● 原 著

非免疫原性腫瘍に対する $\text{TNF}\alpha$ 遺伝子治療の検討

目 片 英 治・寺 田 信 國・小 玉 正 智

Jpn. J. Clin. Immun., 19 (1) : 69~79, 1996.**TNF-alpha gene therapy for nonimmunogenic tumor using immunogenic variant induced with mutagen (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)**

Eiji Mekata, Nobukuni Terata, Masashi Kodama

The 1st Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

【Summary】

We have already reported that a combination of TNF-alpha and immunogenic variant was effective for immunotherapy of nonimmunogenic tumor. Immunogenic variants (A 2 and A 7) were obtained from nonimmunogenic fibrosarcoma (parent cell : 1767-3) by mutagen treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). In this study, we studied about the possibility of TNF-alpha gene immunotherapy for nonimmunogenic tumor. We established two types of TNF-alpha producing cell lines. One is TNF-alpha producing nonimmunogenic variant (1767 TR 2), and another is TNF-alpha producing immunogenic variant (A 7 TR 3). We compared them about the ability of producing specific immunity against parent tumor. TNF-alpha producing immunogenic variant (A 7 TR 3) could induce strong specific immunity to parental cell compared to TNF-alpha producing nonimmunogenic variant (1767 TR 2). Immunogenicity of tumor is very important when we want to perform TNF-alpha gene immunotherapy against cancer.

Key words : nonimmunogenic tumor,
TNF-alpha,
gene immunotherapy,
mutagen(MNNG) treatment
immunogenic variant

【概 要】

消化器癌の免疫療法を念頭においた場合、腫瘍の免疫原性の問題は避けて通ることはできない。そこで非免疫原性腫瘍 1767-3 を親株とした実験モデルで遺伝子治療の可能性について検討した。親株に $\text{TNF}\alpha$ 遺伝子を導入

して得た株を 1767 TR 2 と名づけた。親株を mutagen (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) で処理して樹立した株 A 7 にさらに TNF α 遺伝子を導入して得た株 A 7 TR 3 を作成した。癌のワクチン効果を比較するため 1767 TR 2, A 7, A 7 TR 3 それぞれをマウスの背部皮下に移植 (3 回/1 月間) し免疫した後、親株を移植しその拒絶効果を検討した。A 7 TR 3 > A 7 > 1767 TR 2 の順に拒絶効果が強かった。それぞれの株と親株を混合して皮下移植したところ、やはり同じ順序で親株の生着抑制効果が認められた。次に CTL 誘導効果を *in vitro* にて検討した。A 7, A 7 TR 3 それぞれをマウスの背部皮下に移植 (3 回/1 月間) したマウスの脾細胞を用いて、A 7, A 7 TR 3 と 4 日間混合培養 (MLTC) の後、⁵¹Cr 放出細胞障害試験を行った。A 7 TR 3 免疫群は A 7 免疫群に比較して有意に高い細胞障害活性が得られ、しかも cold target inhibition test でその障害活性は親株に対して特異的であることを確認した。消化器癌のように免疫原性の低い腫瘍に対して、TNF α 遺伝子治療を行う場合、mutagen 処理などによって免疫原性の増強を同時にはかることが効果発現に極めて有効であると考えられた。

I. はじめに

自然発生癌、特に消化器癌は、多くの場合免疫原性が極めて低く、免疫療法を実際に行うにあたって免疫療法が困難であることが多い。そのため癌の免疫治療を考える場合、免疫原性の低い腫瘍を使った実験も考慮に入れる必要がある。免疫原性の低い腫瘍に対して特異的免疫を誘導する方法として、腫瘍側の因子として mutagen 処理によって誘導された高免疫原性腫瘍¹⁻⁴⁾を用いたり、IFN γ などのサイトカイン処理による腫瘍の抗原性増強作用⁵⁾などが試されてきた。ところで、実際の臨床ではサイトカインは全身投与されており、ある程度の結果が報告されている^{6,7)}。しかし、サイトカインの全身投与は大量投与した場合副作用が強いため、臨床において十分な成果を得られていないのが現状である。そこで最近では、サイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入することにより腫瘍自体の免疫原性を増強させると同時に、持続的にサイトカインを産生させようという新しいサイトカイン療法が考案され、実用化されつつある。DDS (Drug Delivery System) を考えた場合、局所の微小環境でサイトカイン濃度が高められ、そのうえで腫瘍の免疫原性が増強されることにより、特異的免疫療法の可能性が期待されるというのがサイトカインの遺伝子治療がめざす究極の機序である。ところでわれわれはマウスで非免疫原性腫瘍として樹立された C 3 H マウス由来の 1767-3 細胞を用いて実験を行ってきた。これまでわれわれは非免疫原性腫瘍である親株に対して細胞障害性 T 細胞を誘導する場合、mutagen (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 以下 MNNG と略す) で処理した高免疫原性腫瘍が有用であることを報告した⁸⁾。非免疫原性腫瘍である 1767-3 腫瘍を mutagen

