



Title	新しい方法による癌免疫療法 III. T細胞増殖因子を加えた自己リンパ球腫瘍細胞混合培養における細胞障害性T細胞の増殖
Author(s)	槇殿, 玲子; 松尾, 博基; 福谷, 龍郎 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1986, 46(9), p. 1130-1137
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19290
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

新しい方法による癌免疫療法

III. T細胞増殖因子を加えた自己リンパ球腫瘍細胞混合培養に おける細胞障害性T細胞の増殖

九州大学医学部放射線科学教室

楨殿 玲子 松尾 博基 福谷 龍郎
明瀬 英毅 佐々木雅之 松浦 啓一

広島日本赤十字病院放射線科

楨 殿 洋 子

（昭和61年3月10日受付）

（昭和61年4月23日最終原稿受付）

New Immunotherapy Methods for Cancer

III. Generation of Cytotoxic Lymphocytes Against Tumor Cells in Autologous Mixed Lymphocyte Tumor Cell Culture with T Cell Growth Factor

Reiko Makidono, Hiroki Matsuo, Tatsurō Fukuya, Hideki Myōse,
Masayuki Sasaki and Keiichi Matsuura

Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyusyu University

Yōko Makidono

Department of Radiology, Hiroshima Red cross Hospital

Research Code No. : 600.5

Key Words : Cytotoxic T cells, Autologous MLTC, In vitro
IL-2, Neoplasm, ¹¹¹In-Oxine

The possibility of In vitro generation of cytotoxic lymphocytes against various tumors and of the further establishment of the adoptive transfer of these cells as an immunotherapy for cancer was assessed. Cell growth kinetics and cytotoxic activity of lymphocytes from 4 tumor patients in autologous mixed lymphocytes tumor cell culture (MLTC) using conditioned medium containing T cell growth factor (IL-2) were studied. During the culture period, continuous cell growth with increasing number of OKT3⁺ OKT8⁺ cells was observed. In cytotoxicity assays, fresh lymphocytes from carcinomatous pleural effusions and peripheral blood of the patients were not cytotoxic against both autologous and allogeneic tumor cells. However after one month of culture, all the patients' lymphocytes showed cytotoxicity against autologous as well as allogeneic tumor cells. There was no evidence of cytotoxicity against normal lymphocytes. Therapeutic potential of these cells and several factors which discriminate the effectiveness of such sensitized lymphocytes in the tumor suppression In vivo were then discussed.

I. はじめに

抗原性のある腫瘍では、自己腫瘍にたいする腫瘍免疫反応が成立し、抗腫瘍抗体も細胞性免疫反応における機能細胞も検出される¹⁾。そして多く

の腫瘍にたいして、抗体と細胞障害性リンパ球とでは後者の腫瘍細胞障害性の方が強いことが明らかにされている。近年、この細胞障害性リンパ球をリンホカインの一つであるT細胞増殖因子(IL-

2)を加えて培養することによって、In vitroでも長期に増殖させることが可能となった²⁾。またRosenbergらは担癌患者または正常健康人末梢血中のリンパ球をIL-2を加えて培養を続けるだけでも腫瘍細胞を障害しうる細胞(LAK細胞, lymphokine activated killer cell)が誘導されることを発見した³⁾。この細胞は自己腫瘍細胞のみでなく同種腫瘍細胞をも障害しうる特性を持ち、従来の腫瘍免疫反応における特異性をもった細胞障害性リンパ球とは異なる機能細胞と考えられている。

したがってこのような腫瘍細胞障害活性をもつ細胞をIn vitroで増殖させ担癌個体にかえす方法(受働免疫療法)は、その個体の抗腫瘍性を亢める一つの有用な方法と考えられる。

この研究では、癌の集学的治療の一環として、このリンパ球による受働免疫療法の可能性を検討するために胸水及び末梢血中のリンパ球を腫瘍細胞とともに培養した場合の細胞増殖と腫瘍細胞障害活性を調べた。

