RSV 誘発マウス脳腫瘍に対する免疫学的研究

I 細胞障害性 T 細胞の誘導とその特異性

中川 邦夫・牧 豊

Immunological Study of RSV-induced Mouse Brain Tumor

I Induction of Tumor Specific Cytotoxic T Cells

KUNIO NAKAGAWA and YUTAKA MAKI

Department of Neurosurgery, Tsukuba University

Summary

Brain tumor was induced with Rous sarcoma virus (RSV) in adult inbred mice of A/J as a model of human malignant brain tumor. This brain tumor could not be transplanted to allogenic mice of C3H/He and BALB/c. Moreover, the syngeneic animals which had undergone surgical removal, did not take the secondary challenge of the same tumor cells. These results suggest the presense of the tumor specific transplantation antigen (TSTA) associated with major histocompatibility complex (MHC). The tumor specific cytotoxic T cells were induced against this brain tumor using ^{51}Cr release assay. Cytotoxic T cells were also induced when the tumor cells were inoculated intracranially, and their cytotoxic activity was higher in spleen cells than in lymph node cells. The brain has no lymphatic tissues. It may be possible that soluble tumor antigens shedding from cell surfaces may induce the cytotoxic T cells. More precise analysis of immune responses against the brain tumor may be necessary for the sake of immunological therapy.

Key words: Rous sarcoma virus, brain tumor, tumor specific cytotoxic T cells, ^{51}Cr release assay, soluble tumor antigens

I はじめに

腫瘍に対する生体の免疫応答は複雑であり、その免疫学的研究も十分とは言えないのが現状である。しかし近年、マウスにおける動物実験で、抑制性 T 細胞、細胞障害性 T 細胞、マクロファージ等の細胞間相互作用が、腫瘍の増殖および退縮に重要な役割を果していることが報告されてきている²⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁸⁾¹¹⁾。

さらに、藤本らは腫瘍免疫に働く細胞障害性 T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体内に存在する I 領域の I-A 亜領域による遺伝子産物を表面に有し、抑制性 T 細胞は I-J 亜領域による遺伝子産物を有し、遺伝的統御を受

けているのであろうと報告している⁹⁾。

しかし脳腫瘍に対しての腫瘍特異的免疫応答に関する報告は少ない¹⁾³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。脳は脳血液関門を有し、またいわゆるリンパ組織を持たないなど、他の臓器とは異なる特殊性を有している。この特殊性を考慮に入れるならば、脳腫瘍に対する免疫応答の解析は、診断、治療上意味のあるものと思われる。

今回私たちは、ヒト悪性脳腫瘍に対する実験モデルとして、ラウス肉腫ウィルス (RSV) を用いて近交系 A/J 系マウスに脳腫瘍を作成し、同系および異系マウスに対する移植実験を行い、さらにこの腫瘍に対する細胞障害性 T 細胞を誘導し、その腫瘍特異性について検討した

筑波大学脳神経外科

〔連絡先：〒300-31 茨城県新治郡桜村妻木、筑波大学脳神経外科、中川邦夫〕

1978年9月30日 受稿

ので報告する。また脳腫瘍に対する生体の免疫応答の特殊性についても若干の検討を加えたので併せて報告する。

II 実験材料と方法

1. ウィルス

ラウス肉腫ウィルス(RSV)およびRSV誘発ニワトリ肉腫細胞を使用した(千葉大学医学部免疫研究部, 多田富雄教授により供与を受けた。)

2. マウス

6~8週令の近交系 A/J, C3H/He および BALB/c マウスを使用した。A/J 系マウスは, 千葉大学医学部免疫研究部の動物施設より, また他の系のマウスは静岡実験動物農協よりの供給を受けた。

3. 脳腫瘍の作成および継代

RSV 誘発ニワトリ肉腫細胞 3×10^5 個をハンクス液 0.02 ml に浮遊させ, ツベルクリン針にて経皮的に A/J 系マウス頭蓋内に接種し, 脳腫瘍を作成した。作成した脳腫瘍は *in vitro* および *in vivo* で継代し, 一部は液体窒素保管器にて凍結保存した。In *vitro* の継代には 5% の胎児ウシ血清 (FCS, microbiological associates) を加えた RPMI 1640 培養液 (Grand Island biological Co.) を使用した。In *vivo* の継代は同系マウスの背部皮下にて行った。