処理し、クローニングすることにより樹立した高免疫原性変異株 A 2, A 7 を作成したが、これらは 1767-3 に対して共通抗原性をもち、*in vivo*において 1767-3 に対し CTL を誘導することが可能となった⁹⁾。一方、腫瘍に対して直接、障害活性がある^{9,10)}と同時に、生体の免疫反応を介した間接作用も兼ね備える tumor necrosis factor α (以下 TNF α と略す) に着目した。TNF α は T 細胞系に関しては活性化 T 細胞の増殖性を高め、CTL 活性を増強させる^{11,12)}。その他マクロファージ^{13,14)}や好中球¹⁵⁾の活性化、NK¹⁶⁾、LAK 活性¹⁷⁾の増強なども報告されている。われわれはマウスのモデルを使って非免疫原性腫瘍に対して TNF α の有効性について検討した。樹立された非免疫原性腫瘍に対して TNF α の局所投与を行うと、中心性壊死をきたして一時的に腫瘍は縮小するものの完全治癒させることはできなかった。ところが前述の高免疫原性変異株 A 2 と TNF α を併用投与することにより完全治癒させることができた¹⁸⁾。次のステップとしてこのモデルの腫瘍系に TNF α 遺伝子を導入することにより癌の遺伝子治療ができないか検討を行った。同じ系統の腫瘍で、免疫原性の高抗原と低抗原性腫瘍系を使用し遺伝子治療の効果の比較を行った論文は今までになく、癌免疫療法の分野に新しい示唆をあたえることを確信する。

II. 材料と方法

1. マウス

米国 NCI より供与されその後、滋賀医科大学動物実験施設にて継代飼育された生後 8~10 週齢、体重 18~20 g の C 3 H/HeN mammary tumor virus (MTV) (-) を使用した。

2. 腫瘍

腫瘍は、非免疫原性腫瘍として C3H/HeN 由来の線維肉腫である 1767-3、高免疫原性腫瘍として 1767-3 を *in vitro* で N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) を用いて mutagen 処理のうえ、クローニングして得られた A2、A7 腫瘍⁹⁾のうち A7 腫瘍を選んだ。A2 と A7 は同等に免疫原性が高いが A2 は細胞分裂速度が遅くレトロウイルス法による遺伝子導入が困難であったため、A7 腫瘍を用いた。1767 腫瘍は、Bartlett により C3H マウスの fetal connective tissue を diffusion chamber の中に入れ、これをマウスの腹腔内に 1 年間放置することにより作られ、さらに非免疫原性であることが確認されたものである。1767-3 (以下親株とする) はこの 1767 をクローニングして得たものである。

3. 遺伝子導入

レトロウイルス法を用いて導入した。huTNF α gene, NeoR gene が組み込まれたレトロウイルスを産生する A103 細胞¹⁹⁾ (札幌医大 4 内より供与) の培養上清液をウイルス液として用いた。直径 3 cm のシャーレに subconfluent となった親株および A7 細胞に 1 ml のウイルス液をかけ、3 時間培養の後 10% FCS 添加 RPMI-1640 に換え 37°C, 5% CO₂ 下で 24~48 時間培養した。その後細胞を回収し、15~20 倍に希釈されるよう分注し、120 μ g/ml 濃度の G418 (GENETICIN: GIBCO) にて 1 週間培養してコロニーをピックアップした。さらに限界希釈法にて、再クローニングした。遺伝子導入の確認は ELISA 法による培養上清の TNF α 濃度の測定にて行った。TNF α 産生株として 1767 TR 2, A7 TR 3 を得た。

4. マウスの免疫操作 (*in vivo* sensitization)

