

学位論文題名

LAK細胞によるヒト膵癌細胞傷害機構

—細胞間接着分子の役割—

学位論文内容の要旨

I 研究目的

膵癌外科治療後の遠隔成績は極めて悪く、補助療法としての免疫療法にも期待が寄せられている。本研究では膵癌補助療法としてのLAK養子免疫療法の効果を検討する目的でヒト膵癌細胞表面分子、特に intercellular adhesion molecule-1（以下 ICAM-1）の発現とLAK細胞表面の lymphocyte function-associated antigen-1（以下 LFA-1）を介するLAK細胞と膵癌細胞との接着、細胞傷害反応との関連について基礎的な検討を行なった。

II 対象と方法

1. PCI-10の樹立：膵頭部原発中分化型管状腺癌より新たに樹立したヒト膵癌細胞株 PCI-10を実験に使用した。約10×10mmの組織片を細切して、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ添加20% fetal bovine serum（以下 FBS）加 RPMI 1640に懸濁し、攪拌、洗浄後、細胞成分を20% FBS加 RPMIに懸濁して37℃、10% CO₂下に培養した。上皮細胞コロニー形成後、FBSを10%に減じて継代培養した。
2. PCI-10細胞表面分子の発現と調節：HLA class IであるHLA-A, B, C, class IIのHLA-DR, DQ、および ICAM-1の発現をFACSを用いて検討した。次に interferon- γ

(以下 IFN- γ) の添加濃度、培養時間と表面分子発現の関係、tumor necrosis factor- α (以下 TNF- α)、interleukin-1 α 、 β (以下 IL-1 α 、 β) による発現調節を検討した。

3. LAK・PCI-10の接着、細胞傷害と反応時間、effector:target比(以下ET比)の関係: LAK細胞は健常人末梢血より単核細胞を分離、粘着細胞を除去した後に1,000U/ml interleukin-2と共に7日間培養誘導した。

1) LAK・PCI-10の接着と反応時間: 実験48時間前より培養したPCI-10にLAK細胞を ^{51}Cr にて2時間標識後加え、15、30、60、120、240分の経過時間ごとに浮遊細胞を洗浄除去し、接着LAK細胞を0.1N NaOHにて破壊し、ガンマーカウンターで計測した。

2) LAK・PCI-10の接着とET比: LAK細胞を 2×10^5 の定数とし、 0.2×10^4 から 40.0×10^4 までのPCI-10に対する1時間混合培養後の接着を検討した。

3) LAK細胞傷害反応とET比: $0.5 \times 10^4/\text{well}$ ~ $1.0 \times 10^6/\text{well}$ のLAKをmicroplateに播き、PCI-10を ^{51}Cr 0.1mCiにて1時間標識した後、 $1.0 \times 10^4/\text{well}$ にて加え、4時間 ^{51}Cr release assayを行なった。

4. LAK・PCI-10の接着、細胞傷害におよぼすIFN- γ の影響: 種々の濃度のIFN- γ で培養、およびIFN- γ 100U/mlにて1~4日間培養後のPCI-10とLAKの接着を検討した。次に100、1,000U/mlのIFN- γ にて培養後のPCI-10に対するLAK細胞傷害を検討した。

5. LAK・PCI-10の接着、細胞傷害におよぼす単クローン抗体による細胞表面分子 blockingの影響: LAK細胞とPCI-10を抗HLA-A, B, C、抗ICAM-1、抗LFA-1抗体で前処理し、接着を検討した。次にLAK・PCI-10混合培養液中に各抗体を添加し、細胞傷害を検討した。またLAKとPCI-10を各抗体にて前処理し、細胞傷害反応を検討した。

III 結 果

1. PCI-10の樹立: PCI-10はin vitroでは単層シート状配列を示した。ヌードマウス皮下に 1×10^7 個/mouseにて皮下注射すると腫瘍結節を形成し、原発巣類似の中分化管状腺癌像を呈した。

2. PCI-10の細胞表面分子の発現と調節: PCI-10はHLA-A, B, CおよびICAM-1を

発現していたが、HLA-DR、DQは発原していなかった。HLA-A, B, C、ICAM-1はIFN- γ の濃度依存的に発現増強が認められた。HLA-DRも発現増強が認められた。IFN- γ 100U/mlではHLA-A, B, Cは4日目まで次第に上昇したが、ICAM-1は2日目で最大となり、その後わずかに減少した。ICAM-1はTNF- α 、IL-1 α 、 β でも軽度増強した。

