

Lymphokine-activated killer 細胞の抗腫瘍効果と その cytotoxic factor 産生能の検討

岡山大学医学部第一外科教室 (指導: 折田薫三教授)

雁 木 淳 一

(昭和62年6月15日受稿)

Key words : LAK 細胞

細胞障害活性
細胞障害因子
腫瘍壊死因子

はじめに

ヒト末梢血リンパ球 (PBL) を Interleukin-2 (IL-2) と培養する事により, 正常細胞は障害しないが, 広範囲な培養腫瘍細胞や新鮮固形腫瘍細胞を障害する非特異的なキラー細胞が得られる¹⁾. Grimm らはこれらの細胞を Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞となづけた^{2,3,4)}. LAK 細胞は *in vitro* のみならず *in vivo* においても強い抗腫瘍効果を発揮する事が知られており^{5,6)}, 現在では悪性腫瘍に対する治療として LAK 細胞の受動免疫療法の臨床応用も検討されている^{7,8)}. しかしながら LAK 細胞が何故この様な強い抗腫瘍効果を発揮するのかや, 腫瘍に対する免疫監視機構における役割についてはまだよくわかっていない.

現在のところ腫瘍に対する免疫監視機構として感作 T リンパ球, 活性化マクロファージ, natural killer (NK) 細胞などが特異的, 非特異的に腫瘍細胞の破壊に関与していると考えられるが, これらのエフェクター細胞は interferon (IFN)⁹⁾, lymphotoxin (LT)¹⁰⁾, tumor necrosis factor (TNF)¹¹⁾, natural killer cytotoxic factor (NKCF)¹²⁾ といったサイトカインと総称される様々な細胞障害因子を mediator としてその細胞障害活性を發揮する事が最近報告されている^{13,14,15,16)}. 今回我々

は LAK 細胞も何らかの cytotoxic factor (CF) を mediator としてその抗腫瘍効果を發揮するのではないかと考え, LAK 細胞の培養腫瘍細胞および新鮮固形腫瘍細胞に対する細胞障害活性を測定するとともに, LAK 細胞を種々の方法で刺激した上清中の細胞障害因子について検討したので報告する.

材料と方法

1. PBL の分離

PBL は正常健康人又は各種癌患者より得られたヘパリン加末梢血を Ficoll-Conray 比重遠心法にて分離し, 磷酸緩衝液 (PBS) にて3回洗浄し, 培養液 (RPMI1640, 10% FBS, 2mML-グルタミン, 5×10^{-5} 2-メルカトエタノール, 100U/ml ペニシリン, 100 μ /ml 硫酸ストレプトマイシン含有) に浮遊させた.

2. LAK 細胞の誘導

LAK 細胞は PBL を各種濃度のヒトレコンピナント IL-2 (塩野義製薬より供与) を含む培養液中に 2.5×10^6 /ml に調整し, 5% CO₂, 37°C の条件下で3日間培養後, PBS にて3回洗浄したのちエフェクター細胞として用いた.

3. 標的細胞

LAK 細胞の細胞障害試験の標的細胞として, 慢性骨髄性白血病由来株 K562, 大腸癌細胞由来株 RPMI4788, 肺癌細胞由来株 PC10,

胃癌細胞由来株 MKN-1, MKN-28, MKN-45, lymphoma 細胞由来 DAUDI を用いた。また自家癌細胞の分離には Grimm らの方法²⁾によった。即ち外科的に切除された腫瘍塊を酵素処理 (collagenase 2mg/ml, DNase 0.2mg/ml, hyaluronidase 5U/ml) し, cell suspension を得た。これを Ficoll-Conray 比重遠心法及び Percoll の不連続比重勾配遠心にかけて自家癌細胞を得た。

4. 細胞障害試験

浮遊細胞は $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ にて 1 時間標識し, 単層培養細胞は約 24 時間培養したのち細胞の状態が安定したところで $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ にて 6 時間標識した。次いで培養液にて 3 回洗浄した後に標的細胞として用いた。Effector cell は effector: target ratio が 50:1 となるように調整して加え, 浮遊細胞は 4 時間, 単層培養細胞は 12 時間反応させた後, 上清中に放出された ^{51}Cr を測定した。% specific lysis は次式より算出した。

% specific lysis

$$= \frac{\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{total cpm} - \text{spontaneous cpm}}$$

