尿路悪性腫瘍由来培養細胞に対するヒト natural killer (NK)

細胞活性に関する研究

第I編 インターフェロン β (IFN)によるNK細胞活性の

増強効果とそのメカニズムについて

防衛医科大学校泌尿器科学教室
(主任: 中村 宏教授)

早 川 正 道

ビュルツブルグ大学泌尿器科学教室
(主任: フローミューラー教授)

B.J. Schmitz-Dräger

R. Ackermann

STUDIES ON HUMAN NATURAL KILLER (NK) CELL ACTIVITY AGAINST CELL LINES DERIVED FROM MALIGNANT URINARY TRACT TUMORS

Part 1. Effects of Human Interferon- β on Augmentation of NK Cell Activity and its Mechanism

Masamichi Hayakawa

Department of Urology, National Defense Medical College, Tokorozawa

(Director: Prof. H. Nakamura)

B.J. Schmitz-Dräger and R. Ackermann

Department of Urology, School of Medicine, Würzburg University, Würzburg

(Director: Prof. H. Fröhmüller)

It has been generally accepted that natural killer (NK) cells are responsible not only for various tumor cells in vitro, but also for the possible role in the resistance against growth of tumor cells in vivo.

This study was designed to demonstrate the human NK cell activity against cell lines derived from malignant tumors of the urinary tract, and the effects of human interferon- β (IFN) on augmentation of NK cell activity.

Peripheral blood lymphocytes (PBL) from the buffy coat, obtained from healthy male volunteers, were separated by centrifugation on a Ficoll-Conray density gradient. IFN-treated and non-treated PBL were used as the effector cells. Different cell lines derived from carcinoma of the prostate and kidney were utilized as monolayer cells for immunoadsorption and target cells for a short-term ^{51}Cr -release assay. K562 cells, well known for their high susceptibility to NK cell-mediated cytotoxicity, were used as the control. IFN-stimulated PBL were depleted of target-binding NK cells on various monolayers and aliquots of nonadherent PBL were assayed for their residual NK cell activity. The finally recovered non-adherent PBL, after the third immunoadsorption, were cultured with IFN to examine the possibility of recruitment of NK cell activity.

The present study demonstrates the following: 5 different anchorage dependent cell lines used in this study were resistant to natural cytotoxicity; preincubation of monocyte-depleted PBL with IFN significantly increased NK cell activity against target cells as well as against K562 cells; and after almost complete loss of NK cell activity by immunoadsorption, appreciable NK cell activity was restored by the subsequent incubation with IFN. This result suggests that IFN promotes the differentiation of human pre-NK cells (immature NK cells) to the active NK cells (mature NK cells) and that there are several stages in the course of the maturation of NK cells.

要旨: ヒト前立腺癌および腎腺癌由来培養細胞に対する, ヒト末梢血リンパ球の Natural killer (NK) 細胞の細胞障害能および, ヒト Interferon- β (IFN) の NK 細胞活性増強効果につき検討を加えた。健

康人男子の末梢血より Ficol-Conray 法にて分離した 10^7 /ml のリンパ球を、 10^3 IU の IFN と共に12時間培養し、 ^{51}Cr 放出試験を用いて NK 細胞活性を測定した。標的細胞として、上記の培養細胞以外に、骨髄性白血病患者より分離された K 562細胞を対照として用いた。標的細胞の単層培養上にて、NK 細胞を吸着させる連続的免疫吸着法にて、リンパ球中の NK 細胞活性を枯渇させた後、IFN と共に一定時間培養することにより、NK 細胞活性の回復につき検討を加えた。その結果は以下のごとくであった。1) 我々の用いた泌尿器悪性腫瘍由来の培養細胞5種ともに、NK 細胞活性に対して、低感受性を示した。2) しかし、IFN の刺激により、これらの標的細胞に対する NK 細胞活性が有意に増強された。3) 免疫吸着法により NK 細胞活性を枯渇したリンパ球から、IFN 刺激により再び NK 細胞活性が再生したことから、IFN によるヒト NK 細胞活性の増強効果のメカニズムのひとつとして、前(未熟型)NK 細胞から成熟型 NK 細胞への分化誘導作用が考えられた。

結 言

natural killer (NK)細胞とは、とくに感作を受けたことのないヒトやマウスなどにみられ、かつある種の腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対して細胞障害作用を有し、骨髄で分化増殖する造血系細胞である。その機能に関して、近年、腫瘍発生に対する免疫監視機構における、NK 細胞の役割が重要視されるに至った¹⁾。しかし、その系列について、T細胞の一部、あるいは単球、マクロファージ系の一部とも推定され、細胞集団としての性格づけがいまだになされていない現状である。また、NK 細胞活性の特異性や、NK 細胞が認識する標的構造(target structure=TS)、あるいは、NK 細胞活性のinterferon (IFN) による増強のメカニズムなどにも、なお不明な点が多い。しかも従来行われた NK 細胞活性に関する研究の多くは、標的細胞(target cell=TC)として、NK 細胞による細胞障害作用に感受性の高い細胞、とくに造血系腫瘍細胞をおもに用いており、固型腫瘍由来の腫瘍細胞に対する検討例は、いまだ少ないのが現状である。また尿路悪性腫瘍に対する IFN 療法の臨床治験も緒に就いたところであり、かつ、ヒト NK 細胞が IFN により活性化されることもすでに知られている²⁾³⁾。そこで本研究においては、ヒト尿路悪性腫瘍由来培養細胞を TC とし、これら TC の NK 細胞活性に対する感受性、および NK 細胞活性の増強に及ぼす IFN- β の効果とそのメカニズムにつき基礎的検討を加えたので、その結果をここに報告する。

