原著

腫瘍抗原処理法別にみた樹状細胞のパルス法と 細胞傷害活性増強効果について

岐阜大学腫瘍総合外科

本 多 俊太郎 長 尾 成 敏 杉 山 保 幸
佐 治 重 豊

Augmentative Effects on Cytotoxic Activity of Human Dendritic Cells pulsed with Various Treated Tumor Antigen

Shuntaro HONDA, Narutoshi NAGAO, Yasuyuki SUGIYAMA
and Shigetoyo SAJI

Department of Tumor and General Surgery, Gifu University School of Medicine

目的：樹状細胞の抗原提示能増強目的で、抗原作製方法につき基礎的検討を行った。

方法：胃癌細胞株MKN-45 (p53 wild type) と KATO-III (p53 deficient) を CDDP と 5FU (CF) 処理, Mitomycin C (MMC) 処理, 凍結融解 (Freezing-thawing, FT) 処理して腫瘍抗原を作製し, 細胞死状態をヘキスト染色と Flow cytometry にて解析したうえで, 樹状細胞にパルスして細胞傷害性キラー細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) を誘導し細胞傷害活性を測定した。

結果：①CF処理にてMKN45でアポトーシスが, MMC処理にて両細胞株とも壊死が高頻度に観察された。②MMC処理にて誘導したCTLが両細胞とも高い細胞傷害活性を示した。

結語：自家腫瘍細胞を抗原処理する場合, CF処理によるアポトーシス細胞より, MMC処理による壊死細胞で樹状細胞をパルスした方が高い細胞傷害活性を有するCTLの誘導が可能であった。

索引用語：樹状細胞 (dendritic cell), 腫瘍抗原 (tumor antigen), アポトーシス (apoptosis), ネクローシス (necrosis), 腫瘍特異的免疫療法 (tumor specific immunotherapy)

はじめに

癌特異的免疫療法で有効性の高いcytotoxic T lymphocyte (CTL) を誘導するためには, professionalな抗原提示機能を持つ樹状細胞に腫瘍抗原をパルスすることが必要である。最近抗原ペプチドでパルスする方法が主流であるが, 1種類のペプチドをパルスするだけでは癌細胞の多型性に対応できないという理由で, 複数のペプチドや自家腫瘍細胞でパルスする方法の有用性が指摘されている¹⁾²⁾。自家腫瘍細胞でパルスする場

合, 無処理の生細胞より何らかの抗原処理を行った方が, 有効性が高いと推察されている³⁾。この場合, アポトーシス細胞は, 壊死細胞よりも樹状細胞に効果的に取り込まれ易いとの報告が多いが³⁾⁴⁾, 誘導されたCTLの細胞傷害活性は, 報告者により異なっている⁵⁾⁶⁾⁷⁾。そこで今回, ①低用量のcisplatin (CDDP) と 5 fluorouracil (5-FU) で誘導されるアポトーシス細胞, 以下CF処理群, ②Mitomycin C (MMC) で誘導される壊死細胞群, 以下MMC処理群, および③凍結融解 (freezing-thawing, FT) 処理で誘導される融解細胞群, 以

下FT処理群を作製し、DC添加刺激時の細胞傷害活性増強効果について基礎的検討を行った。

対象および方法

標的細胞：HLA-A24陽性ヒト胃癌細胞株であるMKN-45(wild type p53, 低分化腺癌)とKATO-III(p53 deficient, 印環細胞癌)を抗原作製用に用いた。培地はRPMI-1640培地(10% fetal bovine serum antibiotic/antimycotic solution (Sigma, St. Louis, MO))で、37℃, 5%CO₂環境下で継代培養した。

樹状細胞の誘導法：HLA-A24陽性の健常成人末梢血からMONO-POLY-RESOLVING MEDIUM(大日本製薬株式会社)を用いて比重遠心分離し、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)を採取した。ついで、PBMCをプラスチックフラスコ内で1時間前培養(5%CO₂, 37℃)後、洗浄し付着細胞を採取後、さらに24時間培養し半付着細胞を回収した。最後に100ng/mlのIL-4(Genzyme Co., Cambridge, MA)と50ng/mlのGM-CSF(PeproTech EC LTD)を添加し7日間培養して未熟樹状細胞を誘導した。