4. リンパ球の採取

マイトマイシン C (MMC, 協和発酵) で処理した腫瘍細胞 1×10^6 個を背部皮下に接種した動物から, 10~14 日後に脾細胞およびリンパ節細胞を採取し, それぞれをガラスホモジナイザーにて細胞浮遊液とした。MMC による処理方法は, 1×10^7 個の培養腫瘍細胞に 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MMC を加え, 37°C で 45 分間放置後, ハンクス液にて 3 回洗浄する。

5. リンパ球の *in vitro* preincubation

採取したリンパ球は 5% FCS, 20mM の HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, International Scientific Ind.) および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシン (万有製薬) を加えた DMEM (Dulbeccos' Modified Eagles Medium, Grand Island Biological Co.) を用いて, 56 mm $\times$ 15 mm のシャーレ (Nunc. N-1400-1) に $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度で 37°C, 5% CO_2 にて 24 時間培養した。培養後, 付着しない浮遊細胞を採取し使用した。

6. 細胞障害試験

培養している腫瘍細胞を ^{51}Cr (Na_2CrO_4 , 日本原子力研究所) でラベルし標的細胞とした。ラベルは 4×10^6

個の腫瘍細胞を 10% FCS を添加したハンクス液 0.5 ml に浮遊させ, これに 50 μCi の ^{51}Cr を加え, 37°C で 40 分間培養した。洗浄後, 感作リンパ球との比が 1:20 および 1:40 となるように, マイクロタイタープレート (Nunc. N-1480) にて 37°C, 5% CO_2 で 16 時間培養し, その上清 0.1 ml に遊離する放射能活性をガンマカウンターで測定した。対象には, 正常マウスよりの脾細胞およびリンパ節細胞を同じ条件で培養し使用した。

細胞障害性は次の式より算定した。

$$\begin{aligned} \% \text{ Specific } ^{51}\text{Cr release} \\ = \frac{\text{CPM}(\text{Sensitized cells}) - \text{CPM}(\text{Normal cells})}{\text{CPM}(\text{Maximum release}) - \text{CPM}(\text{Normal cells})} \times 100 \end{aligned}$$

7. 抗血清および抗血清による処理

Reif and Allen の方法²²⁾ によって得た, マウス T 細胞に対する特異的抗血清である, AKR anti- θ C3H (anti-Thy 1.2) 血清を使用した。処理方法は, 感作したリンパ球 $1 \times 10^7/\text{ml}$ に対し, 10 倍希釈の抗血清を加え, 室温で 45 分間処理し, 1 回洗浄後マウス胸腺細胞に対して細胞障害性の低いウサギの血清を補体として, 37°C で 30 分間処理した。

III 結 果

1. 脳腫瘍の発生

RSV 誘発脳腫瘍は, 接種した A/J 系マウス 7 匹中 3 匹, 約 43% に発生した。その組織所見は H-E 染色で好酸性で均質に染まる大きな胞体を有する細胞が, 特別のパターンをとることなく密に存在している。線維成分はほとんど染まっておらず, 形態的には plump な astrocyte に似ている (Fig. 1)。

2. 可移植性

同系マウスの背部皮下に 3×10^5 個, 3×10^4 個, 3×10^3 個の腫瘍細胞を接種すると, それぞれ 3 日, 9 日, 11 日目頃より生育を始め, およそ 4~6 週ですべて腫瘍死した (Fig. 2)。また図には示していないが, 3×10^3 個の細胞数でも腫瘍は生着した。しかし異系である C3H/He, BALB/c 系マウスでは, 接種後 7 日目までは一時的に腫瘍を形成するが, 14~16 日後には完全に退縮した。

3. 細胞障害性 T 細胞の発現

細胞障害性 T 細胞の誘導過程は Fig. 3 に示してある。皮下に免疫した群では, 所属リンパ節に, 標的腫瘍細胞とリンパ球の比が 1:20 で 6.62%, 1:40 で 10.45% と比較的高い細胞障害性を示すが, 脾細胞では約 3% と低かった。しかし, 脳内に生細胞を接種した場合には, 脾細胞が 1:40 の比で約 8% であるのに比して, リンパ節

Fig. 1 Histology of RSV-induced mouse brain tumor (HE $\times 400$)

Fig. 2 Alive tumor cells injected subcutaneously to syngeneic A/J mice

Fig. 3. Experimental procedure

a. Mitomycin-C treated, 1×10^6 brain tumor cells injected subcutaneously or alive, 1×10^5 tumor cells injected intracranially

細胞ではほとんど細胞障害性を示さなかった (Table 1).

