放射線および interferon- γ がマウス扁平上皮癌細胞の LAK および CTL 感受性に与える影響に関する研究

櫻井裕一郎

A study of the effects of irradiation and interferon- γ on susceptibility to lymphokine activated killer cells and cytotoxic T lymphocytes

Yuichiro SAKURAI

Abstract: The susceptibility of a mouse squamous cell carcinoma cell line to lymphokine activated killer (LAK) cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) was examined in terms of major histocompatibility complex (MHC) class I expression after various treatments with γ -rays and interferon- γ (IFN- γ). The original NR-S 1 cells were squamous cell carcinomas of C 3H/He mice; these were used as target cells. The NR-S 1 cells were previously treated with (1) irradiation with 10 Gys of γ -rays, (2) 100 U/ml of IFN- γ , (3) a combination of γ -rays and IFN- γ , or (4) citric acid at pH 3. The highest expression of MHC class I was obtained in the combination group, followed by the IFN- γ and γ -ray groups. The lowest expression was obtained in the citric acid group. As for evidence of adhesion molecules, ICAM-1 was enhanced slightly in the IFN- γ group, but ICAM-2 was not enhanced in any group.

LAK cells were obtained from the splenic lymphocytes of C 3H/He, C57BL/6 or BALB/c mice, and incubated with rIL-2 for 3 days. These LAK cells showed 17-27% cytotoxicity against P815 cells, 69-75% against YAC-1 cells, and about 30% against untreated NR-S 1 cells. The target cells in the combination group were the most resistant to LAK cells, and those in the citric acid group were more sensitive than the untreated cells. There was no significant difference in activities among the three strains of mice. Anti-CD 8 antibody or anti-asialo GM 1 antibody was intra-peritoneally administered to these three strains of mice, and the spleen cells were collected. The cytotoxicity of LAK cells from the mice given anti-CD 8 antibody was similar to that of the untreated mice.

In contrast, treatment with anti-asialo GM 1 antibody decreased the cytotoxic activities in all groups. These findings suggest a negative correlation between MHC class I expression and the susceptibility of NR-S 1 to LAK cells. The killer activity was predominantly due to asialo-GM 1⁺ cells.

CTL were prepared from untreated C 3H/He mice spleen cells. They were incubated with inactivated NR-S 1 cells for 7 days and cultured again with rIL-2 (5 JRU/ml) for 7 days. Although the cytotoxicity of CTL was lower than the LAK activity, it increased in direct proportion to the expression of MHC class I. These findings suggest that CTL would be most effective for adoptive immunotherapy when combined with radiotherapy or cytokine therapy.

Key words: MHC class I antigen (MHC class I 抗原), IFN- γ (インターフェロン- γ), irradiation (放射線照射), LAK cells (LAK 細胞), CTL (細胞障害性 T リンパ球)

緒 言

悪性腫瘍に対する免疫療法は, lymphokine activated killer (以下 LAK) 細胞を用いた養子免疫療法の開発により臨床応用に大きな期待がかけられた。しかし, その臨床効果は悪性黒色腫や腎癌など一部の癌腫に限られており^{1, 2)}, 当初の期待ほどの成果は上がっていない。LAK 細胞はリンパ球を主に IL-2 と培養することにより得られ³⁾, natural killer (以下 NK) 細胞と同様に非特異的に腫瘍細胞を障害するが, その際主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex; 以下 MHC) の拘束を受けないことが大きな特徴の一つとされてきた。しかし最近, NK 細胞あるいは LAK 細胞の腫瘍障害機序, 特に認識機構の解析によりその障害活性は標的細胞上の MHC class I 抗原や, その他の分子により調節を受けるという報告がみられるようになった⁴⁾。本研究では, 扁平上皮癌細胞上の MHC class I 抗原およびエフェクター細胞の抗腫瘍活性に対する感受性について検討した。エフェクター細胞には LAK 細胞と細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocytes; 以下 CTL) を用い, マウス扁平上皮癌細胞株上の MHC class I 抗原量を放射線照射や recombinant murine interferon- γ (以下 IFN- γ) の添加, あるいはクエン酸処理を行うことにより変化させ, その感受性に与える影響について検討した。

実験材料および実験方法

1. 実験細胞

C3H/He マウス由来の扁平上皮癌細胞株 NR-S1 を, 10% fetal calf serum (GIBCO; 以下 FCS), penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml (GIBCO) を含む MEM-Alpha (GIBCO) 培養液にて 37°C, 5% CO₂ の条件下で継代培養して用いた。NR-S1 細胞は放射線医学総合研究所安藤興一博士より譲与され, 当講座にて継代培養されているものである。

2. 標的細胞の調製

1) 放射線 (γ 線) 照射

NR-S1 1.2×10^6 個/6ml を 25cm² フラスコ (MS-20050; SUMILON) 内で培養し, 24 時間後に回転コバルト治療装置 RTGS-2 (島津) にて放射線照射を行った。照射野は 16cm $\times$ 16cm, SSD 65cm, 線量率 0.38Gy/min の条件下で線量が 10Gy になるように調整した。