抗原処理法：①CF処理群；教室での検討で、アポトーシスが最も効率に誘導可能である濃度としてCDDPは20μg/mlを、5FUは100μg/mlを添加したRPMI-1640培地を用い、MKN-45あるいはKATO-IIIを24時間接触培養した⁸⁾。②MMC処理群；Mitomycin Cを10μg/ml濃度に調整した生理食塩水で、MKN-45あるいはKATO-IIIを24時間接触させた(5%CO₂, 37℃)。③FT処理群；MKN-45およびKATO-IIIをスピッツ内で1mlのRPMI-1640培地に浮遊させ、液体窒素中に5分間静置して凍結し、室温で自然融解する操作を3回繰り返した。

CTLの誘導法：樹状細胞1×10⁶個に各腫瘍抗原1×10⁶個を加えて24時間パルス後、TNF-α(PeproTech EC LTD)を100U/ml添加して成熟させ、同一健常成人から採取した1×10⁶個のPBMCとIL-2(シオノギ製薬)700JRU/ml添加RPMI-1640培地で7日間共培養してCTL細胞を誘導した。

検索項目の一覧

①アポトーシス陽性細胞の検索法：各種抗原で処理した作用細胞をHoechst33258で染色し、蛍光顕微鏡にてアポトーシス小体の有無を観察した。また、作用細胞100個中のアポトーシス陽性細胞数を算定し、apoptotic index (AI) 値を求めた。

②Flow cytometric analysisによるsub G1の検索法：CFおよびMMC処理群から回収した細胞をPBSにて洗浄後、70%エタノールで固定した。ついで、RNase処理後遠心して上清除去しPropidium iodide (PI) 添加後、FACS can (Becton Dickinson, New Jersey, USA)にてfluorescence intensityを求め、Cell Quest (BD Biosciences, California, USA) 解析ソフトを用いsub G1量を算定した。

③壊死細胞の検索法：各抗原処理後、得られた細胞をtripan blueで染色し、染色陽性細胞を壊死細胞と判断し、その頻度を算定した。

④細胞傷害活性の測定法：CTLの細胞傷害活性は、4時間⁵¹Cr release assayを用いて測定した。すなわち、標的細胞を100μCi⁵¹Cr sodium chromate/10⁶に調整した培地で2時間接触・標識後、2×10⁶/mlに調整し、作用細胞であるCTLをE:T比、40:1, 20:1, 10:1および5:1の割合で添加し96穴プレートを用い4時間共培養した。ついで、各wellから上清100μlを回収し、放射性活性をガンマカウンターにて測定した。細胞傷害活性は下記の式より求めた。細胞傷害活性=[(実験cpm-自然放出cpm)/(最大放出cpm-自然放出cpm)×100%]

統計学的処理の解析法：得られた測定値はmean±standard deviation (SD) で表示し、統計学的有意差はBonferroniの多重比較t-検定を用いて行い、p<0.05を有意差ありと判定した。

結 果

アポトーシス陽性細胞数の頻度

①Hoechst 33258染色所見：MKN-45は、CF処理により多数のアポトーシス小体が見られたが、MMC処理およびFT処理ではほとんど観察されなかった。KATO-IIIは、CF、MMCおよびFT処理ともアポトーシス小体はほとんど観察されな

Fig. 1 Fluorescence microscopic findings by Hoechst33258 stain ($\times 200$) of MKN-45 and KATO-III. Many apoptotic bodies (arrows) were observed after CDDP+5FU treatment in MKN-45 (A), but a few in KATO-III (D), and there was almost no apoptotic body after MMC or freezing-thawing treatment in both of MKN-45 (B, C) and KATO-III (E, F).

Fig. 2 Comparison on apoptotic index of MKN-45 and KATO-III treated by CDDP+5FU, MMC and Freezing-Thawing.

った (Fig. 1)。

②Apoptotic index (AI) 値：MKN-45のAI値は、CF処理により $47.3 \pm 8.8\%$ と処理前の $0.2 \pm 0.1\%$ に比べ有意の高値を示したが ($p < 0.0001$)、MMC処理群では $0.1 \pm 0.1\%$ 、FT処理群では $0.2 \pm 0.1\%$ と低値のままであった。KATO-IIIでは処理前 ($0.2 \pm 0.1\%$)、CF処理 ($0.9 \pm 1.1\%$)、

MMC処理 ($0.4 \pm 0.8\%$) およびFT処理 ($0.3 \pm 0.1\%$) の各群とも低値で、アポトーシスの誘導はほとんど観察されなかった (Fig. 2)。