II. 材料及び方法

1. 腫瘍細胞：自己リンパ球腫瘍細胞混合培養のための、またはリンパ球の細胞障害試験における標的細胞としての腫瘍細胞は患者胸水中より下記の方法で分離した。その際細胞の浮遊並びに洗滌にはRPMI 1640培地(15%に胎児牛血清(FCS)添加)を使用した。胸水より分離した細胞の浮遊液を、連続密度勾配を形成させたPercoll®(Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)上に重層し400×g, 15分間遠沈した⁴⁾。各細胞層を別々の試験管に集め、腫瘍細胞を含む細胞層(細胞によって異なりうるが、多くは比重1.062~1.076)を洗滌後プラスチックシャーレで室温60分間培養した。これにより混入しているマクロファージを除去した。この操作による非附着性細胞を以下腫瘍細胞として実験に供した。腫瘍細胞は使用まで凍結保存した。本研究には患者T.T及びM.Tからのadenocarcinomaと患者K.K及びS.Fからのsmall cell carcinomaを使用した(Fig. 1A~D)。

2. 自己リンパ球腫瘍細胞混合培養法：このためのリンパ球は患者胸水中及び末梢血より

FicollHypaque(比重1.077)により分離した。リンパ球 $1 \times 10^6/\text{ml}$ と、Mitomycin C処理腫瘍細胞($50 \gamma/\text{ml}$, 37°C , 30分培養) $2 \times 10^5/\text{ml}$ を15units/ml濃度のIL-2を含むRPMI 1640培養液(10%ヒトAB血清添加)中で培養した(Fig. 2)。6日毎にこの培養液を交換し、リンパ球と腫瘍細胞の培養を続けた。培養開始後18日目の培養液交換時には、 ^{60}Co を2,000R照射した患者末梢血中のプラスチックシャーレ附着性単核細胞(マクロファージ)をリンパ球数の7%の割に加えた(Fig. 2矢印)。

3. 細胞障害試験：新鮮患者末梢血リンパ球および上記の方法で36日間培養したリンパ球の細胞障害活性を、リンパ球：標的細胞の比率を40：1とし、 ^{111}In 標識標的細胞からの ^{111}In 遊離率により調べた⁵⁾。予備実験により至適条件を求めた上でリンパ球の腫瘍細胞にたいする障害性は18時間、自己リンパ球にたいするそれは6時間の培養により調べた。細胞障害率は下記の式により算出した。

$$\text{細胞障害率}(\%) = \frac{\text{test cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{maximum cpm} - \text{spontaneous cpm}} \times 100$$

4. T細胞亜細胞群の解析：長期自己リンパ球腫瘍細胞混合培養によるT細胞亜細胞群比率の変化を培養開始前と36日目に細胞表面抗原の検索により調べた。蛍光標識したT細胞抗原にたいするモノクローナル抗体, OKT 3, 4, 8 (Ortho Diagnostic Systems K.K)を使用し、細胞を抗体とともに室温30分間培養することにより染色を行った。蛍光顕微鏡下に蛍光陽性細胞数を数え、各T細胞亜細胞の比率を算出した。

5. T細胞増殖因子(IL-2)：自己リンパ球腫瘍細胞混合培養には既報の健康人末梢血リンパ球より作成し部分精製したIL-2を10units/ml使用した⁶⁾。

III. 結 果

1) 自己腫瘍細胞リンパ球混合培養におけるT細胞の増殖能：4人の患者胸水中並びに末梢血より分離したリンパ球をT細胞増殖因子(IL-2)を含む培地中で自己腫瘍細胞とともに培養すると、6日毎の培地交換によって、その都度細胞数は2

