

腫瘍拒絶の細胞性機構

中山 睿 一

岡山大学医学部寄生虫学教室

I. はじめに

腫瘍免疫学は、この10年程の間に、大変な進歩をとげた。これは基礎免疫学あるいは他の分野の進歩の恩恵を受けてのことであるが、次の3つ、即ち、モノクローナル抗体の作製技術の開発、サイトカインの発見とその遺伝子の同定、そして、T細胞の抗原認識の機構解明は、特に、大きなインパクトを与えた。この結果、腫瘍免疫学の様々な現象も分子レベルで、そのメカニズムを考えることができるようになり、このような理解は、癌の治療に一層、有効と考えられる。

腫瘍免疫学のもとになっているのは、ヒトの癌が治ることがある。特に、感染を起したとき、あるいは、細菌の産物を注射した場合にヒトの癌が小さくなることがあるという現象である。この場合、効果を発揮しているのは菌ではなくて、感染に伴って産生されるサイトカイン、例えばIFN、IL-2、TNFであることが、近年、明らかになってきたが、実際に臨床で効果が確認されていることは、周知のことである。

II. 腫瘍拒絶抗原

感染で癌が治るという事実は、100年以上も前にColeyが見つけた現象である。この現象の基礎にあるのは、癌が小さくなるような患者には、もともと、抗腫瘍免疫が存在し、細菌やサイトカインはこの特異的免疫を強めているということである。そのような抗腫瘍免疫を引き起こす抗原は、いったい何かと言うのが、腫瘍免疫学の中心課題の一つであるが、それが、腫瘍拒絶抗原、tumor rejection antigen (TRA) である。ウイルス腫瘍の場合には、ウイルス産物が拒絶抗原となっていることが知られている。また、癌遺伝子の産物である可能性もあるが、今の所はまだ癌遺伝子産物が拒絶抗原に

なっているという報告はない。また、実験癌で最初に拒絶抗原が見いだされたのは化学誘発癌（それは3～40年も前のことである）であるが、これについては、未だに拒絶抗原の本態はわかっていない。この化学誘発腫瘍についても同様であるが、これらの腫瘍の拒絶抗原の特徴は、著しい多様性で、同じ近交系マウスに同じメチルコラントンあるいは紫外線で誘発した腫瘍の間でも抗原性が異なることが知られている。つまり、宿主マウスをあるメチルコラントレン腫瘍Aに対して免疫にしても、同じ系統のマウスに誘発した別のメチルコラントレン腫瘍Bを持ってきて腫瘍を移植すると、もはや、拒絶反応が起らない。このように、個々の腫瘍で、抗原性が異なる (individually distinct) わけで、このような性質を固有抗原性という。つまり、unique antigen であるが、この多様性が、体細胞遺伝子のランダムな変化によるのか、あるいは、多様性のもたらず特別のメカニズムがあるのか否かは、大きな問題であるが、まだわかっていない。

この固有抗原性はともかく、なんとか拒絶抗原を明らかにして、この拒絶抗原に対する宿主の免疫応答性をなんらかの方法で亢めて、腫瘍を拒絶させようというのが、腫瘍免疫学にたずさわるものの最終的な目標である。そのためには、腫瘍に対する免疫応答のメカニズムについて知らなければならない。ここでは、マウスを用いた実験腫瘍について、私達のこれまでやってきた研究、つまり近交系マウスにおける腫瘍拒絶抗原認識の際に、どのようなT細胞がどのような役割を果たしているかについて述べ、ついで、T細胞が認識する拒絶抗原について紹介する。