マウスをワクチン実験に供する場合は、1767-3 (親株), 1767 TR 2, A7, A7 TR 3 腫瘍をそれぞれ 2×10^7 cells/ml PBS に調整後、その 0.1 ml を左側背部皮下に移植することにより免疫を行った。

5. *in vivo* における混合投与に関する検討

親株 2×10^6 と TNF α 産生株 5×10^5 を混合して PBS 1 ml に調整し、マウスの背部皮下に投与した。親株の生着率について検討した (Winn assay)。

6. Mixed Lymphocyte-Tumor Cell Culture ⁵¹Cr release assay

前述の方法にて C3H マウスの免疫を行った。1 週~10 日間隔で 3 回免疫後、5~10 日後にマウスから脾臓を採取、これを 4×10^6 /ml の濃度に調整後 responder 細胞として用いた。脾細胞培養液は以下のとおりである。10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) 添加 RPMI-1640 培養液に 5×10^{-8} M の 2 メルカプトエタノール, 2 mM L-グルタミン, 100 units/ml ペニシリン G, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを加えて作成した。stimulator として A7 腫瘍に 2000 rad の X 線照射を行い用いた。responder 細胞と stimulator 細胞の割合は 100:1 になるように調整し、4 日間の培養を行い、CTL を誘導した。CTL 活性の測定は、⁵¹Cr 放出細胞障害試験にて測定した。標的細胞は 10% FCS 添加 RPMI-1640 を培養液として 10^7 cells/ml に浮遊し、クロミウム (Na₂ ⁵¹CrO₄, 日本アイソトープ協会) を 100 μ Ci (1 mCi/ml PBS) 加え、37°C, 5% CO₂ 下で 90 分のラベリングを行った。その後洗浄し、培養液にて、 2×10^5 /ml に細胞数を調整し 96 well のマイクロプレート (FALCON 3072) に分注した。20 時間培養後、上清を取り除き effector 細胞浮遊液 0.1 ml と培養液 0.1 ml を加え、4 時間のインキュベーション後に培養上清中に放出された ⁵¹Cr を γ -counter (PACKARD AUTO-GAMMA 5650) にて測定した。最大放出量 (MR) は effector 細胞の代わりに 1 N HCl を、自然放出量 (SR) は培養液を 100 μ l 加えることとした。

細胞障害活性は次式により算出した。

細胞障害活性 (% cytotoxicity) =

$$(\text{測色値} - \text{SR}) / (\text{MR} - \text{SR}) \times 100$$

実験は triplicate で行い、得られた測色値に関しては平均 (mean) $\pm$ 標準偏差 (SD) で現した。

7. Cold target inhibition test

⁵¹Cr 放出試験の際、effector 細胞を加えた後 ⁵¹Cr にてラベリングしていない腫瘍細胞 (1767-3: H-2^k, MCB-1: H-2^d) を加え、細胞障害活性を測定し、1767-3 に対する特異性について検討した。

8. 統計処理

in vivo の腫瘍生着抑制試験については Mann-Whitney test にて検定し、*in vitro* の細胞障害試験については Student-t test にて検定した。

III. 結 果

1. 1767 TR 2, A 7 TR 3 の特性

1767-3 に対して $\text{TNF}\alpha$ 遺伝子をレトロウイルス法にて導入し、クローニングし、1767 TR 2 を得た。 $\text{TNF}\alpha$ 産生能は $5800 \text{ pg/ml/24 hrs/10}^6$ であった。A 7 に対しても同様に遺伝子導入を行い A 7 TR 3 を得た。 $\text{TNF}\alpha$ 産生能は $8000 \text{ pg/ml/24 hrs/10}^6$ であった。

それぞれを *in vitro* にて doubling time について比較したが有意な差はなかった。*in vivo* においてはマウスに皮下投与してその増殖について比較した。1767 TR 2, A 7 TR 3 は共に 1 週間程度は 3~5 mm の腫瘤を形成したが、その後自然消失した。

2. *in vivo* における親株に対するワクチン効果

1767 TR 2, A 7, A 7 TR 3 それぞれ 2×10^6 ずつを

マウス背部皮下に 3 回/月移植し、最後の移植から 10 日後に、親株を移植した。対照は非移植マウスに親株を移植した。A 7 TR 3 免疫群では 100% (6/6 匹) 親株を拒絶した。A 7 免疫群では 83% (5/6 匹), 1767 TR 2 免疫群においては 0% (0/6 匹) となり A 7 TR 3 群と 1767 TR 2 群の間 A 7 群と 1767 TR 2 群の間では有意差が認められ (それぞれ $p < 0.025\%$), A 7 と A 7 TR 3 による免疫増強効果が確認された (図 1)。