3. LAK・PCI-10の接着、細胞傷害反応と反応時間、ET比の関係：LAK・PCI-10の接着は60分で最大となり、その後は徐々に減少した。LAK細胞 2×10^5 の接着はPCI-10 6.4×10^4 個以下では標的数に比例して増加したが、それ以上では増大しなかった。LAK細胞傷害反応はETにしたがって増加しET比50以上で一定した。
4. LAK・PCI-10の接着、細胞傷害反応におよぼすIFN- γ の影響：LAK・PCI-10の接着はIFN- γ の濃度依存性に増加した。またIFN- γ 100U/mlで培養後のPCI-10に対する接着は1日目で最大となり、その後は減少した。細胞傷害はIFN- γ 100U/mlではわずかに減少し、1,000U/mlでは増強したが、同時にPCI-10の変性を認めた。
5. LAK・PCI-10の接着、細胞傷害反応におよぼす表面分子ブロックの影響：接着はLAKの抗LFA-1抗体処理にて有意に低下し、PCI-10の抗ICAM-1処理にて低下する傾向であった。LAK・PCI-10混合培養中に抗体を添加すると抗LFA-1、抗HLA-A, B, C抗体にて有意の細胞傷害反応抑制が認められ、抗ICAM-1抗体でも低下傾向であった。また各抗体にてLAK・PCI-10を各々前処理すると、LAK細胞の抗LFA-1、抗HLA-A, B, C処理で有意の傷害抑制が、PCI-10の抗HLA-A, B, C処理では有意の傷害増強が認められた。抗ICAM-1処理では有意差は認めなかった。

IV 考 察

PCI-10は肺癌に最も一般的な中分化型管状腺癌細胞であり、肺癌細胞モデルとして普遍的な有用性が示唆された。IFN- γ はHLAclass I、IIおよびICAM-1の発現を増強させることが知られており、PCI-10でも同様であった。IFN- γ 処理したPCI-10ではLAK細胞との接着はIFN- γ 濃度依存的に、またICAM-1と時間的にはほぼ並行して増強し、ICAM-1がLAK細胞との接着に関与していることが示唆された。LAK細胞のLFA-1 blockingにて有意の接着低下が認められるにもかかわらず、PCI-10のICAM-1 blockingではまだ多くの

接着が認められた。

この点に関しては抗 ICAM-1 抗体が真に接着に重要な epitope を認識していない、あるいは PCI-10 に LFA-1 のもうひとつのリガンドである ICAM-2 が存在する可能性が考えられる。LAK 細胞傷害に与える IFN- γ の効果については増強性、抑制性の両方の報告があるが、腫瘍においては抑制性に働くものと推察され、IFN- γ 1,000U/ml にて認められた傷害増強は、IFN- γ の直接作用により修飾された可能性が強い。傷害実験における ICAM-1、LFA-1 blocking による差についても前述の epitope の問題と ICAM-2 の関与が示唆される。標的細胞の HLA class I については、LAK 細胞に対する感受性を低下させるとのいくつかの報告に矛盾しない。また PCI-10 の抗 class I 処理による傷害増強は LAK による antigen dependent cellular cytotoxicity (以下 ADCC) 機能が加わったことによるもので、LAK 細胞の抗 class I 処理では LAK 細胞同志の ADCC のために LAK 細胞数の減少が起こり、PCI-10 に対する細胞害反応を低下させた可能性も示唆された。

IV 結 論

腫瘍 LAK 療法に関わる細胞表面分子と接着、細胞傷害反応に関する基礎的な検討を行ない以下の結論を得た。

1. 腫瘍細胞には ICAM-1 の発現が認められ、LAK 細胞の LFA-1 を介する接着が認められた。
2. IFN- γ は腫瘍細胞に対する LAK 細胞接着を増強したが、傷害反応は増強しなかった。
3. LAK 細胞の LFA-1 分子は腫瘍細胞傷害反応に重要な関与があった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 邊 達 三
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

膵臓癌は増加傾向にあり、治療成績もいまだ満足できる状況ではない。近年、悪性腫瘍に対する lymphokine activated killer (LAK) 細胞を用いた養子免疫療法が注目されてきている。一般に LAK 細胞が腫瘍細胞を破壊するためには腫瘍細胞との結合が必要であり、その機序の解明が望まれている。とくに LAK 細胞の持つ主要接着分子である lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) 分子を介する LAK 療法の効果を検討するため、LFA-1 のリガンドの一つである intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 分子の発現様式を検討し、ICAM-1/LFA-1 を介する LAK 細胞と膵癌細胞との接着、LAK 細胞による膵癌細胞障害反応との関連について基礎的検討を行った。

