頭頸部癌患者の tumor infiltrating lymphocytes (TIL) の増殖能と抗腫瘍活性

宮田 佳代子* 湯山 誠一郎* 持松 いづみ*
澤 木 修二* 佃 守**

論文要旨

頭頸部癌患者より分離した tumor infiltrating lymphocytes (TIL) の増殖能, 抗腫瘍活性, 表面マーカーを, 末梢血リンパ球より誘導した lymphokine activated killer cells (LAK) と比較し, 検討した。

TIL は LAK より増殖率が高く, 平均101.3倍の増殖を示した。分離直後の TIL は NK 活性, LAK 活性, 自己癌細胞傷害活性がほとんど認められないが, IL-2添加培養により活性が増大し LAK より高い値を示した。TIL を IL-2添加培養すると, HLA-DR⁺, CD8⁺ CD11⁻ の表面マーカーが優位となる症例がみられた。TIL は LAK より増殖能, 自己癌細胞傷害活性が高く, 養子免疫療法の移入細胞として有用と考えられた。

Key words: 腫瘍内浸潤リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes), 養子免疫療法 (Adoptive immunotherapy), リンホカイン活性化リンパ球 (Lymphokine activated killer cells), 自己癌細胞傷害活性 (Autologous tumor cell cytotoxicity), 頭頸部癌 (Head and neck cancer)

はじめに

癌の免疫療法の一つとして, リンパ球を interleukin-2 (IL-2) で活性化し, 増殖させた lymphokine activated killer cells (LAK) を移入する養子免疫療法 adoptive immunotherapy が行われるようになり, 临床上, 進行癌患者に効果があったとの報告がなされている。

Rosemberg ら¹⁾は, さらに, 腫瘍組織内に浸潤するリンパ球 tumor infiltrating lymphocytes (TIL) に注目し, TIL は LAK に比較して, in vivo の実験で50~100倍の腫瘍縮小効果を示し, しかも, この抗腫瘍活性は腫瘍に特異的であったとしている。

現在, 幾つかの施設で TIL による養子免疫療法が試みられているが, 治療に有効な量の TIL をどのようにして得るか, その抗腫瘍活性をいかに維持, 増強させるかが問題となっている。

今回, われわれは頭頸部癌患者より TIL を採取し, その増殖能と抗腫瘍活性などを検討し, 末梢血リンパ球

peripheral blood lymphocytes (PBL) から得られる LAK と比較して, 若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

1. 対 象

頭頸部癌患者27例(男23, 女4, 平均年齢63.0歳)より, 生検または手術時に, 局所腫瘍および肉眼的に転移のある頸部リンパ節組織31検体を採取した。生検によるもの14, 手術摘出によるもの17検体, 局所腫瘍26, 頸部リンパ節5検体であった。癌種は喉頭癌5, 上咽頭癌5, 中咽頭癌6, 下咽頭癌3, 上顎癌2, 舌癌2, その他4例を対象とした。病理組織型は扁平上皮癌26(高分化型7, 中分化型3, 低分化型13, 未分化型3), 粘表皮癌1例である。

2. TIL の培養法

患者より採取した癌組織を, ハサミを用いて細切した。これを培養フラスコ (Falcon 3013, Becton Dickinson 社) にまき, 37°C, 5% CO₂ 下に4時間固着させた後, 20% ヒト血清加 RPMI1640培養液 (ニッスイ①,

*横浜市立大学耳鼻咽喉科, **神奈川県立がんセンター頭頸科

Kayoko MIYATA*, Seichiro YUYAMA*, Izumi MOCHIMASTU*, Shuji SAWAKI* and Mamoru TSUKUDA**:
Proliferation and Antitumor Activity on Tumor-infiltrating Lymphocytes (TIL) of Patients with Head and Neck Carcinoma.