3. $\text{TNF}\alpha$ 産生細胞と親株を混合してマウス皮下に投与し、親株の生着率について検討

$\text{TNF}\alpha$ 遺伝子導入細胞と親株とを混合して、マウス背部皮下に移植して、親株の生着抑制効果について検討した。親株生着抑制効果は A 7 TR 3 において有意に強かった ($p = 0.002$)。 $\text{TNF}\alpha$ 非産生株との混合投与においては抑制効果は認められず、 $\text{TNF}\alpha$ の抗

図 1 $\text{TNF}\alpha$ 遺伝子導入細胞 (1767 TR 2, A 7 TR 3), 高免疫株 (A 7) に X 線 10,000 rad を照射した後、それぞれを $2 \times 10^6/0.1 \text{ ml/PBS}$ に調整し、3 週間で 3 回背部皮下に移植し免疫した。その 2 週間後に、親株 2×10^6 を反対側背部皮下に移植した。対照には未処理マウスを用いた。

図2 親株 (1767-3) 2×10^6 に対し A7, 1767 TR2, A7 TR3 をそれぞれ 5×10^5 混合した後、背部皮下に移植し、親株の生着抑制について検討した。対照には親株のみを皮下移植した。

腫瘍免疫への強い関与が示唆された (図2)。

4. 細胞障害性T細胞の誘導能の検討

a) 1767 TR2 と A7 TR3 について

1767 TR2, A7 TR3 それぞれにつき CTL の誘導効果について検討した。3回の *in vivo* sensitization の後に回収した脾細胞を用いて A7 との *in vitro* sensitization を4日間行い、parent を target とした ^{51}Cr release assay を行った。1767 TR2 群においては E:T=50 において10%の細胞障害活性であったのに対し、A7 TR3 群においては E:T=50 において63%の細胞障害活性が認められた。A7 TR3 群は、1767 TR2 群と比較し有意の細胞障害活性の上昇が認められた ($p < 0.001$) (図3-a)。

b) A7 と A7 TR3 について

A7, A7 TR3 それぞれにつき CTL 誘導効果について検討した。対照には未処理マウスを用いた。3回の *in vivo* sensitization の後、脾細胞を用いて A7 と *in vitro* sensitization を4日間加えた。A7 TR3 免疫群において有意に細胞障害活性が高かった ($p < 0.001$)。 *in vivo* を A7 TR3 で免疫した群では E/T=7 で70%の細胞障害活性があった (図3-b)。

5. 細胞障害性T細胞の特異性について (cold target inhibition test を用いて)

細胞障害活性が親株に特異的であることを確認するため cold target inhibition test を行った。MCB-1 (BALB/C: H-2^d) を cold target としておいた場

図 3-a A7TR3 免疫群は 1767TR2 免疫群に比較して、有意に細胞障害活性の上昇を認めた。

合 I/T (Inhibitor/Target) を変化させても細胞障害活性の変化はあまりなかった。標的腫瘍と同じ 1767-3 (C3H/HeN:H-2^k) を cold target とした場合は I/T の増加に伴い比例して細胞障害活性の抑制効果が認められた。I/T=20 では 90% の抑制があった (図 4)。

IV. 考 察

癌に対する免疫治療はさまざまな臨床治験の結果、当初期待された以上に困難とされているが、特に血液癌、悪性黒色腫、腎癌などにおいては、サイトカイン投与方法の工夫⁷⁾、あるいは LAK 療法との併用など⁸⁾によって徐々に治療効果が報告されるようになってき

た。しかし消化器癌に対しての効果は決して満足のできるものではない。

現在のところ、免疫治療として行われているのは、複数のサイトカインを含む BRM と抗癌剤との併用療法、LAK, CTL などの養子免疫療法と BRM の併用などである。サイトカイン単独での治療は副作用が強く、実用的とはいえない。そこで次に注目されてきたのがサイトカインの遺伝子治療である。サイトカインの遺伝子導入はサイトカインを少量持続的に産生するという意味から合理的であり、また腫瘍自体の免疫原性が增強されるとされており、ワクチン療法へ応用もでき、注目をあびるようになった。