実験材料および方法

(1) リンパ球分離：成人健康男子の供血者より得た buffy coat から、Ficoll-Isopaque (Pharmacia. Ficoll-Ronpacon[®]) を用いた比重遠心法により末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocyte=PBL)を分離した。分離法は Böyum 法⁴⁾の方法に準じた。 10^7 /

ml の PBL 浮遊液を作製し、プラスチックシャーレ法にて単球を除去した。この際、培養液として RPMI 1640 (Gibco)+10%牛胎児血清(fetal calf serum=FCS) (Gibco) を用いた。

(2) 標的細胞(TC)：ヒト前立腺癌由来の培養細胞 PC 3⁵⁾、PC 93⁶⁾、DU 145⁷⁾、EB 33⁸⁾およびヒト腎腺癌由来培養細胞 Caki-1⁹⁾、Caki-2 を TC として用いた。これらの培養細胞株は西独 Würzburg 大学泌尿器科 Ackermann 教授のもとで単層培養にて継代保持されているものである。培養液は 10^5 IU/l ペニシリン G、128mg/l ストレプトマイシン、3.7g/l 重曹および200 mM/l L-glutamine を含むダルベッコ MEM (Seromed) を基礎培地とし、これに10%FCS を加えたものを用いた。

対照として、ヒト慢性骨髄性白血病患者より分離した K562細胞¹⁰⁾を用いた。この細胞は NK 細胞活性に対して、高感受性を有しており、浮遊培養で継代されている。培養液として RPMI-1640 に2g/l の重曹、300 mg/l の L-glutamine、10%FCS (以下メディウム A とする) および前記培養液と同濃度の抗生物質を加えたものを使用した。各細胞の継代には37℃炭酸ガスフラン器(CO₂ 5%, air 95%—以下37℃で培養する場合、この条件を示すものとする)内にて静置培養を行った。なお PC 3、DU 145、Caki-1 を用いてヌードマウスに移植したが、現在3者とも可移植性を保っている。

(3) IFN：ヒト線維芽細胞由来 IFN (1.4×10^5 IU/mg protein) (Flow-Rentschler, Fiblaferon[®]) を用いた。上記メディウム A にて 10^7 /ml に調節した単球除去 PBL に、各濃度の IFN を加えて、一定時間37℃で培養した。ついで IFN 非添加の対照 PBL とともにメディウム A にて2回洗浄して IFN を除去したのち、これを作動細胞(effector cell=EC)とした。

(4) 連続免疫吸着法(sequential immunoadsorp-

Fig. 1 Sequential immunoadsorption method.

(a): 10^7 of PBL were preincubated with IFN (10^3 IU) for 12hrs. (b): 2×10^7 of IFN-stimulated PBL were layered on $1.5-2 \times 10^6$ of monolayer cells in each dish and incubated for 70min. After washing with medium-A (the first adsorption), nonadherent cells were adjusted to 10^7 cells/ml in medium-A and layered again on other new dishes containing same target cells (the second adsorption). After the third adsorption was performed, nonadherent cells were assayed for their residual NK cell activities against various TC.

tion): (Fig. 1) 実験前日, 1 種題の TC (2×10^6 個) を用いて, 60mm ペトリディッシュ (Falcon) 上にフルシートに単層培養を行った. 当日, リン酸バッファー (phosphate buffer saline, PBS) にてペトリディッシュ上の浮遊細胞を除去し, ついで, 3 枚のペトリディッシュに各々 2ml ずつの IFN 刺激 PBL 浮遊液 ($2 \times 10^7/2$ ml, メディウム A) を静かに重層して, 37°C にて 70 分間静置培養した. 培養後, 恒温板上にて 37°C を保ちながら メディウム A 2ml で 3 回振盪をくりかえし, 非吸着 PBL を回収した. すなわち, TC に結合出来る NK 細胞を単層培養細胞上に吸着させ PBL から NK 細胞を枯渇させる目的で行われた. 非吸着 PBL の 1 部を ^{51}Cr 放出試験用の EC とし, 残りを $10^7/\text{ml}$ の濃度に調節して, その 2ml を新しいペトリディッシュの単層培養細胞に重層して, 免疫吸着をくりかえした. 同様に 3 回目の免疫吸着を施行して, 回収した非吸着 PBL を EC とした. この EC の生細胞数をトリパンブルー染色にて数え, ついで非吸着性 PBL 中に脱落した単層培養細胞の数より, EC にしめる脱落細胞の割合を算定した.

(5) NK 細胞活性: $1.5-2.0 \times 10^6$ 個の TC を単層培養したディッシュを PBS にて洗浄し, $200\mu\text{Ci}$ の放射性クロム酸ナトリウム (^{51}Cr) (specific activity-

338.7mCi/mg) を含む メディウム A 2ml をディッシュに加えて, 37°C , 1~2 時間培養して TC を標識した. つづいて, 細胞をトリプシン溶液にて分散させ, メディウム A にて 3 回洗浄をくりかえした. 標識した TC を $10^5/\text{ml}$ メディウム A に調節し, その $100\mu\text{l}$ ずつを U 字底マイクロプレート (6.4mm, Falcon, U.S.A.) に分注した. EC は $10^6/\text{ml}$ メディウム A に浮遊させ, TC を含むマイクロプレート内の各 well に, この一部を加えて容量を合計 $200\mu\text{l}$ とした. EC を含まず, 培養液又は 2% Triton-X のみを含む well を別に設定し, TC からの ^{51}Cr の自然放出および最大放出量を測定した. 各実験とも triplicate で施行した. マイクロプレートを 37°C , 4 時間培養し, 続いてプレートを 4°C にて 500G, 10 分間遠心した. 上澄 $100\mu\text{l}$ をプラスチックチューブに分注し, ガンマカウンター内で 4 分間, 放射能活性を測定した. cytotoxicity (%) は, 下式より算出された.

cytotoxicity (%) =

$$\frac{\text{実験 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)}}{\text{最大 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)}} \times 100$$