*Department of Oto-Rhino-Laryngology, School of Medicine, Yokohama City University, Yokohama 232. **Department of Head and Neck Surgery, Kanagawa Cancer Center, Yokohama 241

Fig. 1 Growth curve of TIL obtained from local tumor (●—●) and TIL obtained from neck lymphnodes (●----●)

日水製薬)を添加した。4日間培養し、浮遊してくる細胞をメッシュを通して TIL とし、付着する細胞は自己癌細胞株樹立に供した。TIL は $5 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度で、 $20 \sim 50 \text{ U}/\text{ml}$ の recombinant IL-2 (TGP-3, 武田薬品) および 20% ヒト血清を含む RPMI1640 培養液内で培養し、lymphokine activated TIL (LA-TIL) とした。

一方、患者の末梢血からは、Ficoll-Conray 法により、peripheral blood lymphocytes (PBL) を採取し、 $5 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度で、 $20 \text{ U}/\text{ml}$ の IL-2 および 20% ヒト血清を含む RPMI1640 培養液内で培養し、これを LAK とした。LA-TIL, LAK とともに、5~7 日ごとに培養液を交換して、培養を継続した。なお、ヒト血清は AB 型の健康正常人の新鮮血清を用いた。

3. 腫瘍細胞傷害活性の測定法

20時間 ^3H -thymidine 放出試験で腫瘍細胞傷害活性を測定した。標的細胞として、NK 活性は K562 細胞、LAK 活性は Daudi 細胞を用い、自己の癌細胞株が樹立できたものは、これを用いて、自己癌細胞傷害活性を測定した。E/T 比はすべて 20:1 とした。

4. モノクローナル抗体による表面マーカーの解析

モノクローナル抗体は CD3 として OKT3 (Ortho 社)、CD4, CD8, CD11, CD16, HLA-DR としてそれぞれ Leu 3a, Leu 2a, Leu 15, Leu 11c, Leu

HLA-DR (Becton Dickinson 社) および 2H4 (Coulter 社) を用いた。細胞表面マーカーの測定は、FITC または PE で標識したこれらの抗体の単染色法および二重染色法による、直接蛍光抗体法で行い、FCM-1 analyzer (日本分光社) で解析した。

結 果

1. TIL の分離と培養

採取した 31 検体のうち、分離、培養までに感染をおこしたものの 10、TIL が非常に少なかったり、分離できても増殖しなかったものの 10 で、TIL が増殖したものは 11 検体であった。

2. TIL の増殖能

TIL は IL-2 添加培養後、10 日前後増殖が抑制されたのち増殖するか、または、抑制されることなく増殖し、30 日~70 日で最大数となり、その後徐々に減少するという増殖パターンを示した。リンパ節より分離した TIL は、局所腫瘍からの TIL と比べて、分離時の細胞数が多い傾向があり、細胞数が最大に増殖する時期が早く、やや異なった動態を示すものがみられた (Fig. 1)。

TIL の増殖には PBL よりやや高濃度の IL-2 を必要とすることが多いが、増殖の最大値は TIL の方が高く、PBL で 1.8 から 97.6 倍 (平均 25.6 倍) であるのに対し、TIL では 20.0 から 344.4 倍 (平均 101.3 倍) の増殖

Fig. 2a Growth curve of TIL (●—●) and PBL (○---○) in Case 1.

Fig. 2b Growth curve of TIL (●—●) and PBL (○---○) in Case 3.

Table 1 The highest antitumor cytotoxicity achieved in long-term IL-2 cultures of PBL and LAK obtained from local tumor (L) and neck lymphnode (N).

Case No.	Material	PBL		TIL	
		Fold expansion	Day	Fold expansion	Day
1	L	97.6	62	344.4	71
2	L	1.8	35	27.0	30
3	L	6.3	52	33.8	45
4	N	5.8	22	81.3	27
5	N	16.7	37	20.0	28

Fig. 3 Cytotoxicity of PBL (□), LAK (■), TIL (▨) and LA-TIL (■).

を示した (Fig. 2a, 2b, Table 1)。

2. TIL の抗腫瘍活性

分離直後の TIL は NK 活性と LAK 活性がほとんど認められず、自己癌細胞傷害活性もわずかで、全体的に PBL と比較して抗腫瘍活性は抑制されていた。しかし、TIL を IL-2 存在下に 20~30 日培養して得た LA-TIL では、PBL を同様に培養して得た LAK よ

り NK 活性、LAK 活性とも高く、自己癌細胞傷害活性も明らかに LAK より高い値を示した (Fig. 3)。

TIL の抗腫瘍活性の経時的変化を追跡し得た症例で

Fig. 4 Alternation of cytotoxicity of LAK (▨) and LA-TIL (■) in Case 3.