2) IFN- γ の添加

NR-S1 を 6×10^5 個/6ml になるように培養し,

IFN- γ (PHARMINGEN) を培養液中に 100U/ml (0.06 μ g/ml) になるように添加した。

3) 放射線照射と IFN- γ 添加の併用

NR-S1 を 1.2×10^6 /6ml になるように培養, 24 時間後に放射線 10Gy を照射し, その直後に IFN- γ を 100U/ml になるように添加した。

4) クエン酸処理

未処理のフラスコ内の NR-S1 を phosphate buffered saline (以下 PBS (-)) にて洗浄後, 0.25% trypsin 1.0ml を加えて剥離回収し, これを PBS (-) にて洗浄後 1×10^6 個の細胞に 1% bovine serum albumin を含むクエン酸 (0.263M) + Na₂HPO₄ (0.123M) (以下クエン酸溶液) (pH 3) を 0.5ml 加え, 4°C で 2 分間反応させた。その後, 10% FCS 添加 RPMI 1640 にて 2 回洗浄を行った。

3. 細胞膜表面上の MHC class I 抗原および接着分子の解析

放射線照射, IFN- γ 添加および両者の併用を行ってから, 3 日間培養した NR-S1 を PBS (-) にて洗浄後, 0.25% trypsin 1.0ml により剥離し, さらに PBS (-) にて 2 回洗浄した。これら各処理細胞と表面抗原測定直前にクエン酸 (pH 3) で処理した NR-S1 をおのおの 1×10^6 個ずつ回収し, FITC 標識抗 MHC class I 抗体 (monoclonal anti-mouse H-2K^K antibody; PHARMINGEN) および ICAM-1 と ICAM-2 (PHARMINGEN) 5 μ l をおのおの単独で加え, 4°C で 30 分間反応させた後 PBS (-) にて 2 回洗浄した。次いで FACSscan (Becton Dickinson) にて 488nm のアルゴンレーザー光で励起させ, FITC の蛍光強度は 530 $\pm$ 15nm の narrow band pass filter を使用し, 1 検体あたり 1×10^4 個の細胞について蛍光強度を算出した。

4. 実験動物

マウスは NR-S1 と同系 (syngenic) である C3H/He と異系 (allogenic) である C57BL/6 および BALB/c を使用した。いずれも 5~8 週齢の雌で日本 SLC 社から購入した。

5. LAK 細胞の誘導

1) 未処理マウス脾細胞からの LAK 細胞の誘導

C3H/He, C57BL/6 および BALB/c 各系統マウスを屠殺し, 脾臓を摘出後 RPMI 1640 培養液中で懸濁させた。次いでこれを 50 μ m 金属メッシュを通過させ均一な細胞浮遊液とし, リンパ球比重分離液 (JIMRO) (比重 1.090) を用いた比重遠心法 (400G, 30min) により単核球分画を採取した。これを 5×10^{-5} M-2 ME+10% FCS 添加 RPMI 1640 (complete medium; 以下 CM) に 5×10^6 /ml になるように浮

遊させ, recombinant human interleukin-2 (塩野義製薬; 以下 rIL-2) 1000JRU/ml を添加し, 3日間培養したものを用いた。

2) 抗 CD 8 抗体, 抗 asialo-GM 1 抗体投与マウス脾細胞からの LAK 細胞の誘導
抗 CD 8 抗体 (明治乳業; 抗 Lyt-2 抗体) あるいは抗 asialo-GM 1 抗体 (和光純薬) 100 μ l を C3H/He, C57BL/6, BALB/c マウスに腹腔投与し, 24 時間後に摘出した脾臓より単核球を分離して CM に浮遊させ, rIL-2 1000JRU/ml を添加して 3 日間培養した。また, 抗 asialo-GM 1 抗体投与群の脾細胞は FITC 標識抗 NK 抗体 (PHARMINGEN) で染色し, 抗 CD 8 抗体投与群の脾細胞は PE 標識抗 CD 4, FITC 標識抗 CD 8 抗体 (PHARMINGEN) で二重染色した後, FACScan を用い解析した。

6. CTL の誘導

NR-S1 にマイトマイシン C (協和発酵) を 50 μ g/ml 加えて 37°C, 45 分間インキュベートして不活化したものを刺激細胞として, 未処理 C3H/He マウス脾臓から比重遠心法により得た脾細胞を反応細胞とした。これらの細胞を 24 穴プレート (FALCON 3847) にて, 反応細胞 5×10^6 個に対し刺激細胞 1×10^6 個を 2 ml の CM 中で混合培養し, 培養 7 日後に T 細胞分画を percoll 不連続密度勾配法で比重遠心分離して回収した。この細胞を 20% rat ConA sup を含む CM 中に浮遊させ rIL-2 5JRU/ml を添加後さらに 7 日間培養して CTL とした。また, この細胞の表面抗原を抗 CD 4 と抗 CD 8 抗体で二重染色後, FACScan により解析した。

7. 細胞障害活性の測定

標的細胞には放射線照射, IFN- γ 添加あるいは両者の併用処理を行った後, 3日間培養した NR-S1, クエン酸処理した NR-S1, NK 感受性細胞である YAC-1 と LAK 感受性細胞である P815 を用いた。なお, YAC-1 (A/J マウス白血病由来細胞株) および P815 (DBA/2 マウス由来形質細胞腫) 細胞は東海大学医学部免疫学教室より譲与され, 当講座にて継代培養されているものである。