III. 腫瘍拒絶における CD4⁺ および CD8⁺T 細胞の役割

1. MHC クラス I によって提示される腫瘍拒絶抗原の場合

末梢に存在する T 細胞は、主なものは 2 種類である。その一つは、細胞表面に CD4 を発現し、CD8 を発現しない T 細胞、もう一種類は CD4 は発現せず、CD8 のみを発現する T 細胞、この 2 種類の T 細胞でマウスの場合末梢 T 細胞の 95% 以上を占めている。このような、CD4、CD8T 細胞の同種抗原に対する反応、あるいはウイルス抗原あるいは可溶性抗原に対する反応を解析して、CD4T 細胞は主要組織適合抗原のクラス II に、一方、CD8T 細胞はクラス I に反応すると考えられている。そこで、われわれは、この 2 種類の T 細胞が、腫瘍拒絶において、実際に、それぞれどのような役割を果たしているかを検討した。このため、近交系マウスに誘発した腫瘍のうちで、強い拒絶抗原をもつものを選んで解析した。はじめに用いた方法は、CD4 および CD8 分子に対するモノクローナル抗体を *in vivo* 投与する方法である。CD4、CD8 分子は、T 細胞の機能と密接に関わった分子で、これらのモノクローナル抗体を *in vivo* で投与するとそれぞれの T 細胞は消失する。CD4 に対するモノクローナル抗体を投与すると、CD4T 細胞が体の中から消失し、CD8 に対するモノクローナル抗体を投与すると、CD8T 細胞が体の中から消失する。このような T 細胞除去マウスを用いて腫瘍の拒絶を検討した¹⁾。

図 1 のように BALB/c に誘発した RL δ 1 白血病は、拒絶抗原の抗原性が強く、BALB/c と B6 の F₁ マウスの背中に移植すると、腫瘍は、一旦増殖するが、やがて、拒絶される。宿主マウスに CD8 抗体を投与して CD8T 細胞を除去した場合、マウスはすべて腫瘍死する。一方、CD4T 細胞を除去しておいても、拒絶反応は変わらず、このことから、RL δ 1 の特異的拒絶には、CD8T 細胞のみが関与し、CD4T 細胞は関与していないことがわかる。BALB のミエローマ MOPC-70A についても RL δ 1 と同様の結果が得られた。

さらに別の腫瘍、UV 照射によって誘発した UV

表 1 各種腫瘍拒絶における CD4⁺ および CD8⁺T 細胞の役割

腫瘍	宿主	腫瘍拒絶能		協同作用の必要性
		CD4 ⁺ 細胞	CD8 ⁺ 細胞	
B6RV2	CB6F ₁ ♀	-	++	-
BALBRVD	CB6F ₁ ♀	-	++	-
BALBRL δ 1	CB6F ₁ ♀	-	++	-
BALBMOPC-70A	CB6F ₁ ♀	-	++	-
B6FBL-3	B6 ♀	+	++	-
CB6F ₁ UV ♀1	CB6F ₁ ♀	-	++	+