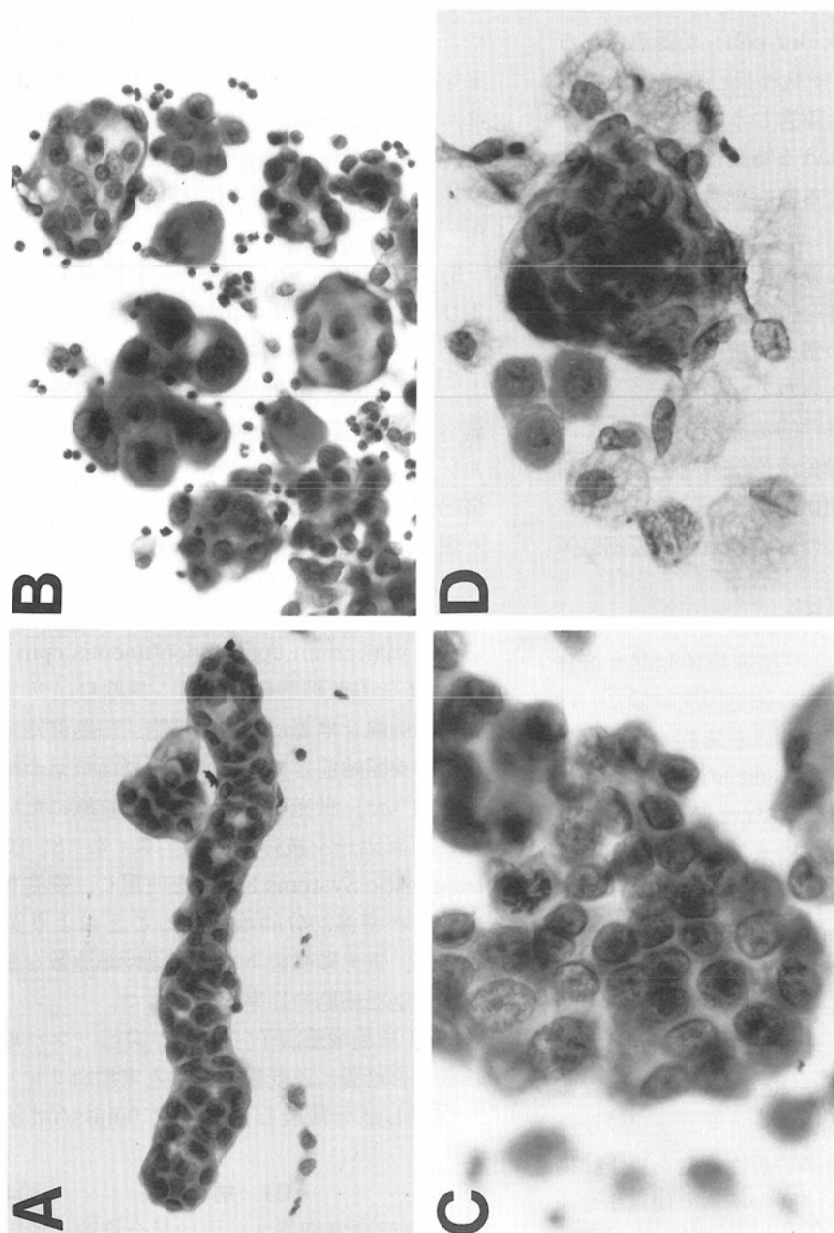


Fig. 1 A~D: Tumour cells in the pleural effusions from 4 patients. Papanicolaou staining (original magnification 40x)

- A Patient M.H: Adenocarcinoma, primary unknown
- B Patient T.T: Adenocarcinoma, Lung carcinoma
- C Patient K.K: Small cell carcinoma, Lung carcinoma
- D Patient S.F: Small cell carcinoma, Lung carcinoma

～3 倍に増加した (Fig. 3). 培養18日目に加えた照射マクロファージは、いずれの個体からのリンパ球の増殖も一過性に促進した (Fig. 2, 矢印). 最終的に増殖した細胞はその細胞表面抗原の検索により、その90%近くが成熟T細胞 (OKT3陽性細胞) であることが確認された (Table 1). そして培養開始前後の亜細胞群比率の比較により、細胞障害性リンパ球の属する OKT 8陽性細胞がヘルパー/インデューサー亜細胞群である OKT 4陽性細胞よりも優位に増殖したことが示された.

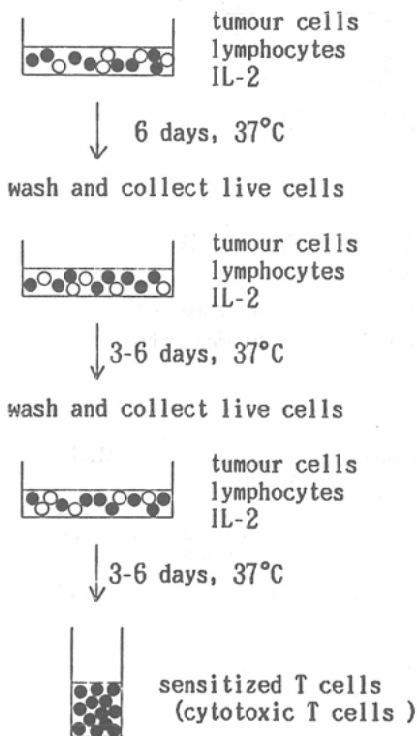


Fig. 2 Mixed lymphocyte tumour cell culture (MLTC) method

2) 自己腫瘍細胞リンパ球混合培養により増殖したT細胞の腫瘍細胞障害性：まずいずれの患者の新鮮末梢血T細胞も自己及び同種腫瘍細胞を障害しなかった (データ省略). 一方、自己腫瘍細胞リンパ球混合培養で増殖したT細胞は、自己及び同種の腫瘍細胞を種々の程度に障害し、自己リンパ球 (正常細胞) は障害しないことが示された (Table 2).

