して、IM 患者では正常人と比較して Tc 活性の上昇 (30.3 ± 3.2 に対して 11.5) と NK 活性の低下 (11.3 ± 2.5 に対して 26.0) がみられ、ADCC 活性には両者間に差はなかった (49.7 ± 11.2 に対して 48.5) (図 1)。また細胞傷害性に関しては、ADCC 活性が最も強く、特異的細胞傷害性反応の主体をなすと考えられた。

II. EBV ゲノム陰性上皮系細胞 (Ad) に対する IM 患者及び健康正常人 (抗 EBV 抗体価陽性) リンパ球による細胞傷害性

target に EBV ゲノム陰性細胞株を用いた時の細胞傷害性は、正常人と比較して前回と同じく IM 患者の NK 活性の低下 (12.3 ± 3.1 に対して 27.0) がみられ、Tc 活性、ADCC 活性はともに低値で両者間に差はなかった (図 2)。

以上の結果から A2L/AH 細胞に対する特異的細胞傷害性を示す T 細胞は急性期 IM 患者リンパ球にのみ存在すると考えられた。また NK 活性は、IM 患者よりも常に正常人に高い活性を示し、EBV 感染の有無に関係なく両細胞に対して同程度に存在するところから非特異的細胞傷害によるものと考えられた。

III. n-butyrate 処理 A2L/AH 細胞に対する健康正

常人 (抗 EBV 抗体価陽性) リンパ球による細胞傷害性

NK や ADCC 活性を有する effector 細胞の標的細胞についての考察を加えるため n-butyrate 処理細胞での細胞傷害性について調べた。既報のごとく⁹⁾、A2L/AH 細胞の自然培養条件下における EBV 早期抗原 (EBV-EA) の発現率は 0.1% 以下であるが、n-butyrate, 4mM/ml 添加 3 日目にはそれが約 40% に増強される。かかる細胞を target とした時の正常人の各種細胞傷害性は Tc 活性には変化なく、NK 活性の著しい増強が観察され、ADCC においてはわずかな上昇がみられた (図 3)。このことは、NK 細胞および ADCC 反応に関与する K 細胞の target が異なることを示唆する。ただし、両反応とも effector 細胞の一部は EA 陽性細胞を target としていることも事実である。

考 察

1984 年、Baer ら²⁾ によって B95-8 細胞由来 EBV-DNA の全塩基配列が決定された。それによれば、約 172kb の EBV-DNA は両末端と分子内に多くの反復配列をもち、潜在 EBV ゲノムはその両末端反復配列 (TR) が結合して環状構造 (プラスミド) をとって染色体分画上に存在している。EBV は好リンパ球性であるが、はじめにも述べたように、NPC のように上皮性細胞の腫瘍化に密接に関係していることから実験的に DNA 断片のトランスフェクションを行い、EBV トランスフォーム遺伝子の同定が進められている¹⁰⁾。現在潜在 EBV-DNA から転写される RNA として、3 種類挙げられている (それに対してウイルス産生細胞では 50 種以上の mRNA が存在する¹¹⁾¹²⁾)。それらは分子量 200 以下の低分子 (166b と 172b) の small RNA となる EBERs (EBV-encoded small RNA)¹³⁾¹⁴⁾ と 5 種類の EBNA をコードする polycistronic RNA¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ と、膜蛋白である LMP (latent membrane protein) をコードする RNA¹⁸⁾ である。EBV 感染早期蛋白のひとつである LYDMA (lymphocyte detected membrane antigen) は、主要組織適合遺伝子複合体 MHC (major histocompatibility complex) のクラス I を介して細胞傷害性リンパ球 (キラー T 細胞) によって認識されることが明らかにされている¹⁹⁾²⁰⁾。このことは、EBV トランスフォーム細胞や IM の EBV 感染 B リンパ球についてのみならず、最近 Gotch ら²¹⁾ によってインフルエンザウイルスでも明らかにされたように、一般にウイルス感染細胞や腫瘍細胞は本来自己細胞で

あるが、ウイルス抗原や腫瘍抗原がクラス I 分子と共に細胞表面に提示され、MHC 拘束性の細胞傷害性 T 細胞により排除を受けることが明らかになっている。急性期 IM 患者リンパ球が特異的に認識し、細胞傷害を発揮する抗原は EBV 感染細胞に発現される LYDMA であり、それは、EcoRI-D_{het} フラクシオンから転写される 2.8kb の mRNA にコードされている²²⁾。Wang ら²³⁾によると EBV-DNA の EcoRI-D_{het} 断片を NIH3T3 および Rat-1 細胞（ラットの上皮性細胞株）にトランスフェクトすると LYDMA が発現され、それらの細胞が接触阻害（contact inhibition）能を失い、軟寒天中でコロニーを形成し、ヌードマウスに腫瘍形成をみたことから EBNA 遺伝子とともに、この 2 つの EBV 特異的蛋白質が、トランスフォーメーション（癌化）に際し、重要な働きをもっているとしている。