NK 細胞活性はさらに Ortaldo ら¹¹⁾ による lytic unit (LU) を用いて検討された. 1IU は, 30% cytotox-

icity 値を得るのに必要な EC の細胞数と規定されている。異なった PBL 間の細胞障害能を比較する場合、total lytic unit (TLU) を用いる方が、ある一定の EC: TC 比における cytotoxicity (%) にもとづく比較検討よりは理論的である。TLU は下式より求められた。

$$TLU = \frac{10^6 EC}{1LU \text{ の EC 細胞数}}$$

(6) 細胞膜の脆弱性の検討: 上記と同様に TC を ^{51}Cr にて標識し、 $2 \times 10^5/\text{ml}$ メディウム A の浮遊液をつくり、この $50\mu\text{l}$ をマイクロプレートの各 well に分注した。これに蒸留水およびメディウム A を加え、容量比で蒸留水対メディウムが 3:1, 1:1, 1:3 の 3 段階になるように、well 内の TC 浮遊液を希釈した。各 triplicate にて 4 時間、 37°C で培養し、遠心後、上澄 $100\mu\text{l}$ をとり、 ^{51}Cr 放出量を測定した。方法 (5) の、cytotoxicity の計算式を用いて、 ^{51}Cr 放出率 (%) を算定した。なお自然放出量 (cpm) および最大放出量 (cpm) には、平行して行った NK 細胞活性の測定実験の数値を利用した。

(7) cold target inhibition assay: 上記と同様に TC を ^{51}Cr にて標識し、 $2 \times 10^5/\text{ml}$ メディウム A の浮遊液を作製した (hot TC)。ついで同種の TC および他種の TC を標識せずに $2 \times 10^5/\text{ml}$ メディウム A の細胞浮遊液とし (cold TC)、これら hot および cold TC 各々を、マイクロアプレートの各 well に分注した。hot TC と cold TC の細胞数比を 0.5:1 から 2:1 までの 4 段階とし、各 well にさらに IFN で刺激した PBL を EC:hot TC 比が 50:1 になるように加えて、各 well の総量を $200\mu\text{l}$ とした。同時に cold TC を含まない well も準備して対照とした。 37°C 、4 時間培養後、500G で 10 分間遠心し、上澄 $100\mu\text{l}$ を採取して放射活性を測定した。NK 細胞活性は方法 (5) の式に順じて算出した。

結 果

(1) IFN の至適濃度および作用時間について: TC として、浮遊細胞 K562, 単層培養細胞 PC 93, EB 33 を用い、NK 細胞活性の増強におよぼす、PBL と IFN との至適培養時間につき検討を加えた (Fig. 2)。 $10^7\text{PBL}/\text{ml}$ メディウム A の浮遊液を 4 本用意し、それぞれに $10^4\text{IU}/\text{ml}$ メディウム A の IFN 溶液 0.1ml (10^3IU) を加え、1, 4, 8 および 16 又は 24 時間の培養群を設定した。 ^{51}Cr 放出試験の開始前に、各群が同時に培養を終了するように設定し、各群の cytotoxicity (%) を測定した。なお、3 例の PBL は供血者がおのおの異

Fig. 2 Effect of incubation time of PBL with IFN on NK cell activity.

Points represent mean of cytotoxicity (%) in triplicate. 10^7 of PBL were incubated with 10^3IU of IFN for several periods of time. IFN-stimulated PBL were assayed for their NK cell activity against various TC (K562, PC93, EB33).

なっている。

Fig. 2 に示されるごとく、培養 1 時間目より IFN による NK 細胞活性の増強効果がみられ、cytotoxicity (%) の最高は、K 562 および PC 93 に対しては 8 時間目、EB 33 に対しては 24 時間目に得られた。しかしいづれにしても、実験を行うに充分な増強効果が認められており、したがって以後の実験系において、IFN の作用時間を 12 時間前後と設定した。

ついで細胞活性の増強におよぼす IFN の濃度につき検討を加えた。PBL $10^7/\text{ml}$ メディウム A 浮遊液に、各種の濃度の IFN を加えて培養し、12 時間後に NK 細胞活性を測定した。Fig. 3 には、TC が K 562 細胞の場合の NK 細胞活性の変動が示されている。すなわち、NK 細胞活性の増強作用を顕著にしめす IFN の濃度は、3 例中 2 例において $2,000\text{IU}/\text{ml}$ であり、他は $1,000\text{IU}/\text{ml}$ であった。 $250\text{IU}/\text{ml}$ でもすでに十分に増強効果が生じるが、 $10^4\text{IU}/\text{ml}$ の高濃度ではむしろ、NK 細胞活性の増強効果が弱まることが判明した。ついで単層培養細胞である、EB 33, PC 93, PC 3, DU 145, Caki-1 各細胞を TC として用いた実験結果を Fig. 4 に示した。2 例 (EB 33, DU 145) が $250 \sim 500\text{IU}/\text{ml}$ で、1 例 (PC 3) が $2,000\text{IU}/\text{ml}$ で、残りの 2 例 (PC 3, Caki-1) が $10^4\text{IU}/\text{ml}$ で、それぞれ最増強効果が得られていた。しかし、 $10^4\text{IU}/\text{ml}$ の高濃度ではむしろ

Fig. 3 Effect of dose of IFN on augmentation of NK cell activity of PBL.

Points represent mean of cytotoxicity (%) in triplicate. PBL were incubated with various units of IFN for 12hrs and NK cell activity against K562 cells was assayed.

Fig. 4 Effect of dose of IFN on augmentation of NK cell activity of PBL.