IV. 考 察

この研究においてもT細胞増殖因子 (IL-2) を使うことによって、In vitro で大量の腫瘍細胞障害性リンパ球 (OKT8⁺) を作成しうることが確認された. しかし得られる細胞障害活性の特異性は実験系毎に異なるようである. われわれの実験系では、自己腫瘍細胞も同種腫瘍細胞も障害しうる細胞が得られた. 一方 Vanky らの報告では同様の培養系であるにも拘わらず、自己腫瘍細胞しか障害しない細胞が得られた⁷⁾.

Rosenberg らの腫瘍細胞を加えないリンパ球培養では謂ゆるリンホカイン活性化キラー (LAK) 細胞が増殖し、これは自己も同種の腫瘍細胞も障害しうることが示されている³⁾. このような、自己のみでなく同種腫瘍細胞をも障害する活性の発現を左右する要因はまだ充分に解っていない. 本研究ではリンパ球源として患者末梢血中リンパ球と胸水中リンパ球の両方を使用している. このうち胸水中のリンパ球 (その50～70%はT細胞であるが) は、すでに共存する腫瘍細胞の特異抗原に感作された状態であることが考えられる. T細胞がIL-2によって増殖するためにはその受容体を持つ必要があるが、感作リンパ球にはそれが発現している⁸⁾. したがって初回培養時より IL-

Table 1 Surface phenotypes of T cells in mixed lymphocyte tumour cell culture with IL-2

Days in culture mo-Ab ¹⁾	Patient(M.H)		Patient(T.T)		Patient(K.K)		Patient(S.F)	
	Day 0	Day 36	Day 0	Day 36	Day 0	Day 36	Day 0	Day 36
OKT-3	ND	92% ²⁾	72%	93%	51%	91%	63%	89%
OKT-4	ND	28%	37%	36%	21%	25%	35%	42%
OKT-8	ND	65%	23%	55%	23%	58%	19%	41%

1) monoclonal antibodies to T cells

2) % staining with monoclonal antibodies

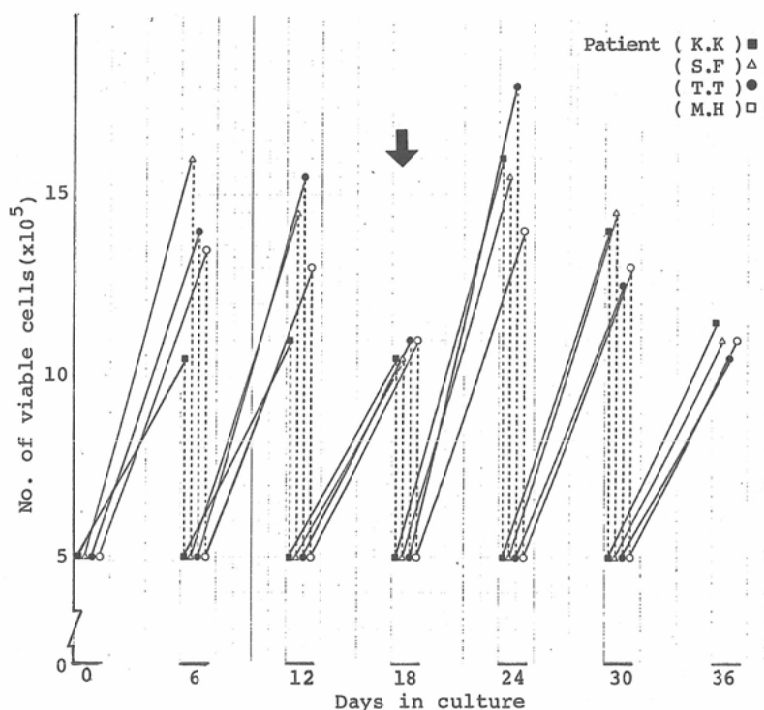


Fig. 3 Cellular expansion of T cells from pleural effusion maintained with autologous tumor cells in IL-2 medium. The arrow indicates the time, when autologous macrophages were added to the culture.

