放射線照射による腫瘍関連抗原の shedding 抑制に関する研究

柴田 敏之

Modulation of the expression and shedding of tumor associated antigen by radiation

Toshiyuki SHIBATA

Abstract: We have previously reported that the 3-methylcolanthrene induced rat fibrosarcoma KMT-17 cell line and its subclone A3 shed a TAA, termed CE 7, from the cell surface and that this phenomenon might play a role in the immunological escape mechanism.

We have also reported that, when tumors in rats were treated by local 30 Gy irradiation, anti-tumor immune responses of spleen cells obtained from these treated rats were augmented. Thus, we examined whether this CE 7 antigen shedding is inhibited by x-irradiation and as a result tumor immunogenicity is enhanced. When A 3 cells growing in a medium containing 10% FCS were irradiated with ^{60}Co - γ -rays on day 2, the expression of CE 7 antigen on A 3 cells was enhanced. These CE 7 expressing cells were fixed with 1% paraformaldehyde and used for immunization by i.d. inoculation into syngenic WKA rats. The immunogenicity of CE 7 expressing cells was increased at least 100 fold (increase of LTD_{50}) as compared to non-irradiated cells. KMT-17 cells were transplanted into the right hind limb of syngenic WKA rats and the local tumor area was treated by irradiation with 10, 30 or 60 Gy 5 days after transplantation. CE 7 antigen positive cells were found in greater proportion within 30 Gy-irradiated tumors than in nonirradiated, 10 Gy-irradiated or 60Gy-irradiated tumors. These results suggested that irradiation enhanced the CE 7 antigen expression on A 3 and KMT-17 cells and that these CE7 antigen expressing cells can stimulate the anti-tumor immunity.

Key words: radiotherapy (放射線療法), tumor associated antigen (腫瘍関連抗原), immunogenicity (免疫原性)

緒 言

悪性腫瘍の治療において、放射線を用いた治療法は広く臨床応用されており、口腔領域の悪性腫瘍の治療においても単独療法あるいは併用療法として頻用されている。また、その治療効果には、腫瘍細胞に対する直接効果以外に、放射線により障害を受けた腫瘍細胞が誘導する宿主抗腫瘍免疫が重要な役割を演じていると指摘されている。放射線治療の効果に免疫学的な背景が存在する

証明として、放射線照射による不活化腫瘍細胞が強い免疫原性を示すこと^{1,2)}、放射線治療後腫瘍組織への免疫担当細胞の浸潤が著しいこと^{3~6)}、さらには、腫瘍への局所放射線治療が宿主抗腫瘍免疫の誘導をもたらし得ることなどがあげられている^{7~15)}。そして、この放射線による抗腫瘍免疫誘導の機序として放射線により障害を受けた腫瘍細胞の抗原性の変化、とくに腫瘍関連抗原 (tumor associated antigen: 以下 TAA) の増強が推察されている。しかし、放射線による TAA の増強を直接的に証明した研究は少なく、パーキット・リンパ腫由来の培養細胞の EB ウイルス関連抗原の表現が放射線照射により増強されることを示しているにすぎない^{16~18)}。

放射線治療における間接的效果として、水越は、3-methylcolanthrene 誘発 WKA ラット線維肉腫 KMT-17細胞を用いた局所放射線照射治療実験を行い、放射線

北海道大学歯学部口腔外科学第1講座

(主任: 福田 博教授)

First Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Hokkaido University (Chief: Prof. Hiroshi Fukuda)

受付日: 平成2年3月7日

照射線量の違いにより宿主に誘導される抗腫瘍免疫、さらには転移の抑制効果に違いがあることを指摘し、30 Gy 局所照射後の腫瘍組織が免疫原となる可能性を示唆している¹⁹⁾。最近になり、KMT-17 細胞より得られた培養株の1クローン A 3 細胞が、通常の10% fetal calf serum (FCS) 添加培地で増殖させると TAA である CE 7 抗原を vesicles とともに shedding し、細胞膜面から失って免疫学的に逃避し同系宿主で致死的増殖をすること、一方、A 3 細胞は、培養条件を変え1% FCS 添加培地で緩徐に増殖させるとその shedding が抑制され、CE 7 抗原を細胞膜面に表現し同系宿主から免疫学的に拒絶されることが示されてきた。また、この CE 7 抗原の shedding は、A 3 細胞の親株である *in vivo* 継代 KMT-17 細胞でも認められることが示されてきた^{20,21)}。そこで、放射線治療における免疫学的背景を検索するために、放射線照射による腫瘍細胞膜面の CE 7 抗原の shedding の抑制と免疫原性の変化との関係を検討した。

材料および方法

1. 実験動物

北海道大学医学部附属動物施設より供与された8~12週までの雌 WKA ラットを用いた。

2. 腫瘍細胞

WKA ラットに 3-methylcolanthrene (MC) により誘発された線維肉腫 KMT-17 細胞を用いた。

3. 細胞培養

In vivo 継代 KMT-17 より得られた培養株 c-KMT-17 細胞を限界希釈法にてクローニングし、得られたクローンのうち最も腫瘍原性が高く、免疫原性が低いクローン A 3 細胞を本実験に用いた²²⁾。A 3 細胞は、熱非働化 fetal calf serum (FCS), sodium pyruvate (1 mM), glycine (0.1 mM), L-serine (0.25 mM), L-glutamine (2 mM) を補った Eagle's MEM 培地にて、37°C の 5% CO₂ 培養器にて培養した。以下、10%もしくは1% FCS 添加培地で培養している A 3 細胞をおのおの 10% FCS-A 3 細胞、1% FCS-A 3 細胞と略す。また、この A 3 細胞は、ヘキスト 33258 染色法、走査型電子顕微鏡 (SEM) および、PPLO-agar による試験にてマイコプラズマ非感染であり、また抗 gP 70 抗体による細胞障害試験、抗 VAA (virus associated antigen) 血清による間接蛍光抗体法により、ウイルス非感染であることを確認した。