Same as Fig. 3. NK cell activity against tumor cells derived from urinary tract malignancies

しる、IFN による増強効果が2,000IU/ml の場合より抑制される例 (EB 33, PC 3) が認められた。

以上の結果から、IFN 刺激の至適条件として、 10^7 /ml の PBL に対して 10^3 IU/ml の IFN を加えて12時間培養することを原則とした。

(2) 尿路悪性腫瘍由来培養細胞に対する NK 細胞活性と、IFN の刺激効果について：IFN 処置および無処置 PBL の、各種 TC に対する NK 細胞活性を Table 1 にまとめた。従来より、NK 細胞に対して高感受性をしめす腫瘍細胞系として知られる K 562細胞にくらべて、前立腺癌および腎細胞癌由来の腫瘍細胞は、

Table 1 Comparative study of cytotoxic activity of IFN-activated PBL and non-treated PBL.

(a): 10^7 of PBL were preincubated with 10^3 IU of IFN for 12hrs. (b): EC : TC ratio. (c) : values represent mean $\pm$ SD of cytotoxicity (%) in triplicate. (d) : There are significant differences ($p\leq 0.01$) in NK cell activity between IFN-activated PBL and non-treated PBL at EC : TC ratio of 50 : 1 and 25 : 1.

TARGET CELLS	No. of Experiments	TREATMENT OF PBL			
		IFN (-)		IFN (+) ^(a)	
		50=1 ^(b)	25=1	50=1	25=1
K562	16	59.6 $\pm$ 16.7 ^(d)	48.4 $\pm$ 16.5	80.9 $\pm$ 6.9 ^(d)	72.9 $\pm$ 8.8
PC 3	3	3.5 $\pm$ 1.7	1.5 $\pm$ 1.9	21.8 $\pm$ 3.7 ^(d)	14.4 $\pm$ 5.3
PC 93	11	14.8 $\pm$ 8.1	10.2 $\pm$ 5.2	55.5 $\pm$ 19.2 ^(d)	40.7 $\pm$ 17.0
DU 145	11	9.2 $\pm$ 9.8	6.6 $\pm$ 9.1	51.6 $\pm$ 22.4 ^(d)	38.8 $\pm$ 17.0
Caki-1	18	7.0 $\pm$ 4.6	3.8 $\pm$ 4.4	41.3 $\pm$ 15.8 ^(d)	26.8 $\pm$ 13.1
Caki-2	3	6.7 $\pm$ 3.3	5.1 $\pm$ 3.7	32.5 $\pm$ 3.8 ^(d)	21.6 $\pm$ 2.9

無処置 PBL の NK 細胞による細胞障害作用に対して、明らかに抵抗性を示していた。すなわち、EC : TC 比 50 : 1 において、10% 前後の低い cytotoxicity (%) を示すのみであった。しかし、IFN を用いて PBL を培養すると、これらの TC に対する NK 細胞活性が有意に ($p\leq 0.01$) 増強され、22~55% の cytotoxicity (%) を示すようになった。したがって、これらの TC は、IFN 刺激 NK 細胞に対してかなりの感受性をしめすことが判明した。

さらに、TC 間においても、IFN 刺激加 NK 細胞に対する感受性に差異があるかどうかを検討した。Fig. 5 に示されるごとく、同一の PBL を異なった数種の TC に作用させ cytotoxicity (%) を測定した場合、PC 93 は Caki-1 より NK 細胞に対して有意に高感受性をしめす ($p\leq 0.05$) ことが判明した。しかし、DU 145 と Caki-1 との間には、有意差を認めなかった。

さらに、各 TC に対する NK 細胞活性を TLU にて比較検討した (Table 2)。K 562 細胞に対する NK 細胞活性は、IFN の刺激により有意に ($p\leq 0.01$) 増強された。他の TC については、IFN 無処置 PBL の NK 細胞に対して低感受性を示すため、EC : TC 比 50 : 1 では、TC の 30% 溶解が得られず、TLU が算出されなかった。しかし IFN の刺激により、NK 細胞活性が増強され、TLU が算定された。この結果、PC 3 細胞が

Fig. 5 Susceptibility of target cells to NK cell activity of PBL preincubated with or without IFN.

There is a significant difference in susceptibility to NK cell-mediated cytotoxicity between PC3 and Caki-1 cells ($p \leq 0.05$).

他の TC に比較して、NK 細胞により細胞障害作用に対して、有意に ($p \leq 0.01$) 低感受性を示すことが判明した。

(3) TC の細胞膜の脆弱性と NK 細胞に対する感

Table 2 Comparative study of cytotoxic activity of PBL, preincubated with or without IFN, against various target cells.

(a) : 10^7 ml of PBL are preincubated with 10^3 IU of IFN for 12hrs. (b) and (c) : Values represent mean $\pm$ SD of total lytic unit/ 1×10^6 EC. (c) : There is a significant difference in NK cell activity between (b) and (c).

— : Total lytic unit is not calculated due to low susceptibility of these target cells to NK cell-mediated cytotoxicity.

TARGET CELLS	No. OF EXPERIMENTS	TREATMENT OF EFFECTOR CELLS	
		IFN (-)	IFN (+) ^(a)
K562	7	8.4 $\pm$ 3.5 ^(b)	14.9 $\pm$ 2.9 ^(c)
PC93	8	—	5.3 $\pm$ 3.9
DU145	8	—	5.9 $\pm$ 5.8
PC3	7	—	1.2 $\pm$ 0.2
Caki-1	9	—	3.9 $\pm$ 1.4

受性について：低浸透圧溶液を用いて細胞膜の脆弱性と、TC の NK 細胞に対する感受性との関連につき検討を加えた。メディウム A に蒸留水を加えて低浸透圧状態を作製し、標識した TC をその溶液内で 4 時間培養して、 ^{51}Cr の放出率を測定した。低浸透圧溶液のか

Fig. 6 Relationship between fragility of target cell membrane in hypotonic solution and susceptibility of target cells to NK cell-mediated cytotoxicity.

Aliquot of target cells labeled with ^{51}Cr were cultured for 4hrs in various concentrations of hypotonic solution and %release of ^{51}Cr was assayed. The rest of labeled target cells were simultaneously assayed for their susceptibility to NK cell activity. There is no close relationship between their fragility and susceptibility.

