口腔扁平上皮癌患者リンパ球より誘導された抗 CD3 抗体／ IL-2 活性化細胞 (CD3・LAK) の標的細胞認識の検索

森 良 之 高 橋 雄 三 湊 秀 次
藤 林 孝 司 榎 本 昭 二

論文要旨

口腔扁平上皮癌患者末梢血リンパ球から、抗 CD3 抗体および IL-2 で LAK 細胞を誘導し、その性状および標的細胞認識に関与する細胞表面分子をモノクローナル抗体を用いて検索した。その結果、培養19日目の LAK細胞は TCR α/β のT細胞 (CD3+) とNK 細胞 (CD3- NKH-1+) が主体で、残りは TCR γ/δ T細胞より構成されていた。また、LAK 細胞は自己および同種の培養腫瘍細胞に対し障害活性を示し、その活性は抗 CD3 抗体によって抑制されたが、K562に対する細胞障害活性は抑制されなかった。このことより、LAK 細胞の標的細胞認識は MHC 非拘束性であり、TCR/ CD3 複合体を介しているものと、NK 様の TCR/ CD3 複合体を介さない二つの異なった機序が関与しているものと考えられた。

Key words: 口腔癌 (Oral cancer), インターロイキン 2 (Interleukin 2: IL-2), TCR/ CD3 複合体 (TCR/ CD3 complex)

緒 言

T細胞が抗原認識する際、抗原単独ではなく主要組織適合複合 (MHC) 抗原も同時に認識する必要がある^{1,2)}。またキラーT細胞が標的細胞を殺すためにも MHC クラスⅠの一致 (MHC-restriction) が必要であることが知られている³⁾。一方、このような古典的な抗原認識様式にあてはまらない MHC 非拘束性のキラー細胞の存在が明らかになってきている。

1976年 Morgan⁴⁾により TCGF として発見された IL-2 によってリンパ球から誘導される Lymphokine-activatedkiller (LAK) 細胞は、腫瘍に対する広い細胞障害性を示すことから MHC 非拘束性のキラー細胞の代表例とすることが出来る。

現在我々はT細胞に対してマイトジェニックに働く抗 CD3 モノクローナル抗体および IL-2 によって誘導された LAK 細胞 (CD3・LAK) を移入細胞として用いて口腔癌患者に対する養子免疫療法を行っている。

そこで今回、この CD3・LAK の細胞障害活性機序を明らかにする目的で、その性状および標的細胞認識に関与する細胞表面分子をモノクローナル抗体を用いて検索した。

方 法

1. 対象症例

自己培養腫瘍細胞株 (Ca9-22) が樹立された下顎歯肉扁平上皮癌患者 (症例 1: 62歳, 男性) と上顎洞扁平上皮癌患者 (症例 2: 57歳, 男性) を対象とした。

2. 末梢血リンパ球 (PBL) の分離

PBL はヘパリン加採血した被検者の末梢静脈血より比重遠心法により分離した。5%非動化 AB+ 新鮮凍結血漿を含む培養液 (Hymedium-910: コージンバイオ社) 中に浮遊させ、Türk 染色法によりリンパ球数を算出した。

3. 抗 CD3 モノクローナル抗体の培養フラスコ底面への固相化

抗 CD3 抗体 (OKT3: ヤンセン協和) を PBS に溶解し、10 μ g/ ml の濃度でフラスコ底面いっぱいに広げ、2時間室温で静置しその後 PBS で洗浄して使用した。

4. CD3・LAK 細胞の誘導

PBL より固相化抗 CD3 抗体および700JRU/ ml の IL-2 (r IL-2: S6820, 塩野義製薬) を用いて CD3・LAK 細胞を誘導した。

東京医科歯科大学歯学部第二口腔外科

Yoshiyuki MORI, Yuzo TAKAHASHI, Shuji MINATO, Takashi FUJIBAYASHI, Shoji ENOMOTO: Target cell recognition of anti-CD3 antibody and IL-2 induced LAK cells from lymphocytes on patients with oral squamous cell carcinoma