次にこのリンパ球をマウス T 細胞に対する特異的抗血清である, anti-Thy-1.2 血清と補体で処理すると, この細胞障害性は消失したが, 対象としての正常マウス血清と補体では細胞障害性は消失しなかった. このことより, T 細胞由来の細胞障害性であるといえる (Table 2).

4. 細胞障害性 T 細胞の腫瘍特異性

脳腫瘍で誘導した細胞障害性 T 細胞の活性は, A/J 系マウスの自然発生リンパ腫である L 1117 を標的とした場合にはまったく示されなかった. このことより腫瘍特異的であるといえる (Table 3).

IV 考 察

実験的脳腫瘍の作成およびその組織学的検討については, 古くは Seligman and Shear (1939年) の報告に始まり多数の報告がある. ラウス肉腫ウィルスを用いての発癌実験, 移植実験および組織学的検討については, 熊西らの詳細な報告がある¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾. 我々の作成した脳腫瘍による発生頻度, 組織像, 可移植性等も彼らの結果とよく一致している.

生体に免疫応答を惹起させると考えられている腫瘍特異抗原あるいは, 腫瘍特異的移植抗原に関する研究は, 純系マウスの導入により組織不適合抗原による反応の重複が除かれて以来, 飛躍的な発展を遂げた. すなわち, Foley⁶⁾ (1953年) は, 担癌マウスより外科的に腫瘍を全摘出すると, この動物は同じ腫瘍細胞の移植を拒絶する反応を示すことを観察し, 腫瘍特異的移植抗原の存在を示し, 次いで Prehn²¹⁾, Klein¹³⁾ ら多くの実験結果が報告されている. 我々の実験においても異系マウスに移植できない点, および外科的に全摘出すると, 同じ腫瘍に対して免疫状態を獲得する点より主要組織適合抗原と関連する, 腫瘍特異的移植抗原の存在が示唆される. この腫瘍特異的移植抗原に対する生体の免疫応答の主役は, 拒絶に作用する細胞障害性 T 細胞および活性化マクロファージ, これらの機能に抑制的に働く抑制性 T 細胞等の細胞性免疫が果していると示唆する報告が多い²⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾. しかしながら, 脳腫瘍に対する免疫応答の報告はきわめて少ない. Denlinger ら³⁾ は, ラットの腫瘍を用いて放射線照射により不活化した腫瘍細胞で背部皮下に免疫すると, 脳内に生細胞を接種しても腫瘍は生着せず, 何らかの免疫学的機序が脳内にも作用し, 腫瘍を拒絶するのであろうと推測しているが, 機序の解析には及んでいない.

今回の我々の実験で, その機序の一端を説明する二つの結果を得た. 第 1 は, 脳内に腫瘍細胞を接種した場合

Table 1 Specific tumor cell lysis by sensitized spleen and lymph node cells

Immune Cells	Percent specific lysis $\pm$ S.E.			
	S.C. immunization ^a		I.C. inoculation ^b	
	1: 20	1: 40	1: 20	1: 40
Spleen	3.08 $\pm$ 1.23	3.35 $\pm$ 1.12	3.82 $\pm$ 0.97	7.99 $\pm$ 0.99
Lymph node	6.62 $\pm$ 1.14	10.45 $\pm$ 1.42 ^c	0.91 $\pm$ 0.54	0.74 $\pm$ 0.43

- a. Mitomycin-C treated, 1×10^6 brain tumor cells injected subcutaneously into A/J mice, and lymph node cells collected 10 days later.
b. Spleen and lymph node cells from A/J mice with 1×10^5 alive brain tumor cells intracranially injected 7 days earlier were used.
c. $P < 0.01$

にも、細胞障害性T細胞が出現すること。第2は、皮下に免疫した群では細胞障害性は所属リンパ節に高いが、脾臓では低く、反対に、脳内に接種した群では脾臓に高く、リンパ節では低いという結果である (Table 1)。脳には脳血液関門が存在し、さらにいわゆるリンパ組織を持たないという臓器特殊性を考慮に入れると、以上の結果は興味深い。すなわち、どのような機序により細胞障害性T細胞が発現したのであろうか？ 脳内においてその可能性を考察すると、第1には、腫瘍細胞表面より脱落した可溶性抗原物質が血中に入り、細胞障害性T細胞を誘導したとする考え方である。可溶性抗原物質の免疫応答に与える影響については、細胞障害性T細胞を活性化するという報告と、逆に抑制性T細胞を活性化すると