エフェクター細胞には各 LAK 細胞と CTL を用いた。

細胞障害活性はエフェクター細胞/ターゲット細胞比を 20 : 1 (2×10^5 個 : 1×10^4 個) として培養 4 時間後の ^{51}Cr 遊離量を測定した⁵⁾。RI の自然遊離量はエフェクター細胞のかわりに 10% FCS 添加 RPMI

図1 NR-S1 細胞上の MHC class I 抗原量の推移

1640 0.1ml を添加し, 最大遊離量はエフェクター細胞のかわりに 1N-HCl 0.1ml を添加することにより得た。

細胞障害活性は次式により算出した。

$$\text{細胞障害活性 (\%)} = \frac{\text{実験群遊離 (c. p. m)} - \text{自然遊離 (c. p. m)}}{\text{最大遊離 (c. p. m)} - \text{自然遊離 (c. p. m)}} \times 100$$

なお, 測定はすべて triplicate で行い, 蛍光強度あるいは細胞障害活性の測定値群の有意差は Cochran-cox 法を用いた t 検定により求め, $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 各処理に伴う NR-S1 上の MHC class I 抗原および接着分子の変化

NR-S1 は細胞表面に MHC class I (以下 class I) 抗原を発現しているが, 放射線照射と IFN- γ 添加併用群, 放射線照射群, IFN- γ 添加群の順でヒストグラ

表1 NR-S1上のMHC class I抗原の蛍光量平均値

	n = 5				
	未処置	放射線照射 10Gy	IFN- γ 添加培養 100U/ml	放射線照射 + IFN- γ 添加	pH3クエン酸 処理
MHC class I 抗原蛍光量 (平均値)	47.8 $\pm$ 9.5	104.8 $\pm$ 11.1*	451.5 $\pm$ 66.8*	650.2 $\pm$ 65.7*	18.8 $\pm$ 4.6*

※ 対未処置群 (p<0.05)

図2 NR-S1細胞上のICAM-1, ICAM-2抗原量の推移

ム上でのclass I抗原蛍光の右方への偏位が認められた。これに対しクエン酸処理では、未処理群に比べclass I抗原蛍光の左方への偏位が認められた(図1)。NR-S1の各処理におけるclass I抗原平均蛍光強度は、未処理群で47.8であったのに対し、放射線照射群では104.8、IFN- γ 添加群では451.5、併用群では650.2と有意に増加し、クエン酸処理では18.8と有意な減少が観察された(表1)。また、接着分子についてはIFN- γ 処理でICAM-1発現量の軽度な増加が認められたのみであった(図2)。なお、各処理3日後に回収したNR-S1のviabilityはトリパンブルー染色下での観察で90%以上であった。

2. 各処理NR-S1におけるLAK感受性の変化

C3H/He, C57BL/6, BALB/c各マウスから誘導したLAK細胞はP815に対し、それぞれ27.1%, 22.0%, 17.4%, YAC-1に対しそれぞれ69.8%, 61.8%, 57.0%の細胞障害活性を示した。NR-S1は新鮮脾細胞では障害されないが、各系統のマウスのLAK細胞は、未処理NR-S1に対し、約30%の細胞障害活性を示し、各マウス系統間で有意差は認められなかった。NR-S1に放射線照射、IFN- γ 添加あるいは両者の併用を行うことによりLAK感受性は低下を示し、class

I抗原量が最も増加した併用群でLAK感受性の低下は最も顕著であった。また、class I抗原量の減少を認めたクエン酸処理したNR-S1では、未処理のNR-S1に比べLAK感受性の増強が認められた。しかし、IFN- γ 添加群では放射線照射群に比べclass I抗原量が約4倍増加したのに対してLAK感受性の低下は放射線照射群の方が強くclass I抗原増加量とLAK感受性低下の程度は並行しなかった。また、各処理後のNR-S1毎のLAK感受性についても、各系統マウス間で有意差は認められず、各系統とも同様な変動を示した(図3)。

3. 抗CD8抗体あるいは抗asialo-GM1抗体投与マウス由来LAK細胞の各処理NR-S1に対する細胞障害活性

抗CD8抗体投与24時間後の脾細胞では、C3H/HeでCD8陽性細胞が若干存在したが、C57BL/6, BALB/cマウスではほとんど消失した(図4)。また、抗asialo-GM1抗体投与後の脾細胞では、各系統のマウスにおいて抗体投与前よりNK細胞の減少が認められた(図5)。

これら抗体投与24時間後の各系統マウス脾細胞から得たLAK細胞の各処理NR-S1に対する細胞障害

図 3 未処置マウス群での MHC class I 抗原量と LAK 活性の推移

図 4 抗 CD 8 抗体腹腔投与前後の脾細胞の表面マーカー (CD 4 / 8)

活性は、抗 CD 8 抗体投与群では、class I の増加が最も著明であった併用群で細胞障害活性が最も低く、次いで放射線照射群、IFN- γ 添加群の順で活性の低下が認められ、クエン酸処理での class I 抗原が減少すると活性は増強した。これらの変動は未処理マウス群からの LAK 細胞とはほぼ同様であった (図 6)。