ところで担癌患者における細胞性免疫能を細胞性傷害の程度から評価する方法としては、⁵¹Cr をラベルした K562 細胞（ヒト慢性骨髄性白血病由来リンパ球）を標的細胞とする方法がよく用いられる。今回我々が用いた方法上の特徴は、target 細胞が上咽頭癌モデル細胞として樹立化された上皮系細胞とリンパ球とのハイブリドマを用いたことにある。この細胞は、普通の単層培養細胞と同じく、培養器の壁に張り付いて増殖するところから、effector 細胞との反応後、コロニー形成が可能であった。したがってコロニー形成率を対照実験のそれと比較し、コロニー形成抑制率として細胞傷害性を評価することができた。ただし、この実験系における問題点として、effector 細胞との接触がない対照実験のコロニー形成率に比較して、テスト実験においては effector 細胞との反応後、target 細胞が培養器に接着して増殖を開始する間、リンパ球との混合培養の形式をとるため、plating efficiency が低下することである。また一連の操作の影響も考慮すると、後者のコロニー形成率は実際よりも低くなることが予想される。その結果、コロニー形成抑制率としては値が大きくなり、いわゆる偽陽性の混入が避けられない欠点が存在する。しかしながら本実験の狙いは、IM 患者と正常者リンパ球との比較にあるわけであるから、絶対値での判断よりも相対的な比較に意味があり、この点において本実験方法は妥当と考えられた。

さて NPC では、NK および ADCC 活性の低下のみならず⁵⁾、EBV 感染に特異的に作用する T 細胞機能低下が、B リンパ球のトランスフォーミング能測定から

報告されている²⁴⁾が、NPC 細胞に対する特異的細胞傷害性を発揮するキラー T 細胞活性の報告は、見あたらない。この特異的細胞傷害性を発揮するキラー T 細胞の認識する抗原は、EBV 感染リンパ球の場合と同様、LYDMA と推測される。今回の実験結果は、IM 患者リンパ球にはそのような活性を示す T 細胞が存在するが、健康正常人にはほとんど存在しないことを示している。このことは NPC に対する免疫療法を考える時、一つの試みとして EBV 特異的感作 T リンパ球の移入療法、さらには LYDMA 活性化キラー T 細胞療法が考えられる。この点に関しては、将来の検討課題として話題提起のみにとどめたい。しかしながら先にも述べたように、NPC 細胞にたいする細胞傷害活性はキラー T 細胞のみではなく、ADCC 反応や NK 活性に関与するそれぞれの細胞集団も存在する。今回の実験から、後者に属する細胞が target とする細胞の一部は EA 陽性細胞であることが判明したが、これと同様の結果は、target にヒト B リンパ球を用い、これに P3HR-1 細胞株由来 EBV を重感染させた時の EBV-EA、EBV-VCA の発現率と NK、ADCC 活性を調べた Patarroyo らの報告にもみられる²⁵⁾。

ところで NPC 治療における BRM (biological response modifier) 療法は、治療成績の向上にも示されるように、支持される傾向にある。近年、LAK (lymphokine activated killer) 細胞の移入で代表される養子免疫療法が NPC 治療で行われつつあることも²⁶⁾、上述の考え方に他ならない。

ま と め

上皮系の上咽頭癌モデル細胞、A2L/AH (EBV ゲノム陽性) を target, IM および健康正常人末梢血リンパ球を effector に用いて細胞傷害性をコロニー形成抑制率で求めた。その結果、IM 患者において NK 活性の低下と ADCC、Tc 活性の順で細胞傷害性がみられた。また IM 患者における Tc 活性は EBV ゲノム陰性細胞に対する細胞傷害性、および正常人との比較から EBV 感染細胞特異的であった。一方、n-butyrate 処理による EBV ゲノム活性細胞を用いた実験結果から NK および ADCC 活性の一部は EA 陽性細胞を target とすることが判明した。以上の結果は NPC に対する特異的免疫療法を考える上で有用な基礎的データと思われた。