The second department of oral and maxillofacial surgery, Faculty of dentistry, Tokyo medical and dental university

表 1 実験に使用したモノクローナル抗体 (mAb)

抗 体	クローン	サブクラス
抗 HLA-Class I	B.9.12.1	IgG ₂ (Immunotec)
HLA-DR	L 243	IgG ₁ (B/D)
TCR α / β	WT 31	IgG ₁ (B/D)
TCR γ / δ	11 F 2	IgG ₁ (B/D)
CD3 (OKT3)		IgG ₁ (Ortho)
(Leu4)	SK 7	IgG ₁ (B/D)
CC 4 (Leu 3 a)	SK 3	IgG ₁ (B/D)
CD 8 (Leu 2 a)	SK 1	IgG ₁ (B/D)
CD16 (Leulla)	NKP 15	IgG ₁ (B/D)
NKH 1	N 901	IgG ₁ (C/C)

結 果

1. 標的細胞として用いた口腔扁平上皮癌由来細胞株 (Ca9-22, NA) および K562 について, その細胞表面上の HLA-class I および class II 抗原の発現状態を検索した (図 1)。その結果, Ca9-22, NA および K562 において, 抗原発現の程度に差はあるが, HLA-class I 抗原の発現が認められた。一方, HLA-class II 抗原の発現はいずれの細胞にも認められなかった。

2. 症例 1 の PBL より誘導した CD3・LAK (培養19日目) の細胞表面形質を検索した (図 2)。その結果, CD3・LAK の約90%は活性化細胞 (HLA-DR+) であり, 約60%はT細胞 (CD3+) で, 約40%は NK 細胞 (CD3- NKH1+) であると考えられた。さらに, CD3+ 細胞のうち約3/4 は TCR α / β 細胞であり約1/4 は TCR γ / δ 細胞であった。以上のことより, 培養19日目の CD3・LAK は TCR α / β の T細胞と NK 細胞が主体で, 残りは TCR γ / δ T細胞より構成されていると考えられた。

3. 症例 1 より誘導された CD3・LAK の自己培養腫瘍細胞 (Ca9-22) に対する細胞障害活性を測定し, それに及ぼす抗 CD3 抗体の影響を観察し, TCR/ CD3複合体の関与について検索した (図 3)。また同時に K562に対する細胞障害活性についても検討した。その結果, Ca9-22に対する細胞障害活性は, 培養21日, 30日のいずれの時期においても抗 CD3 抗体によって濃度依存性に抑制された。一方, K562に対する細胞障害活性はいずれの時期においても抑制されなかった。

5. CD3・LAK の細胞表面形質の検索

表 1 に示した各種モノクローナル抗体を用い, フローサイトメーターを使用して 2 重染色法により検索した。

6. 各種モノクローナル抗体による CD3・LAK の細胞障害活性阻害試験

細胞障害活性は 4 時間の ⁵¹Cr release 法で測定し, 試験遊離 - 自然遊離 / 最大遊離 - 自然遊離 $\times 100 = \%$ Lysis で表した。標的細胞として K562 および NK 非感受性の Ca9-22 (症例 1: 自己培養腫瘍細胞), NA (舌扁平上皮癌由来樹立細胞株) を用いた。エフェクター細胞の標的細胞認識の検索のため, 抗 CD3 抗体 (OKT3) および抗 HLA クラス I 抗体 (B9.12.1) をはじめ各種モノクローナル抗体を用い, 細胞障害活性の阻害試験を行った。標的腫瘍細胞上の HLA 抗原の発現は, あらかじめフローサイトメーターにて確認した。

図 1 培養腫瘍細胞の HLA class I および class II 抗原の発現状態

図 2 CD3・LAK の細胞表面形質
(症例 1 : 培養19日目)