5. モノクローナル抗体処理

LAK 細胞のモノクローナル抗体処理には OKT-4, OKT-8 (Ortho Pharmaceutical) を用いた。LAK 細胞を $1 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し, それぞれの抗体を $50 \mu\text{g}$ 直接加え 4°C にて 1 時間反応させた後, ウサギ低毒素補体 (Cederlane) を加えて更に 1 時間 37°C にて shaking しながら反応させた。この後細胞を PBS にて 2 回洗浄してから, 生細胞をトリパンブルーにて数えて以後の実験に用いた。

6. LAK 細胞からの CF の誘導

LAK 細胞を $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し, 各種の刺激剤あるいは腫瘍細胞と一定期間混合培養し, その培養上清中の CF 活性を測定した。刺激剤としては, Con A (Miles Yeda), PHA-P (Wellcome), rIL-2 (塩野義), rIFN- γ (協和醗酵) をそれぞれ用いた。

7. Cytotoxic factor assay

CF の活性はマウス L929 細胞を標的細胞と

した細胞障害試験にて測定した¹⁷⁾。即ち段階希釈したサンプルと L929 細胞 ($1.5 \times 10^4/0.1\text{ml}/\text{well}$) をアクチノマイシン D ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) の存在下に 96 穴の平底プレートにて 18 時間培養し, 0.02% の Neutral Red を加え, OD540nm にて ELISA を用いて測定した。また CF 活性の中和には, ヒト natural tumor necrosis factor (TNF) およびヒト natural lymphotoxin (LT) に対するモノクローナル抗体 (いずれも林原生物化学研究所作成)¹⁸⁾ を用いた。

結 果

1. LAK 細胞の各種腫瘍細胞に対する細胞障害活性

健康人 PBL より誘導された LAK 細胞の各種培養腫瘍細胞に対する細胞障害活性と, 担癌患者の PBL より誘導された LAK 細胞の自家癌細胞に対する細胞障害活性を図 1 に示す。このように LAK 細胞は広い target spectrum を有する強力な非特異的キラー細胞であることが

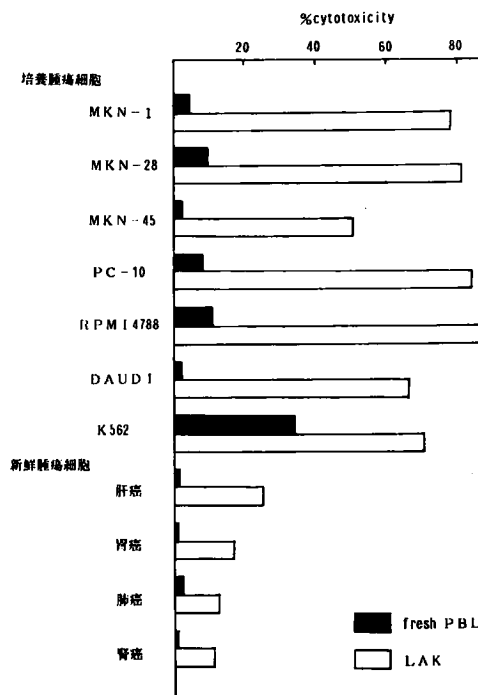


図 1 各種腫瘍細胞に対する LAK 活性

表1 各種刺激による LAK細胞の CF 産生

Stimulation	LAK
ConA	20700
PHA	13000
IL-2	648
γ IFN	542
P4788	5670
PC10	3020
None	0

LAK cells were cultured with ConA ($10 \mu / \text{ml}$), PHA ($10 \mu / \text{ml}$), IL-2 ($1000 \text{U}/\text{ml}$), IFN ($10000 \text{U}/\text{ml}$) or tumor cells (1×10^6). After 12 hours incubation, supernatant was collected and assayed for CF activity.

判明した。

2. 各種刺激による LAK 細胞の CF 産生

LAK 細胞に種々の刺激を加えた場合の24時間後の上清中の CF 活性を表1に示す。Con-A や PHA で LAK 細胞を刺激した場合はその上清中に強い CF 活性が検出されたが、IL-2 や IFN- γ では CF 活性は誘導されなかった。次に LAK 細胞を RPMI4788 や PC10 といった腫瘍細胞と24時間混合培養すると、その上清中にも CF 活性が検出された。LAK 細胞に刺激を加えない場合や刺激剤の上清中には CF 活性は検出されなかった。

