



Title	放射線治療による抗腫瘍免疫増強のメカニズム-腫瘍照射による実験腫瘍特異的CD4+ヘルパーT細胞の分化-
Author(s)	榎殿, 玲子
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1996, 56(8), p. 575-578
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/15511">https://hdl.handle.net/11094/15511</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 放射線による抗腫瘍免疫増強のメカニズム

## —腫瘍照射による実験腫瘍特異的CD4+ヘルパーT細胞の分化—

楨殿 玲子

久留米大学免疫学教室

### A Mechanism Involved in Augmentation of Anti-tumor Immunity by Irradiation to the Tumor : Tumor irradiation promoted generation of CD4+ helper T cells against a murine immunogenic tumor

Reiko Makidono

It has long been suggested but not generally accepted that anti-tumor immunity is enhanced by irradiation of the tumor. In this study, the mechanism involved in enhancing the effect of irradiation on tumor immunity was analyzed. 20 Gy of irradiation to a murine hepatoma, MH134, in the thigh muscle of syngeneic C3H/He mice, augmented the generation of cytotoxic T cells (CTL) in the spleen. It was assumed that radiation-damaged apoptotic tumor cells are readily phagocytosed by macrophages and that tumor specific transplantation antigen (TSTA) is presented as a complex with MHC class II antigen on macrophages to CD4+ T cells. To examine the hypothesis, that irradiated tumor cells induce CD4+ helper T cells required for the generation of CD8+ CTL, C3H/He mice were immunized with  $2 \times 10^7$  MH134 cells which contained irradiated tumor cells (100 Gy, *in vitro*) at varying ratios. When irradiated tumor cells are contained at levels of 60-80 %, the generation of helper T cells as well as CTL against the tumor was significantly enhanced. The findings obtained suggest that tumor irradiation enhances anti-tumor immunity by promoting the induction of antigen-specific helper T cells, which play a key role in anti-tumor immunity, i.e., either generating CTL or antibody-forming B cells depending on the activity of TH1 or TH2 subset cells.

Research Code No. : 405.9

Key words : CD4+ helper T cell, Cytotoxic T Cell,  
Enhanced anti-tumor immunity, Tumor-  
irradiation

Received Apr. 3, 1995; revision accepted Oct. 17, 1995  
Department of Immunology, Kurume University School of Medicine

### はじめに

放射線治療(腫瘍照射)は、抗腫瘍免疫を増強するという説が出されて久しいが、未だ確実に証明されていない。しかしそれは、腫瘍照射法の検討や集学的治療の可否など放射線治療学の基本的問題とも関わり合いを持っており、ぜひとも解明が必要である。本研究の結果は、腫瘍細胞の照射は抗腫瘍免疫を増強すること、それはそれまで十分に免疫系によって認識されていなかった既存の抗原が、腫瘍細胞の放射線による傷害を契機として認識されるためであることを明らかにした。

### 材料ならびに方法

- 1) マウス：一連の実験には、久留米大学医学部附属実験動物飼育センターにおいて無菌的環境下で飼育したC3H/Heマウス(4~6週令, 雌)を使用した。
- 2) 細胞：腫瘍細胞は、同系マウスで継代移植されたC3H/Heマウス由来の肝癌細胞, MH134細胞を使用した。また免疫機能解析のためのリンパ球は、担癌動物の脾ならびにリンパ節より用意した。各臓器よりスチールメッシュを使用して細胞を遊離し、比重分離によりリンパ球分画を採取した後、Nylon wool columnを使用してT細胞を分離した。
- 3) 細胞浮遊液：細胞の分離ならびに浮遊には、RPMI 1640培養液(Whittaker M.A. Bioproducts, Inc., Walkersville, MD, USA. 5%牛胎児血清添加)を使用した。腫瘍細胞の動物投与時には、その浮遊に生理食塩水を使用した。
- 4) 放射線照射：マウスならびに細胞は、久留米大学医学部放射線治療センターの医療用ライナック装置(東芝LMR-15型)で照射した。マウスの照射には10MV X線(3Gy/min)を、細胞の照射には6 MeV電子線を使用した。動物は、ネンブータル麻酔し大腿筋肉内の腫瘍以外の部位は鉛板で遮蔽して照射した。腫瘍細胞浮遊液は、氷冷水中に保持し10Gy照射した。
- 5) 中和テスト(Winn assay)：脾のNylon wool column非付着性リンパ球(T細胞)と腫瘍細胞を種々の比率で混ぜて、5Gy全身照射マウス皮下に移植した。その後経時的に腫瘍サイ