③壊死細胞の頻度：trypan blueによる生体染色では、MMCおよびFT処理によりMKN-45およびKATO-IIIともほぼ100%の細胞が染色され、細胞死状態にあると推察された。一方、CF処理群ではKATO-IIIはほとんど染色されなかった。以上の結果、MKN-45はCF処理により約半数の細胞がアポトーシスに陥り、MMC処理により高率に細胞死状態が誘導された。一方、KATO-IIIはCF処理では細胞死には至らず、MMC処理では高率に死細胞が誘導された。また、FT処理ではMKN-45およびKATO-IIIとも高率に細胞死が誘導された。

Flow cytometryによるsub G1の解析結果

MKN-45のsub G1の割合は、薬剤処理前の $12.7 \pm 4.8\%$ に比べ、CF処理群が $46.5 \pm 4.4\%$ 、MMC処理群が $53.4 \pm 3.5\%$ 、FT処理群が $29.0 \pm 1.4\%$ と有意の増加がみられた (それぞれ $p < 0.0001$)。

KATO-IIIのsub G1の割合は、MMC処理群が

94.4±3.5%, FT処理群が40.5±15.3%と薬剤処理前の3.7±0.8%に比べ有意(それぞれ $p<0.0001$, $p=0.0003$)の高値を示した。また, FT処理群はMMC処理群に比べ有意($p<0.0001$)に低値であったが, CF処理群(21.3±4.0%)との間に有意差はみられなかった。一方, CF処理群は薬

剤処理前に比べ有意($p=0.049$)の高値を, MMC処理群に比べ有意($p<0.0001$)の低値を示した(Fig. 3, 4)。

細胞傷害活性

MKN-45に対する各種CTLの細胞傷害活性は, E/T比の増加とともに漸次増加した。また, E/

Fig.3 Flow cytometric analysis of variously treated cell cycles by CDDP+5FU (b), MMC (c) or freezing-thawing methods (d).

Fig.4 Proportion of subG1 content in cell cycle following various treatments.

※ $p<0.0001$ * $p=0.0003$ # $p=0.049$

Fig. 5 Comparison on cytotoxic activity of CTL induced by coculture with DC pulsed with MKN-45 or KATO-III treated by CDDP+5FU, MMC or freezing-thawing manner.

T比40：1ではMMC処理にて誘導したMMC-CTL群が $23.1 \pm 1.6\%$ とFT処理にて誘導したFT-CTL群の $10.6 \pm 2.5\%$ に比べ有意 ($p=0.0152$) の高値を示し、CF処理にて誘導したCF-CTL群が $17.3 \pm 4.3\%$ とその中間値を示した。

KATO-IIIに対する各種CTLの細胞傷害活性は、E/T比の増加にともない漸次増加した。また、E/T比40：1ではMMC-CTL群が $35.7 \pm 1.6\%$ とFT-CTL群の $21.3 \pm 2.5\%$ およびCF-CTL群の $14.6 \pm 4.3\%$ に比べ有意(それぞれ $p=0.0149$, $p=0.001$)の高値であった (Fig. 5)。

考 察

癌免疫療法において、患者PBMCをIL-2で誘導するLAK細胞に注目が集まったが、期待された程の治療効果がみられず、現在CTL細胞を主体とした特異的免疫療法に活路が求められている。一方、特異的抗腫瘍免疫活性の誘導法として、従来から腫瘍細胞の凍結融解処理法やMMC処理法が汎用されてきたが、分子生物学的手法の発達により、抗原ペプチドが同定され、これを樹状細胞にパルスする方法が主流となってきた。しかし、単一ペプチドから誘導した抗腫瘍免疫では、同じペプチドを発現する腫瘍細胞には有効であっても、異なるペプチドを発現している腫瘍細胞は免疫逃避状態となり増殖抑制が誘起困難なため、対応策とし

て複数のペプチドでパルスする試みが行われている¹⁾²⁾。また、抗原ペプチドを用いたCTL誘導法は、当該患者の癌細胞が同じペプチドを発現し、かつHLAが一致する必要があるが、普遍的な癌治療への応用は困難である。それゆえ、手法的には若干古典的ではあるが、自家腫瘍細胞を抗原として用いる方法が特異的免疫療法の最終ゴールとして、今も研究が進められている。すなわち、自家腫瘍細胞の抗原処理方法として、抗癌剤との接触、凍結融解法⁹⁾、酸抽出法¹⁰⁾、放射線や紫外線照射法¹¹⁾、などが試みられている。さらに、抗原提示細胞である樹状細胞の存在が注目されてからは、腫瘍細胞との細胞融合法¹²⁾、腫瘍細胞のDNAを樹状細胞に導入する方法なども試みられている¹³⁾。