これに対して、抗 asialo-GM1 抗体投与マウスからの LAK 細胞では C3H/He で YAC-1 に対する細胞障害活性の低下が未処理 LAK 細胞の約 30%とやや少なかったが、他の系のマウスでは約 60%以上の低下が認められ、P815 については全系統マウスで各処理 NR-S1 に対する障害性が低下し、さらに未処理群と

図5 抗 asialo-GM 1 抗体腹腔投与前後の脾細胞の表面マーカー (NK)

図6 抗 CD 8 抗体投与マウス群での LAK 活性の推移

抗 CD 8 抗体投与群で認められていた NR-S 1 の class I 抗原の増減による LAK 細胞の細胞障害活性の有意な変動が消失した (図 7)。

4. 各処理 NR-S 1 に対する CTL の細胞障害活性の変化

誘導された CTL は 56% が CD 8 の陽性細胞であり (図 8), 細胞障害活性は P815 に対して 6% と未処理 LAK 細胞の約 1/6, YAC-1 に対しては 12.4% と未

図7 抗 asialo-GM1 抗体投与マウス群での LAK 活性の推移

処理 LAK 細胞の約 1/7 の活性を示した。未処理 NR-S1 に対する障害性は rIL-2 の高濃度 (1000 JRU/ml) 添加により得られた C3H/He マウスからの未処理 LAK 細胞に比べ 6.7% と低値であったが, NR-S1 に対する各処理により, 細胞上の class I 抗原が放射線照射群, IFN- γ 添加群, 併用群と増加するのに従い, 細胞障害活性も未処理群で 6.7% であったのに対し, 放射線照射群で 10.5%, IFN- γ 添加群で 15.5%, 併用群では 24.1% と有意に増強した。クエン酸処理では class I 抗原減少による細胞障害活性が 6.8% と未処理の NR-S1 での活性と同程度となった (図 9)。

考 察

MHC は抗原とともに T リンパ球に認識され, 自己・非自己の識別, 排除に重要な役割をもつ分子である。特に CTL は細胞障害活性発現の際, class I 抗原の認識が必要である (MHC 拘束性) ことが知られているが, これに対して NK 細胞と LAK 細胞は自己および非自己の腫瘍細胞などに対して広く細胞障害活性を発揮するため, MHC 非拘束性と考えられてきた。しかし近年 NK 活性, LAK 活性発現に関与するエフェクター細胞のレセプターおよびそのリガンドとなる標的細胞上の分子の検索で, class I 抗原を含むいくつかの分子が報告されるようになった。また, 細胞同士の接着に関与する接着分子も NK 活性, LAK 活性の発現に影響を与えることが知られている。

class I 抗原が放射線照射, IFN 投与などにより増加するという報告がなされていることから, 著者はマウス扁平上皮癌由来細胞株に放射線照射と IFN- γ 添加を行い, class I 抗原および ICAM-1, ICAM-2 に

図8 CTL の表面マーカー

ついて解析した。その結果放射線照射, IFN- γ 添加あるいは両者の併用により class I 抗原の増加が認められた。放射線照射の影響についてはヒト胃腺癌細胞と肺腺癌細胞^{6, 7)}, マウスメラノーマ細胞⁸⁾, ヒト口腔扁平上皮癌細胞⁹⁾ などに対して放射線照射により class I 抗原の増加することが報告されている。これは今回のマウス扁平上皮癌細胞での結果と一致したが, 放射線照射による class I 抗原増加の機序については明らかになっておらず, 今後の研究が待たれるところである。また, IFN- γ 添加培養における class I 抗原の増加についての報告は数多くなされており¹⁰⁻¹²⁾, それらの結果も本研究と一致するものであった。一方, 腫瘍細胞上の class I 抗原はクエン酸処理により減弱することが報告されており¹³⁾, 本研究でもクエン酸処理により同様の結果が得られた。また, 今回検索した接着分子についてはいずれの処理においても大きな変化は認められず, LAK 感受性への関与は少ないと考

図9 MHC class I 抗原量と自己 CTL 活性の推移

えられた。これら各処理 NR-S1 の LAK 感受性の検索では、class I 抗原の増加した細胞では LAK 感受性は低下し、class I 抗原増加の大きい群では LAK 感受性の低下が大きく、class I 抗原の減少したクエン酸処理では LAK 感受性は上昇した。なお、class I 抗原のハプロタイプが異なる C3H/He, C57BL/6, BALB/c の各系統マウス間に差は認められず、これは LAK 活性抵抗分子としての class I 抗原が、従来の MHC 拘束性とは異なった機序で働くことを示唆するものと考えられた。class I 抗原量と NK 細胞や LAK 細胞の感受性についてはマウス^{14, 15)} やヒト^{16, 17)} について両者は逆相関を示す報告があり、クエン酸処理による NK 感受性の増強についても同様に報告されている¹⁸⁾。本研究では class I 抗原が LAK 感受性に対して抵抗性に働いていると考えられる結果が得られ、これは前述の報告と一致するものと考えられる。