そこでわれわれは腫瘍に TNF α 遺伝子を導入し in

図 3-b A7 TR3 免疫群は A7 免疫群に比較して、有意に細胞障害活性の上昇を認めた。

vivo における効果 (Winn assay), ワクチン効果について検討を加えた。免疫原性の低い腫瘍株においては、遺伝子導入を行っても著明な免疫誘導効果は認められないことが確かめられた。一方、われわれは現在までに mutagen 処理により免疫原性を高めた株が親株と共通抗原性があり免疫誘導に効果的であることを報告してきた⁹⁾。そこでこの高免疫原性株 A7 腫瘍に対して $\text{TNF}\alpha$ 遺伝子を導入してより効果的な遺伝子治療の可能性を検討した。遺伝子導入腫瘍細胞の免疫誘導能に関する評価を *in vivo* においてはワクチン効果, また *in vitro* においては親株を標的とした細胞障害性試験で判定した。非免疫原性腫瘍である親株に

$\text{TNF}\alpha$ 遺伝子導入して得た 1767 TR 2 においては非特異的な効果は認められるが特異的 T リンパ球は誘導できなかった。高免疫原性株 A7 に $\text{TNF}\alpha$ 遺伝子を導入して得た A7 TR 3 では、これを用いてマウスを免疫することによって、また *in vitro* でリンパ球を sensitize することによって親株に対してより強力な免疫が誘導された。A7 TR 3 免疫群の脾細胞では cold target inhibition test において著明な腫瘍特異的な抑制が認められ、腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞 (以下 CTL) が関わっていることが示唆された。また高免疫原性株 A7 と $\text{TNF}\alpha$ 産生高免疫原性株 A7 TR 3 との間で CTL 誘導能において差がみられるの

図 4 A7TR3免疫群の脾細胞を用いて腫瘍特異性について検討した。親株を inhibitor とし、増量すると、比例して細胞障害活性が抑制された。

か否かを検討した。両細胞をそれぞれ3回/月移植し、そのマウスの脾細胞をA7と4日間混合培養を行うことによってCTLを誘導し、細胞障害活性を測定した。その結果A7TR3の場合A7と比較して有意の細胞障害活性の増強がみられた。

われわれは免疫原性のない腫瘍(親株)に対して、TNF α 遺伝子導入を行いワクチン療法の可能性を検討した。親株にTNF α 遺伝子を直接導入したが、親株の再移植に対して生着までの期間を延長させる傾向を認めるのみで有意な差はなかった。しかし、親株と共通抗原性をもつ高免疫原性株に対して、TNF α 遺伝子を導入して得た株は、親株に対する強いCTLを誘導することが可能であった。これらの実験のデータからわれわれは、抗原性のない腫瘍に対して、TNF α 遺伝子を導入しても特異的免疫応答を誘導できないが、抗原性のある腫瘍に対してTNF α 遺伝子を導入して得たもので免疫すると特異的免疫応答がより強力に誘導できると考えた。Rosenbergらも very poorly immunogenic tumor (MCA 102) に対

してTNF α geneを導入した株で親株に対する特異的免疫を誘導しようとしたが、あらかじめ親株によるプライミングが必要であったとしている²⁰⁾。

IL-2^{21,22)}, IL-4²³⁾, IL-6²⁴⁾, IL-7²⁵⁾, GM-CSF²⁶⁾, Interferon- γ ²⁷⁾, TNF- α ³⁰⁾などのサイトカイン遺伝子は腫瘍に導入したものをを用いることにより親株に対する免疫が効率よく誘導されるという結果が報告されているが、同じ系統の腫瘍で、免疫原性の高低により遺伝子治療の効果の比較を行った論文は今までになく、非免疫原性腫瘍に対する免疫治療を考える場合こういった試みは重要であると考えられる。

TNF α を含めサイトカインの特異的免疫への関与について、Forni, Gら^{28,29)}が述べているように、腫瘍局所のサイトカインは初期の段階で炎症反応を起こし、この炎症反応の中では更に、サイトカインはマクロファージや顆粒球による腫瘍の貪食を助けるものと考えられている。やがて、所属リンパ節において、リンパ球による腫瘍抗原(Tumor Associated Antigen TAA)の認識がなされるが、その際にも2次的に産