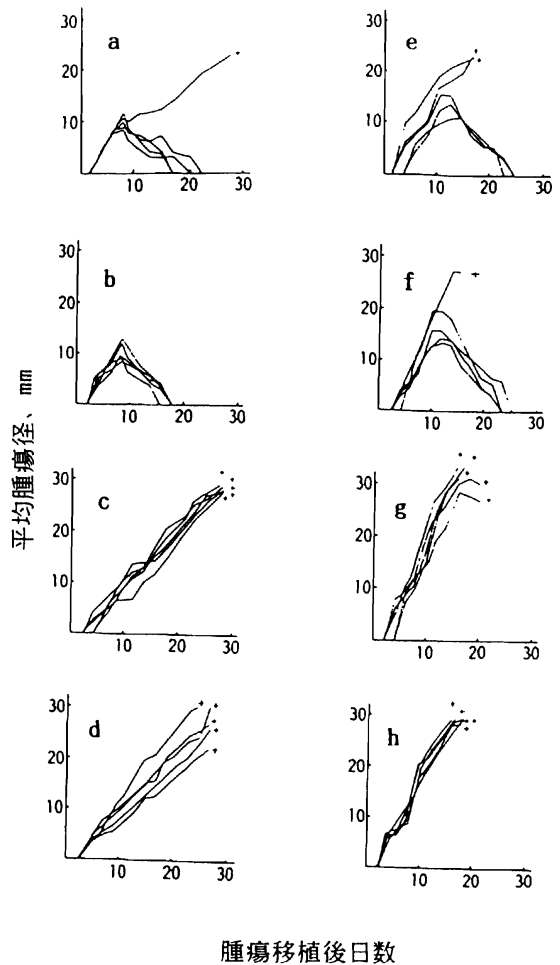


図 1 BALBRL δ 1 (a-d) および BALBMOPC-70A (e-h) の半同系 CB6F₁ マウスによる拒絶に及ぼす抗 CD4 mAb (b, f)、抗 CD8 mAb (c, g) 投与の効果。(a, e) は対照の MEM 投与。RL δ 1 は 1×10^6 個、MOPC-70A は 5×10^5 個を背部皮下に注入した。

♀1 も同系のマウスで拒絶される拒絶抗原性の強い腫瘍である (図 2)。この腫瘍の場合も、CD8T

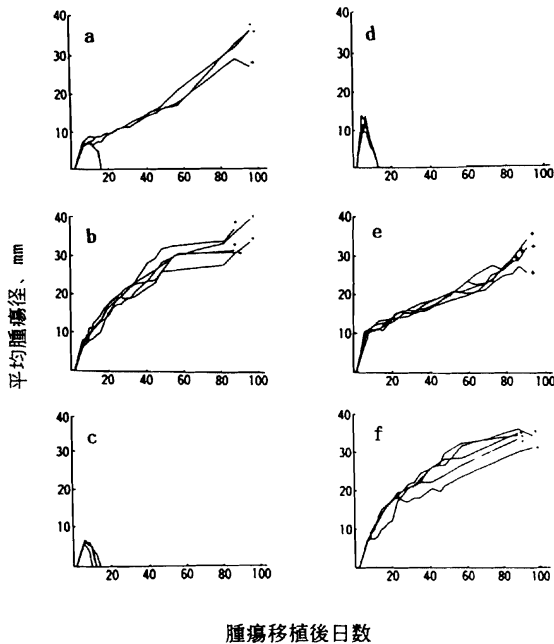


図2 UV♀肉腫の半同系CB6F₁マウスによる拒絶に及ぼす抗CD4mAb (a, d), 抗CD8 mAb (b, e) あるいは両抗体 (f) 投与の効果. (c) は対照MEM投与. a, b, f では, 抗体を0および4日目に投与し, d, e では5および9日目に投与した.

細胞を除去すると, 先程と同様に, 腫瘍は拒絶されることなく増殖してマウスは腫瘍死する。しかし, CD4T細胞を除去した場合にも, 腫瘍は増殖する。ここで, モノクローナル抗体投与の時期は腫瘍移植後1日と4日で行っているが, これを5日と9日にすると, CD4T細胞がなくても拒絶できるようになる。つまり, このことは, 拒絶を直接担うのはCD8T細胞であるが, CD8T細胞の機能の発現, 即ち, CD8CTLへの分化にCD4T細胞が, ヘルパーとして必要であることを示している。

同様の検討を, 他のいくつかの腫瘍についても行い, まとめたのが表1であるが, 拒絶はすべてCD8T細胞が直接関与するが, UV♀1のようにCD4とCD8両方のT細胞の協同作業 synergyが必要な場合もある。つまり, 腫瘍抗原によってT細胞の反応に, 特に, CD4T細胞の関与の程度に違いがあることがわかる。このように, 拒絶抗原の刺激が, RL♂1のように強い場合は, CD8の