次に各処理 NR-S1 の LAK 感受性変化に関するエフェクター群を検索する目的で、抗 CD8 抗体あるいは抗 asialo-GM1 抗体投与マウスから誘導した LAK 細胞の細胞障害活性を解析したところ、抗 CD8 抗体投与群の LAK 活性では未処理群と差異はなかったが、抗 asialo-GM1 抗体投与群では LAK 活性の低下が認められ、各処理群での有意差も消失した。LAK 細胞は CD3 陰性の NK 様細胞と CD3 陽性の T 細胞からなることが知られており、本研究では抗 asialo-GM1 抗体処理により LAK 活性の変化が消失することから LAK 細胞の主体が activated NK 細胞であると考えられた。

in vitro の系での class I 抗原量と NK 感受性の逆相関は *in vivo* の抗腫瘍作用にも重要であると報告されている。Karre ら¹⁹⁾ は、H-2 陰性と H-2 陽性のマウス細胞株を同系マウスに移植したところ H-2 陽性

の細胞のみが増殖し、このマウスに抗 asialo-GM1 抗体を投与すると H-2 陽性、H-2 陰性細胞株とも増殖することを報告している。またマウスメラノーマ²⁰⁾ での実験でも、H-2 陽性株のみが肺転移を形成するが、抗 asialo-GM1 抗体投与により H-2 陰性株も肺転移を示すようになり、さらに H-2 陰性株の IFN 処理でも肺転移形成を示すようになる。ヌードマウスの実験で、この現象に T 細胞が関与していないという報告もある²¹⁾。しかし、class I 抗原量と NK・LAK 感受性の逆相関について否定的な意見もあり、片岡²²⁾ は横紋筋肉腫細胞の IFN-γ あるいはクエン酸処理による autologous の LAK 感受性の観察で、本研究と全く逆の結果を示している。これは使用した LAK 細胞が autologous の系で誘導期間が 14~31 日と長期間であり、誘導期間が長期間になると T 細胞系の LAK 細胞が増加してくるとの報告²³⁾ を考え合わせると、T 細胞、特に CTL 活性が誘導されたためであると考えられる。また、class I 抗原量と NK あるいは LAK 感受性は単純な逆相関を示さないというデータの報告も多数見られる^{24~28)}。本研究でも、放射線照射と IFN-γ 処理による class I 抗原増加と LAK 感受性低下の割合の間には逆転傾向が認められ、かならずしも逆相関しない結果が得られている。

最近の NK および LAK 細胞の認識機構の解析で Storkus ら²⁹⁾ は class I 抗原を発現していない NK 感受性細胞株に class I (HLA-A3, -B7, -B27, -Bw58) 遺伝子を導入すると NK 抵抗性になるが、HLA-A2 遺伝子では NK 感受性のままであることを示し、Karlhofer ら^{30~32)} はマウス NK レセプターの候補である Ly-49 が H-2D^d を認識し NK 抵抗性に関与していることを示している。また NK 細胞クローンにより認識される class I 分子が異なるという報告もされている^{33, 34)}。

class I 抗原以外の標的分子としては, 86Kda と 62Kda の 2 つの分子が, NK 抵抗分子としては CHO-1 分子が報告されている³⁵⁻³⁷⁾。また NK レセプター候補分子として NKR-P1 が報告され^{38, 39)}, このリガンドが標的細胞上の各種オリゴ糖であることが示されている⁴⁰⁾。このような class I 抗原の性状や, それ以外の分子が複雑に関与して class I 抗原量と LAK 感受性とが単純な逆相関にならなかったことに関与しているのかもしれない。

以上, 程度の差はあるにしても, 養子免疫療法と併用された放射線療法や IFN- γ 投与などは, 腫瘍細胞の表面性状に変化を与え, LAK 療法への抵抗性を増加させていた可能性が十分に考えられる。

一方, 以前から腫瘍内浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes; 以下 TIL) が体内を循環しているリンパ球に比べて強い抗腫瘍活性を示すことが報告されており⁴¹⁾, ヒト頭頸部扁平上皮癌⁴²⁻⁴⁹⁾ や, 子宮頸癌⁵⁰⁻⁵³⁾ についても TIL から自己癌細胞に強い細胞障害性をもった特異的な CTL が誘導され, 腫瘍特異的 CTL 療法の可能性が報告されている。そこで今回 NR-S1 に対する CTL の誘導を試み, 各処理 NR-S1 に対する細胞障害活性についても検索した。本研究で得られた CTL は rIL-2 添加濃度が 5 JRU/ml とかなり低濃度で誘導され, P815 あるいは YAC-1 に対する障害性が LAK 細胞に比べて 1/6 ~ 1/7 程度と弱かったが, NR-S1 に対する障害性が確認された。これは放射線照射や IFN- γ 添加による NR-S1 上の class I 抗原の増減と並行し, 障害活性も増減した。腫瘍抗原は MHC 抗原の存在下においてのみ免疫系に認識され, CTL が腫瘍を障害する際には, T 細胞と同一の class I 抗原が標的細胞の表面に発現していることが条件となる。一般に CTL は抗 class I 抗体処理により活性の消失することが知られており, 標的細胞上の class I 抗原量に強く影響を受ける。本実験で誘導された細胞は, class I 抗原量と並行した活性の変化を示したため, 本細胞群を CTL と判断した。石川ら, 田中らの誘導した CTL は TIL より得た CTL クローンであり自己癌細胞に対する活性が高く, 非自己癌細胞に対しての活性は低値を示している。本実験で得られた CTL は class I 抗原の拘束を受けており, NR-S1 に対する特異性が存在していると考えられた。また, NR-S1 に対する活性は rIL-2 濃度を増加させることにより上昇が期待できることから, 基本的には石川ら, 田中らの報告している CTL と同様の性格をもつのではないかと考えている。