Table 1 Effect of irradiation to the tumor on the induction of cytotoxic T cells<sup>1)</sup>

Dose of irradiation	% take of MH134 tumor cells	size of tumor <sup>3)</sup>
0Gy	100 (8/8) <sup>2)</sup>	0.80 ± 0.22 (cm <sup>3</sup> )
5Gy	100 (8/8)	0.65 ± 0.13
10Gy	50 (5/10)	0.46 ± 0.19
20Gy	10 (1/10)	0.38
30Gy	70 (7/10)	0.60 ± 0.18

- 1)  $2.5 \times 10^6$  MH134 cells were mixed with  $5.0 \times 10^7$  NW-column passed T cells and transplanted subcutaneously to 5Gy irradiated syngeneic mice (neutralization test, tumor cells : T cells = 1 : 20).  
 2) Number of animals per group.  
 3) Size of the tumor was measured on Day 7. Mean size ± standard deviation

Table 2 Relative anti-tumor capacity of mice immunized with non-irradiated and/or irradiated MH134 hepatoma cells

group	rejection of tumor cells			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
I ( 0%) <sup>1)</sup>	20% (2/10) <sup>2)</sup>	60% ( 6/10)	60% ( 6/10)	50% ( 5/10)
II ( 20%)	20% (2/10)	60% ( 6/10)	60% ( 6/10)	60% ( 6/10)
III ( 40%)	20% (2/10)	60% ( 6/10)	50% ( 5/10)	60% ( 6/10)
IV ( 60%)	40% (4/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)
V ( 80%)	20% (2/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)
VI (100%)	10% (1/10)	60% ( 6/10)	60% ( 6/10)	40% ( 4/10)

- 1) Each group of mice were intramuscularly immunized with  $2 \times 10^7$  tumor cells containing irradiated cells at varying ratio as indicated in the parenthesis on Day 0, and  $1 \times 10^7$  tumor cells serially transplanted into peritoneal cavity to examine the capacity of tumor rejection.  
 2) Number of animals subjected to the experiment.

ズを計測した<sup>1)</sup>.

6) 抗TNP抗体価の測定：マウス血清中の凝集素価を、TNP標識ヒトO型赤血球(R. Mの血球)を作成し、倍数希釈法によって測定した<sup>2)</sup>.

7) 有意差検定：Student-t test によった。

## 結 果

### 1) 腫瘍の *in vivo* 照射による腫瘍排除の促進

腫瘍細胞を大腿筋肉内に移植し、同時に完全フロインドアジュバントに混ぜた同数の腫瘍細胞の免疫を皮下に行った。大腿筋肉内に  $2 \times 10^7$  個の腫瘍細胞を移植すると、7日目にはほぼ直径1cm<sup>3</sup>の腫瘍を形成した後、14日から21日目にかけて100%拒絶する。7日目に形成された腫瘍に0-30Gyまでの異なる線量を照射し、28日目に脾のT細胞の腫瘍傷害活性を中和テストにより調べた。腫瘍に対する20Gy照射は、腫瘍傷害活性を有意に促進した(Table 1, 10 Gyの場合  $p < 0.01$ , 20Gy照射の場合  $p < 0.001$ )。