実験方法は膵頭部原発中分化型管状線癌より新たに樹立したヒト膵癌細胞株 PCI-10 を使用した。PCI-10 細胞表面分子の発現と調節について HLA class I である HLA-A, B, C, class II の HLA-DR, DQ, および ICAM-1 の発現を FACS を用いて検討した。次いで interferon- γ (以下 IFN- γ) の添加濃度、培養時間と表面分子発現の関係、tumor necrosis factor- α (以下 TNF- α), interleukin-1 α , β (以下 IL-1 α , β) による発現調節を検討した。LAK・PCI-10 の接着、細胞傷害と反応時間、effector : target 比 (以下 ET 比) の関係をみるため、1) LAK・PCI-10 の接着と反応時間 : 培養した PCI-10 に LAK 細胞を ^{51}Cr にて標識後加え、経過時間ごとに浮遊細胞を洗浄除去し、接着 LAK 細胞を 0.1N N_2OH にて破壊し、ガンマカウンターで計測した。

2) LAK・PCI-10 の接着と ET 比 : LAK 細胞を 2×10^5 の定数とし、 0.2×10^4 から 40.0×10^4 までの PCI-10 に対する 1 時間混合培養後の接着を検討した。

3) LAK 細胞傷害反応と ET 比 : 0.5×10^4 /well ~ 1.0×10^6 /well の LAK を microplate に播き、PCI-10 を $^{51}\text{Cr}0.1\text{mCi}$ にて標識した後、4 時間 ^{51}Cr release assay を行った。さらに LAK・PCI-10 の接着、細胞傷害におよぼす IFN- γ の影響をみるため IFN- γ で培養、および IFN- γ 100U/ml にて 1 ~ 4 日間培養して検討した。次に 100, 100U/ml の IFN- γ にて培養後の PCI-10 に対する LAK 細胞傷害を検討した。単クローン抗体による細胞表面分子

blocking の影響について LAK 細胞と PCI-10 を抗 HLA-A, B, C, 抗 ICAM-1, 抗 LFA-1 抗体で前処理し, 接着を検討した。次に LAK・PCI-10 混合培養液中に各抗体を添加し, また LAK と PCI-10 を各抗体にて前処理し, 細胞傷害反応を検討した。

実験結果は, 1 : PCI-10 は HLA-A, B, C および ICAM-1 を発現していたが, HLA-DR, DQ は発現していなかった。HLA-A, B, C, ICAM-1 は IFN- γ の濃度依存的に発現増強が認められた。HLA-DR も発現増強が認められた。IFN- γ 100U/ml では ICAM-1 は 2 日目で最大となり, その後わずかに減少した。ICAM-1 は TNF- α , IL-1 α , β でも軽度に増強した。2 : LAK・PCI-10 の接着は 60 分で最大となり, その後は徐々に減少した。LAK 細胞 2×10^5 の接着は PCI-10 6.4×10^4 個以下では標的数に比例して増加したが, それ以上では増大しなかった。LAK 細胞傷害反応は ET にしたがって増加し ET 比 50 以上で一定した。3 : LAK・PCI-10 の接着は IFN- γ の濃度依存性に増加した。また IFN- γ 100U/ml で培養後の PCI-10 に対する接着は 1 日目まで最大となり, その後は減少した。細胞傷害は IFN- γ 100U/ml ではわずかに減少し, 1,000U/ml では増強したが, 同時に PCI-10 の変性を認めた。4 : LAK・PCI-10 の接着は LAK の抗 LFA-1 抗体処理にて有意に低下し, PCI-10 の抗 ICAM-1 処理にて低下する傾向であった。LAK・PCI-10 混合培養中に抗体を添加すると抗 LFA-1, 抗 HLA-A, B, C 抗体にて有意の細胞傷害反応抑制が認められ, 抗 ICAM-1 抗体でも低下傾向であった。LAK 細胞抗 LFA-1, の抗 HLA-A, B, C 処理で有意の傷害抑制が PCI-10 の抗 HLA-A, B, C 処理では有意の傷害増強が認められた。

以上の結果から膀胱癌細胞と LAK 細胞には ICAM-1/LFA-1 を介する接着が認められ, IFN- γ は接着を増強させたが細胞傷害の増強は認めなかった。LAK 細胞による膀胱癌細胞傷害反応には LFA-1 及び HLA-ABC の重要な関与が示唆された。

口頭発表にあたって葛巻教授から control としての正常血漿の使用の有無, IFN による接着と傷害反応に解離のある理由, 長嶋教授から接着と細胞傷害の解離機序, 宮崎教授から腫瘍 marker の発現, LAK 細胞傷害の機序などの質問があったが, 申請者はおおむね妥当な回答を行った。また副査の葛巻教授, 長嶋教授には個別に審査を受け合格と判定された。

膀胱癌における養子免疫療法について, LAK 細胞と膀胱癌細胞と接着, 傷害の機序を明らかにした本研究の意義は大きく, 学位授与に値すると考える。