は、NK 活性、LAK 活性とも、分離直後は活性が認められず、その後上昇して、NK 活性では32日目、LAK 活性では25日目に最大値に達し、その後下降するという山型のパターンを示した (Fig. 4)。

3. TIL の phenotype

モノクローナル抗体による細胞表面マーカーの解析では、LA-TIL の phenotype は症例1にみられるように、CD3⁺ (pan T) が大部分を示し、CD16⁺ (NK cell) は少なく、CD8⁺ (suppressor/cytotoxic T) と HLA-DR⁺ (activated T) の細胞が多く、さらに詳しくみると、CD8⁺ CD11⁻ (cytotoxic T) の細胞の割合が非常に多い傾向を示す症例が多かった。しかし、症例3のように、HLA-DR⁺ の割合は高いが、CD8⁺ CD11⁻ よりも CD4⁺ 2H4⁻ (helper T) の割合が高くなるものも観察された (Fig. 5)。

4. 血清の違いによる増殖能と抗腫瘍活性の違い

ヒト新鮮血清 (AB 血清) と自己血清の添加の違いによる LAK と LA-TIL の増殖率と抗腫瘍活性の違いを、症例3で検討した。LAK, LA-TIL とも増殖率、NK 活性、LAK 活性の最大値は、自己血清で抑制される傾向が認められた (Table 2)。

考 察

腫瘍組織中に浸潤するリンパ球 TIL は Tリンパ球が主体であり、腫瘍抗原に特異的に感作されたリンパ球集団であることが推測される。これは腫瘍に対する宿主の免疫応答の一つと考えられる。

癌の免疫療法として、末梢血リンパ球 PBL から IL-2 で誘導した LAK を移入する養子免疫療法が試みられているが、治療に有効とされる10¹¹コのオーダーの大量の LAK を得るのはかなりの無理がある。そこで、腫瘍抗原に特異的に感作されていると考えられる TIL を養子免疫療法に利用して、より少量のリンパ球で治療効果を上げようとする試みが考えられ、現在、幾つかの

Table 2 Cell proliferation and cytotoxicity cultured in AB serum and suto-serum in Case 3.

LAK	AB serum	Auto-serum
fold expansion	6.3	2.8
NK activity (%)	5.9	4.3
LAK activity (%)	5.0	4.4

LA-TIL	AB serum	Auto-serum
fold expansion	33.8	12.6
NK activity (%)	61.8	16.7
LAK activity (%)	31.7	10.6

施設で TIL による養子免疫療法が検討され始めている。

われわれは、頭頸部癌患者より TIL を分離し、その増殖能と機能、また phenotype の検索を行った。無菌的に大量の腫瘍組織が得られる腎癌や肝癌と異なり、頭頸部癌では TIL の分離はより困難である。頭頸部癌では局所腫瘍が非無菌下にあり、生検では組織採取量が少なく、手術摘出では、化学療法や放射線療法による TIL の減少、活性の低下が避けられないからである。31検体のうち、感染10、TIL が少なかったり増殖しなかったもの10検体で、結局増殖に成功したのは11検体にすぎなかった。局所腫瘍をより無菌的に採取する工夫や少量の生検組織からいかに TIL を大量に増殖させるかが、今後の課題といえる。

TIL の増殖は、IL-2 存在下に培養後30~70日で最大となり、平均101.3倍の増殖を示した。これは、PBL の平均増殖率25.6倍よりも高かった。文献的にも TIL は数100倍²⁾、3~1000倍³⁾、~3000倍 (平均100倍)^{4,5)}、50000倍⁶⁾に増殖し、PBL よりも増殖率が高い^{4,6)}といわれている。増殖パターンは、10日前後抑制された後増殖するものと、抑制がなく直接増殖するものとがみられた。文献的にも、このような現象が観察されている⁴⁾。TIL の増殖には PBL と比較して、より高濃度の IL-2 が必要であった結果とも考え合わせ、分離直後の TIL に何らかの腫瘍周辺での抑制因子が影響している可能性が示唆された。今回の検討では、TIL は30~70日で最大増殖を示した後減少したが、文献的に3カ月位で増殖が停止することが多いようである²⁾。

TIL の抗腫瘍活性について、分離直後は NK 活性、LAK 活性、自己癌細胞傷害活性とも低いが^{3,6,7)}、IL-2 添加により増強し、20~30日で最高となり⁵⁾、45日以降低下³⁾、80日までに消失する⁵⁾と報告されている。とくに、自己癌細胞傷害活性は IL-2 添加によって著明に増強するとされている⁷⁾。症例数は少ないが、今回の結果も同様の傾向を示した。

分離直後の TIL の抗腫瘍活性が低い理由として、suppressor cell の混在⁸⁾、腫瘍から放出される因子に

Fig. 5 Phenotype of PBL (□), LAK (■), TIL (▨) and LA-TIL (■).