4. 放射線照射

In vivo 放射線照射は、KMT-17 細胞 ($1 \times 10^6/0.05$ ml) を WKA ラットの右下肢筋肉内に移植し、移植後5日目に行った。*in vitro* 放射線照射は10% FCS-A 3 細胞を10% FCS 添加培地に $1 \times 10^6/\text{dish}$ 播き、培養開

始2日目の対数増殖期に行った。照射装置は ⁶⁰Co- γ 線照射装置 (東芝社製 RCR 120 C 3型) を用い、線源からの距離を *in vivo* では 80 cm, *in vitro* では 50 cm とし、線量率 0.715~0.716 Gy/分で照射を行った。

In vivo 照射では腫瘍局所のみ照射されるように厚さ 5 cm の鉛板で遮蔽して行った。

In vitro 照射では細胞培養用 plastic dish を氷上に置き行った。

5. 抗 CE7 Monoclonal 抗体 (anti-CE 7 MoAb)

WKA ラットに 1% FCS-A 3 細胞で過免疫して得られた脾細胞とマウス・ミエローマ細胞とを細胞融合して得られたハイブリッドマ (CE 7 細胞) の培養上清を anti-CE 7 MoAb として用いた。この抗体は、分子量 4,200 の糖タンパク質 (CE 7 抗原) を認識するラット IgG である。

6. 抗 RT1^K Monoclonal 抗体 (anti-RT1^K MoAb)

ACI ラットに WKA ラットの脾細胞を免疫し得られた脾細胞とマウス・ミエローマ細胞とを細胞融合して得られたハイブリッドマの培養上清を anti-RT1^K MoAb として用いた。この MoAb はラットの主要組織適合抗原 (MHC class I 抗原) を認識するラット IgG である。

7. 間接蛍光抗体法および Flow cytometry (FCM) による抗原量の測定

腫瘍細胞上の CE 7 抗原は、1次抗体に anti-CE 7 MoAb を用い、2次抗体に FITC 標識抗ラット IgG (Cappel 社製) を用いた間接蛍光抗体法により染色し、flow cytometry (FACSscan Becton Dickinson) により蛍光量の測定を行った。また、同時に propidium iodide 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用い、生死細胞の判定を行った。

8. 免疫電子顕微鏡 (免疫電顕) 学的検索

In vitro 放射線照射後1日目の 10% FCS-A 3 細胞を anti-CE7 MoAb とビオチン化抗ラット IgG を用い、ABC 法にて染色後、2% glutaraldehyde 0°C 20分 で固定し、DAB 発色させた。発色後、2% osmium acid 室温60分 で再固定し、30~100% のアルコールにて脱水後 epon 812 に包埋し、超薄切片を作製し、透過型電顕 (HITACHI 800 型) にて細胞膜面の CE 7 抗原を検索した。

9. 放射線照射後腫瘍細胞の処理

In vitro 照射後の腫瘍細胞は、0.5 mM EDTA にて浮遊細胞とした。*in vivo* 照射後の腫瘍組織は、その後、経目的に摘出し半側を H-E 標本とし、残り半側を氷上シャーレにて細切し 0.2% Type I collagenase 37°C 30分 処理にて浮遊細胞とした。また、浮遊細胞の一部を塗抹標本とし、May-Giemsa 染色し腫瘍細胞の確認を行った。

10. 腫瘍細胞の不活化固定

In vitro 30 Gy 照射後1日目の10% FCS-A 3 細胞および未処理10% FCS-A 3 細胞を1% paraformaldehyde

37°C 30分で不活化固定し、おのおの 2×10^6 個皮内免疫に用いた²³⁾。

11. 統計学的解析

2つの群における統計学的差異は χ^2 -test によって解析し、また、2つの群の平均値の統計学的差異は Student's-test によって解析した。

結 果

1. *In vitro* 放射線照射による CE 7 抗原の変化

10% FCS-A 3 細胞を10% FCS 添加培地に 1×10^6 /dish 播き、培養開始2日目の対数増殖期に1~90 Gyまでの各線量の放射線照射を行い、照射終了後に EDTA 処理にて浮遊細胞とし、再度10% FCS 添加培地に 1×10^6 /dish 播いた。その後経時的に細胞数の算出と細胞膜面上の CE 7 抗原を anti-CE 7 MoAb を用い、蛍光抗体間接法にて染色し FCM を用い測定した。

なお、対照群として1% FCS-A 3 細胞と非照射 10% FCS-A 3 細胞を用いた。蛍光強度 (mean 値) の変化は、照射後1日目では、非照射 10% FCS-A 3 細胞群 49.62, 10 Gy 照射群 65.89, 30 Gy 照射群 81.37, 60 Gy 照射群 82.33, 90 Gy 照射群 85.21, 1% FCS-A 3