わりに、Triton-X 100を加えた場合の ^{51}Cr の放出を 100%として、各 TC からの放出率を Fig. 6 に示した。同一の TC に対する、IFN 無処置および処置 PBL の示す NK 細胞活性を、同様に Fig. 6 に併記した。

蒸留水量とメディウム A の量を 3 : 1 から 1 : 3 と 3 段階とり、 ^{51}Cr の放出率を比較した。いずれの浸透圧においても、K 562細胞からの ^{51}Cr の放出率が他の 2 種の TC からの放出率より低かった。このことは、NK 細胞により容易に溶解される K 562細胞の細胞膜が、低浸透圧状態に最も抵抗性をしめすことを意味していた。また PC 3 と Caki-1 細胞の NK 細胞に対する感受性と、両 TC の細胞膜の脆弱性との間にも、一定の傾向は認められなかった。

(4) 免疫吸着による NK 細胞活性の枯渇と、IFN による活性の再増強のメカニズムについて：TC の単層培養面上にて、連続的に NK 細胞を吸着除去せしめたのちに、洗浄回収した非吸着性 PBL の生細胞数は、全体の 90%以上を占めていた。免疫吸着用の腫瘍細胞が非吸着性 PBL 中に脱落して混在することは避けられないが、そのリンパ球中にしめる割合は常に 1 ~ 1.5%以下であった。したがって、この非吸着性 PBL を EC とし、ひきつづき、EC : TC 比 50 : 1 で ^{51}Cr 放出試験を行う場合、EC 中に混在した脱落腫瘍細胞と、新しい TC との比は、0.5 ~ 0.75 : 1 となることが予想される。したがって、この EC における免疫吸着用腫瘍細胞の混入率が、EC の NK 細胞活性の測定にどの程度影響を与えるかを知る目的で、cold target inhibition assay を行った (Fig. 7)。hot TC と cold TC が同じ種類の腫瘍細胞である組み合わせが 3 例、両者が異なる細胞同士が 3 例である。cold TC と hot TC 比が 0.5 :

Fig. 7 Cross inhibition of cytotoxicity. Unlabeled TC was used as an inhibitor.

1 の場合、hot TC のみの場合の cytotoxicity (%) にくらべて、6 例中 5 例で、5 % 以下のごく低い抑制率が示されるに過ぎなかった。比が 1 : 1 の場合でも、測定した 3 例ではともに抑制率が 15% 以下であった。したがって、最初的に回収した非吸着性 PBL 中に混入する免疫吸着用腫瘍細胞の存在は、この PBL を EC とした場合の NK 細胞活性の同定に対して、それほど大きな影響を与えないことが推定された。

そこで、この非吸着性 PBL の残存 NK 細胞活性を測定するとともに、この一部を再度 IFN とともに、あるいはメディウム A 単独で 12 時間培養し、その後の NK 細胞活性の増減につき検討を加えた (Table 3)。表 3 に示されるごとく、免疫吸着後の非吸着性 PBL の NK 細胞活性は、免疫吸着前の IFN 刺激加 PBL が有した NK 細胞活性にくらべると著明に低下してお

Table 3 Reduced NK cell activity of IFN-stimulated PBL by immunoadsorption and the effect of subsequent incubation of nonadherent PBL with IFN on recruitment of NK cell activity. Values represent mean of cytotoxicity (%) at a EC : TC ratio of 50 : 1 in triplicate.

	EFFECTOR CELLS (EC) ADSORPTION ON	cytotoxicity(%)		cytotoxicity(%)		TARGET CELLS (TC)
		PBL (pre-adsorption)	non-adherent PBL (post-adsorption)	non-adherent PBL cultured with medium for 12 hrs	non-adherent PBL cultured with medium + IFN for 12hrs	
(1)	Caki-1	46.0-25.6	6.3-5.6	7.2-6.5	43.1-27.3	Caki-1
		45.3-28.3	3.9-3.7	5.7-3.1	41.7-30.9	DU145
(2)	Caki-1	29.9-22.0	3.0-1.6	1.5-1.2	8.5-4.1	Caki-1
		73.7-55.6	13.1-11.3	7.2-5.3	33.3-20.9	PC93
(3)	PC93	28.8-17.1	3.9-3.4	6.9-0.5	27.6-13.7	PC93
		35.3-18.2	5.7-3.7	7.3-5.0	28.7-14.9	DU145

り、大部分のNK細胞が単層培養面に吸着し、枯渇したことがわかる。また、免疫吸着用に使用した腫瘍細胞に対してのみならず、他のTCに対するNK細胞活性も同時に枯渇していた。ひきつづき、この非吸着性PBLをメディウムAのみにて培養した結果、NK細胞活性の回復は認められなかった。これに比して、1,000 IUのIFNを含むメディウムA 1mlで 10^7 個の非吸着性PBLを12時間培養したところ、著明なNK細胞活性の回復が認められた。

考 察

正常ヒトおよび無処置マウスのリンパ球が、試験管内である種の悪性細胞に対して細胞障害性を示すことが発見され¹²⁾¹³⁾、このリンパ球中のECが、発見者の1人であるKiessling¹³⁾により、NK細胞と命名された。その後、NK細胞がin vivoにおいて腫瘍細胞の排除に働いている可能性が報告され^{14)~16)}、NK細胞の生体内における免疫防御因子としての役割が注目されるにいたった。また従来よりNK細胞活性に感受性を示すTCの多くは、造血系の腫瘍細胞であったが、近年、固型腫瘍由来の腫瘍細胞をTCとして用いる研究も増加している。