Table 2 Cytotoxicity of autologous MLTC-activated lymphocytes cultured with IL-2 (MLTC-Lak cells)^{a)}

Target cells from donor Lak cells from donor	%cytotoxicity against tumour cells ^{b)}				%cytotoxicity against autologous lymphocytes ^{c)}			
	M. H	T. T	K. K	S. F	M. H	T. T	K. K	S. F
M. H	39.7±3.1	35.6±2.6	ND	ND	0.4±0.5	/	/	/
T. T	13.9±6.7	46.7±3.2	ND	19.8±2.8	/	1.2±1.0	/	/
K. K	28.9±4.6	ND	52.1±2.3	ND	/	/	1.5±1.2	/
S. F	22.0±2.4	ND	33.2±3.4	36.4±5.2	/	/	/	0.5±0.7

a) Lymphocytes for the assays were obtained from the cultures on day 36.

b) Cytotoxicity was measured by a 18hr ¹¹¹In-release assay. The effector-to-target cell ratio was 40 : 1.

c) Cytotoxicity was measured by a 6hr ¹¹¹In-release assay. The effector-to-target cell ratio was 40 : 1.

d) Each value is the mean of 3 separate experiments with quadruplicate determinations.

2を共存させたわれわれの自己リンパ球腫瘍細胞混合培養においては、まず腫瘍抗原特異的細胞障害性リンパ球が増殖することが考えられる。もしも抗原に感作されたT細胞を抗原を加えることなくIL-2添加培養液中で培養を続けていると抗原特異性が低下することが示唆されており、一度低

下してから抗原を加えても特異性は回復しない⁹⁾。われわれの培養系には腫瘍抗原が常に存在しているため同種腫瘍細胞にたいする細胞障害活性の発現をこの機転(一部の細胞の特異性の低下)で説明することは出来ない。そこでいくつかの可能な理由を挙げてみると、まず細胞障害性T細胞

の交叉反応性による機転がある。また IL-2 により増殖したナチュラルキラー (NK) 細胞 (抗原特異性を持たない) による障害機転も考えられる¹⁰⁾。すでに体内で種々の抗原により感作されていた T 細胞も IL-2 により In vitro で増殖する。中でもいずれの患者も OK432 (Picibanil, 中外製薬) 治療を受けていたため、その感作リンパ球による非特異的腫瘍細胞障害機転は充分に考えられる⁹⁾。これらも含めて自己リンパ球腫瘍細胞混合培養で増殖する細胞の腫瘍細胞障害活性の特異性については今後さらに解析する必要がある。

In vitro で増殖させた細胞障害性リンパ球の投与 (受働免疫療法) は個体の腫瘍排除能力を増強することが考えられる。実験腫瘍ではそれによる腫瘍の増殖抑制や転移抑制が示されている¹¹⁾¹²⁾。ヒトでも主として LAK 細胞の投与が試みられているが、その有効性はまだ確認されていない。

今までの研究結果をみても移入した細胞が抗腫瘍効果を発揮するためには、いくつかの要因が充たされなければならないことがわかる。例えば In vitro で IL-2 依存性に増殖して来た細胞が体内でも生き続け機能を発現するためには、IL-2 投与が不可欠であること¹³⁾、それらの細胞に体内で細胞増殖を誘導する充分な量の IL-2 が結合するためには、そのための条件 (一定濃度以上の IL-2 が一定時間以上細胞周囲に保たれる) を充たす投与方法が選ばなければならないことなどである。現在 IL-2 投与方法としては静注よりも皮下、筋肉内、或いは腹腔・胸腔内投与の方がよく、頻回投与がよいことがわかって来ている。われわれは受容体をもつ細胞への IL-2 の結合を促進するために、輸血バッグを使用した投与方法を開発した⁶⁾。この方法によれば、患者体内で増殖した感作リンパ球を IL-2 によりさらに増加させることが出来る。また腫瘍細胞障害性 T 細胞や LAK 細胞も IL-2 とバッグ内で 2 時間培養して IL-2 結合状態で投与出来るため、細胞のその後の増殖は直接投与よりも確実に促進される。その他細胞への結合を促進する手段として IL-2 の代謝、分布をかえる物質の使用も試みられている。例えば IL-2 を 15% のゲラチンに混ぜて腹腔内投与すると、血中濃度の持続が 4