細胞群 78.76 であり、照射後2, 3日目でも同様の結果であった。つまり、10 Gy 以上の照射により照射後1日目より CE 7 抗原を膜面に表現する細胞が出現し始め、30 Gy 以上の照射により1% FCS-A 3 細胞と同等の CE 7 抗原を表現する細胞が出現した。また、このような CE 7 抗原を表現する細胞は、観察した3日間とも同様に認められた (図1, 表1)。

細胞数の変化は、非照射群では、照射後1日目, 1.93 ± 0.11 , 2日目 4.10 ± 0.30 , 3日目 $7.80 \pm 0.70 (\times 10^6)$ 個と増加したのに比べ、30 Gy 照射群1日目, 0.75 ± 0.03 , 2日目 0.72 ± 0.06 , 3日目 $0.50 \pm 0.04 (\times 10^6)$ 個と減少していった。一方、60, 90 Gy 照射群では、1日目, 0.64 ± 0.02 , 0.36 ± 0.02 , 2日目 0.21 ± 0.03 , $0.15 \pm 0.02 (\times 10^6)$ 個と急速に減少していった (図2)。

2. 免疫電顕による CE 7 抗原の検索

10% FCS-A 3 細胞を10% FCS 添加培地に 1×10^6 /dish 播き、培養開始2日目の対数増殖期に30 Gy, 60 Gy の放射線照射を行い、照射後1日目の細胞膜面の CE 7 抗原を ABC 法を用いた免疫電顕にて検索した。なお、対照群として非照射 10% FCS-A 3 細胞と1% FCS-A 3 細胞を用いた。

非照射 10% FCS-A 3 細胞は、CE 7 抗原をほとんど

図1 *In vitro* 放射線照射による CE 7 抗原の変化

10% FCS-A 3 細胞を 1×10^6 /10 ml/dish 播き、培養開始2日目に各線量の $^{60}\text{Co}-\gamma$ -線照射を行った。照射後1日目に細胞膜面の CE 7 抗原量を蛍光抗体間接法と FCM にて検索した。

表 1 *In vitro* 放射線照射による CE 7 抗原（蛍光強度）の変化

放射線照射 ^{a)} 線量 (Gy)	CE 7 抗原表現（蛍光強度） ^{b)c)}		
	1 日目 平均値（増加率％）	2 日目 平均値（増加率％）	3 日目 平均値（増加率％）
0	49.62 (0.0)	48.75 (0.0)	69.38 (0.0)
1	57.10 (15.1)	57.27 (17.5)	70.69 (1.9)
5	57.00 (14.9)	58.73 (20.1)	74.48 (7.4)
10	65.89 (32.8)	66.76 (36.9)	90.57 (30.5)
30	81.37 (64.0)	90.42 (85.4)	107.93 (55.6)
60	82.33 (65.9)	93.08 (90.0)	114.86 (65.6)
90	85.21 (71.1)	92.05 (88.8)	—
1% FCS-A 3	78.76 (59.2)	91.50 (87.7)	103.5 (49.2)

a) 10% FCS-A3 細胞を 1×10⁶/10 ml/dish 播き、培養開始 2 日目に各線量の ⁶⁰Co-γ-線照射を行った。
b) 放射線照射後、経日的に細胞膜面の CE 7 抗原量を 蛍光抗体間接法と FCM を用い、 蛍光強度にて検索した。
c) 蛍光強度の増加率 (％)=(照射群蛍光強度-非照射群蛍光強度)/(非照射群蛍光強度)×100

図 2 *In vitro* 放射線照射後の細胞数の変化
10% FCS-A 3 細胞を 1×10⁶/10 ml/dish 播き、培養開始 2 日目に各線量の ⁶⁰Co-γ-線照射を行った。照射後、再度 1×10⁶/10 ml/dish 播きその後経日的に生細胞数をトリパンブルー染色後算出した。

写真 1 免疫電顕像
非照射10% FCS-A 3 細胞
細胞膜面に CE 7 抗原は、ほとんど表現されていない (ABC 法・×8,000)。

胞膜面に表現されることを示した。
3. *In vitro* 放射線照射後腫瘍細胞の免疫原性の変化
In vitro 30 Gy 放射線照射により CE 7 抗原を細胞膜面に表現している 10% FCS-A 3 細胞と非照射 10% FCS-A 3 細胞の免疫原性を比較検討した。 *in vitro* 30 Gy 放射線照射後 1 日目の 10% FCS-A 3 細胞と非照射 10% FCS-A 3 細胞を 1% paraformaldehyde にて 37℃ 30 分で不活化固定し、おのおの 2×10⁶ 個ずつ皮内免疫に用いた。なお、この 1% paraformaldehyde 固定により CE 7 抗原の抗原性に変化のないことを固定後 anti-CE 7 MoAb を用い FCM にて確認した。皮内免疫後 10 日目に A 3 細胞の親株である *in vivo* 継代

ど表現していないが、30 Gy、60 Gy 照射後 10% FCS-A 3 細胞は、1% FCS-A 3 細胞と同等に CE 7 抗原を細胞膜面に表現していた。また 30 Gy 照射群と 60 Gy 照射群との間にその表現量に差は認められなかった (写真 1, 2)。以上の結果は FCM の結果と一致し、CE 7 抗原は放射線照射によりその shedding が抑制され細胞

図 3 放射線照射後 10% FCS-A3 細胞の免疫原性の測定

写真 2 免疫電顕像
30 Gy 照射後 1 日目 10% FCS-A3 細胞
細胞膜面の CE 7 抗原の表現が、増強されている
(ABC 法: ×8,000).