腫瘍特異的 CTL の誘導と障害活性発現には標的細胞の class I 抗原と腫瘍抗原の存在が重要である。腫瘍抗原については現在ヒトメラノーマで class I に結合するペプチドが同定されている⁵⁴⁾。今回の実験においては, NR-S1 上の抗原ペプチドあるいは遺伝子等

の検索は行っておらず, その存在は明らかにできていない。しかし, 腫瘍上 class I 抗原増加で CTL 活性が上昇するなどを考え合わせると, 扁平上皮癌においても腫瘍抗原が class I 上に表現されている可能性が考えられる。一方, 標的細胞上 class I 抗原量が CTL 誘導に与える影響について上田ら⁵⁵⁾ は class I 低発現腫瘍では CTL が誘導できず, IFN- γ 処理により class I 抗原の発現を高めると誘導可能となることを示している。本研究では扁平上皮癌においても放射線および IFN- γ は腫瘍細胞の class I 抗原を増加させることから CTL の誘導に有効に働くと考えられた。また, 放射線照射および IFN- γ が扁平上皮癌に対する CTL の障害活性を増強することを明らかにした。

腫瘍特異的 CTL を用いた免疫療法は標的細胞に対する特異性や障害性が高く, 臨床応用への期待が大きい。しかし従来の CTL 誘導法では必要な細胞数を得るのは困難であり, 十分な臨床応用ができなかった。しかし, 固層化抗 CD3 抗体と高濃度 IL-2 を用い T 細胞増殖活性を利用して, 自己腫瘍障害活性を損なうことなく大量の T 細胞を得る方法が報告されており⁵⁶⁾, 腫瘍特異的 CTL が十分量得られる可能性がある。また, 今回結果は示さなかったが放射線照射および IFN- γ で class I 抗原の増加している期間は数日から 10 日程度であり, 治療時期や放射線照射による CTL 前駆細胞としてのリンパ球のダメージなどを考慮することにより, 有効な臨床応用が可能になるものと考えられる。

これまで養子免疫療法の有効性を高めるための研究は, 活性の高い抗腫瘍細胞を得ることに主眼がおかれたものが多く, エフェクター細胞の活性が腫瘍細胞上分子から受ける影響について報告されるようになったのは比較的最近のことである。特に悪性腫瘍への放射線照射が腫瘍細胞上の class I に与える変化や NK・LAK 活性に及ぼす影響についての報告は少ない。本研究が放射線照射, IFN- γ あるいはこれら両者併用による腫瘍細胞上の class I 抗原に与える影響, さらにそれにともなう LAK および CTL の感受性変化について明らかにしたことは, 癌養子免疫療法の有効性を高めるための有用な情報を提供するものと考えられる。

結 語

マウス扁平上皮癌細胞株 NR-S1 に放射線照射, IFN- γ 添加培養および両者の併用を行い LAK および CTL 感受性に与える影響について検討し, 以下の結果を得た。

1. 放射線照射, IFN- γ 添加, 両者の併用により NR-S1 上の MHC class I 抗原は併用群で最も増加し, 次いで IFN- γ 添加群, 放射線照射群の順に増加した。これに対しクエン酸処理では MHC class I 抗原は減

少しした。

2. NR-S1を各処理することにより接着分子はIFN- γ 添加群でICAM-1の軽度増加が認められたのみであった。

3. NR-S1に放射線照射, IFN- γ 添加および両者の併用を行うと併用群, 放射線照射群, IFN- γ 添加群の順でLAK感受性が低下した。これに対しクエン酸処理ではLAK感受性が増強した。なお, C3H/He, C57BL/6, BALB/cの各系統マウス間で差は認められなかった。

4. MHC class Iの発現量とLAK感受性は単純な逆相関にならなかったことから, LAK活性に対する抵抗性発現には他の分子も関与している可能性が示唆された。

5. CTLではNR-S1上のMHC class I抗原の発現量増加に並行した活性が得られ, 放射線およびIFN- γ が有効に作用していることが示された。

稿を終えるにあたり, ご親切なご指導, ご校閲をいただいた神奈川歯科大学口腔外科学第一講座新藤潤一教授, 口腔細菌学教室梅本俊夫教授, 歯科放射線学教室鹿島勇教授, 口腔外科学第二講座久保田英朗教授ならびに自治医科大学口腔外科学教室神部芳則博士に厚く謝意を表します。また本研究に終始ご指導, ご鞭撻をいただいた口腔外科学第一講座笹倉裕一博士, 小瀬 晃博士に心から感謝の意を表します。

