

Tumor-dormancy に関する実験的研究 (その2)

— H-2 ハプロタイプが異なる個体間での
養子免疫の成功とその遺伝的背景の分析 —

新潟大学医学部附属動物実験施設

佐藤 徳光

Experimental Studies on the Tumor-Dormancy (No.2)
— Success of Adoptive Immunotherapy beyond the Difference
of H-2 Haplotype and the Genetic Backgrounds Analysis —

Norimitsu L. SATO

*Institute for Laboratory Animals,
Niigata University School of Medicine*

We established Ehrlich ascites tumor (EAT)-dormant mice (ddY-drm, H-2^d) by selective breeding of ddY closed colony stock and had reported the characteristics of the mouse subline in contrast to EAT-progressive one (ddY-prg, H-2^d).

In this report, I showed successful adoptive immunotherapy between the two sublines against EAT outgrowth beyond their different H-2 haplotype, and suggested some genetic backgrounds for success of the passive immune transfer.

Key words: Ehrlich ascites tumor, tumor-dormancy, adoptive immunotherapy, ddY mouse subline

エールリッヒ腹水癌, 癌休眠, 養子免疫, ddY マウス亞系

はじめに

長年の選抜交配により、「癌休眠マウス (ddY-drm)」を作出した。これについては既にその概要を報告してきた¹⁾²⁾。このマウス亞系は、癌の養子免疫成立のために、

いかなる遺伝的背景が重要かについて、一つの分析手段を与えてくれるものと期待される。今回はそれに焦点を当て紹介したい。

さて、癌の養子免疫療法は、色々な発想や手法により試みられている。しかし、確実かつ普遍的効果を生む手

Reprint requests to: Norimitsu L. SATO,
Institute for Laboratory Animals,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部附属動物実験施設

佐藤 徳光

法とはなりきっていない。自然発生癌の抗原特性や、個体間に横たわる GVHR など大きな障壁があるためと思われる。しかし、時として、他リンパ球移入による癌の養子免疫が効を奏した例も聞かれ、成功例に横たわる要因分析は特に望まれるところである。

動物実験のレベルでも様々な手法が試みられ、中には効を奏する例も数多く報告されてきた。しかし、実際に追試してみると臨床応用に発展できるほどの手ごたえは意外と少ない、というのが我々の実感である。

まず、これまでの近交系マウスにおける癌研究を通じ、ほぼ共通した認識にあると思われる事項はおおよそ次のように要約されよう。

1) 近交系に自然発ガン、ないし化学発ガンさせた癌 (syngeneic 癌) は、同一近交系マウスにしか移植できず、H-2 ハプロタイプを異にする他近交系マウスへの移植は無理である。そして、syngeneic 癌の免疫療法は、特殊な例を除き先ずはあまり期待出来そうにない。この系で何らかの免疫療法が効を奏した場合、それは多少なりとも癌関連抗原を同系宿主 (同系統とはいえ、自己 autochthonous ではない) が認識しているか、非特異的免疫反応が人工の実験環境下で直接かつ機会的に癌細胞を損傷するような場合である。

2) 異系統間 (allogeneic) では、癌細胞膜表面に MHC 遺伝子産物を残す限り、近交系由来の癌は他系統個体 (無胸腺マウスを除く) では増殖できず、大概、細胞性免疫を惹起し強い拒絶を受ける。しかし、その際、活性化された異系統リンパ球を元の宿主マウスに移入しても、いわゆる、養子免疫は成立しがたい。著者の経験した範囲では、例えば、C57BL/6 と C57BL/6-nu/nu の組み合わせのように、nu 遺伝子を除き他の遺伝的背景が同じ場合、養子免疫が成立する。