NK細胞活性は、IFNにより増強される。また従来より、NK細胞活性を増強する物質として、Bacillus Calmette-Guérin (BCG)¹⁷⁾、Coryne Bacterium Parvum¹⁸⁾、Polyinosinic: Polycytidylic Acid (Poly I: C)¹⁹⁾、そしてLipopolysaccharides等が報告されている。しかも、これらの物質の多くはIFNの誘導物質であることから、NK細胞性の増強効果におよぼす種々の因子のうち、IFNが最も代表的な物質であろうと考えられている。さらにNK細胞自体、ある種のマイトゲンや腫瘍細胞との反応中にIFNを産生することが知られている。IFNの働きとして、NK細胞活性の増強作用以外に、マクロファージの食能を亢進し、あるいは抗腫瘍性マクロファージを誘導することが報告されている。このように、IFN、NK細胞、そしてマクロファージの3者のかかわりあい、腫瘍発生に対する免疫監視機構において重要な役割をはたしていると考えられている。このIFNによるNK細胞活性増強の機構について以下のような諸説が発表されている。すなわちIFNは、1) 個々のNK細胞の細胞障害能を増強させる、2) TCに接触、溶解させたNK細胞が、新たに他のTCに接触し破壊する能力、すなわちrecycling activityをたかめる²⁰⁾、3) 未成熟なpre-NK細胞に作用し、細胞障害能を有する成熟型NK細胞へ

と分化される。上記1)について、Targanら²¹⁾は、single cell binding assayを用い、TCとリンパ球を1対1に結合させ、アガロースの中で培養し、NK細胞の活性におよぼすIFNの効果につき検討を加えた。その結果、K-562細胞に結合するリンパ球の全リンパ球に占める割合は、未処置PBLとIFN前処置PBLとの間で差異が認められないものの、K-562細胞を傷害するリンパ球の割合はIFN前処置により増加することを見出し、この結果、IFNにより個々のNK細胞の細胞障害能が増強される、と結論づけている。Minatoら²²⁾は、ヌードマウスのspleen $Ly5^+$ cellsを枯渇させ、それに伴ないNK細胞活性が消失したことを確認後、この $Ly5^+$ cellsをマウスIFNと共に3時間培養したところ、 $Ly5^+$ cellsの出現とともに、枯渇していたNK細胞活性がほぼ完全に回復したことを報告している。従って、IFNにより、pre-NK細胞が成熟NK細胞へと分化し、それにともないリンパ球の細胞膜に $Ly5$ 抗原を示すようになったと推定し、上記3)を支持している。さらにsingle cell binding assayを用いたTimonenら²⁰⁾の報告によると、K-562細胞に結合するリンパ球の全リンパ球数に対する割合は、PBLのIFN刺激では増加しなかったものの、他の単層培養細胞に対する結合リンパ球の割合は、IFNにより増加する、すなわち、用いるTCの種類により、PBLに対するIFNの刺激効果に差異が見られることが見出されている。

以上のような基礎的研究を背景に、IFNの固型腫瘍に対する臨床治験が開始されている。しかし、IFNの量的制約や、純粋度および投与方法にも未解決な点が多く、IFNの臨床効果に対する評価はまだまだ定まらない現状である。特に泌尿器科領域においては、小数の臨床報告が散見されるに過ぎない。しかし最近では、Ikicら²³⁾が、膀胱腫瘍に対してIFNを経尿道的に局所および筋肉内に投与しており、またQuesadaら²⁴⁾は転移性腎腺癌に対するIFNの全身投与を行ない、両者ともその有効性を報告している。我々は、IFNの作用機序のうち、NK細胞活性の増強効果に焦点をしばり研究を進めてきた。すなわち、本実験において、泌尿器悪性腫瘍由来の腫瘍細胞をTCとして選択し、これらのTCに対する正常ヒトNK細胞活性と、IFNによるヒトNK細胞活性の増強効果につき研究し、あわせて、IFNによる増強効果のメカニズムの解明の目的で、連続的免疫吸着法を応用した。

PBLをIFNと共に培養し、そのNK細胞活性を増

強させる実験において、IFN の作用時間と至適濃度について、従来の報告でも一致をみていない。IFN の種類や力価、また各施設の培養条件や、PBL の IFN に対する感受性の違いによっても、NK 細胞活性に差異が生じるからであろう²⁾。我々は $10^7/\text{ml}$ の PBL 浮遊液に、 10^3IU の IFN を加え、12時間培養して、これを EC として実験に用いた。

我々の用いたヒト泌尿器悪性腫瘍由来の培養細胞は、正常ヒト NK 細胞に対して低感受性しか示さなかった (Table 1)。これらの TC の中では、PC 93および DU 145は、他の単層培養 TC より、NK 細胞に対して比較的高い感受性を示すこともあるが、両者間に有意な差は認められなかった。一方、対照として用いた K-562細胞は、他の TC より有意に ($p \leq 0.01$) 高い感受性を呈した。IFN 未処置 PBL にくらべ、K-562細胞および他の TC に対する NK 細胞活性は、IFN 刺激により有意に ($p \leq 0.01$) 増強された。しかし、IFN によりもたらされた K-562細胞に対する cytotoxicity (%) の増加幅より、PC 3を除く他のすべての TC に対する cytotoxicity (%) の増加幅の方が大きかった。この増強効果の差異を生じさせる理由について、確かではないが、次のようにも推論出来る。すなわち、K-562細胞を溶解するのに必要な NK 細胞活性値の閾値が本来的に低いために、IFN 未処置 PBL の有する NK 細胞活性値でもすでに相対的に十分高く、その結果、IFN の NK 細胞活性の増強効果が直接 cytotoxicity (%) の増加として反映されにくいのであろう、と考えられる。これに比して、他の TC を溶解する場合、この細胞溶解を生じさせるに必要な NK 細胞活性値の閾値が高いため、IFN の刺激によりはじめて、NK 細胞の示す活性値が、この閾値を越えることになり、その結果、多くの TC が溶解される。したがって、IFN の刺激が直接 cytotoxicity (%) の増加幅に結びつくことになる。すなわち、TC を傷害出来る EC の数が相対的に増加したとも言える。