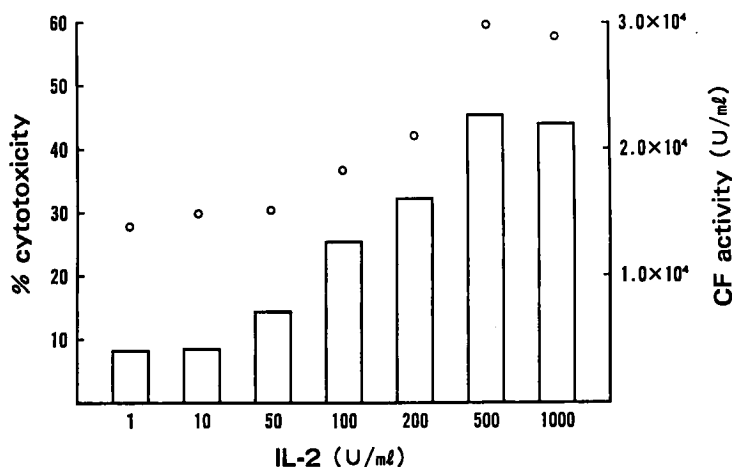
3. LAK 細胞の CF 産生の経時的変動

LAK 細胞を Con-A で刺激した時の上清中の CF 活性の経時的変動を表2に示す。刺激

表2 LAK 細胞の CF 産生の time course

Culture Treatment	CF Activity(U/ml) After Incubation for						
	2hr	4hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr
LAK+ConA	8560	18100	25100	14100	15500	15600	15300

LAK cells (2.5×10^6) were cultured with ConA ($10 \mu / \text{ml}$) for the time indicated and culture supernatant were assayed for CF activity on L929 cells.



LAK cells were generated with various IL-2 concentration. %cytotoxicity was assayed by ^{51}Cr release assay against P4788 (open bar). LAK cells were stimulated with ConA ($10 \mu / \text{ml}$) and supernatants were assayed for CF activity (open circle).

図2 各種濃度 IL-2による LAL 活性および CF 産生能

表3 LAK細胞により産生されるCFの中和試験

Effector Stimulation	CF activity remaining after treatment with (U/ml)			
	None	Anti TNF	Anti LT	
	ConA	9790	2840	8330
LAK	IL-2	328	ND	ND
	P4788	5670	354	5100
	PC10	3020	239	3210

LAK cells (5×10^6 /ml) were incubated with ConA (10μ /ml) IL-2 (1000 U/ml) or tumor cells (1×10^5). After 12 hours incubation supernatant was collected and assayed for CF activity.

表4 LAK細胞のモノクローナル抗体処理後のLAK活性およびCF産生能の変動

Treatment	LAK activity against P4788 (%)	CF activity (U/ml) remaining after treatment with		
		None	Anti-TNF	Anti-LT
None	41.3	7810	823	6230
C'	39.7	7910	781	7440
OKT-4+C'	46.6	7120	1270	6320
OKT-8+C'	9.9	473	0	672

後2時間でCF活性は既に検出され、6時間でそのピークをむかえた。刺激後72時間でもCF活性は検出可能であった。

4. LAK細胞におけるLAK活性とCF産生能の相関関係

PBLを各種濃度のIL-2と3日間培養した時のそれぞれのLAK活性とCF産生能の相関関係を図2に示す。IL-2の濃度を増すにつれてLAK活性とCF産生能は上昇してゆき、500U/mlのIL-2で培養した時に両者の活性はピークに達し比較的良く相関していた。またLAK活性の低いものでもCF産生能は十分保持していると考えられた。

5. CF活性の中和試験

LAK細胞が産生するCFが何であるかを検討する目的で、抗TNF抗体および抗LT抗体を用いて中和試験を行った。種々の刺激によってLAK細胞が産生するCF活性は、表3に示すように抗TNF抗体によって70~95%が中和されるが抗LT抗体にては10~15%しか中和されなかった。このことからLAK細胞によって産生されるCFとはその大部分がTNFであることが判明した。

6. CFを産生するLAK細胞の細胞表面抗原の解析

CFを産生するLAK細胞の細胞表面抗原を解明する目的で、LAK細胞を各種モノクローナル抗体で処理した後、LAK活性とCF産生能を測定した。表4に示すようにLAK細胞をOKT-8で処理すると、LAK活性もCF産生能もほぼ完全に消失した。OKT-4の処理ではLAK活性もCF産生能も殆ど影響を受けなかった。このことよりCF即ちTNFを産生するLAK細胞はOKT-8陽性であることがわかった。

考 察

LAK細胞は何ら抗原刺激を加えることなくリンパ球とIL-2を培養することによって誘導される非特異的キラーリンパ球であり、NK非感受性である広範囲の同系または同種の腫瘍細胞を破壊する^{2,4)}。多くの動物実験においてLAK細胞の受身移入がin vivoにおいて抗腫瘍効果を発揮することが証明されており^{5,6)}、すでに臨床においてもLAK細胞の受身移入療法が開始されておりその有効性が報告されつつある^{7,8)}。我々の実験結果においてもLAK細胞は健康人からも担癌患者からも誘導可能な非特異的なキラー細胞であり、新鮮固形腫瘍細胞に対しても細胞障害活性を有することが判明した。