ところが、我々の作出した ddY-drm は H-2^s であり、もう一方の癌増殖系 (ddY-prg) は H-2^q である。互いの皮膚移植片を拒絶する間柄である。それなのに、ddY-drm の Ehrlich 癌抵抗性 (癌休眠特性) は確実に ddY-prg へ養子免疫できる。その要因は、おそらく次のような選抜交配の歴史に秘められているものと思われる。すなわち、開始時の ddY マウスは非近交系 (クローズドコロニー) であり、その集団の H-2 は q が約 64%、他は q と s の混合像を示していた。ところが、皮下移植 Ehrlich 癌の増殖の有無を目安に選抜交配 (非兄妹交配) を続けたら、第16代目には ddY-drm の H-2 は s となり、ddY-prg のそれは q に分離していた。しかし、他の遺伝子については未だ共通するもの (ないし

不規則な分離) がある。おそらく、これが幸いして (要因となって)、H-2 の相違を越えて養子免疫が成立したものと考えている。したがって、その辺の遺伝的背景を詳細に分析すれば、H-2 が異なる個体間でも養子免疫が可能になる条件が見いだせそうに思えるのである。

以上のことを念頭に、以下には我々の実験系で得たこれまでの結果を交え、総説としてまとめてみたい。

I. Ehrlich 腹水癌 (EAT) の特徴

まず、EAT の特徴についてふれておきたい。ご存知のとおり、EAT は今世紀初頭から延々と継代されて来た最も古い癌 (マウス乳ガン由来) の一つである。当初は、マウスに近交系は存在しなかったから、長い期間、遺伝的多型のマウス腹腔を経由し、H-2 の異なる場合は癌細胞の多くは淘汰され、MHC 遺伝子産物を欠損する偏奇癌細胞が主体に生き残ってきたと見なされる。実際、今日の EAT 細胞は、モノクローナル抗体を用いて調査する限り膜表面に H-2 抗原を見いだせない (Table 1)。現在では、EAT 細胞 10⁵ 以上の腹腔内移植でどの近交系マウスにも生着する。しかし、詳細に検討すると、細胞数 10⁴ 以下の腹腔移植でわずかながら系統差が生ずる。そして、その差は、皮下移植により明確にとらえられる³⁾。実際に皮下移植で調べて見ると、Fig. 1 に示すごとく、A/J, BALB/cCr, C57BL/10Sn, C57BL/6 (今回あらたに追加)、NZB/N, および SJL/J は EAT-regressive (EAT に対し拒絶的であり、dormant とは言えない) であり、一方、AKR/J, C3H/He, CBA/J, DBA/1J, DBA/2Cr は EAT-progressive (増殖系、固型癌を形成) であった³⁾。

これら 2 系列の近交系マウスについて、遺伝的 profile

Table 1 Surface antigenicity of EAT cells

MAbs specificity	Dead cells/counted (%)	
	EAT	BAMC-1*
K ^b · D ^b · H-2 ^q	6.0	3.2
K ^k · H-2 ^{q,r}	7.8	7.6
D ^d · H-2 ^s	6.6	75.4
K ^d	8.9	82.4
D ^k	8.2	5.1
I-A ^{b,f,k,p,q,r,s,u,v}	8.0	3.3
I-A ^{d,f,j}	7.6	3.8

*) for positive control, BAMC-1; methylcholanthrene-induced fibroma which has been passaged in syngeneic mice (BALB/c, H-2^d)

の一部を比較してみると Table 2 のごとくであった。目下のところ、H-2 に関してはさらに細部に立ち入ってパブリックK決定基内の類似性を、Ly1 と Ly2 に

ついてはその type 分析を重視している。特に、EAT-progressive 系列は Ly2.1, EAT-regressive 系列は Ly2.2 と共通性があり興味がそそられる。しかし、未だ決定打は得られていない。