またNR-S1の提供を頂いた放射線医学総合研究所安藤興一博士, P815, YAC-1の提供を頂いた東海大学医学部免疫学教室垣生園子教授に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は第39回日本口腔外科学会総会(平成7年10月20日, 東京), 第30回神奈川歯科大学学会(平成7年12月9日, 横須賀)において発表した。

引用文献

- 1) Rosenberg, S.A., Packard, B., et al.: Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 319: 1676-1680 1988.
- 2) Kradin, R., Kurnick, J., et al.: Tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in treatment of advanced cancer. *Lancet* 18: 577-580 1989.
- 3) Grimm, E., Mazumder, A., et al.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. *J Exp Med* 155: 1823-1841 1982.
- 4) Haridas, V., Saxena, R.K.: Role of major histocompatibility complex class I antigens in modulating the performance of murine tumor cells in cold target competition assays. *immunol* 84: 86-90 1995.
- 5) 奥野清隆, 水落利明, 他: キラーT細胞の誘導

(*in vitro* sensitization)とその活性の測定(cytotoxicity test). 免疫実験操作法 X: 3351-3563 1982.

- 6) 晴山雅人, 今井浩三, 他: 放射線による癌細胞膜抗原への影響. 癌の臨床 38: 1294-1298 1992.
- 7) 晴山雅人: 放射線のヒト肺癌細胞関連抗原に及ぼす影響. 日医放線会誌 48: 1553-1562 1988.
- 8) Hauser, S.H., Calorin, L., et al.: Radiation-enhanced expression of major histocompatibility complex class I antigen H-2D^b in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 53: 1952-1955 1993.
- 9) 櫻井裕一郎, 小瀬 晃, 他: 放射線とIFN- γ がLAK感受性に与える影響について. (抄) 頭頸部腫瘍 20: 396 1994.
- 10) Miyatake, S., Kikuchi, H., et al.: Decreased susceptibility of lined human gliosarcoma cells to lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by γ -interferon treatment. *Cancer Res* 50: 596-600 1990.
- 11) 宮武伸一, 近藤藤二, 他: 標的細胞のインターフェロン処理による細胞性免疫に対する感受性の変化. 脳神経外科 19: 1053-1059 1991.
- 12) Carrel, S., Kessen, A., et al.: Recombinant interferon- γ can induce the expression of HLA-DR and-DC on DR-negative melanoma cells and enhance the expression of HLA-ABC and tumor-associated antigens. *Eur J Immunol* 15: 118-123 1985.
- 13) Sugawara, S., Abo, T., et al.: A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J Immunol Methods* 100: 83-90 1987.
- 14) Piontek, G., Taniguchi, K., et al.: YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or *in vivo* passage. *J Immunol* 135: 4281-4288 1985.
- 15) Quillet, A., Presse, F., et al.: Increased resistance to non-MHC-restricted cytotoxicity related to HLA A, B expression. *J Immunol* 141: 17-20 1988.
- 16) Storkus, W., Howell, D., et al.: NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol* 138: 1657-1659 1987.
- 17) Harrel-Bellan, A., Quillet, A., et al.: Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5688-5692 1986.