よる suppressor cell の活性化⁹⁾, また, この因子による直接の TIL の抑制¹⁰⁾などが推定されている。自己血清によって, TIL の増殖と抗腫瘍活性が抑制されていた今回の結果も, 腫瘍患者の血清中に TIL 抑制因子が存在する可能性を示唆している。しかし, 分離直後の TIL の抗腫瘍活性の抑制は十分量の IL-2 添加により解除される傾向も観察された。

TIL の phenotype の検索では CD8⁺ (suppressor/cytotoxic T) が60~70%, CD4⁺ (helper/inducer T) が20~50%, Leu7⁺ (NK cell) が~20%, B cell が~30%を占めると報告されている^{2,11,12)}。TIL を IL-2 存在下に培養すると, CD8⁺ が主に増殖する場合と, CD4⁺ が増殖することがあり, NK cell と B cell は減少し, HLA-DR⁺ と IL-2 receptor 陽性細胞が増加すると指摘されている^{2,6,11)}。

今回の検討では, 症例1をはじめ, 幾つかの症例の LA-TIL は CD8⁺, HLA-DR⁺ が主体で, しかも CD8⁺ CD11⁻ (cytotoxic T) が高い割合を占め, 自己癌細胞傷害活性を担っていたものは, 腫瘍特異的な cytotoxic T cell ではないかと推定された。しかし, 症例3のように異なる phenotype を示す症例もみられた。また, CD4⁺ 細胞に抗腫瘍活性が存在したとの報告もあり^{13,14)}, LA-TIL の表面マーカーとその活性には何種類かのパターンがみられるものと考えられる。

なお, 今回の検討では, 転移リンパ節からも TIL を分離した。局所腫瘍に比べて多量の細胞を得られるが, その増殖, 抗腫瘍活性, 表面マーカーはやや異なるという印象をうけた。これは, リンパ節中の転移巣の多寡によるのではないかと推察される。

癌患者の免疫療法として, TIL による養子免疫療法が臨床的に検討され始めている。実際の施行にあたり, 培養日数がどの時期の TIL をどの位の量移入すればよいか問題となるが, TIL の増殖と抗腫瘍活性の経時的变化より, 培養開始3週間位のものを投与することが望ましい¹⁵⁾。投与量は多ければ多いほど効果的と考えられるが, 今後臨床で TIL を応用し, その答えを出したいと考えている。また, 投与上, 細菌感染の防止など, 安全性にも注意を払わなければならない。今後さらに, TIL をより効率的に増殖させ, より高い抗腫瘍活性を維持させる方法の確立が望まれ, 現在, 他の cytokine や CD3 抗体添加による影響を検討中である。

おわりに

頭頸部癌患者27例より腫瘍組織31検体を採取し, このうち11検体で TIL の分離, 増殖が可能であった。この TIL を IL-2 存在下に培養して得た LA-TIL につき, PBL から得た LAK と比較し, 増殖能, 抗腫瘍活性, 表面マーカーを検討した。

1. TIL は IL-2 添加培養により増殖し、30~70日
で最大数となり、その後減少するパターンを示した。
LA-TIL は LAK より増殖率が高く、平均101.3倍に
増殖した。

2. TIL は NK 活性, LAK 活性, 自己癌細胞傷害
性をほとんど持たないが, LA-TIL はいずれの活性も
増強し, LAK より高い値を示した。

3. LA-TIL の phenotype は HLA-DR⁺ (acti-
vated T) が優位で, 症例により CD8⁺ CD11⁻ (cyto-
toxic T) の割合が高いものとそうでないものがみられ
た。

4. LA-TIL の増殖と抗腫瘍活性は, 自己血清によ
り抑制され, 患者血清中に TIL の抑制因子が存在する
可能性が考えられた。

5. LA-TIL は LAK に比べて, 増殖能, 自己癌細
胞傷害活性が高く, 養子免疫療法の移入細胞として有用
と考えられた。

ABSTRACT

Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) were
obtained from 11 out of 31 head and neck carci-
noma specimens (27 patients). TIL were cultured
in medium containing recombinant interleukin
2 (IL-2). Also the peripheral blood lymphocytes
(PBL) were obtained from same patients and
cultured in IL-2. The cell proliferation, antitu-
mor activity and phenotype of cultured TIL
(lymphokine activated TIL, LA-TIL) and cultured
PBL (lymphokine activated killer cells, LAK)
were investigated.