Brooks ら²⁵⁾は、固型腫瘍由来の培養細胞に対する NK 細胞活性の特異性を決定する因子につき検討を加え、TC の osmotic fragility が、その NK 細胞に対する感受性を決定する重要な因子であろうと報告している。たしかに、NK 細胞により細胞膜に傷害を受けた TC が、細胞溶解へと進む段階において、TC の膜の脆弱性が関与していることも否定出来ない。ただ、膜の脆弱性をあらわす指標として osmotic fragility が最適なものであるかどうかにも議論の余地がある。しか

も少数の検討例ではあるが、我々の実験の結果 (Fig. 6)においても、TC の膜の低浸透圧状態での脆弱性と、NK 細胞に対する感受性との間に一定の傾向が認められていない。TC の NK 細胞活性に対する感受性は、TC の膜の osmotic fragility といった非特異的な現象に依存しない、もっと特異的なメカニズムによるものであろうと考えられる。Quan ら²⁶⁾は、マウスの NK 細胞を用い、TC の溶解の機構を研究している。すなわち、NK 細胞障害に際して、TC との接着には、cytotoxic T リンパ球によるそれとは異なり、Ca イオンが関与しない。しかし、TC の細胞溶解そのものには、Ca イオンが必須であり、かつこの溶解は、ある種の蛋白分解酵素阻害剤により抑制されるとされている。NK 細胞による TC 溶解のメカニズムがより詳細に解明されれば、NK 細胞活性の有効な増強手段が得られることも期待され、この面での研究成果が望まれている。

IFN による NK 細胞活性増強の機構について、前述の説明を含め諸説がある。本研究において、ヒト PBL を EC とし、免疫吸着を用いて、この機構の解析を試みた。IFN により刺激増強された PBL を用いて、TC の単層培養上にて免疫吸着を行い、NK 細胞を吸着、枯渇させたのち、非吸着性 PBL を回収した。この PBL を IFN とともに培養することにより、NK 細胞活性の回復が観察された (Table 3)。この場合、免疫吸着に用いられた PBL はすでに IFN にて前処置を受けた状態であり、この PBL は免疫吸着にて NK 活性を消失したのち、再び12時間にわたり IFN により刺激を受けることになる。これらのことから、以下の2点が推論される。すなわち、1) IFN の刺激により、細胞障害能を持たない前駆(未成熟)NK 細胞が、TC に接合出来、かつ障害能を有する活性型(成熟)NK 細胞へと分化する。2) この分化成熟には種々の段階があり、ある一定の時間的経過を要する。

この免疫吸着により、Caki-1細胞上で NK 細胞を枯渇した PBL は、同時に DU 145および PC 93に対する NK 細胞活性の多くを失活していた。同様の現象が DU 145と PC 93との間にも認められた。したがって、Caki-1, DU 145, PC 93との間に何か共通の標的構造 (TS) が存在し、この共通の TS を認識する NK 細胞が、いづれの免疫吸着においても TC に結合してしまい、その結果、非吸着性 PBL は、他の TC に対する NK 細胞活性の多くを同時に失ってしまうことになる、と考えられる。また、個々の TC の膜上に、それ

それ特異的な TS が存在するとしても、それらの TS を特異的に認識出来る NK 細胞は、IFN 刺激加 PBL 中の NK 細胞のうちのごく一部であろうとも推測される。Phillips²⁷⁾および Jensen²⁸⁾は、EC として無処置 PBL を、TC としての種々の培養細胞を用い、免疫吸着法にて NK 細胞の heterogeneity について検討している。彼らによると、NK 細胞は、TC に固有の TS を特異的に認識出来る細胞集団であると同時に、いくつかの TC 間により広範に分布する共通の TS をも非特異的に認識出来る細胞よりなる、とされている。我々はこの点につき、2 編において、ひき続き検討を進める予定である。

以上の結果にもどつき、尿路悪性腫瘍に対する IFN 療法に関して、以下のことが推論される。1) ヒト尿路悪性腫瘍細胞は、未処置ヒト NK 細胞に対する感受性が低いにもかかわらず、IFN 刺激 NK 細胞により、明らかに有意に傷害された。したがって、腫瘍患者に対する IFN 療法の根拠が、IFN の腫瘍増殖に対する直接抑制効果とともに、マクロファージや NK 細胞の活性増強作用を介する抗腫瘍効果であるならば、in vivo においても、IFN により増強された NK 細胞による、腫瘍の発育に対する抑制効果がある程度、期待出来ると思われる。2) IFN による NK 細胞の分化誘導に際して、時間的経過の異なる pre-NK 細胞集団が PBL 中に存在することは、IFN の頻回投与に際して、ある一定期間内では持続的な NK 細胞活性の増強が期待出来ることを示唆している。

担癌患者で、IFN 療法を受けている症例の、NK 細胞活性の in vivo および in vitro における動態につき、現在検討中であり、今後順次、報告の予定である。

結 語

腎腺癌および前立腺癌由来細胞を TC として用い、ヒト NK 細胞活性および、ヒト IFN- β の NK 細胞活性増強効果につき、検討を加えた。

1) これらの TC は、ヒト NK 細胞活性に対して、低感受性を示した。

2) しかし、IFN- β にてリンパ球を刺激することにより、これらの TC に対する NK 細胞活性が有意に ($p \leq 0.01$) 増強された。

3) TC の単層面で、NK 細胞を吸着、枯渇させたリンパ球から、IFN 刺激により同一 TC に対する NK 細胞活性が再び回復することから、IFN によるヒト NK 細胞活性増強のメカニズムのひとつとして、pre-NK 細胞から mature NK 細胞への分化誘導が考えられ

た。

4) この種の研究成果が、泌尿器悪性腫瘍患者に対する IFN 療法の基礎的検討にとって、有益な知見をもたらすとの私見を述べた。

本論文要旨は、第 6 回 Symposium für Experimentelle Urologie (1982, Bonn) および第 71 回日本泌尿器科学会総会にて発表した。本研究は西独、フンボルト財団の奨学金による。記して感謝する。