表2 MHCクラスII抗原陽性異株FBL-3NのCD8T細胞除去B6マウスにおける拒絶とCTLの誘導

	IA抗原	腫瘍拒絶	CTL
FBL-3	-	-	-
FBL-3N	+	+	CD4 ⁺ CTL CD4 ⁻ CD8 ⁻ CTL

中のヘルパーを充分活性化して, CD8のいわゆるキラーを働かすことができるが, UV♀1のようにやや弱い場合は, CD8の中のヘルパーが活性化してくれないために, CD4の助けが必要で, この活性化が, CD8キラーを働かすことになる。

2. MHCクラスII抗原によって提示される腫瘍拒絶抗原の場合

これまで述べた腫瘍は, すべて, MHCクラスII抗原が陰性の腫瘍であるが, この型の腫瘍の拒絶にはCD8T細胞が必須であることがわかった。MHCクラスII抗原陽性の腫瘍は, 通常は, ほとんどないが, われわれは, フレンド誘発白血病FBL-3に, クラスII抗原を発現した変異株FBL-3Nを見出した²⁾。親株FBL-3と変異株FBL-3Nについて, いろいろな抗原についてその発現を調べたが, I-A^b, つまり, MHCクラスII抗原についてのみ違いが認められ, 他の抗原については, 2つの腫瘍について発現に違いは認められない。さらに厳密に, FBL-3NがFBL-3に由来するものであることを, フレンドウイルスのenv遺伝子のプローブを用いてサザンブロッティングにより検討した。FBL-3とFBL-3Nにのみ共通のbandが検出されることから, FBL-3Nは, FBL-3由来であることが確認された。これら2つの腫瘍について, CD8T細胞を予め除去したB6マウスを宿主に用いて, 拒絶されるか否かを検討した。親株FBL-3は, CD8T細胞がなければ拒絶されないが, FBL-3Nは, CD8T細胞がなくても, 効率よく拒絶される。つまり, この場合は, CD8以外のT細胞によって拒絶されていることがわかる。この2つの場合について, FBL-3については, day8で腫瘍が約10mmになった時点で, またFBL-3Nについては拒絶した後で脾細胞をとり出し, in vitroで再度刺激すると, FBL-3に対してはキラーT細胞

胞が誘導されないが、FBL-3N に対しては強いキラー活性が誘導される。このキラー細胞の表現型を抗体と補体による処理によって調べると、キラー活性は、抗 CD8 抗体と補体の処理では勿論減弱せず、抗 CD4 抗体と補体の処理で部分的に減弱した。抗 Thy-1 抗体と補体の処理で、完全に消失するので、キラー活性は、すべて T 細胞によるものであることがわかるが、その中に、CD4CTL と CD4⁻CD8⁻CTL が含まれていることを示唆している。そこで、FBL-3 で刺激した脾細胞と FBL-3N で刺激した脾細胞についてフローサイトメトリーによる解析を行った。FBL-3N で刺激した脾細胞には、CD4 の発現について、強弱 2 種類の細胞があり、さらに、Thy-1 陽性で、CD4 も CD8 も発現しない細胞が認められた。フローサイトメトリーで調べると、CD4 強陽性の細胞は、Pgp-1 (CD44) 抗も発現していることがわかった。そこで、CD4 high と low の 2 つの CD4 の集団を分取して、細胞傷害活性を調べたところ、CD4 強陽性の集団だけが、傷害活性を有することがわかった。

次に、もう一方の、CD4⁻CD8⁻ つまり Double negative CTL について、TCR 表現型を調べた。FBL-3N で刺激した脾細胞の培養細胞には、Thy-1 陽性つまり T 細胞で CD4 を発現していない、もともと、CD8 を除去してあるので、CD4 も CD8 も発現していない DNT 細胞がある。ここから、まず、non T 細胞をできるだけ除き、次に CD4、さらに残っているかも知れない CD8 を除去すると、CD4、CD8 は全く陰性の集団が得られる。この集団について、TCR を調べると、 $\alpha\beta$ が陽性で、 $\gamma\delta$ は陰性であった。DNT 細胞には、 $\gamma\delta$ 型のものが存在することが、知られているが、われわれの実験系で出現する DNT 細胞は、このように $\alpha\beta$ 型である。ここで、CD4 の CTL と、DN の CTL の集団を、純粋に取り出して、それらの細胞傷害活性を検討した。CD8 CTL は、宿主から、CD8T 細胞を除去しない場合に出現する通常の CTL であるが、CD8T 細胞を除去した宿主マウスに出現する CD4 も DN CTL も CD8 に劣らない程度の傷害活性を示している。傷害活性の特異性についてみると、CD8 および DN CTL は、FBL-3、FBL-3N のいずれの腫瘍に対しても傷害活性を示している