一方、抗 TCR α/β および抗 TCR γ/δ 抗体ではその抑制は明かでなかった。さらに抗 HLA-class I 抗体では逆に細胞障害活性は増強された。

このことより、CD3・LAK は少なくとも培養21日から30日の期間では自己培養腫瘍細胞に対する細胞障害において TCR/CD3 複合体が関与している可能性が示された。一方、腫瘍細胞上の HLA-class I 抗原の関与については明かでなかった。

4. 症例 2 において、PBL より誘導された CD3・LAK (培養19日目) について、同種腫瘍細胞である NA および K562 に対する細胞障害活性に及ぼす抗 CD3 抗体前処理の影響を検討した (図 4)。その結果、症例 1 と同様に NA に対する細胞障害活性は抑制されたが、K562 に対しては抑制されなかった。

以上の結果より、CD3・LAK の標的細胞認識は MHC 非拘束性であり、また TCR/CD3 複合体を介しているものと、NK 様の TCR/CD3 を介さないものの 2 つの異なった機序が関与しているものと考えられた。

考 察

T 細胞による自己腫瘍細胞障害の機構において、一般に抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) は TCR/CD3 複合体を用いて標的細胞の MHC 抗原により提示された特異抗原を認識し、標的細胞を傷害すると考えられている^{5,6)}。

一方、IL-2 により末梢血リンパ球 (PBL) から誘導される Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞は、自己腫瘍を含む各種癌細胞に対して広く細胞障害活性を示し、このような古典的な抗原認識様式にあてはまらない MHC 非拘束性のキラー細胞と考えられる。また、抗腫瘍エフェクターとしての重要性が示されている NK 細胞も同様のものと考えられる。

図 3 CD・LAK の自己培養腫瘍細胞に対する細胞障害活性に及ぼす mAb の影響 (症例 1)

Target /mAb	(症例 2 : CD3・LAK 培養19日目)			
	% Lysis (E/T = 40, 4 hr ⁵¹ Cr release assay)			
	NA		K 562	
	none	anti-CD3* inhibition	none	anti-CD* inhibition
CD3・LAK				
	40.5±2.3	33.4±1.2	17.5%	82.9±0.7 78.9±1.3 4.8%

* assay 前 4°C, 45min, 10 μ g/ml の anti-CD3 で incubate.

図 4 CD・LAK の同種培養腫瘍細胞に対する細胞障害活性に及ぼす抗 CD3 抗体の影響 (症例 2)

今回の実験で、PBL から抗 CD3 モノクローナル抗体および IL-2 で活性化された LAK 細胞 (CD3・LAK) の性状を検討したところ、培養19日目において TCR α/β の T 細胞と NK 細胞が主体で、残りは TCR γ/δ T 細胞より構成されていると考えられた。また同時期の自己腫瘍細胞に対する細胞障害活性は濃度依存性に一部抗 CD3 抗体により抑制された。この事実より CD3・LAK 中の約60%をしめる T 細胞 (CD3+) は、その標的細胞認識において TCR/CD3 複合体が関与していることが示唆された。

一方、K562 に対する NK 活性は抗 CD3 抗体による阻害をほとんど受けなかった。この理由として、K562 に対する NK 活性の主体が約40%存在した NK 細胞 (CD3-NKH1+) によるものであり、NK 活性と LAK 活性はそれぞれ異なるポピュレーションにより担われている可能性と、逆に同一のポピュレーションだが K562 に対する NK 様の標的細胞認識には TCR/CD3 複合体が関与していない可能性が考えられる。ここで、FACS sorting により得た純粋な T 細胞からも培養20日後では NK 活性が誘導されること⁷⁾から、後者の可能性が高いと考えられた。一方、抗 TCR α/β 、TCR γ/δ 抗体による自己腫瘍細胞障害活性の抑制は明かでなく、抗 HLA-class I 抗体の添加では逆にその活性は増強された。これは、抗体の Fc 部と標的細胞の Fc レセプターにより ADCC がはたらいたものと考えられた。