KMT-7 細胞を 1×10⁴, 1×10⁵, 1×10⁶ 個攻撃皮下移植し、その後、腫瘍増殖と腫瘍死するラットの観察を行った(図3)。なお、対照群として非免疫群を設けた。1×10⁴個攻撃移植した場合、各群間に有意差は認められなかったが、1×10⁵個移植した場合腫瘍死したラットは、30 Gy 照射後 10% FCS-A3 免疫群 9 匹中 0 匹、非照射 10% FCS-A3 免疫群 10 匹中 5 匹、非免疫群 5 匹中 2 匹であった。1×10⁶ 個移植した場合も腫瘍死したラットは、30 Gy 照射後 10% FCS-A3 免疫群 10 匹中

0 匹、非照射 10% FCS-A3 免疫群 10 匹中 4 匹、非免疫群 4 匹中 4 匹であった(表2)。また、30 Gy 照射後 10% FCS-A3 細胞免疫群は、非照射 10% FCS-A3 細胞免疫群および非免疫群に比べ有意に腫瘍増殖の抑制も示した。以上より、*in vitro* 30 Gy 放射線照射により CE7 抗原を表現した 10% FCS-A3 細胞の免疫原性は、表現していない非照射 10% FCS-A3 細胞に比べ強い免疫原性を示した。

4. *In vitro* 放射線照射によるラット主要組織適合抗原(RT1^K抗原)の変化

免疫原性の検索に用いた *in vitro* 30 Gy 放射線照射後 10% FCS-A3 細胞のラット主要組織適合抗原の表現量を anti-RT1^K MoAb を用いて検索した。*in vitro* 放射線照射後 1 日目の 10% FCS-A3 細胞と非照射 10% FCS-A3 細胞を anti-RT1^K MoAb を用い、蛍光抗体間接法にて染色後 FCM を用いて測定した。その結果、30 Gy 照射後 10% FCS-A3 細胞の RT1^K 抗原の表現量は、非照射 10% FCS-A3 細胞とほぼ同等であり、むしろ若干ではあるが、非照射 10% FCS-A3 細胞に比べ表現量が減少している傾向が認められた(図4)。このことより、*in vitro* 30 Gy 照射後 10% FCS-A3 細胞の免疫原性の上昇は、RT1^K 抗原の表現量の変化に基づく現象ではなく、CE 7 抗原の表現量の変化に基づく現象であると推察された。

5. *In vivo* 放射線照射による CE 7 抗原の変化

A3 細胞の親株である KMT-17 細胞を 1×10⁶個/0.05 ml WKA ラット右下肢筋肉内に移植し、腫瘍移植 5 日目に腫瘍局所へ 10, 30, 60 Gy の放射線照射を行っ

表 2 放射線照射後10% FCS-A 3 細胞の免疫原性の変化

放射線照射処理 ^{a)} 線量 (Gy)	皮内免疫 ^{b)}	KMT-17 細胞の増殖率 (腫瘍死亡率) ^{c)}		
		1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶
30	+	0/10	0/9 ^{d)}	0/10 ^{e)}
0	+	2/10	5/10	4/10
対照群	—	2/5	2/5	4/4

a) 10% FCS-A 3 細胞に各線量の ⁶⁰Co- γ -線照射を行い、照射後1日目に1% paraformaldehyde 30°C, 30分間にて不活化固定した。

b) 不活化固定後の細胞をおのおの2×10⁶個ずつ皮内免疫に用いた。

c) 皮内免疫後10日目に、各細胞数の KMT-17 細胞を攻撃皮下移植した。

d), e) 他群に対し p<0.05 で有意差を示す。

図 4 *In vitro* 放射線照射による RT1K (ラット MHC class I) 抗原の変化

10% FCS-A 3 細胞を 1×10⁶/10 ml/dish 播き、培養開始2日目に各線量の⁶⁰Co- γ -線照射を行った。照射後1日目に細胞膜面の RT1K 抗原の量を蛍光抗体間接法と FCM にて検索した。

た。その後、経時的に局所腫瘍組織を摘出し、一部を H-E 標本とし腫瘍組織の確認を行い、残りを細切し 0.2 % Type I collagenase 37°C 30分処理にて浮遊細胞とした。この細胞の CE 7 抗原を anti-CE 7 MoAb を用い 蛍光抗体間接法にて染色し FCM を用い測定した。また、FCM に用いた細胞の一部を塗抹標本とし May-Giemsa 染色し腫瘍細胞の確認を行った(図5)。対照群として非照射腫瘍組織を用いた。照射後1日目では照射群は非照射群に比べ CE 7 抗原の軽度増強が認められたが、照射線量による差は認められなかった。しか