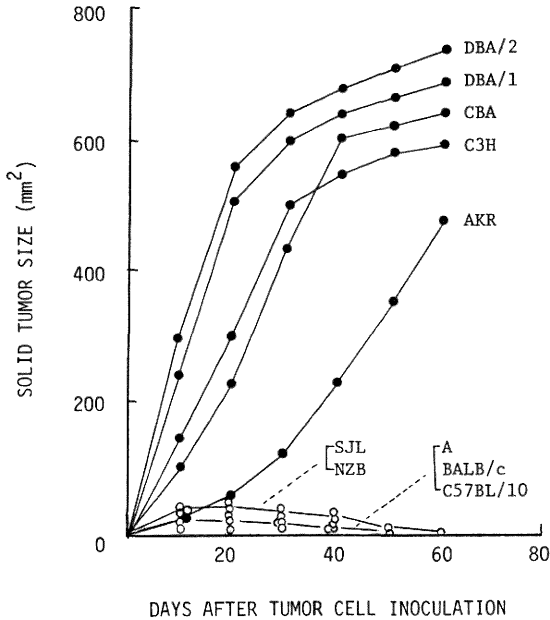


Fig. 1 Subcutaneous progression or regression of EAT in inbred mice

II. ddY-drm と ddY-prg マウスの遺伝検査

皮下移植された EAT は ddY-drm マウスでは dormant, ddY-prg マウスでは増殖（固型癌を形成）する。これら2亞系マウスについて、リンパ球に対するモノクローナル抗体を用い H-2 クラス I およびクラス II を調べると、ddY-drm は s, ddY-prg は q であった²⁾。そして、これら2亞系間の皮膚交換移植片は、いずれも拒絶された。リンパ球混合培養試験でも活性化が起こっている。

一方、Ly1 および Ly2 について見ると、type 1, type 2 への分離が明確でない。つまり、ddY-drm は、Ly1.1（リンパ球障害率 11.0%）、Ly1.2（48.0%）、Ly2.1（32.0%）、Ly2.2（32.0%）といずれも反応が弱く、対する ddY-prg の方は、Ly1.1（70.4%）、Ly1.2（75.8%）、Ly2.1（65.5%）、Ly2.2（67.7%）と両 type 抗原のいずれにも高率に反応した。この点は、近交系（inbred）マウスとは異なっている。一般に近交系マウスの Ly ハプロタイプは、type 1 か 2 のどちらか、つまり、Ly1 について見れば Ly1.1 か Ly1.2 のどちらかにきれいな分離を示すものが多い。

Table 2 H-2 haplotype and Ly-antigens of EAT-regressive or EAT-progressive mice strains.

Chromosome	H-2K	Ia	H-2D	TL	Thy-1	Ly-1	Ly-2	Ly-3	Ly-6A	Ly-6B	Ly-10	Ly-11	Ly-18	Ly-19	Ly-20	Ly-22	Ly-31	Ly-00
	17	17	17	17	9	19	6	6	9	9	19	2	12	4	1	1	1	1
EAT-regressive																		
A/J	k	k	d	a	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2
BALB/cCr	d	d	d	c	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2
C57BL/10Sn	b	b	b	b	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NZB/N	d	d	d	a	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2
SJL/J	s	s	s	a	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2
EAT-progressive																		
AKR/J	k	k	k	b	1	2	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2
C3H/He	k	k	k	b	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2
CBA/J	k	k	k	b	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2
DBA/1J	q	q	q	b	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2
DBA/2Cr	d	d	d	c	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2

他方, ddY-drm と ddY-prg 間の F₁, F₂, ならびに戻し交雑群の EAT 感受性を調べると結果は Table 3のごとくであった. Snell の理論⁴⁾にもとづき感受性遺伝子数を予測すると, F₁×drm については, (0.5)ⁿ=0.28, F₂ については, (0.75)ⁿ=0.72 を満足する n の値として「1~2」が得られる. したがって, 関連する遺伝子数は少ないものと推測される.

III. 養子免疫

まず, ddY-drm と ddY-prg 間での実験結果を示す.

Fig. 2 から分かるように, ddY-drm の脾細胞移入により, 癌抵抗性 (癌休眠特性) が ddY-prg に移入しうることが分かる. 特に, EAT で免疫した ddY-drm の脾細胞の効果が顕著である. この際, 移入した donor 脾細胞の recipient 内運命はまだ追求していないが, recipient の健康状態には大きな変化 (病的と思われる GVHR) は肉眼的に観察されていない.