倍近く長くなり、それと一致して抗腫瘍効果が増強された結果が得られている¹⁴⁾。

この受働免疫療法を確立する上での別の問題点は、腫瘍細胞障害活性をもつ細胞が静注によってはたして腫瘍部位に集まるのかどうかははっきりしないことである。この点は¹¹¹In 標識細胞を使って一応解析されている¹⁵⁾。それによれば、最初の 4 時間で注入した細胞の 30% が肺に集まり、それは 2 日位で消失する。また肝脾への集積は 24 時間前後がピークとなる。投与した細胞の 35~45% は肝へ、15~25% は脾に集まる。それらはそれぞれの臓器に少なくとも数日間とどまる。しかし特定の腫瘍への集積は検出されていない。われわれも¹¹¹In 標識 LAK 細胞投与によりほぼ同様の結果を得た。このように¹¹¹In 標識 LAK 細胞の分布でみる限り、その腫瘍への集積は確認されない。LAK 細胞を始めとする各種腫瘍細胞障害性細胞を腫瘍に集める最も確実な方法は、直接腫瘍内或いは癌性胸水、癌性腹水中に注入することである。例えば Fig. 4 の症例では 1×10^8 個の¹¹¹In 標識 LAK 細胞と IL-2 を腫瘍内に注入して、少なくとも 10 日間はその局所に充分な放射活性が検出された。しかしこの適応は限られている。静注投与では腫瘍への細胞集積が起こりにくいのであればそれを促進する何等かの方法の開発が必要となる。

細胞障害性リンパ球、NK 細胞による受働免疫療法を実現するには、In vitro で細胞を増殖させるための、そして増殖した細胞とともに投与する大量の IL-2 が用意されなければならない。IL-2 は分化した T 細胞により産生されるので、正常 T 細胞を T 細胞分裂促進物質 (マイトジェン) 或いは、抗原で刺激することによってその培養上清中に得られる¹⁶⁾。また IL-2 産生 T 細胞腫瘍株や T 細胞ハイブリドーマからも得られる¹⁷⁾。このような天然型の IL-2 にたいして、近年では遺伝子操作による組換え型 IL-2 も開発されている (例えば TGP-3, 武田薬品工業)。組換え型 IL-2 は、大量に得られる利点をもつため、安全性が確認されれば IL-2 の臨床応用において最も実用性がたかい。しかし天然型 IL-2 と腫瘍 IL-2 とでは糖鎖の結合部位が異なっているし、組換え型 IL-2 では糖が結合してい

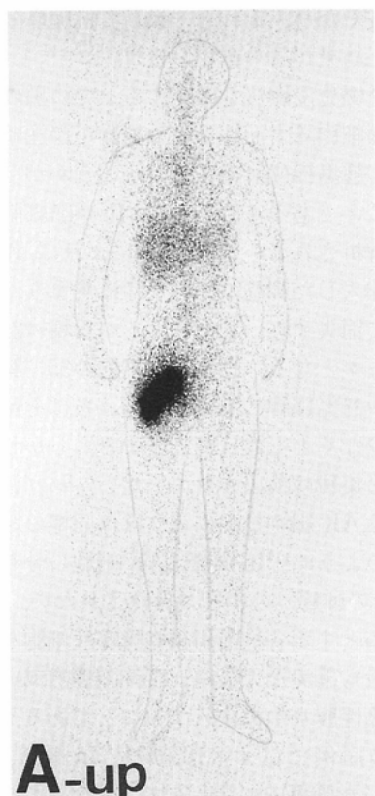


Fig. 4 Localization of (^{111}In -labelled) lymphokine activated killer (LAK) cells. A 43 year-old male patient (M.S) with recurrent rectal carcinoma was treated by intratumoral injections of LAK cells and OK432 (picibanil), which completely suppressed local severe pains over a long period.