し、照射後、2日目、3日目では 30 Gy 照射群で、10 Gy、60 Gy 照射群および非照射群に比べ有意に CE 7 抗原を表現する細胞が出現した。また、10 Gy 照射群では、照射後3日目以後、非照射群と同様に細胞膜面に CE 7 抗原を表現しなくなった。一方、60 Gy 照射群では、細胞死が強く照射後4日目には腫瘍細胞の回収が不可能となった(図6、表3)。このことは、*in vivo* 放射線照射でも *in vitro* と同様に CE 7 抗原の shedding が抑制され、細胞膜面に表現されることを示し、また、CE 7 抗原を細胞膜面に表現する細胞が出現するには、

図 5 *In vivo* 放射線照射による CE 7 抗原の変化の測定

図 6 *In vivo* 放射線照射による CE 7 抗原の変化

WKA ラット右下肢筋肉内に 1×10^6 個の KMT-17 細胞を移植し、移植後 5 日目に各線量の放射線照射を行った。照射後 3 日目の腫瘍組織を摘出し、細切後 0.2% Type I collagenase 処理により浮遊細胞とし、この細胞の CE 7 抗原を蛍光抗体間接法と FCM により検索した。

表 3 *In vivo* 放射線照射による CE 7 抗原 (蛍光強度) の変化

放射線照射 ^{a)} 線量 (Gy)	CE 7 抗原表現 (蛍光強度) ^{b)c)}			
	1 日目 平均値 (増加率%)	2 日目 平均値 (増加率%)	3 日目 平均値 (増加率%)	4 日目 平均値 (増加率%)
0	25.15 (0.0)	7.91 (0.0)	10.05 (0.0)	30.05 (0.0)
10	33.97 (35.1)	11.01 (39.2)	10.94 (8.9)	26.75(-11.5)
30	37.67 (49.8)	28.06(254.2)	48.00(377.6)	52.70 (75.4)
60	32.82 (30.5)	23.45(196.5)	12.00 (20.0)	—

a) WKA ラット右下肢筋肉内に 1×10^6 個の KMT-17 細胞を移植し, 移植後 5 日目に腫瘍局所に各線量の $^{60}\text{Co}-\gamma$ -線照射を行った.

b) 照射後経目的に腫瘍組織を摘出し, 細切後 0.2% Type I collagenase 37°C 30 分処理にて浮遊細胞とし, この細胞の抗原量を蛍光抗体間接法と FCM を用い蛍光強度にて検索した.

c) 蛍光強度の増加率 (%) = (照射群蛍光強度 - 非照射群蛍光強度) / (非照射群蛍光強度) $\times 100$

30 Gy 程度の至適線量の存在することを示唆した.

考 察

本研究で用いた腫瘍細胞 (*in vivo* 継代 KMT-17 およびその培養株の 1 クローン A 3 細胞) は, 増殖の良い状態では TAA である CE 7 抗原を vesicles とともに shedding 放出し細胞膜面より失い免疫学的逃避をしていると考えられる. また, CE 7 抗原を表現する 1% FCS-A 3 細胞は, 宿主より免疫学的に拒絶されること, CE 7 抗原を表現しない 10% FCS-A 3 細胞より強い免疫原性を示すことから, CE 7 抗原は, きわめて免疫原性の強い抗原と考えられる^{20,21)}. 一般に, 細胞膜抗原は抗体が作用すると clustering, capping が進行し shedding されやすくなることが知られているが, CE 7 抗原のように抗体の非存在下での shedding の報告も多く, 特に白血病細胞やメラノーマ細胞から TAA の shedding が知られている^{24,25)}. しかし, これらの場合, TAA が細胞膜面に表現されていると同時に shedding されており, CE 7 抗原のように vesicles の放出とともに高度に TAA の shedding が起こり細胞膜面より失われてしまう例は少ない. また, 腫瘍細胞の膜面より TAA が shedding され失われると, 腫瘍が宿主免疫より逃避するばかりでなく, shedding された TAA が blocking factor またはサブプレッサー細胞を誘導する suppressogenic 抗原として作用し, 宿主に負の免疫を誘導する可能性も指摘されている²⁶⁻²⁸⁾. そこで, CE 7 抗原の shedding の抑制に注目し, shedding し失われてしまう CE 7 抗原を細胞膜面にとどめ, CE 7 抗原を 1% FCS-A 3 細胞のように表現する細胞を出現させることが宿主抗腫瘍免疫の誘導, さらに治療成績につながると考えられた.

今回の実験結果で CE 7 抗原は, *in vitro* 放射線照射によりその shedding が抑制され 10% FCS-A 3 細胞

の膜面に表現された. この現象は, 10 Gy 以上の照射により認められ始め, 30 Gy 以上において著明であった. しかし, 30 Gy 以上の照射線量では, 細胞膜面の CE 7 抗原の表現量は, ほぼ同等であり, 照射線量の増加に伴う抗原量の増加はあまり認められなかった. また *in vitro* 照射後の腫瘍細胞数は, 30 Gy 照射群ではその減少が比較的緩徐であったのに対し, 60, 90 Gy の高線量群では, 急速な減少を示した. これらのことより照射線量の増加は細胞膜面上の抗原量の増加には直接結びつかずむしろ細胞数の減少をもたらし, CE 7 抗原を表現する細胞は, *in vitro* 照射では, 30-60 Gy 程度の放射線照射線量で最も効率よく出現したと考えられた (図 1, 2, 表 1, 2).