今後、LAK 細胞の標的細胞認識に関与する細胞間接着分子の解析と標的細胞上のリガンド分子の解析が重要な課題であると考えられる。

結 語

1. 標的細胞として用いた口腔扁平上皮癌由来細胞 Ca9-22, NA および K562 の細胞表面に、HLA-class I 抗原の発現が認められた。

2. 培養19日目の CD3・LAK は、約60%の T 細胞 (CD3+) と約40%の NK 細胞 (CD3-NKH1+) から構成されていた。この T 細胞のうち、約75%に TCR α/β が、約25%に TCR γ/δ が発現していた。

3. 抗 CD3 抗体により CD3・LAK の自己培養腫瘍細胞 (Ca9-22) に対する細胞障害活性は濃度依存性に抑制された。また、NA に対する細胞障害活性の一部も抑制された。しかし、K562 に対する細胞障害活性は抑制されなかった。

4. 抗 HLA-class I 抗体では CD3・LAK の標的細胞に対する細胞障害活性は抑制されず、むしろその活性は増強された。これは抗体の FC 部分と標的細胞の Fc receptor を介した ADCC がはたらいたものと考

えられた。

5. 抗 TCR α/β および抗 TCR γ/δ 抗体では CD3・LAK の細胞障害活性の明らかな抑制は認められなかった。

以上の結果より、CD3・LAK の標的細胞認識は MHC 非拘束性であり、TCR/CD3 複合体を介しているものと、NK 様の TCR/CD3 複合体を介さないものの二つの異なった機序が関与しているものと考えられた。

SUMMARY

We investigated the characteristics and target cell recognition of CD3・LAK induced by anti-CD3 monoclonal antibody (mAb) and interleukin 2 (IL-2) from peripheral blood lymphocytes (PBL) on the patients with oral squamous cell carcinoma.

<Materials and Methods> CD3・LAK were induced by 10 μ g/ml of anti-CD3 mAb (solid phase) and 700JRU/ml of IL-2 (S6820). Surface marker of CD3・LAK were detected by flow cytometry. A 4-h ⁵¹Cr release assay was used to detect cytotoxic activity. Cultured tumor cell lines, which are Ca9-22 (established from squamous cell carcinoma of the lower gingiva: case 1), NA (established from squamous cell carcinoma of the tongue) and K562, were used as target cells. The expression of HLA antigen on the surface of the cultured tumor cell lines were detected by flow cytometry prior to 4-h ⁵¹Cr release assay detection. In order to investigate the target cell recognition of CD3・LAK, inhibition assay with mAb were done.

<Results> On day 19, CD3・LAK population mainly consisted of TCR α/β positive T cell (CD3+) and NK cell (CD3-NKH-1+), and remaining portion was TCR γ/δ positive T cell (CD3+). The CD3・LAK showed the cytotoxic activities against autologous and allogeneic cultured tumor cell lines, and these activities were inhibited by anti-CD3 monoclonal antibody. However the cytotoxic activities against K562 were not inhibited by anti-CD3 monoclonal antibody. These results indicate that the target cell recognition of CD3・LAK does not need MHC restriction. CD3・LAK maybe concerned with two different types of target cell recognition which can either be through TCR/CD3 complex or none at all.

文 献

- 1) Rosenthal, A. S., Shevach, E. M.: Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. J. Exp Med 138: 1194-1212, 1973.
- 2) Katz, D. H., Hamaoka, T., et al.: Cell interaction

- between histoincompatible T and B lymphocytes. II. Failure of physiologic cooperative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates. *J. Exp Med*, 137 : 1405-1418, 1973.
- 3) Zinkernagel, R. M., Doherty, P. C.: Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248 : 701-702, 1974.
 - 4) Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., et al.: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 193 : 1007-1008, 1976.
 - 5) Buss, S., et al.: The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science*, 235 : 1353-1358, 1987.
 - 6) Townsend, A., et al.: The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*, 44 : 959-968, 1986.
 - 7) 東みゆき : 口腔癌患者における IL-2 活性化キラー細胞の誘導に関する研究. *日口外誌* 34 : 438-450, 1988.