ないとされている¹⁸⁾。そのような差が臨床効果に影響するか否かは今後の研究に待たねばならない¹⁹⁾。

この研究は第21回福岡県対がん協会がん研究助成金の一部を使ってなされたことを附記します。またこの研究に協力された九州大学医学部附属病院検査部、臨床検査技師大田政之氏、並びに教室研究室大石文さんに感謝します。

文 献

- 1) Ioachim, H.L., Dorsett, B.H. and Paluch, E.: The immune response at the tumour site in lung carcinoma. *Cancer*, 38: 2296—2309, 1976
- 2) Gillis, S. and Crystal, R.G.: Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature*, 268: 154—156, 1977
- 3) Grimm, E.A., Robb, R.J., Roth, J.A., Neckers, C. M., Lachman, L.B., Wilson, D.J. and Rosenberg, S.A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.*, 158: 1356—1361, 1983
- 4) Pertoft, H., Hirtenstein, M. and Kagedal, L.: Cell separation in a new density gradient medium, percoll • (In) Reid, E. ed: *Cell population* 67—80, 1979, John Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto
- 5) Wiltout, R.H., Taremelli, D. and Holden, H. T.: Measurement of macrophage-mediated cytotoxicity against adherent and non-adherent target cells by release of $^{111}\text{Indium}$ Oxine. *J. Immunol. Methods*, 43: 319—331, 1981
- 6) Makidono, R., Takamoto, H., Matsuura, K. and Makidono, Y.: New immunotherapy methods. I. T cell growth factor (IL-2) administered by using transfusion bags, augmented lymphokine production. *Nippon Acta Radiol.*, 45: 1023—1031, 1985
- 7) Vanky, F.T., Vose, B.M., Fopp, M. and Klein, E.: Human tumour-lymphocyte interaction in vitro. VI. Specificity of primary and secondary autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J.N.C.I.*, 62: 1407—1413, 1979
- 8) Bonnard, G.D., Yasaka, K. and Jacobson, D.: Ligand-activated T cell growth factor-induced proliferation: Absorption of T cell growth factor by activated T cells. *J. Immunol.*, 123: 2704—2708, 1979
- 9) Hemler, M.E., Brenner, M.B., McLean, J.M. and Strominger, J.L.: Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin-2 receptor on human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sic. U.S.A.*, 81: 2172—2175, 1984
- 10) Henney, C.S., Kuribayashi, K., kern, D.E. and Gillis, S.: Interleukin-2 augments natural Killer cell activity. *Nature*, 291: 335—338, 1981
- 11) Donohue, J.H., Rosenstein, M., Chang, A.E., Lotze, M.T., Robb, R.J. and Rosenberg, S.A.: The systemic administration of purified interleukin 2 enhances the ability of sensitized murine lymphocytes to cure a disseminated syngeneic lymphoma. *J. Immunol.*, 132: 2123—2128, 1984
- 12) Rosenberg, S.A., Mule, J.J., Spiess, P.J., Reichert, C.M. and Schwarz, S.L.: Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumour mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin-2. *J. Exp. Med.*, 161: 1169—1188, 1985

- 13) Cheever, M.A., Greenberg, P.D., Irle, C., Thompson, J.A., Urdal, D.L., Mochizuki, D.Y., Henney, C.S. and Gillis, S.: Interleukin 2 administered in vivo induces the growth of cultured T cells in vivo. *J. Immunol.*, 132: 2259—2265, 1984
- 14) Donohue, J.H., Lotze, M.T., Robb, R.J., Rosenstein, M., Braziel, R.M., Jaffe, E.S. and Rosenberg, A.: In vivo administration of purified jurkat-derived interleukin 2 in mice. *Cancer Res.*, 44: 1380—1386, 1984
- 15) Rosenberg, S.A., Grimm, E.A., Lotze, M.T. and Mazumder, A.: The growth of human lymphocytes in T cell growth factor—Potential applications to tumour immunotherapy. (In) Pick, E. and Landy, M. ed: *Lymphokines* 7, 243—244, 1982, Academic Press, New York London
- 16) Spiess, P.J. and Rosenberg, S.A.: A simplified method for the production of murine T cell growth factor free of lectin. *J. Immunol. Methods*, 42: 213—222, 1981
- 17) Friedman, S.M., Thompson, G., Halper, J.P. and Knowles, D.M.: OT-CLL a human T cell chronic lymphocytic leukemia that produces IL-2 in high titer. *J. Immunol.*, 128: 935—940, 1982
- 18) Rosenberg, S.A., Grimm, E.A., McGrogan, M., Doyle, M., Kawasaki, E., Kothe, K. and Mark, D.F.: Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science*, 223: 1412—1415, 1984
- 19) Roifman, C.M., Mills, G.B., Chu, M. and Gelfand, E.W.: Functional comparison of recombinant interleukin 2 (IL-2) with IL-2-containing preparations derived from cultured cells. *Cell. Immunol.*, 95: 146—156, 1985