- 18) Sugawara, S., Abo, T., et al.: Analysis of mechanisms by which NK cells acquire increased cytotoxicity against class I MHC-eliminated targets. *Cell Immunol* 119: 304-316 1989.
- 19) Karre, K., Gustaf Ljunggren, H., et al.: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319: 675-678 1986.
- 20) Taniguchi, K., Peterson, M., et al.: Interferon γ induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3405-3409 1987.
- 21) McMillan, T.J., Rao, J., et al.: Interferon-induced alterations in metastatic capacity, class-I antigen expression and natural killer cell sensitivity of melanoma cells. *Int J Cancer* 40: 659-663 1987.
- 22) 片岡佳子: 横紋筋肉腫細胞での autologous の LAK 感受性: HLA class I 抗原の増減による変化. *日小児会誌* 97: 2224-2231 1993.
- 23) Roussel, E., Gerrard, M., et al.: Long-term cultures of human peripheral blood lymphocytes with recombinant human interleukin-2 generate a population of virtually pure CD3⁺ CD16⁻ CD56⁻ large granular lymphocyte LAK cells. *Clin Exp Immunol* 82: 416-421 1990.
- 24) 富田善彦, 木村元彦, 他: 腎細胞癌におけるインターフェロンおよび酸処理による Lymphokine activated killer (LAK) 細胞に対する感受性の変化. *日泌会誌* 82: 762-768 1991.
- 25) Tomita, Y., Watanabe, H., et al.: Interferon γ but not tumor necrosis factor α decreases susceptibility of human renal cell cancer cell lines to lymphokine-activated killer cells. *Can Immunol Immunother* 35: 381-387 1992.
- 26) Gorelik, E., Gunji, Y., et al.: H-2 antigen expression and sensitivity of B16 melanoma cells to natural killer cell cytotoxicity. *J Immunol* 140: 2096-2102 1988.
- 27) Dennert, G., Landon, C., et al.: Lysis of a lung carcinoma by poly I : C-induced natural killer cells is independent of the expression of class I histocompatibility antigens. *J Immunol* 140: 2472-2475 1988.
- 28) Ramani, P., Blakwill, F.R., et al.: Enhanced metastases of a mouse carcinoma after *in vitro* treatment with murine interferon gamma. *Int J Cancer* 40: 830-834 1987.
- 29) Storkus, W.J., Salter, R.D., et al.: Class I -induced resistance to natural killing: Identification of nonpermissive residues in HLA-A 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5989-5992 1991.
- 30) Karlhofer, F.M., Ribaud, R.K., et al.: MHC class I alloantigen specificity of Ly-49⁺ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358: 66-70 1992.
- 31) Smith, H.R.C., Karlhofer, F.M., et al.: Ly-49 multigene family expressed by IL-2 activated NK cells. *J Immunol* 153: 1068-1079 1994.
- 32) Daniels, B.F., Karlhofer, F.M., et al.: A natural killer cell receptor specific for a major histocompatibility complex class I molecule. *J Exp Med* 180: 687-692 1994.
- 33) Ciccone, E., Pende, D., et al.: Evidence of a natural killer (NK) cell repertoire for (Allo) antigen recognition: Definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *J Exp Med* 175: 709-718 1992.
- 34) Moretta, L., Ciccone, E., et al.: Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv Immunol* 55: 341-380 1994.
- 35) 佐藤昇志, 田村保明, 他: NK 細胞の標的分子 (NKTS) としての transformation-associated antigen. *臨免疫* 26: 1043-1049 1994.
- 36) Cho, J.M., Sato, N., et al.: Natural killer target molecules associated with the transformation of the oncogenetransfected fibroblast. *Cancer Res* 51: 4250-4256 1991.
- 37) 田村保明, 佐藤昇志, 他: 癌細胞における NK 抵抗性分子の発現と癌免疫. *Annu Rev 免疫* 120-125 1995.
- 38) Giorda, R., Rudert, W.A., et al.: NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science* 249: 1298-1300 1990.
- 39) Ryan, J.C., Niemi, E.C., et al.: NKR-P1, an activating molecule on rat natural killer cells, stimulates phosphoinositide turnover and a rise in intracellular calcium. *J Immunol* 147: 3244-3250 1991.
- 40) Bezousla, K., Yuen, C.T., et al.: Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity. *Nature* 372: 150-157 1994.
- 41) 石井誠一, 椎葉健一, 他: 各種固形癌由来腫瘍浸潤リンパ球の rIL-2 による活性化と抗腫瘍活性担当細胞の解析. *日外会誌* 94: 213-223

- 1993.
- 42) 石川 孝, 江浦正郎, 他: 人扁平上皮癌に対する免疫応答. 耳鼻展望 38: 6-20 1995.
- 43) Ichino, Y., Ishikawa, T.: Generation of human cytotoxic T lymphocytes against fresh autologous and allogenic solid tumors by mixed lymphocyte tumor cell culture with T cell growth factor. *Gann* 75: 436-441 1984.
- 44) Maehara, T., Eura, M., et al.: Differences of sensitivity to autologous cytotoxic lymphocytes between primary tumor and its cervical lymph node metastases. *Auris Nasus Larynx* 14: 187-198 1987.
- 45) Ishikawa, T., Ikawa, T., et al.: Adoptive immunotherapy for head and neck cancer with killer cells induced by stimulation with autologous or allogenic tumor cells and recombinant interleukin-2. *Acta Otolaryngol* 107: 346-351 1989.
- 46) Fukiage, T., Murakami, H., et al.: Killer cells induced by stimulation with allogenic tumor cells and subsequent culture with recombinant interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 33: 139-145 1991.
- 47) Murakami, H., Matsuoka, H., et al.: Electron microscopic observation of killer cells induced by mixed culture of lymphocytes with autologous cancer cells and further culture with recombinant interleukin-2. *Auris Nasus Larynx* 19: 175-188 1992.
- 48) Chikamatsu, K., Eura, M., et al.: Analysis of T cell receptor variability in fresh tumor-infiltrating lymphocytes from human head and neck cancer. *Jpn J Cancer Res* 85: 626-632 1994.
- 49) Chikamatsu, K., Eura, M., et al.: The role of major histocompatibility complex expression in head and neck cancer cells in the induction of autologous cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 38: 358-364 1994.
- 50) 田中憲一: CTL の誘導における腫瘍細胞の HLA 抗原発現の意義. *Biother* 3: 638-645 1989.
- 51) Okada, Y., Yahata, G., et al.: A correlation between the expression of CD 8 antigen and specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 80: 249-256 1989.
- 52) Aoki, Y., Takakuwa, K., et al.: Use of adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes alone or in combination with cisplatin-containing chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 51: 1934-1939 1991.
- 53) 本田修司, 八幡剛喜, 他: 癌免疫療法—Adoptive immunotherapy を中心として—. *臨婦産* 43: 325-331 1989.
- 54) Traversari, C., Bruggen, P., et al.: A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ 2-E. *J Exp Med* 176: 1453-1457 1992.
- 55) 上田祐二, 山岸久一, 他: Class I 抗原低発現腫瘍に対する CTL の誘導. *Biother* 7: 885-887 1993.
- 56) 溝端静馬, 谷村 弘, 他: CD 4 陽性自己腫瘍細胞障害性 T リンパ球の誘導とその基礎的解析. *Biother* 8: 417-418 1994.