が、CD4 CTL は、クラス II を発現している FBL-3N のみを傷害し、クラス II 抗原のない FBL-3 を傷害することができない。

さらに、CD4 および DN CTL を同時に B6 のヌードマウスに静注して、FBL-3N 腫瘍を接種すると増殖の後、拒絶される。CTL を移入しなければ、勿論、腫瘍は増殖し続け、マウスは腫瘍死する。つまり、CD4、DN CTL は in vivo でまぢがいなく、拒絶能を発揮できることが確認された。

以上述べたことをまとめると、表 2 のように、MHC クラス II 抗原陽性の FLB-3N は、CD8T 細胞がなくても拒絶され、その拒絶は、CD4 の CTL と、TCR は $\alpha\beta$ 型の CD4⁻CD8⁻ の CTL、この 2 種類の CTL によっておこることが、わかった。そして、このどちらの CTL も、CD4 ヘルパーの助けを借りて生成する。ここで、重要なことは、FBL-3N には、MHC クラス I 抗原も勿論存在するので、正常の場合、つまり、CD8T 細胞がある場合は、CD8 の反応が優位になって、CD4 および double negative CTL の反応は認められない。この理由として、考えられる可能性は、MHC クラス II 拘束性の CD4 および DN CTL の反応は、MHC クラス I 拘束性の CD8 CTL の反応のレスキューの機構として存在していることである。そこで、通常の場合、腫瘍細胞は MHC クラス II 抗原を発現しないのがほとんどであるが、この場合、クラス I 上の拒絶抗原が CD8 キラーを刺激するわけであるが、この反応が弱い場合、つまり、十分な CD8 キラーができない場合、この腫瘍細胞に強制的にクラス II を発現させることによって抗腫瘍免疫を高めることが可能かもしれない。

IV. DN CTL

クラス II 陽性の FBL-3N は、CD8T 細胞がないにもかかわらず、拒絶されるが、その際に現れる CD4⁻CD8⁻ (つまり Double negative) のキラー T 細胞について、その機能あるいは役割についてはほとんど不明であった。われわれは、同種の腫瘍拒絶の実験系を用いた場合にも、やはり、宿主から CD8T 細胞を除去すると、DN キラー T 細胞が出現することを確認している³⁾。DN キラー

T細胞がまちがいなく DN であることを DN の CTL クローンを作成して調べたが、ノザンプロテイングで、CD4 も CD8 も発現していない。TCR は、 α 、 β 、 γ を発現しているが、 δ の発現はなく、 $\alpha\beta$ 型であることがわかった。このように、DN $\alpha\beta$ T細胞は末梢にも存在し、機能を発揮し得る T細胞であることがわかったが、この T細胞の成熟分化、TCR レパトアの選択のメカニズムについては、未だ不明の点が多く、今後の解析が期待される。