放射線照射後の腫瘍細胞の免疫原性の変化について検討したところ, *in vitro* 30 Gy 放射線照射により CE 7 抗原を表現する細胞を 1% paraformaldehyde 37°C 30 分固定し皮内免疫に用いた群は, 表現していない細胞 (10% FCS-A 3) を用い免疫した群より *in vivo* 継代 KMT-17 細胞に対する強い移植抵抗性を示した (表 3). このことは, 放射線照射により CE 7 抗原を表現した状態の細胞が, CE 7 抗原を表現していない状態の細胞 (非照射 10% FCS-A 3 細胞) より強い免疫原性を有していることを示し, *in vitro* 放射線照射により CE 7 抗原を細胞膜面に表現した細胞の免疫原性が上昇したと考えられた. また, 10% FCS-A3, 1% FCS-A 3 細胞を用いて, 1% paraformaldehyde による不活化固定の影響を検索したところ, CE 7 抗原の表現は, 不活化固定前後において FCM で検索する限り変化していなかった.

このことより, CE 7 抗原の抗原性および抗原表現は, この 1% paraformaldehyde 不活化固定により変化しないと考えられた. さらに, 免疫原に用いた放射線照射後 10% FCS-A 3 細胞の主要組織適合抗原の表現量を, anti-RT1^K MoAb を用いて検索した結果, その表現量

は非照射10% FCS-A 3細胞とはほぼ同等でありむしろ若干ではあるが、非照射10% FCS-A 3細胞に比べ表現量が減少している傾向が認められた。以上の結果より、*in vitro* 30 Gy 放射線照射後10% FCS-A 3細胞の免疫原性の上昇は、RTI^K 抗原の表現量の変化に基づく現象ではなく、CE 7 抗原の表現量の増加に基づく現象であると推察された。

水越は、*in vivo* 継代 KMT-17 細胞を用いた照射治療実験を行い、局所放射線照射線量の違いが宿主抗腫瘍免疫の誘導ならびに転移に及ぼす影響について検索し、局所腫瘍を50%程度制御する 30 Gy 局所照射が最も強い宿主抗腫瘍免疫の誘導と転移の抑制を示すことを明らかにした。また、この 30 Gy 局所照射における転移抑制効果は、放射線照射後1日目に腫瘍を外科摘出すると認められなくなることから、適当な線量の放射線照射を受けた腫瘍組織が一定期間宿主に残存していることが、強い抗腫瘍免疫を誘導し、転移の抑制につながったと推察している¹⁹⁾。本研究において、水越が行ったのと同じ実験系を用い、*in vivo* 放射線照射線量の違いによる CE 7 抗原の発現の差異について検討した。放射線照射後1日目では、各線量照射後の腫瘍細胞は、ほぼ同等に CE 7 抗原を表現していた。しかし、その程度は弱く非照射の KMT-17 細胞との差は軽度であった。2日目、3日目では、30 Gy 局所照射後の腫瘍細胞は、他の10 Gy 照射群、60 Gy 照射群および非照射群の腫瘍細胞に比べ有意に CE 7 抗原を表現していた(図5、表4、5)。このことは、30 Gy 局所照射治療が、最も強い抗腫瘍免疫の誘導を示すという実験結果と一致し、放射線照射により CE 7 抗原のような TAA を表現する細胞の出現が、放射線治療における宿主抗腫瘍免疫誘導の機序の一因として関与していると推察された。以上の結果から、放射線治療の効果には、放射線による直接効果以外に、放射線により傷害を受けた腫瘍細胞の腫瘍関連抗原(TAA)の増強を介した宿主抗腫瘍免疫の誘導が関与していると考えられた。

放射線照射は直接的、間接的に細胞を障害し、線量に応じて核障害、細胞質障害、細胞膜障害を引き起こし、最終的に細胞死をもたらす。特に間接作用の free radical による影響は、核 DNA 鎖への作用以外に細胞内各種酵素の失活作用を持ち、細胞の代謝全体に傷害を及ぼすことが知られている。本研究で検索した CE 7 抗原は、10% FCS-A 3細胞および KMT-17 細胞の細胞膜面より放出される vesicles に乗って shedding されている。一方、CE 7 抗原は、10% FCS-A 3細胞を1% FCS 添加培地で培養することにより、vesicles の放出の抑制とともに細胞膜面にとどまり表現されるようになる。最近になり CE 7 抗原は、膜面にはあまり表現されていない10% FCS-A 3細胞の細胞内にも多く存在していることも示されてきた。つまり、この CE 7 抗原