教室でも、外科腫瘍学の立場から手術時採取した腫瘍細胞を用い、特異的免疫誘導法の可能性を種々検討してきた。また、樹状細胞を用いたCTL細胞誘導法の過程で、腫瘍細胞をパルスする場合、壊死細胞よりもアポトーシス細胞の方が効率的であるという報告³⁾⁴⁾、およびアポトーシス細胞の方が樹状細胞の抗原提示能が増強されるという報告⁴⁾や、逆に免疫寛容が起り低下するという異なる見解がみられる¹⁴⁾¹⁵⁾。そこで、今回アポトーシス、細胞壊死、細胞融解という3つの抗原処理方法を用い、誘導されるCTLの抗腫瘍効果を比較検討し、上記諸結果を得たわけである。

アポトーシス誘導能について

教室では、アポトーシス誘導法として低用量のCDDPと5FUを用いる方法の有用性を種々検討してきた。その結果20 μ g/mlのCDDPと100 μ g/mlの5FU併用添加時に最も高いAI値を示した⁸⁾。細胞壊死法として従来から汎用されているMMC処理法を、細胞融解法としては液体窒素を用いた凍結融解処理法を採用したが、同様報告が多い。その結果、ヘキスト染色によるアポトーシス誘導程度は、MKN-45ではCF処理により多数のアポトーシス小体が見られ、AI値も50%前後を示したが、MMC処理およびFT処理ではほとんど観察されなかった。一方、KATO-IIIでは何れの処理方法でもAI値は1%以下でアポトーシスの誘導はほとんどみられなかった。この理由として、教室ではp53遺伝子発現の有無による影響を推察し、cDNA microarrayを用い種々検索中であるが、アポトーシスの誘導にはp53遺伝子がwild typeであることが必要条件と推察している。それゆえ、p53がwild typeであるMKN-45でアポトーシスが高率に誘導され、deficientであるKATO-IIIでは誘導不能であったと考えている。一方、MMC処理群ではHoechst染色像でMKN-45およびKATO-IIIともに核の形態学的変化は観察されなかったが、tripan blue生体染色ではともに100%近く染色され、細胞死状態にあると判定可能であった。また、FT処理では全細胞が細胞膜融解状態で、tripan blue生体染色でも同様に生細胞は観察されなかった。

ところで、Flow cytometryによるcell cycleの解析で、sub G1の増加は核の断片化によるアポトーシスあるいは壊死の程度を示すと考えられている。今回の検索でsub G1は、MKN-45がCFあるいはMMC処理で50%前後に増加したが、KATO-IIIではMMC処理で94.4%に増加したがCF処理では21.3%と低値であった。この結果とヘキスト染色所見を合わせると、MKN45でのsub G1はCF処理で90%以上がアポトーシス由来と推察された。またtripan blue生体染色との関連で、MMC処理で誘導される壊死細胞の割合は、MKN45の場合は50%前後で、KATO-IIIの場合は90%と著差がみられた。

抗原処理方法と細胞傷害活性について

抗原処理方法別に誘導されたCTLの細胞傷害活性を検討すると、MKN-45およびKATO-IIIはMMC-CTL群がFT-CTL群に比べ有意の高値を示し、KATO-IIIはCF-CTL群が最も低値であった。なお、KATO-IIIでCF-CTL群が14.3%の傷害活性を示した理由は、AI値が数%と低値であったがsub G1で20%前後を示したことから、壊死部分から誘導された可能性を推察している。何れにしても、MMC処理法(壊死細胞)が最も高率的に抗腫瘍免疫活性を増強可能と思われた。

ところで、アポトーシス細胞による樹状細胞のバルスは、適切な刺激を受けた場合のみ抗原提示能が増強されると報告されている¹⁴⁾¹⁶⁾。すなわち、アポトーシスの抗原提示能はFlow cytometryでの検索で、早期アポトーシスをバルスした場合にはTNF- α で刺激しても樹状細胞の成熟は誘起されず、晚期アポトーシスと2次的壊死が含まれているときに成熟化刺激が誘導されると報告されている¹⁷⁾。細胞壊死による成熟化刺激はheat shock protein (HSP) が関与し⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、HSPは壊死により発現量が増加するが、アポトーシスでは発現量は少ないとの報告がある⁷⁾。腫瘍細胞から精製されたHSPは、腫瘍細胞内の抗原ペプチドを保持しており²⁰⁾、抗原ペプチドに対する免疫応答がin vitroで証明されている。また、バルスされる抗原量にも適量があり、少な過ぎる場合は抗原提示能が低下すると報告されている。