他方, Table 4 に示すごとく, ddY-drm から H-2 を同じくする他系統マウスへの脾細胞移入を試みたが, これまでのところ, いずれの養子免疫も成功していない⁵⁾.

H-2 が異なる場合はなおさらである. 参考のために, C57BL/6 と, これの athymic マウス (C57BL/6-nu/nu) の間で移入試験を試みると, この際は見事に養子免疫が成立する (ただし, C57BL/6 は, EAT 拒絶的で dormant では無い). 一方で, ddY-drm (H-2^s) と ICR-nu/nu (クローズドコロニー, H-2 は q の頻度が高いが, 全体的に遺伝子型はヘテロ) 間では, recipient が無胸腺であっても, 養子免疫は成立しなかった.

つまり, 以上の結果を要約すると次のようになるだろう.

- 1) EAT に対する養子免疫は, ddY-drm と ddY-prg

Table 3 EAT-susceptibility of [ddY-drm × ddY-prg] hybrids

	ddY-drm	×	ddY-prg
P	0		100
F ₁		0.80(32/40)	
F ₂		0.72(103/144)	
F ₁ ×drm	0.28(14/51)		
F ₁ ×prg			0.89(54/61)

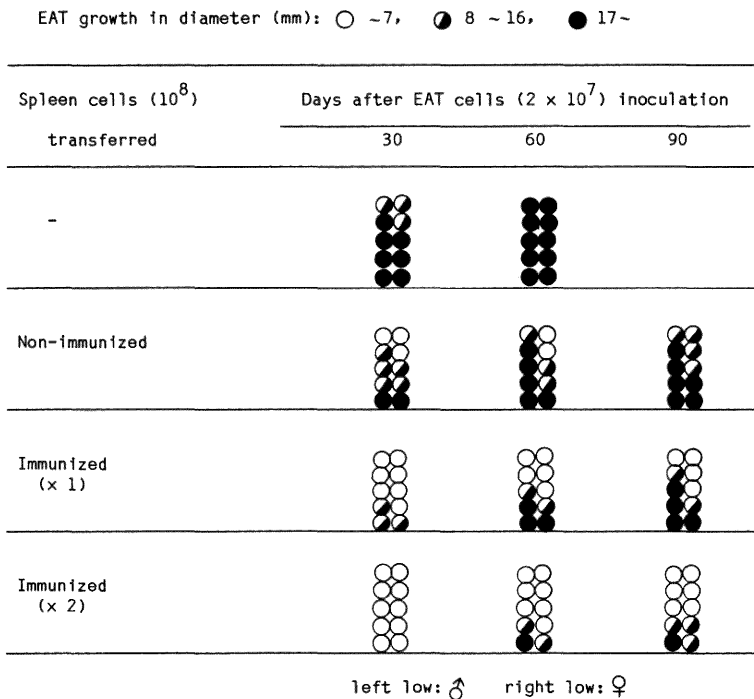


Fig. 2 Passive immune transfer of EAT-dormant disposition from ddY-drm mice to ddY-prg mice

Table 4 Efficiency of adoptive immunotherapy

Donor		Recipient		Suppression of EAT growth
Strain	H-2	Strain	H-2	
ddY-drm	s	ddY-prg	q	+++
		DBA/1	q	-
		ICR	q major	-
		AKR	k	-
		ICR-nu/nu		-
		C57BL/6-nu/nu	b	-
A.SW (congenic)	s	ddY-prg	q	-
C57BL/6	b	C57BL/6-nu/nu	b	+++

Spleen cells (10^8) from donor immunized with 2×10^7 EAT cells ($\times 2$) were transferred intravenously into recipient before EAT (2×10^7) S.C. inoculation. Suppression of EAT growth in recipient was determined at the day 60 after EAT inoculation.