は、増殖の良い A 3細胞、KMT-17 細胞では、盛んに産生され、次々に vesicles に乗って細胞膜面より細胞外に shedding されている抗原であると考えられる。また、本研究において *in vitro* 放射線照射後24時間以内という比較的短時間に CE 7 抗原を細胞膜面に表現する細胞が出現し、その後観察した3日間とも表現量に変化が認められなかった。これらのことから、放射線照射により CE 7 抗原が細胞膜面に表現する細胞が出現した理由として、放射線照射により DNA レベルでの、CE 7 抗原の産生が促進されたり、抑制されたりしたのではなく、vesicles の産生の抑制をも含めた細胞の代謝レベルでの傷害により CE 7 抗原が細胞膜面にとどまったと推察された。また、*in vivo* 30 Gy 照射によって CE 7 抗原を表現する細胞が多く出現した理由として 10 Gy 照射では、腫瘍細胞に十分な傷害が及ばず、60 Gy の高線量照射群では、腫瘍細胞が完全に細胞死し、CE 7 抗原が細胞膜面に表現されず、30 Gy 照射では、中等度に腫瘍細胞に傷害が及んだことが推察された。このことは、*in vivo* 照射実験で各線量照射後の腫瘍径が、60 Gy 照射後のものでは、急速に縮小し照射後3日目には、生細胞の回収が不可能であったのに対し、10 Gy では、ほとんど影響を受けず非照射のものと同等の増殖を示し、30 Gy 照射群では、増殖が抑制され、観察した5日間ともほぼ同じ腫瘍径を示したことから、さらには、*in vitro* 照射実験で、照射線量の増加が細胞膜面 CE 7 の抗原量の増加には結びつかず、むしろ細胞数の減少をもたらしたことから推察された。

これまで、KMT-17 細胞を同系宿主に移植すると腫瘍の増殖に伴い、宿主に強い負の免疫、サプレッサー活性が誘導されること²⁹⁾、また治療実験でも、凍結外科や 60 Gy 高線量放射線照射のように腫瘍組織を1度に破壊した場合、宿主に負の免疫が誘導されてくることが知られている^{19,30-32)}。先に述べたように、腫瘍細胞より shedding された抗原は可溶性抗原となり宿主に負の免疫を誘導することが知られている。KMT-17 細胞より vesicles とともに放出される CE 7 抗原も可溶性抗原となり宿主に負の免疫を誘導することが予想される。このことから、放射線により shedding を抑制することは、宿主抗腫瘍免疫を有効に作動させるのに必要となってくる。また、CE 7 抗原は、KMT-17 細胞の細胞内にも多く含まれており、凍結外科や、60 Gy 高線量照射のように KMT-17 細胞を1度に破壊した場合には、多量の CE 7 抗原が細胞外に流出し、宿主に負の免疫を誘導すると考えられる。一方、本研究で示したようにこの CE 7 抗原を細胞膜面にとどめた場合には、有効な免疫原となり宿主抗腫瘍免疫が誘導される。これらのことから、30 Gy 程度の線量による治療は、TAA の shedding を抑制し腫瘍細胞の抗原性を増強するとともに凍結外科や 60 Gy 高線量照射のような多量の可溶性抗原

の流出もなく、宿主抗腫瘍免疫を誘導するのに有効であると考えられた。

本研究の結果は、放射線照射による抗腫瘍免疫誘導の機序として、TAA の存在様式の変化が関与している可能性を示し、このような現象が生じるのには、30 Gy 照射のような至適線量が存在することを示している。また、TAA の shedding は、人の悪性腫瘍より得られた培養株においても見出されており、治療の面から考えて、外科手術を前提とした術前照射として 30 Gy 照射のような低線量放射線照射が、宿主抗腫瘍免疫の誘導ならびに治療成績に有利に働く可能性を示唆している。

現在、CE 7 抗原の shedding の抑制は、放射線以外に Cyclophosphamide (CY), Bleomycin (BLM), Mitomycin (MMC), などの抗癌剤でも認められ、この現象が、治療成績と相関していることも筆者は観察している。しかし、今までのところ、CE 7 抗原を細胞膜面に表現している細胞と免疫原性との間に関連性のあることは示せているが、この CE 7 抗原が直接免疫原性を左右している証明、さらには、shedding されたこの抗原の生物学的活性の証明はいまだ得られていない。今後、CE 7 抗原の shedding の機構および腫瘍細胞の免疫学的逃避の機序を含め、この抗原の直接的役割についてさらに検索をすすめてゆく必要がある。

結 語

1. 腫瘍細胞からの TAA (CE 7 抗原) の shedding は、*in vivo*, *in vitro* において放射線照射により抑制され、同抗原を細胞膜面に表現する細胞が出現した。

2. *In vitro* 30 Gy 照射により細胞膜面に CE 7 抗原を表現した細胞は、表現していない細胞より強い免疫原性を示した。

3. *In vivo* 照射実験では、CE 7 抗原を表現する細胞の出現と抗腫瘍免疫の誘導および転移の抑制との間に関連性が認められた。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました北海道大学歯学部口腔外科学第 1 講座福田博教授、同口腔病理学講座雨宮璋教授、同歯科放射線学講座山崎岐男教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたりかぎりないご教示とご援助をいただいた北海道大学医学部癌研究施設病理部門の小林博教授、同細川真澄男助教授はじめ教室の皆様には厚くお礼申し上げます。

引 用 文 献

1) Klein, G., Sjögren, H.O., et al.: Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 20: 1561-1572 1960.