References

- 1) Herberman, R.B.: Significance of natural killer (NK) cells in cancer research. *Human Lymphocyte Differentiation*, 1, 63—76, 1981.
- 2) Zarling, J.B., Eskra, L., Borden, E.C., Horoszewics, J. and Carter, W.A.: Activation of human natural killer cell cytotoxic for human leukemia cells by purified interferon. *J. Immunol.*, 123, 63—70, 1979.
- 3) Djeu, T.Y., Heinbaugh, J.A., Holden, J.T. and Herberman, R.B.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.*, 122, 175—181, 1979.
- 4) Böyum, A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, 77—89, 1968.
- 5) Kaighn, M.E., Lechner, J.F., Narayan, K.S. and Jones, L.W.: Prostate carcinoma: Tissue culture cell lines. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 49, 17—21, 1978.
- 6) Steenbrugge, G.J.V., Oishi, K., Romijin, J. and Schroeder, F.H.: Submitted for publication.
- 7) Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H. and Paulson, D.F.: Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer*, 21, 274—281, 1978.
- 8) Okada, K. and Schroeder, F.H.: Human prostatic carcinoma in cell culture: Preliminary report on the development and characterization of an epithelial cell line (EB 33). *Urol. Res.*, 2, 111—121, 1974.
- 9) Fogh, J. and Trempe, G.: New human tumor lines. In *Human Tumor Cells in Vitro*, Fogh, J., p. 115, Plenum Press, New York-London, 1975.
- 10) Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B.: Brief communication: Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50, 535—538, 1973.
- 11) Ortald, J.R., Bonnard, G.D. and Herberman, R.B.: Cytotoxic reactivity of human lymphocytes cultured in vitro. *J. Immunol.*, 119,

- 1351—1357, 1977.
- 12) Herberman, R.B., Nunn, M.E. and Lavrin, D.H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer*, 16, 230—237, 1975.
 - 13) Kiessling, R., Klein, A. and Wigzell, H.: Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, 5, 112—117, 1975.
 - 14) Kasai, M., Leclerc, J.C., Mcvay-Boudreau, L., Shen, F.W. and Cantor, H.: Direct evidence that natural killer cells in nonimmune spleen populations prevent tumor growth in vivo. *J. Exp. Med.*, 149, 1260—1264, 1979.
 - 15) Herberman, R.B. and Holden, H.T.: Guest editorial: Natural killer cells and antitumor effector cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62, 441—445, 1979.
 - 16) Riccardi, C., Santoni, A., Barlozzari, T. and Herberman, R.B.: Role of NK cells in rapid in vivo clearance of radiolabeled tumor cells. In *Natural Cell-mediated Immunity Against Tumors*, Herberman, R.B., p. 1121—1139, New York, Academic, Press, 1980.
 - 17) Tracey, D.E., Wolfe, S.A., Durdik, J.M. and Henney, C.S.: BCG-induced murine effector cells. I. Cytolytic activity in peritoneal exudates: An early response to BCG. *J. Immunol.*, 119, 11445—1151, 1977.
 - 18) Kirchner, H., Hirt, H.M., Becher, H. and Munk, K.: Production of an antiviral factor by murine spleen cells after treated with *Corynebacterium Parvum*. *Cell. Immunol.*, 31, 172—176, 1977.
 - 19) Djeu, J.Y., Heinbaugh, J.A., Holden, H.T. and Herberman, R.B.: Role of macrophage in the augmentation of mouse natural killer cell activity by poly-I: C and interferon. *J. Immunol.*, 122, 182—188, 1979.
 - 20) Timonen, T., Ortaldo, J.R. and Herberman, R. B.: Analysis by a single cell cytotoxicity assay of natural killer (NK) cell frequencies among human large granular lymphocytes and of the effects of interferon on their activity. *J. Immunol.*, 128, 2514—2521, 1982.
 - 21) Targan, S. and Dorey, F.: Interferon activation of "pre-spontaneous killer" (pre-Sk) cells and alteration in kinetics of lysis of both "pre-SK" and active SK cells. *J. Immunol.*, 124, 2157—1161, 1980.
 - 22) Minato, N., Reid, L., Neighbour, A., Bloom, B. R. and Holland, J.: Interferon, NK cells and persistent virus infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 350, 42—54, 1980.
 - 23) Ikic, D., Nola, P., Maricic, Z., Smudi, K., Oresic, V., Jusic, D. and Soos, E.: Application of human leucocyte interferon in patients with urinary bladder papillomatosis, breast cancer and melanoma. *Lancet* 1, 1022—1024, 1981.
 - 24) Quesada, J.R., Swanson, D.A., Trindade, A. and Gutterman, J.U.: Renal cell carcinoma: Antitumor effects of leukocyte interferon. *Cancer Research* 43, 940—943, 1983.
 - 25) Brooks, C.G., Wayner, E.A., Webb, P.J., Gray, J. D., Kewrick, S. and Baldwin, R.W.: Thd specificity of rat natural killer cells and cytotoxic macrophages on solid tumor-derived target cells and selected variants. *J. Immunol.*, 127, 2477—2483, 1981.
 - 26) Quan, P.C., Kshizaka, T. and Bloom, B.R.: Studies on the mechanism of NK cell lysis. *J. Immunol.*, 128, 1786—1791, 1982.
 - 27) Phillips, W., Ortaldo, J.R. and Herberman, R. B.: Selective depletion of human natural killer cells on monolayers of target cells. *J. Immunol.*, 125, 2322—2327, 1980.
 - 28) Jensen, J.P. and Koren, H.: Depletion of NK by cellular immunoadsorption. *J. Immunol.*, 123, 1127—1133, 1979.

(1983年5月15日受付)