TIL increased by 30~70 days after the initiation
of culture ranged from 20.0~344.4-fold (average
of 101.3-fold). It was larger than PBL.

LA-TIL had the higher cytotoxic activities,
such as NK activity, LAK activity and auto-
logous tumor cell cytotoxicity than LAK.

The vast majority of TIL were HLA-DR⁺ cells
(activated T cells), and in some cases there
were large numbers of CD8⁺ CD11⁻ cells (cyto-
toxic T cells.).

The proliferation and antitumor activity of LA-
TIL was suppressed by auto-serum from patients.
It was suspected that there were suppressive
factors against TIL in the serum of patients.

TIL had much proliferative potential and auto-
logous tumor cell cytotoxicity than LAK. So,
it was considered that TIL were useful for the
adoptive immunotherapy.

文 献

- 1) Rosenberg SA, Spiess P. et al: A new approach
to the adoptive immunotherapy of cancer with tu-
mor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233 : 1318-
1321, 1986.
- 2) Topalian SL, Muul LM. et al: Expansion of hu-
man tumor infiltrating lymphocytes for use in im-
munotherapy trials. *J Immunol Methods* 102 : 127-
141, 1987.
- 3) 伊東恭悟, Balch, CM 他: 腫瘍内浸潤リンパ球
(TIL, Tumor Infiltrating Lymphocytes) とリンホ
カイン活性化リンパ球 (LAK Cells, Lymphokine
Activated Killer Cells) —ヒト新鮮分離癌細胞に
対するキラー細胞とインターロイキン 2 による活
性化—. *Oncologia* 20 : 71-85, 1987.
- 4) Whiteside TL, Heo DS. et al: Cytolytic antitumor
effector cells in long-term cultures of human tumor-
infiltrating lymphocytes in recombinant interleukin
2. *Cancer Immunol Immunother* 26 : 1-10, 1988.
- 5) Heo DS, Whiteside TL, et al: Long-term interleu-
kin 2-dependent growth and cytotoxic activity of
tumor-infiltrating lymphocytes from human squa-
mous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer
Res* 47 : 6353-6362, 1987.
- 6) Beldegrun A, Muul LM. et al: Interleukin 2 ex-
panded tumor-infiltrating lymphocytes in human
renal cell cancer: isolation, characterization, and
antitumor activity. *Cancer Res* 48 : 206-241, 1988.
- 7) Rabinowich H, Cohen R. et al: Functional anal-
ysis of mononuclear cells infiltrating into tumors:
lysis of autologous human tumor cells by cultured
infiltrating lymphocytes. *Cancer Res* 47 : 173-177,
1987.
- 8) Vose BM: Quantitation of proliferative and cyto-
toxic precursor cells directed against human tumors:
limiting dilution analysis in peripheral blood and at
the tumor site. *Int J Cancr* 30 : 135-142, 1982.
- 9) Keong A and Rabson AR: Supernatants derived
from a human hepatocellular carcinoma cell line (PLC
/PRF/5) activates a population of T-suppressor
cells. *Cancer Immunol Immunother* 15 : 178-183,
1983.
- 10) Miescher S, Whiteside TL. et al: Functional pro-
perties of tumor infiltrating and blood lymphocytes
in patients with solid tumors: effects of tumor cells
and their supernatants on proliferative responses
of lymphocytes. *J Immunol* 136 : 1899-1907, 1986.
- 11) Kurnick JT, Kradin RL. et al: Functional chara-
cterization of T lymphocytes propagated from human
lung carcinomas. *Clin Immunol Immunopath* 38 :
367-380, 1986.
- 12) Itoh K, Tilden AB et al: Interleukin 2 activat-
ion of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating into hu-
man metastatic melanomas. *Cancer Res* 46 : 3011-
3017, 1986.
- 13) Miescher S, Whiteside TL. et al: Clonal and fre-
quency analyses of tumor-infiltrating T lymphocytes
from human solid tumors. *J Immunol* 138 : 4004-
4011, 1987.
- 14) Rabinowich H, Steiner Z. et al: Clonal analysis
of human tumor infiltrating lymphocytes reactive
with autologous tumor cells: different target cell
specificities of NK-like and cytotoxic T-cell clones.
Cellular Immunol 104 : 210-217, 1987.
- 15) 関根暉彬: Tumor infiltrating lymphocytes (TIL)
による 養子免疫療法. *Medical Immunology* 16 :
727-730, 1987.