いうものがある。この相反する結果は、腫瘍自身の差異によるものかもしれない。第2の可能性としては、腫瘍細胞が他の細胞を刺激して何らかの signal を出し、それにより細胞障害性T細胞が誘導されるとする考え方である。いずれにしても、脳の持つ臓器特殊性を考慮に入れた上での脳腫瘍に対する腫瘍特異的免疫応答の解析が、診断、治療、治療効果判定のためにも必要なことと思われる。

次に ^{51}Cr release assay で の細胞障害試験について述べる。この方法は Holden ら¹²⁾によって確立され、広く使用されるようになった。一般に同系腫瘍に対する細胞障害性は低く、10~20%前後である。Vasudevan ら²³⁾は二つの理由を挙げている。①同系の腫瘍に対しては、effector cell の動員が少ないのではないかと、②その作用を抑制する何か、たとえば antigen によるブロックが起こっているのではないかと等である。今回の我々の実験でも10%前後と低いが、上記の二つの可能性の他に、③ ^{51}Cr release assay 自体の精度の問題、④培養時間の問題、⑤標的細胞とリンパ球の比の問題等いくつかの原因が考えられる。しかしながら松沢らの実験では¹⁸⁾、in vitro で10~15%の細胞障害性であっても、そのリンパ球を用いた in vivo の腫瘍中和試験で十分に腫瘍を退縮させることができると述べている。要するに ^{51}Cr relea-

Table 2 Effect of anti- θ serum plus rabbit complement (RC) on cytotoxicity of immune cells

Immune cells	Treatment	Percent specific lysis ^a
Lymph node cells	—	10.63 $\pm$ 0.04
	Anti- θ^b + RC	-0.14 $\pm$ 1.22
	NMS ^c + RC	7.41 $\pm$ 0.71

- a. Target: Effector = 1: 40
b. AKR antiserum to C₃H thymus cells
c. Normal mouse serum

Table 3 Specificity of cytotoxic T cells

Tc source ^a	Target cells	Percent specific lysis $\pm$ S.E.	
		1: 20	1: 40
Lymph node cells	Brain Tumor	11.46 $\pm$ 2.71	11.75 $\pm$ 0.80 ^b
	L1117 ^c	-0.34 $\pm$ 0.65	-0.97 $\pm$ 0.51

- a. Lymph node cells from A/J mice with 1×10^6 Mitomycin C treated brain tumor cells injected subcutaneously 10 days earlier were cultured 24-36 hr. before using.
b. $P < 0.01$
c. Another tumor of A/J mice

se assay では低い値を示すが、腫瘍の退縮については細胞障害性T細胞が主役を果していると考えられる。

ヒト悪性脳腫瘍に対する免疫学的研究もいくつか報告されているが¹²⁾¹⁷⁾¹⁹⁾、免疫応答の複雑な細胞間相互作用や、液性成分の関与等を考えれば、ただちにヒト悪性脳腫瘍の診断、治療に結びつけるのは困難であり、in vitro と in vivo との差異、動物実験と人間との違いなどを考慮に入れた上で、着実な免疫応答の解析が必要であると思われる。今後の免疫学的研究の成果に期待したい。

V ま と め

ヒト悪性脳腫瘍に対する実験モデルとして、ラウス肉腫ウィルス(RSV)を用いて近交系A/Jマウスに脳腫瘍を作成し、移植実験、細胞障害性T細胞の誘導とその腫瘍特異性について検討を加え、下記の結果を得た。

- 1) A/Jマウスに43%の発生頻度でRSV誘発脳腫瘍を作成した。
- 2) この腫瘍は異系マウスには移植不能であること、全摘出すると免疫状態を獲得しうることから、主要組織適合抗原と関連する腫瘍特異的移植抗原が存在した。
- 3) この脳腫瘍に特異的な細胞障害性T細胞が誘導された。
- 4) 頭蓋内接種の場合も細胞障害性T細胞が出現し、脾臓に高い障害性が示されたことより、可溶性抗原物質あるいは何らかの化学物質の関与が示唆された。