間では H-2 が異なるのに確実に成立する。その要因は今後明らかになるであろう。他の系統間では、このような養子免疫は成立しがたい。

2) athymic マウスを対象にした場合、C57BL/6 と C57BL/6-nu/nu のように、nu 遺伝子以外を同じくするもので、養子免疫が成立する。

おわりに

Tumor-dormancy (癌休眠) の定義は難しいが、我々の実験系では次のような考えを持っている。すなわち、ddY-drm 皮下での EAT の状態は、生体の不完全な(弱い)拒絶反応にもとづく中間像であろう。ただし、癌細胞の分裂と癌細胞壊死のバランスの問題ではなく、組織学的に見ると ddY-drm マウス皮下に移植された EAT の大部分は退行変性像を示しているのに、ごく一部の癌細胞が低分裂頻度で長期間(60日以上)推移し、しかも悪性度を消失していないという現象である。

EAT の頻繁な細胞分裂と細胞壊死の混合像はむしろ ddY-prg の方で顕著であり⁶⁾⁷⁾、この際は、炎症像を伴いながら主に固形癌の中心部から増殖した細胞は次第に壊死、そして繊維化が起り、周辺部では活発な癌細胞分裂を繰り返すといった様相を呈する。結果として、ddY-prg では固型癌は次第に大きくなって行く。

一般に、allogeneic な癌の移植に際しては、強い拒絶にあって早期に癌細胞は壊死・消滅する。だが、細胞膜表面に MHC 遺伝子産物を欠く癌細胞の移植や、何らかの宿主要因が重なってその拒絶が不完全な時、すなわち癌の休眠状態が起り得ると解釈している。それら

要因の一つは、この ddY-drm と ddY-prg マウスの比較研究から新たな情報が得られるかもしれない。

また、当マウス亜系に関する詳細なゲノム分析を進め、もし、養子免疫成立の前提となる遺伝的背景が明らかになれば、H-2 が異なる個体間でも癌に対する養子免疫が成功しうる図式が浮かび上がるはずで、今後の主要な研究課題と考えている。

謝 辞

本研究に際し、新潟大学学術奨励会より多大な研究補助金を、また文部省の科学研究費(No. 01480510, No. 05454687)を頂戴した。稿を借り、心より深謝申し上げる。また、終始、研究をサポートしてくれた加藤明子技術補佐員、忙しい日々のルーチンワークの合間に助力してくれた藤沢信義助手、前田宜俊技官、山本美丘技術補、田代智子事務補に感謝申しあげたい。

参 考 文 献

- 1) Sato, N.L., Fujisawa, N., Kato, A., Maeda, Y. and Yamamoto, Y.: Tumor dormancy and the effect of selected drugs on the tumor-dormant state. *Lab. Anim. Sci.*, **42** (6): 555~560, 1992.
- 2) 佐藤徳光, 加藤明子, 藤沢信義, 山本美丘, 前田宜俊: Tumor-dormancy に関する実験的研究. *新潟医学会雑誌*, **107** (6): 471~478, 1993.
- 3) Sato, N.L., Kato, A. and Fujisawa, N.: Mouse Ly-gene haplotypes and subcutaneous regression

- of Ehrlich ascites tumor. *Exp. Aim.*, **43** (2): 227~233, 1994.
- 4) **Sato, N.L. and Kato, A.**: Passive immune transfer of murine tumor-dormant disposition. *Acta Med. Biol.*, **42** (1): 7~12, 1994.
- 5) **Snell, G.D., Dausset, J. and Nathenson, S.D.**: *Histocompatibility*, Academic Press, New York, 1976.
- 6) **Sato, N.L., Fujimaki, M. and Niimura, S.**: Characterization of tumor-induced inflammation and the effect of some drugs on the increased vascular permeability. *Jpn. J. Pharmacol.* **37**: 31~38, 1985.
- 7) **Sato, N.L., Niimura, S., Fujisawa, N. and Maeda, Y.**: Characterization of vascular permeability-increasing component isolated from solid tumors and effect of highly polymerized dextran sulfate on its activity. *Jpn. J. Pharmacol.* **41**: 163~171, 1986.
-