今回の検索で、MKN-45とKATO-IIIともMMC処理群で細胞傷害活性が最も高値を示した。そこで、ヘキスト染色とsub G1分析から抗原量を合算推察すると、MKN-45とKATO-IIIとも壊死細胞により樹状細胞の成熟化刺激が最も高率的に誘起されたと推察可能である。一方、MKN-45のCF処理群ではアポトーシスによる細胞死量(AI値50%前後)にMMC処理による細胞壊死量(sub G1で50%前後)が加算された結果、MMC処理類似の高い傷害活性を示したと推察している。一方、KATO-IIIの場合はAI値がゼロに近く、sub G1での20%前後がそのまま壊死細胞量として反映された結果、低い傷害活性を示したと推察された。

ところで、FT処理は通常壊死群として扱われ、抗原提示能増強効果が高いと報告されている。この場合、抗原処理にはFT処理後の細胞上清が用いられているが²¹⁾、今回FT-CTL細胞がMMC-CTL類似の傷害活性を示さなかった理由として、細胞成分も含め一括使用した影響の可能性は否定できない。また、MMC処理は今回10 μ g/ml濃度に添加した生理食塩水で接触・刺激したが、この細胞壊死は薬剤接触によるDNA障害と生食水培養による栄養障害との加算効果が推察されており、FT処理による膜の機械的破壊とは異なった機序の可能性を推察している。この方面で、今後さらに検索予定である。

おわりに

自家腫瘍細胞をMMC処理で誘導した壊死細胞で樹状細胞をパルスすると、高い細胞傷害活性を有するCTLが効率的に誘導される可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al: Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD 34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61: 6451-6458, 2001
- 2) Maruyama H, Zaloudik J, Li W, et al: Cancer vaccines: single-epitope anti-idiotypic vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 49: 123-132, 2000
- 3) Shaif-Muthana M, McIntyre C, Sisley K, et al: Dead or live: Immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res* 60: 6441-6447, 2000
- 4) Albert ML, Pearce SFA, Francisco LM, et al: Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via α v β_3 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1359-1368, 1998
- 5) Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-87, 1998
- 6) Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, et al: Cutting edge: Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 161: 4467-4471, 1998
- 7) Kotera Y, Shimizu K, Mule JJ: Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based Immunization. *Cancer Res* 61: 8105-8109, 2001
- 8) 杉山保幸, 佐治重豊, 安田邦彦他: 免疫化学療法による消化器癌のtumor dormancy therapy. *日消外会誌* 34: 397-402, 2001
- 9) Schnurr M, Galambos P, Scholz C, et al: Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res* 61: 6445-6450, 2001
- 10) Rawson P, Hermans IF, Huck SP, et al: Immunotherapy with dendritic cells and tumor major histocompatibility complex class I-derived peptides requires a high density of antigen on tumor cells. *Cancer Res* 60: 4493-4498, 2000
- 11) Strome SE, Voss S, Wilcox R, et al: Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 62: 1884-1889, 2002
- 12) Kugler A, Stuhler G, Walden P, et al: Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nature Med* 6: 332-336, 2000
- 13) Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, et al: Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nature Med* 6: 1011-1017, 2000
- 14) Ronchetti A, Rovere P, Iezzi G, et al: Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: Role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 163: 130-136, 1999
- 15) Bellone M, Iezzi G, Rovere P, et al: Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 159: 5391-5399, 1997
- 16) Voll RE, Herrmann M, Roth EA, et al: Im-

- munosuppressive effects of apoptotic cells. Nature 390 : 350-351, 1997
- 17) Pietra G, Mortarini R, Parmiani G, et al : Phases of apoptosis of melanoma cells, but not of normal melanocytes, differently affect maturation of myeloid dendritic cells. Cancer Res 61 : 8218-8226, 2001
- 18) Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, et al : Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. J Immunol 167 : 4844-4852, 2001
- 19) Melcher A, Todryk S, Hardwick N, et al : Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. Nature Med 4 : 581-587, 1998
- 20) 山崎浩一 : 分泌型熱ショック融合蛋白質による癌拒絶とCTL. Annual Review免疫2001 (1版), 中外医学社, 東京, 2001, 309-316
- 21) Herr W, Ranieri E, Olson W, et al : Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte responses. Blood 96 : 1857-1864, 2000
-