- 2) Mathé, G., Amiel, J.L., et al.: Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*, i: 697-699 1969a.
- 3) 大星章一, 下里幸雄, 他: 癌放射線療法の病理, [I] 癌組織の治癒過程の組織学的追跡. *医学のあゆみ* 61: 618-625 1967a.
- 4) 大星章一, 下里幸雄, 他: 癌放射線療法の病理, [II] 癌組織の治癒過程におけるリンパ球様細胞反応の免疫学的意義. *医学のあゆみ* 61: 725-730 1967b.
- 5) 御厨修一, 上村志伸, 他: 放射線治療と腫瘍内の細胞性反応. *Oncologia* 9: 148-151 1984.
- 6) 御厨修一, 幡野和男, 他: 小分割大線量照射における遠達効果と腫瘍巢内の細胞浸潤に関する研究. *Jap J Cancer Clin.* 33: 1239-1252 1987.
- 7) Le Francois D, Troise, G.D., et al.: Comparative effect of local radiotherapy and surgery on cell-mediated immunity against a mouse transplantable mammary tumor. *Int J Cancer* 13: 629-639 1974.
- 8) 土谷武彦: 局所照射における免疫作用の役割 1. 抗腫瘍細胞性免疫について. *日本医放会誌* 36: 922-929 1976.
- 9) Moroson, H., Nowakowski, J. et al.: Enhanced lymphocyte-mediated killing of tumor cells after tumor irradiation *in vivo*. *Int J Radiat Biol* 33: 473-483 1978.
- 10) 山下 孝: マウスにおける細胞性腫瘍免疫能に対する放射線の効果. *日本医放会誌* 41: 887-893 1981.
- 11) Crile, G., Deodhar, S.D. et al.: Role of preoperative irradiation in prolonging concomitant immunity and preventing metastases in mice. *Cancer* 27: 629-634 1971.
- 12) Mashiba, H., Matsunaga, et al.: The role of Macrophages in preventing metastasis of a homotransplantable hamster lymphoma. *Gann* 74: 548-553 1983.
- 13) 土屋武彦: 放射線治療における免疫機能の関与. *癌の臨* 29: 1499-1506 1983.
- 14) Nobler, M.P.: The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation. *Radiology* 93: 410-412 1969.
- 15) Kingsley, D.P.E.: An interesting case of possible abscopal effect in malignant melanoma. *Brit J Radiol* 48: 863-866 1975.
- 16) Yata, J., Klein, G., et al.: Effect of metabolic inhibitors on membrane immunofluorescence reactivity of established Burkitt lymphoma cell lines. *Int J Cancer* 5: 394-403 1970.
- 17) Cikes, M., Klein, G.: Effects of inhibitors of protein and nucleic acid synthesis on the expression of H-2 and Moloney leukemia vi-

- rus determined cell surface antigens on cultured murine lymphoma cells. J Nat Cancer Inst 48: 509-515 1972.
- 18) 橋 武彦: 腫瘍細胞の表面抗原の表現と放射線照射—放射線治療への免疫学的考察. 癌の臨 20: 84-89 1974.
- 19) 水越孝典: 局所放射線照射線量が抗腫瘍免疫と癌転移に及ぼす影響. 北海道医誌 63 875-881 1988.
- 20) Chiba, I., Oikawa, T., et al.: Enhanced immunogenicity of cultured rat fibrosarcoma KMT-17 by cultivation in a low concentration of fetal calf serum. Cancer Res 47: 1815-1819 1987.
- 21) Chiba, I., Jin, R., et al.: Growth associated shedding of a tumor antigen (CE 7) detected by a monoclonal antibody. Cancer Res 49: 3972-3975 1989.
- 22) Yamashina, K., Oikawa, T., et al.: Development of highly immunogenic variants of rats fibrosarcoma line during *in vitro* cultivation. Cancer Immunol Immunother 21: 45-50 1986.
- 23) Oikawa, T., Gotohda, E., et al.: Temperature-dependent alteration in immunogenicity of tumor associated transplantation antigen monitored via paraformaldehyde fixation. Cancer Res 39: 3519-3523 1979.
- 24) Kodama, Y., Peiper, S., et al.: Shedding of the common lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphoblastoid lines. Leukemia Res 10: 665-670 1986.
- 25) Giacomini, P., Aguzzi, A., et al.: Modulation by recombinant DNA leukocyte (α) and fibroblast (β) interferons of the expression and shedding of HLA-and tumor associated antigen by human melanoma cells. J Immunol 133: 1649-1655 1984.
- 26) Taylor, D.D., Black, P.: Inhibition of macrophage Ia antigen expression by shed plasma membrane vesicles from metastatic murine melanoma line. JNCI 74: 859-867 1985.
- 27) Taylor, D.D., Taylor, C., et al.: Characterization of plasma membrane shedding from murine melanoma cells. Int J Cancer 41: 629-635 1988.
- 28) Barz, D., Goppelt, M., et al.: Characterization of cellular and extra cellular plasma membrane vesicles from a non-metastasizing lymphoma (Eb) and its metastasizing variant (ESb). Biochem Biophys Acta 814: 77-84 1985.
- 29) Morikawa, K., Hosokawa, M., et al.: Host mediated therapeutic effects produced by appropriately timed administration of bleomycin on rat fibrosarcoma. Cancer Res 45: 1502-1506 1985.
- 30) Yamashita, T., Hayakawa, K., et al.: Enhanced tumor metastases in rats following cryosurgery of primary tumor. Gann 73: 222-228 1982.
- 31) 鈴木一史, 山下徹郎, 他: 癌凍結外科による転移促進の免疫学的機序の解析. 医学のあゆみ 126: 899-902 1983.
- 32) Minami, A., Kasai, M., et al.: Characterization of immunosuppressor cells in rats immunized with solubilized tumor associated antigens prepared from a Methylcholanthrene induced fibrosarcoma. Cancer Res 40: 2129-2134 1980.