### 2) 照射腫瘍細胞の抗腫瘍免疫の増強作用

*in vivo*照射によって得られた腫瘍傷害活性の促進は、腫瘍内の生細胞(傷害されなかった細胞)と照射細胞(傷害された細胞)の至適な構成比率によることが考えられた。この仮説のもとに、照射腫瘍細胞(*in vitro* 10Gy照射)と非照射腫瘍細胞を異なる比率で混合した。そしてそれぞれの一定数で動物を免疫し、腫瘍排除率(腫瘍傷害活性)を比較した。その結果、生細胞と照射細胞の比率が20:60あるいは40:80からなるとき、それは最も促進された(Table 2)。照射細胞だけの免疫ではその促進効果は消失した。これら各群の免疫動物で腫瘍細胞(キャリアー)に対して分化したヘルパーT細胞をTNP-MH134細胞で免疫することによって調べた。ヘルパーT細胞の分化は、上記の細胞傷害性T細胞(CTL)の分化が促進される免疫条件のとき、同じく促進されていることが判明した(Table 3, 全凝集素の産生は、IV群V群IV群いずれも  $p < 0.001$ 。しかもIV群V群では7S凝集素も産生)。したがって、腫瘍の*in vivo*照射では、20Gy照射によって腫瘍内に傷害されなかった細胞と傷害された細胞の至適細胞比率が構成されたことが示唆された。

Table 3 Anti-TNP responses in mice immunized with constant number of MH134 tumor cells consisting of varying ratio of non-irradiated and irradiated cells

group	log <sub>2</sub> antibody titer	
	19S + 7S	7S
I ( 0%)*	4.6 ± 0.9	0
II ( 20%)	4.4 ± 0.8	0
III ( 40%)	4.3 ± 0.6	0
IV ( 60%)	7.6 ± 0.6	20 ± 0
V ( 80%)	7.4 ± 0.6	1.0 ± 0
VI (100%)	6.8 ± 0.8	0
unprimed	2.7 ± 1.3	0

\* Same as the legend of Table 2. Percentage of irradiated cells among the cells used for immunization is shown in the parenthesis. Each group consisted of 6 mice. Mice immunized with combination of non-irradiated and/or irradiated tumor cells at varying ratio were boosted with  $1 \times 10^6$  TNP-MH134 cells 35 days after primary immunization. The anti-TNP agglutinating antibody titers on Day 8 were shown in the Table.

## 考 察

今回の実験腫瘍によるモデル実験の結果は、腫瘍に対する放射線照射(照射腫瘍細胞)は、腫瘍特異的なCD4+ヘルパーT細胞の分化と、CTLの分化(最終的な腫瘍傷害機転)を促進することを示した。

腫瘍に対して特異的な免疫反応が誘導されるためには、腫瘍細胞が腫瘍特異抗原(TSTA, tumor specific transplantation antigen)を発現している必要がある。特にヒト腫瘍ではそれが不明のものが多いが、一部の腫瘍ではその存在が遺伝子レベルでも証明されている<sup>3)</sup>。今回使用した実験腫瘍の抗原性は立証されており、この腫瘍に対して抗体産生系の免疫反応も細胞性免疫反応も誘導される<sup>4),5)</sup>。腫瘍特異あるいは腫瘍関連抗原が存在するとき、それは腫瘍細胞自身あるいはそれを貪食・処理する抗原提示細胞(マクロファージ)の、主要組織適合性抗原(MHC, major histocompatibility antigen), class I またはclass IIとの複合体として、T細胞に提示される。T細胞は、これをその抗原受容体(TCR, T cell receptor)によって認識し、機能細胞(CD4+ヘルパーT細胞, CD8+またはCD4+のCTLなど)に分化する。この免疫誘導の過程において、抗原性のある腫瘍でも(非照射時)マクロファージにより貪食され難いものでは、腫瘍免疫反応(CTLの分化)が発現しないことが示唆されている<sup>6)</sup>。

照射により傷害された腫瘍細胞は、マクロファージによる貪食・処理を経て生体より排除される。腫瘍照射を契機としたこの経路の活性化により、CD4+ヘルパーT細胞の分化が促進される。したがって、この分化促進の程度は、腫瘍細胞の放射線感受性の他に、局所の解剖学的あるいは病理組織学的な特性にも左右されることが考えられる。