本論文の要旨は第36回日本脳神経外科学会総会(昭和52年10月、大阪)において発表した。

文 献

- 1) BROOKS, W. H., NETSKY, M. G., NORMANSELL, D. E. & HORWITZ, D. A.: Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. Characterization of a humoral immunosuppressive factor. *J Exp Med* 136: 1631-1647, 1972
- 2) CEROTTINI, J.-C., ENGERS, H. D., MACDONALD, H. R. & BRUNNER, K. T.: Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. I. Response of normal and immune mouse spleen cells in mixed leukocyte cultures. *J Exp Med* 140: 703-717, 1974
- 3) DENLINGER, R. H., AXLER, D. A., KOESTNER, A. & LISS, L.: Tumor specific transplantation immunity to intracerebral challenge with cells from a methylnitrosourea-induced brain tumor. *J Med* 324: 249-259, 1975
- 4) DOHERTY, P. C. & ZINKERNAGEL, R. M.: Capacity of sensitized thymus-derived lymphocytes to induce fatal H-2 gene complex. *J Immunol* 114: 30-33, 1975
- 5) DOHERTY, P. C. & ZINKERNAGEL, R. M.: H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* 141: 502-507, 1975
- 6) FOLEY, E. J.: Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 13: 835-837, 1953
- 7) FUJIMOTO, S., GREENE, M. I. & SEHON, A. H.: Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor bearing host. *J Immunol* 116: 791-799, 1976
- 8) 藤本重義: 腫瘍免疫における細胞性調節機構. 千葉医学会雑誌52: 45-47, 1976
- 9) FUJIMOTO, S., MATSUZAWA, T., NAKAGAWA, K. & TADA, T.: Cellular interaction between cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumors in the mouse. *Cell Immunol* (in press)
- 10) HENNEY, C. S.: On the mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. *Transplant Rev* 17: 37-70, 1973
- 11) HERBERMAN, R. B. & AOKI, T.: Specificity of Cr release cytotoxicity by lymphocytes immune to murine sarcoma virus. *J Natl Cancer Inst* 53: 1103-1111, 1974
- 12) HOLDEN, H. T., OLDHAM, R., ORTALDO, J. R. & HERBERMAN, R. B.: Standardization of the chromium-51 release, cell-mediated cytotoxicity assay: Cryopreservation of mouse effector and target cells. *J Natl Cancer Inst* 58: 611-621, 1977
- 13) KLEIN, G., SJÖGREN, H. O., KLEIN, E. & HELLSTRÖM, K. E.: Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 20: 1561-1572, 1960
- 14) KUMANISHI, T.: Brain tumors induced with Rous Sarcoma Virus, Schmidt-Ruppin Strain. 1. Induction of brain tumors in adult mice with Rous Chicken Sarcoma Cells. *Jpn J Exp Med* 37: 461-474, 1967
- 15) KUMANISHI, T. & YAMAMOTO, T.: Brain tumors induced with Rous Sarcoma Virus, Schmidt-Ruppin Strain. 2. Rous tumor specific transplantation antigen in subcutaneously passaged mouse brain tumors. *Jpn J Exp Med* 41: 79-86, 1970
- 16) KUMANISHI, T., IKUTA, F. & YAMAMOTO, T.: Brain tumors induced by Rous Sarcoma Virus, Schmidt-Ruppin Strain. 3. Morphology of brain tumors induced in adult mice. *J Natl Inst* 50: 95-109, 1973

- 17) MARTIN-ACHARD, A., DISERENS, A. C., TRIBOLET, N. D., ZANDER, E. & CARREL, S.: Search for anti-tumor anti-bodies in sera of glioma patients. *Schweiz Med Wochenschr* 108: 959-961, 1978
- 18) 松沢建夫, 藤本重義, 多田富雄: II. In vivo における Cytotoxic T cell の不活性化. 第36回日本癌学会総会, 東京, 1977
- 19) NELSON, L. L., MAHALEY, M. S., JR. & DAY, E. D.: In vitro demonstration of cell-mediated immunity to human brain tumors. *Cancer Res* 32: 477-482, 1972
- 20) PLATA, F., CEROTTINI, J-C. & BRUNNER, K. T.: Primary and secondary in vitro generation of cytolytic T lymphocyte in the murine sarcoma virus system. *Eur J Immunol* 5: 227-233, 1975
- 21) PREHN, R. T. & MAIN, J. M.: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcoma. *J Nat Cancer Inst* 18: 769-778, 1957
- 22) REIF, A. E. & ALLEN, J. M. V.: The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J Exp Med* 120: 413-416, 1964
- 23) VASUDEVAN, D. M., BRUNNER, K. T. & CEROTTINI, J-C.: Increased cytolytic effect of immune lymphocytes in a syngeneic tumor system following simple purification procedures. *Br J Cancer* 28: 35-36, 1973
- 24) 山内克己, 藤本重義, 多田富雄: 可溶性腫瘍抗原による抑圧性T細胞の選択的活性化. 第37回日本癌学会総会, 東京, 1978
- 25) 山田誠一, 藤本重義, 多田富雄: 抗 I-J 抗血清投与による抗腫瘍免疫の誘導. 第37回日本癌学会総会, 東京, 1978