しかしながらLAK細胞が何故このような強い抗腫瘍効果を発揮するのかは未だに不明であり、その細胞障害作用のメカニズムに関する報告は少ない。今回の実験において示したように、LAK細胞をレクチンや腫瘍細胞と混合培養す

ることにより、その上清中にマウスL929細胞に対して細胞障害活性を有するCFが検出される。さらにLAK細胞の*in vitro*での細胞障害活性とCF産生能は比較的良く相関していることがわかった。このCFはTNFに対するモノクローナル抗体によりその活性がほとんど中和されることより、LAK細胞が種々の刺激によってTNFを産生していることが明らかとなった。

TNFはBCG/LPSにより刺激されたマウスの血清中に検出されるcytotoxinであり、BALB/cマウスに移植されたMethA肉腫に出血壊死をもたらす物質である¹³⁾。TNFを産生する細胞としては、活性化マクロファージがその中心と考えられているが¹⁹⁾、NKCFとTNFが同一物質という報告もあり²⁰⁾、NK細胞もTNFを産生するものと考えられる。またマウスnatural cytotoxic (NC)細胞もTNFをmediatorとして細胞障害活性を発揮する報告がある^{21,22)}。このようにTNFを産生する細胞としては活性化マクロファージ以外にも種々の細胞があり、今回の我々の結果よりLAK細胞もその1つだと考えられる。

ヒトのLAK細胞はその細胞表面抗原がOKT-3陽性・OKT-8陽性と報告されており、T細胞系列のものである可能性が示唆されている³⁾。今回の我々の結果もLAK細胞をOKT-8で処理することにより、*in vitro*の細胞障害活性もTNF産生能も殆ど消失し、これ

は諸家の報告と一致するものであった。またこのことからTNFはLAK細胞の細胞障害活性のmediatorである可能性も示唆された。実際LAK細胞の細胞障害活性とTNF産生とは比較的良く一致していた。このことよりLAK細胞は確かにTNFを産生するが、TNFをmediatorとして細胞障害活性を発揮するとは断言できなかった。このことに関しては次の2つの可能性が考えられる。1つは今回の実験に用いられたアッセイがマウスL929細胞に対する障害活性を検出するものであり、ヒトの種特異的な細胞障害因子の検出ができていない可能性があることである。さらにL929細胞には障害活性を示さないが、他の細胞には障害活性を示す因子があるのかもしれない。もう1つの可能性は、LAK細胞によって産生されるTNFは*in vivo*における腫瘍細胞の制御に重要な役割を果たしているということである。今後はLAK細胞がTNFを産生する真の意義を追求する目的で、LAK細胞の*in vitro*の細胞障害活性に抗TNF抗体が影響するか否か、また*in vivo*におけるLAK細胞の移入療法のTNFの測定等をおこなってゆくつもりである。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲をいただいた折田薫三教授に深甚なる謝意を表すとともに、直接御指導いただいた田中紀章博士に深謝いたします。

参 考 文 献

1. Lotze MT, Grimm EA, Mazumder A, Strausser JL, and Rosenberg SA: *In vitro* growth of cytotoxic human lymphocytes. IV. Lysis of fresh and cultured autologous tumor by lymphocytes cultured in T cell growth factor (TCGF). *Cancer Res* (1981) 41, 4420-4425.
2. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ and Rosenberg SA: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* (1982) 155, 1823-1841.
3. Grimm EA, Ramsey KM, Mazumder A, Wilson DJ, Djeu JY and Rosenberg SA: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic, thymus derived lymphocytes and natural killer cells. *J Exp Med* (1983) 157, 884-897.
4. Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, Neckers LM, Lachman LB, Wilson DJ and Rosenberg SA: Lympho-