CD4+ヘルパーT細胞は、いずれの免疫反応においても鍵を握る細胞である<sup>7)</sup>。腫瘍免疫反応においても、そのT細胞・B細胞に対するヘルパー機能(リンフォカイン産生)の

発現によって、細胞性免疫反応(CTLの分化)或いは抗体産生系免疫反応を成立させる。ある種の腫瘍細胞では、ヘルパーT細胞の関与なしにCTL(CD8+, IFN- $\gamma$ の他にIL-2も産生)が増殖することが報告されているが、基本的にその存在が必要と考えられている<sup>7),8)</sup>。ヘルパーT細胞は、その産生するリンフォカインの種類から、TH1とTH2の亜細胞に分けることが提唱されている<sup>9)</sup>。TH1タイプのリンフォカインは、IL-2, IFN- $\gamma$ , LT(TNF- $\beta$ )など、TH2タイプは、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10などである。これらは、それぞれ相互に拮抗的に作用するリンフォカインによって制御されていると考えられる。そしてTH1の優位は細胞性免疫反応と、TH2のそれは抗体産生と関連することが示唆されている。この両細胞の分化は、該当するサイトカインあるいは拮抗するサイトカインに対する抗体の使用(投与)によって、人為的にも調節可能である。放射線治療はCD4+ヘルパーT細胞の分化を促進することが示されたが、そのときの照射部位や照射条件などによってTH1とTH2のバランスをも規制する可能性がある<sup>10),11)</sup>。しかし、それがいずれに偏位しようともIL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, (TGF- $\beta$ )などの投与は、TH1優位を導きCTLの分化を促進することが期待される。特に近頃、IL-12の著明なCTL誘導能と転移抑制効果が注目されている<sup>12)</sup>。

放射線治療は、腫瘍細胞を物理学的に破壊(傷害)する目的で行われる。したがって、照射野の正常組織が耐えうる最大の線量を腫瘍組織に与えることを目標に、照射法の改良がなされてきた(幾何学的線量分布と時間的線量分布の研究)。そして照射プロトコルとしての大線量一回照射法と遷延分割照射法のいずれが是か非かについて議論された後、現行の照射法に落ち着いている。腫瘍免疫の立場からは、当初より抗原の持続的存在を可能とする後者の照射法が推奨された<sup>13)</sup>。今回放射線による腫瘍免疫の増強(機能T細胞の分化の促進)は、腫瘍内の傷害されていない細胞と傷害された細胞の特定比率のとき最も著明となることが示

唆された。放射線治療中一過性に、照射腫瘍組織内に著明なリンパ球浸潤が出現する現象も、同一のメカニズムの作動を示唆することが考えられる。そしてそれが持続しない理由の一つとして、分割照射のある時点以降、腫瘍細胞の高度の傷害(破壊)により抗原性が低下する可能性が挙げられる。

腫瘍に対する照射が腫瘍免疫を増強することを示す証左は、実際には少ない。槇殿順は摘出腫瘍組織を術後照射野に移植し、術後照射を行う独自の“放射線免疫療法”を考案した。そしてこの治療によって、(腫瘍に対するヘルパーT細胞が分化した結果として)抗体産生が促進された症例を報告している<sup>10), 11), 14)</sup>。しかし、腫瘍の種類・照射条件などによっては、この方法でCTLも誘導される(私信)。これは外科領域でも追試がなされたが、当時の免疫学の知識ではその論拠に議論があった。しかし今回の結果は、その理論的正当性を支持するものと考えられる。個々の腫瘍で、それを最も傷害する免疫学的機転は異なっている。しかし多くの腫瘍は、CTLによって最も傷害されることが示されている。一方、造血系腫瘍などでは抗体によっても傷害され得る。“放射線免疫療法”は、照射条件如何によって、さらには前述のサイトカインによるCD4+ ヘルパーT細胞分化の調節、あるいは腫瘍細胞への各種遺伝子導入などの免疫操作を加えることによって、その腫瘍を最も傷害する機転を選択的に促進する可能性がある<sup>15), 16)</sup>。また、この方法で