参考文献

- 1) Henle G, Henle W, Diehl V : Relationship of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 59 : 94-101, 1968.
- 2) Baer R, Bankier AT, Biggin MD et al : DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310 : 207-211, 1984.
- 3) Fennewald S, van Santen V, Kieff E : Nucleotide sequence of a mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J Virolog* 51 : 411-419, 1984.
- 4) Svedmyr E, Jondal M : Cytotoxic effector cells specific for B cell lines transformed by Epstein-Barr virus are present in patients with infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 : 1622-1626, 1975.
- 5) 佃 守, 玉虫 昇, 持松いずみ, 御手洗佳代子, 澤木修二 : 上咽頭癌患者の細胞性免疫能. *日耳鼻* 89 : 7-13, 1986.
- 6) Takimoto T, Furukawa M, Hatano M et al : Epstein-Barr virus nuclear antigen-positive nasopharyngeal hybrid cells. *Annals Otolaryngol Rhinol Laryngol* 93 : 166-169, 1984.
- 7) Böyum A : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21 (Suppl 97) : 77-89, 1968.
- 8) Weiner MS, Bianco C, Nussenzweig V : Enhanced binding of neuramidase-treated sheep erythrocytes to human T-lymphocytes. *Blood* 42 : 939-946, 1973.
- 9) 古川 昶, 岩脇淳一, 大村隆代, 梅田良三 : Epstein-Barr ウイルス早期抗原 (EBV-EA) 誘導におけるレチノイドの抑制効果. *日耳鼻* 90 : 186-190, 1987.
- 10) Griffin BE, Karran L : immortalization of monkey epithelial cells by specific fragments of Epstein-Barr virus DNA. *Nature* 309 : 78-82, 1984.
- 11) Hummel M, Kieff E : Epstein-Barr virus RNA VIII. Viral RNA in permissively infected B95-8 cells. *J Virolog* 43 : 262-272, 1982.
- 12) Weigel R, Miller G : Major EB virus-specific cytoplasmic transcripts in a cellular clone of the HR-1 Burkitt lymphoma line during latency and after induction of viral replicative cycle by phorbol esters. *Virolog* 125 : 287-298, 1983.
- 13) Van Santen V, Cheung A, Kieff E : Epstein-Barr virus RNA VII : Size and direction of transcription of virus-specified cytoplasmic RNAs in a transformed cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 1930-1934, 1981.
- 14) Arrand JR, Rymo L : Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virolog* 41 : 376-389, 1982.
- 15) Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L et al : U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 7632-7636, 1984.
- 16) Hennessy K, Fennewald S, Kieff E : A third viral nuclear protein in lymphoblasts immortalized by Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 5944-5948, 1985.
- 17) Dillner J, Kallin B, Alexander H et al : An Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA5) partly encoded by the transformation-associated Bam WYH region of EBV DNA : Preferential expression in lymphoblastoid cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 6641-6645, 1986.
- 18) Modrow S, Wolf H : Characterization of two related Epstein-Barr virus encoded membrane proteins that are differentially expressed in Burkitt lymphoma and in vitro-transformed cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 5703-5707, 1986.
- 19) Misko I, Moss DJ, Pope JH : HLA antigen-related restriction of T lymphocyte cytotoxicity to Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 4247-4250, 1980.
- 20) Rickinson AB, Wallace LE, Epstein MA : HLA-restricted T-cell recognition of Epstein-Barr virus-infected B cells. *Nature* 283 : 865-867, 1980.
- 21) Gotch F, Rothbard J, Howland K et al : Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2. *Nature* 362 : 881-882, 1987.
- 22) Hennessy K, Fennewald S, Hummel M et al : A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth transforming infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 7207-7211, 1984.
- 23) Wang D, Liebowitz D, Kieff E : An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43 : 831-840, 1985.
- 24) Moss DJ, Chan SH, Burrows SR et al : Epstein-

- Barr virus specific T-cell response in nasopharyngeal carcinoma patients. Int J Cancer 32: 301-305, 1983.
- 25) Patarroyo M, Blazar B, Pearson G et al: Induction of the EBV cycle in B-lymphocytes-derived lines is accompanied by increased natural killer (NK) sensitivity and the expression of EBV-related antigen(s) detected by the ADCC reaction. Int J Cancer 26: 365-371, 1980.
- 26) 佃 守, 持松いずみ, 樋口章子, 御手洗佳代子, 矢野間俊介 他: 上咽頭がんの特異的免疫療法へのアプローチ. 日耳鼻87: 1191-1192, 1984.
-
- (原稿受付 昭和63. 1.12日)
- 別刷請求先 〒920 金沢市宝町13-1
金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室 古川 侃