生されたサイトカインが有効的に働いている。一方ではリンパ球、繊維芽細胞、内皮細胞などにおいて、接着分子³¹⁻³³⁾、MHC glycoproteins^{34,35)}を発現、増強させることを介して、TAA のより効率的な認識がされるという機序も考えられている。

in vivo において親株と TNF α 産生株を混合してマウス皮下に投与してみたところ、親株の生着抑制が認められた。これは TNF α 自体に直接的腫瘍細胞障害性があるため、持続的な局所の TNF α 高濃度によって奏功したものと考えられる。

その中で TNF α 産生高免疫株 (A 7 TR 3) との混合投与のほうが TNF α 産生非免疫株 (1767 TR 2) との混合投与に比べ親株の生着抑制が強く現れた。TNF α 産生量は A 7 TR 3 のほうが高かったがそれほ

ど大きな差ではなく、この現象は TNF α 自体の直接的腫瘍細胞障害性だけでなく、むしろ TNF α 産生株の免疫原性にも関連があったのではと考えられる。この意味から混合投与における親株の生着抑制には生体の免疫系を介した効果が大きな比重を占めていると考えられた。

ヒトの癌、特に消化器癌のようなありふれた頻度の高い腫瘍であるが、免疫原性という面からは一般に低いといわれている腫瘍に対して、今回、いかにすれば効率のよい免疫治療ができるかを追求した。

最近では癌の特異抗原は遺伝子レベルで解明されつつあるが、われわれの実験はこの遺伝子工学の手法を治療の分野でとり入れて抗原性とサイトカインの関連についていま一步明らかにするものである。

文 献

- 1) Van-Pel, A., Boon, T. : Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by a immunogenic variant obtained by mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 4718~4722, 1982.
- 2) Frost, P., Kerbel, RS., Bauer, E. et al. : Mutagen treatment as a means for selecting immunogenic variants from otherwise poorly immunogenic malignant murine tumors. Cancer Res., 43 : 125-132, 1983.
- 3) Boon, T. : Antigenic tumor cell variants obtained with mutagens. Adv. Cancer Res., 39 : 121-151, 1983.
- 4) Gorelik, E., Peppoloni, S., Overton, R. et al. : Increase in H-2 antigen expression and immunogenicity of BL 6 melanoma cells treated with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. Cancer Res., 45 : 5341~5347, 1985.
- 5) Goguel, AF., Le-Borgne, F., Baude, B. et al. : MHC class I antigen expression and alterations induced by rIFN gamma in tumor hybrid cell immunogenicity. In Vivo, 4 : 185~190, 1990.
- 6) Tartour, E., Mathiot, C., Fridman, W.H. : Current status of interleukin-2 therapy in cancer. Biomed. & Pharmacother., 46 : 473~484, 1992.
- 7) Bergmann, L., Fenchel, K., Weidmann, E. et al. : Daily alternating administration of high-dose alpha-2 b-interferon and interleukin-2 bolus infusion in metastatic renal cell cancer. Cancer, 72 : 1733~1742, 1993.
- 8) Sainouchi, R., Terata, N., Kodama, M. : The induction of enhanced antitumor effect against a nonimmunogenic tumor by highly immunogenic variants obtained by mutagen treatment. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 79 : 1247~1253, 1988.
- 9) Watanabe, N., Niitsu, Y., Neda, H. et al. : Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 76 : 1115~1119, 1985.
- 10) Watanabe, N., Niitsu, Y., Umeno, T. et al. : Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. Cancer Res., 48 : 2179~2183, 1988.
- 11) Ranges, G.E., Figari, I.S., Espevik, T. et al. : Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor-beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor-alpha. J. Exp. Med., 166 : 991~998, 1987.
- 12) Robinet, E., Branelec, D., Termijtelen, A.M. et al. : Evidence for tumor necrosis factor-