V. T細胞が認識する腫瘍拒絶抗原

以上、種々の腫瘍について、拒絶に関与する T細胞の種類と役割について述べてきたが、次に T細胞が認識する腫瘍拒絶抗原について最近の結果を紹介する。

先に述べたように、ある腫瘍でその腫瘍が発生したのと同じ近交系マウスを免疫すると宿主はその腫瘍に対して免疫能を獲得し、あらためてその腫瘍を移植しても拒絶する。腫瘍の抗原性が強ければ、免疫しなくても拒絶されることも上に述べたとうりである。この宿主の免疫能は、T細胞によって担われており、感作 T細胞をあらたに別のマウスに移入することにより、移入マウスに免疫能を付与することができる。化学誘発癌の固有拒絶抗原は、長い間、腫瘍免疫学者の興味を惹いてきたが、いまだに、その本態は不明である。しかし、この点について、Boonら⁴⁾は、彼らの開発した実験系を用いて興味ある結果を得ている。彼らは、DBA/2 マスト細胞腫 P815 を用いて、これに、変異原性物質を加えて突然変異を誘導した。変異 P815 で腫瘍原性を失ったものを tum⁻、そしてもとの腫瘍を tum⁺ と呼んだ。tum⁻ 腫瘍は CTL によって傷害されるが、その抗原は非常に多様性に富み、各々のクローン化腫瘍はすべてことなる抗原性を示した。コスミドを用いていくつかの tum 抗原遺伝子をクローニングした結果、抗原は癌化とは関係ないと考えられる種々の正常遺伝子が突然変異を起こしたものであった。この結果は、化学誘発癌や紫外線誘発癌の癌抗原の多様性を説明する根拠になるかも知れない。突然変異を起こさない P815 についても解析を行い、P815A と P815B の二つの抗原を見出しているが、これらはいずれ

も腫瘍細胞によって異常発現した正常遺伝子であった⁵⁾。

VI. おわりに

T細胞は、T細胞表面上の分子によって抗原と結合し、これを認識するが、最近、抗原提示細胞内での抗原処理とその提示の機構が明らかになってきた。腫瘍抗原のように細胞質内で合成される蛋白は、プロセッシングを受け、その一部の抗原となるペプチドが、ER に選ばれて、新しく合成された MHC クラス I 分子の溝にはめ込まれ、これが細胞表面に運ばれる。そこで、標的腫瘍細胞表面から MHC クラス I 分子の溝にはまっているペプチドを酸で溶出して、HPLC で分画し、それぞれのペプチドを含む分画を同じ MHC を有するが殺されない標的細胞に結合させ、細胞傷害性を検討する。このような方法によって腫瘍拒絶抗原ペプチドの同定が可能である。もしペプチドが決まれば、このアミノ酸配列をもとに、もとの抗原分子の同定が可能となるであろうし、また一方、腫瘍ワクチンの開発に大きく寄与するであろう。

文 献

- 1) Udono, H., Mieno, M., Shiku, H., et al. : The roles of CD8⁺ and CD4⁺ cells in tumor rejection. *Jpn. Cancer Res.*, 80 : 649—654, 1989.
- 2) Yoshimura, A., Shiku, H., and Nakayama, E. : Rejection of an IA⁺ variant line of FBL-3 leukemia by cytotoxic T-lymphocytes with CD4⁺ and CD4⁻ CD8⁻ T-cell receptor $\alpha\beta$ phenotypes generated in CD8-depleted C57BL/6 mice. *J. Immunol.* in press.
- 3) Mieno, M., Suto, R., Obata, Y. et al. : CD4⁻CD8⁻ TCR $\alpha\beta$ T-cells : generation of in vitro MHC class I specific CTL response and allogenic tumor rejection. *J. Exp. Med.*, 174 : 193—201, 1991.
- 4) Lurquin C, van Pel A, Mariame B. et al. : Structure of the gene of tum⁻ transplantation antigen P91A : the mutated exon encodes a peptide recognized with L^d ay cytolytic T cells. *Cell*, 58 : 293—303, 1989.
- 5) Lethe, B., van den Eynde, B., van Pel, A., et al. : Mouse tumor rejection antigen-P815A and antigen-

P815B-2 epitopes carried by a single peptide. Eur. J. Immunol., 22 : 2283, 1992.