- kine-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* (1983) 158, 1356–1361.
5. Lafreniere R and Rosenberg SA: Adoptive immunotherapy of murine hepatic metastases with lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin 2 can mediate the regression of both immunogenic and nonimmunogenic sarcomas and an adenocarcinoma. *J Immunol* (1985) 135, 4273–4280.
 6. Mule JJ, Yang J, Shu S and Rosenberg SA: The antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo: direct correlation between reduction of established metastases and cytolytic activity of lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* (1986) 136, 3899–3909.
 7. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, vetto JT, Seipp CA, Simpson C and Reichert CM: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *Engl J Med* (1985) 313, 1485–1492.
 8. Jacobs SK, Wilson DJ, Kornblith PL and Grimm EA: Interleukin-2 or autologous lymphokine-activated killer cell treatment of malignant glioma: Phase I Trial. *Cancer Res* (1986) 46, 2101–2104.
 9. Stewart WE, Gressor I, Trovey MG, Bauda MT and LeGross S: Identification of the cell multiplication inhibitory factors in interferon preparations as interferons. *Nature* (1976) 262, 300–302.
 10. Evans CH: Lymphotoxin - an immunologic hormone with anti-carcinogenic and anti-tumor activity. *Cancer Immunol Immunother* (1982) 12, 181–190.
 11. Carswell EA, Old JL, Kassel RI, Green S, Fiore N and Williamson B: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* (1975) 72, 3666–3670.
 12. Wright SC and Bonavida B: Studies on the mechanism of natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity (CMC). I. Release of cytotoxic factors for NK-sensitive target cells (NKCF) during co-culture of NK effector cells with NK target cells. *J Immunol* (1982) 129, 433–439.
 13. Hiserodt JC, Britvan IJ and Targan SR: Differential effects of various pharmacologic agents on the cytolytic reaction mechanism of the human natural killer lymphocyte: further resolution of programming for lysis and KCIL in discrete stages. *J Immunol* (1982) 129, 2266–2270.
 14. Philip R and Epstein LB: Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced itself, γ -interferon and interleukin-1. *Nature* (1986) 323, 86–89.
 15. Quan PC, Ishizaka T and Bloom BR: Studies on the mechanism of NK cell lysis. *J Immunol* (1982) 128, 1786–1791.
 16. Roder JC, Argov S, Klein M, Petersson C, Andersson K and Hansson M: Target-effector interactions in the natural killer (NK) cell system. V. Energy requirements protein synthesis and possible involvement of lysosomal enzymes. *Immunology* (1980) 40, 107–116.
 17. Spofford BT, Daynes RA and Granger GA: Cell-mediated immunity in vitro: a highly sensitive assay for human lymphotoxin. *J Immunol* (1974) 112, 2111–2116.
 18. Nobuhara M, Kanamori T, Nagase Y, Nii A, Morishita H, Tohyama J, Andoh S and Kurimoto M: The expression of human tumor necrosis factor in *E. coli*. *Nucleic Acids Symposium Series* (1986) 17, 131–134.
 19. Mannel DN, Moore RN and Mergenhagen SE: Macrophages as a source of tumorcidal activity (Tumor Necrosis Factor). *Infect Immun* (1980) 30, 523–329.
 20. Dergiantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis MK, Perussia G and Trincheri G: Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with

- tumor necrosis factor and synergism with immune interferon. *J Exp Med* (1985) 162, 1512–1530.
21. Ortaldo JR, Mason LH, Mathieson BJ, Liang S-M, Flick DA and Herberman RB: Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumor necrosis factor. *Nature* (1986) 46, 4973–4978.
 22. Jadayl MR, Schmuck G, Djeu JY and Parkman R: Morphology and lytic mechanisms of interleukin-3 dependent natural cytotoxic cells: tumor necrosis factor as a possible mediator. *J Immunol* (1986) 137, 2724–2783.

**Anti-tumor activity and production of
cytotoxic factor by**

Lymphokine-activated killer cells

Junichi GANGI

Dept of 1st Surg.

Okayama Univ. Med. Sch.

(Prof. Kunzo Orita)

Lymphokine-activated killer (LAK) cells can be generated by incubating peripheral blood lymphocytes in recombinant Interleukin-2. LAK cells kill fresh autologous and allogeneic human tumor cells in vitro. The adoptive transfer of these LAK cells into tumor-bearing hosts can mediate the cure of disseminated cancer in a variety of animal model systems. But the mechanism of target cell killing by LAK cells is as yet undefined. We have postulated that such killing may involve some soluble cytotoxic factors produced and secreted by LAK cells. LAK cells were induced by mitogens and tumor cells to secrete cytotoxic factors against L929 cells. LAK cells produced cytotoxic factors within 2 hr after induction and maximal production was observed 6 hr after induction. There was a good correlation between in vitro LAK cell activity and production of cytotoxic factors. We have identified one of these cytotoxic factors as tumor necrosis factor (TNF). LAK cells lost their in vitro cytotoxic activity and TNF producibility after treatment with OKT-8 antibody. These findings suggest that TNF may be a mediator of in vitro LAK cell activity.