- alpha involvement in the optimal induction of class I allospecific cytotoxic T cells. *J. Immunol.*, 144 : 4555~4561, 1990.
- 13) Philip, R., Epstein, L. : Tumor necrosis factor as Immunomodulator and mediator of monocyte toxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature*, 323 : 86~89, 1986.
 - 14) Talmadge, J.E., Phillips, H., Schneider, M. et al. : Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor. *Cancer Res.*, 48 : 544~550, 1988.
 - 15) Shalaby, M.R., Aggarwal, B.B., Rinderknecht, E. et al. : Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J. Immunol.*, 135 : 2069~2073, 1985.
 - 16) Ostensen, M.E., Thiele, D.L., Lipsky, P.E. : Tumor necrosis factor - alpha enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.*, 138 : 4185~4192, 1987.
 - 17) Owen-Schaub, L.B., Gutterman, J.U., Grimm, E.A. : Synergy of tumor necrosis factor and interleukin-2 in the activation of human cytotoxic lymphocytes : Effect of tumor necrosis factor alpha and interleukin-2 in the generation of human lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.*, 48 : 788~792, 1988.
 - 18) Otsuki, T., Terata, N., Kodama, M. : Studies on the augmentation of immunity against non-immunogenic tumor by recombinant human tumor necrosis factor alpha. *J. Shiga Univ. Med. Sci.*, 8 : 111~117, 1993.
 - 19) Itoh, Y., Koshita, Y., Takahashi, M. et al. : Characterization of tumor-necrosis-factor-gene-transduced tumor-infiltrating lymphocytes from ascitic fluid of cancer patients : analysis of cytolytic, growth rate, adhesion molecule expression and cytokine production. *Cancer Immunol. Immunother.*, 40 : 95~102, 1995.
 - 20) Marincola, F.M., Ettinghausen, S., Cohen, P. A. et al. : Treatment of established lung metastases with tumor-infiltrating lymphocytes derived from a poorly immunogenic tumor engineered to secrete human TNF-alpha. *J. Immunol.*, 152 : 3501~3513, 1994.
 - 21) Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B. et al. : Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J. Exp. Med.*, 172 : 1217~1224, 1990.
 - 22) Vieweg, J., Rosenthal, F.M., Bannerji, R. et al. : Immunotherapy of prostate cancer in the dunning rat model : Use of cytokine gene modified tumor vaccines. *Cancer Res.*, 54 : 1760~1765, 1994.
 - 23) Golumbek, P.T., Lazenby, A.J., Levitsky, H.I. et al. : Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin 4. *Science (Washington DC)*, 254 : 713~716, 1991.
 - 24) Porgador, A., Tzehoval, E., Katz, A. et al. : Interleukin 6 gene transfection into Lewis lung carcinoma tumor suppresses the malignant phenotype and confers immunotherapeutic competence against parental metastatic cells. *Cancer Res.*, 52 : 3679~3686, 1992.
 - 25) Aoki, T., Tashiro, K., Miyatake, S. et al. : Expression of murine interleukin 7 in a murine glioma cell line results in reduced tumorigenicity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 3850~3854, 1992.
 - 26) Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A. et al. : Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 3539~3543, 1993.
 - 27) Gansbacher, B., Bannerji, R., Daniels, B. et al. : Retroviral vector-mediated gamma-interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity. *Cancer Res.*, 50 : 7820~7825, 1990.
 - 28) Forni, G., Giovarelli, M., Cavallo, F. et al. :

- Cytokine-induced tumor immunogenicity : From exogenous cytokines to gene therapy. *J. Immunother.*, 14 : 253~257, 1993.
- 29) Pierro, F.D., Cavallo, F., Pericle, F. et al. : Strategies for cytokine utilisation tumor therapy. *Med. Oncol. & Tumor Pharmacother.*, 10 : 53~59, 1993.
- 30) Asher, A.L., Mule, J.J., Kasid, A. et al. : Murine tumor cells transduced with the gene for tumor necrosis factor- α . Evidence for paracrine immune effects of tumor necrosis factor against tumors. *J. Immunol.*, 146 : 3227~3234, 1991.
- 31) Marlin, S.D., Springer, T.A. : Purified intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1(LFA-1). *Cell*, 51 : 813~819, 1987.
- 32) Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A. Jr. et al. : Endothelial leukocyte adhesion molecule 1 : an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 243 : 1160~1165, 1989.
- 33) Osborn, L., Hession, C., Tizard, R. et al. : Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59 : 1203~1211, 1989.
- 34) Ina, Y., Koide, Y., Nezu, Y. et al. : Regulation of HLA class II antigen expression : Intracellular signaling molecules responsible for the regulation by IFN- γ and cross-linking of Fc receptors in HL-60 cells. *J. Immunol.*, 139 : 1711~1717, 1987.
- 35) Nezu, N., Ryu, K., Koide, Y. et al. : Regulation of HLA class 2 molecule expression by IFN- γ . The signal transduction mechanism in glioblastoma cell lines. *J. Immunol.*, 145 : 3126~3135, 1990.
-