は皮下に移植された腫瘍が万一再増殖してもその制御は容易であり、凍結保存された腫瘍組織により追加免疫も可能であるなどの利点がある。

## ま と め

腫瘍の放射線照射は、以下の機序で抗腫瘍免疫を増強するものと考えられる。放射線により傷害された腫瘍細胞は、傷害されていない細胞よりもマクロファージによって貪食・処理されやすくなる(腫瘍排除の促進)。そして抗原性のある腫瘍では、マクロファージによって処理された腫瘍抗原がCD4+T細胞に提示され、ヘルパーT細胞の分化が促進される。この分化したヘルパーT細胞の機能(リンフォカイン産生)に依存して、細胞性免疫反応あるいは抗体産生系免疫反応が誘導(促進)されるが、今回の実験系では細胞性免疫反応側(CTLの分化)が増強されたものと考えられる。この免疫増強(機能T細胞の分化の促進)は、特に腫瘍内の傷害されていない細胞と傷害された細胞の至適比率が構成されたときに最も強く発現することが示唆された。

稿を終えるにあたり、放射線照射に際して協力された久留米大学医学部放射線医学教室諸氏に謝意を表します。なお本研究は、平成4・5年度文部省科学研究費の助成によったことを付記します(課題番号04670684)。

## 文 献

- 1) Sprent J. and Schaefer M: Capacity of purified unprimed Lyt-2+ cells to reject Ia<sup>-</sup>H-2-different tumor cells in the winn assay. *J Immunol* 140: 2899-1902, 1988
- 2) Rittenberg MB, Pratt KL: Antitrinitrophenyl (TNP) plaque assay. Primary response of Balb/c mice to soluble and particulate immunogen. *Proc Soc Exptl Biol Med* 132: 575-581, 1969
- 3) Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647, 1991
- 4) Makidono R, Nomoto K, Takeya K: Enhanced development of metastatic foci in thymectomized, irradiated, and bone marrow-reconstituted mice. *Gann* 67: 645 - 649, 1976
- 5) Yoshioka T, Sato S, Ogata M, et al: Mediation of in vivo tumor-neutralizing activity by Lyt-2+ as well as L3T4 T cell subsets. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 79: 91-98, 1988.
- 6) 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
- 7) Cellular and molecular Immunology (Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS eds.). 2nd Edition. WB Saunders Company, Philadelphia, London, Tront, Montreal, Sydney, Tokyo, 1994
- 8) Schild H, Kyewski B, Von Hoegen P, et al: CD4+ helper T cells are required for resistance to a highly metastatic murine tumor. *Eur J Immunol* 17: 1863-1866, 1987.
- 9) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357, 1986
- 10) Makidono J: Effect of the preoperative irradiation and subcutaneously cancer tissue implantation on the antitumor antibody levels. Report I. *Nippon Acta Radiologica* 22: 897-904, 1962
- 11) Makidono J: Effect of the preoperative irradiation and subcutaneously cancer tissue implantation on the antitumor antibody levels. Report II. *Nippon Acta Radiologica* 23: 574-578, 1963
- 12) Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, et al: Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumor. *J Exp Med* 178: 1223 -1230, 1993
- 13) 槇殿 順, 高梨慎吾, 吉本 功, 他: 千葉大学の癌に対する新しい術前照射方式を批判する. *広島医学* XVI(11・12): 1041-1047, 1963
- 14) Makidono J: Cancer immunity of irradiated tumor-bearing individuals and its clinical experience. Oral presentation at a symposium on "Biological foundation of radiotherapy" at XIth International Congress of Radiology in Rome, Italy on Sep.24, 1965
- 15) 槇殿玲子: 放射線治療とBRM. サイトカインによる放射線治療の増強. *癌の臨床* 41: 585 - 592, 1995
- 16) Pardoll DM: Cancer vaccines. *Immunology Today* 14: 310-316, 1993