

## 7) メラノーマと胸腺外分化T細胞

新潟大学医学部医動物学教室 渡部 久実・飯合 恒夫  
安保 徹

## Activation of Extrathymic T cells in Melanoma Transgenic Mice

Hisami WATANABE, Tsuneo IIAI, and Toru ABO

*Department of Immunology, Niigata University School of Medicine*

Extrathymic T cells in mouse liver have TCR of intermediate intensity, contain double-negative CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> cells, and comprise forbidden self-reactive oligoclonal. In the present study, we investigated how such extrathymic T cells were modulated during melanoma development in melanoma transgenic mice. Melanoma appeared in various organ of the transgenic mice at 15 wk of age. Extrathymic T cells with TCR of intermediate intensity increased in the liver, as the tumors advanced. Such cells infiltrated the tumor lesions. In consequence of this study, it was proved that extrathymic T cells in the liver played important roles in tumor immunity.

Key words: Extrathymic T cells, Melanoma transgenic mouse

胸腺外分化T細胞, メラノーマトランスジェニックマウス

## 1. はじめに

T細胞は、胸腺で分化することはよく知られているが、最近胸腺外で分化するT細胞の存在が注目されてきた。我々は、それらが肝類洞で集中的に分化していることをマウスで見だし、その特徴について報告してきた<sup>1)~4)</sup>。この細胞は、胸腺内分化するT細胞と異なり、① CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の double positive のステージがなく CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>の double negative の細胞を含む。② 自己応答性の禁止クローンを多く含む。③ T cell receptor の数が少ない、等の特徴がある。今回、癌の自然発症モデルであるメラノーマトランスジェニックマウスを用い、発癌と胸腺外分化T細胞の関係について調べた。

## 2. 材料と方法

① メラノーマトランスジェニックマウスは、名大、

医、免疫学教室、中島 泉先生、岩本隆司先生より供与していただいた。このマウスは、ret 遺伝子を導入して作成されたマウスで、生後15週程経過すると皮膚、眼、リンパ節など全身にメラノーマを発症してくる<sup>5)</sup>。対照として C56BL/6 マウスを用いた。② エーテル麻酔下にマウスを脱血、屠殺し、肝臓、脾臓、胸腺、腫瘍より単核球を取り出し、それらを各種蛍光抗体で染色しFACScan にて解析した。

## 3. 結 果

## 1) 胸腺外(肝)分化細胞の同定

肝で分化する胸腺外分化T細胞は、T cell receptor の数が、通常のT細胞より少ない。そのため、TCR- $\alpha\beta$  または CD3 抗体で染色した時に、胸腺細胞のいわゆる dull, bright の中間の位置を占める。我々は、この細胞を intermediate T 細胞と名付けた。また、この細胞

Reprint request to: Hisami WATANABE  
Department of Immunology, Niigata  
University School of Medicine,  
Asahimachi-dori 1, Niigata City,  
951, Niigata, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通り1番町  
新潟大学医学部医動物学教室 渡部 久実

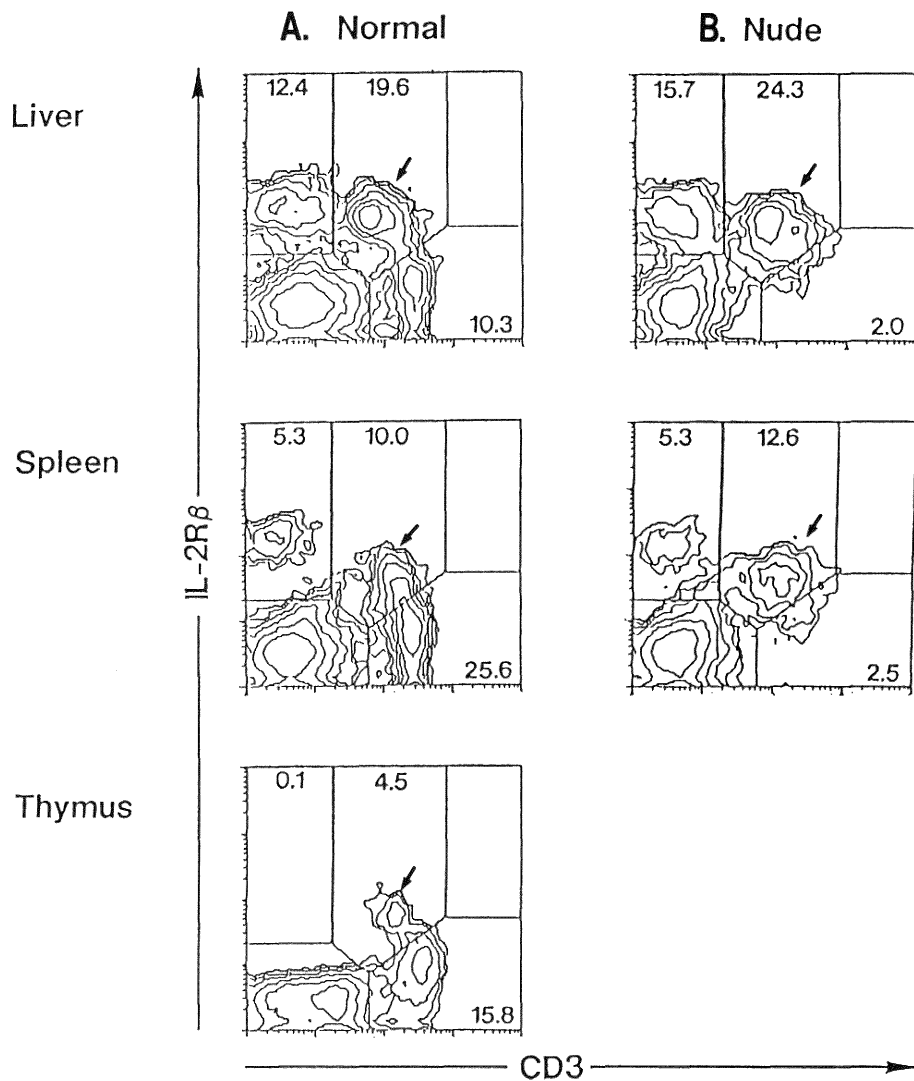


図1 各臓器より取り出した単核球の CD3 と IL-2R $\beta$  抗体による二重染色。

A. normal mouse, B. nude mouse

矢印が intermediate T 細胞である。nude mouse は、intermediate T 細胞しかもたない。

胞は、Interleukin-2 receptor  $\beta$  chain (IL-2R $\beta$ ) を強く発現する。

肝より取り出した単核球を CD3, IL-2R $\beta$  の両抗体で二重染色すると4種類の細胞に分類できる。CD3<sup>bright</sup> IL-2R $\beta$ <sup>-</sup> (胸腺内分化細胞), CD3<sup>intermediate</sup> IL-2R $\beta$ <sup>+</sup> (胸腺外分化細胞), CD3<sup>-</sup> IL-2R $\beta$ <sup>+</sup> (NK 細胞), CD3<sup>-</sup> IL-2R $\beta$ <sup>-</sup> (B細胞) である。この方法で、intermediate T 細胞が容易に同定できるようになった<sup>6)</sup>。脾細胞、胸腺細胞

も少ないながら intermediate T 細胞を含む。これらの細胞は、赤脾髄、胸腺髄質に存在するが、肝で分化したものが移動してきたのか、その場で分化しているのかは現在検討中である。また、先天的に胸腺を欠くヌードマウスは、intermediate T 細胞しか持たない(図1)。

## 2) メラノーマトランスジェニックマウスと胸腺外分化細胞

各週令のメラノーマトランスジェニックマウスの肝臓、

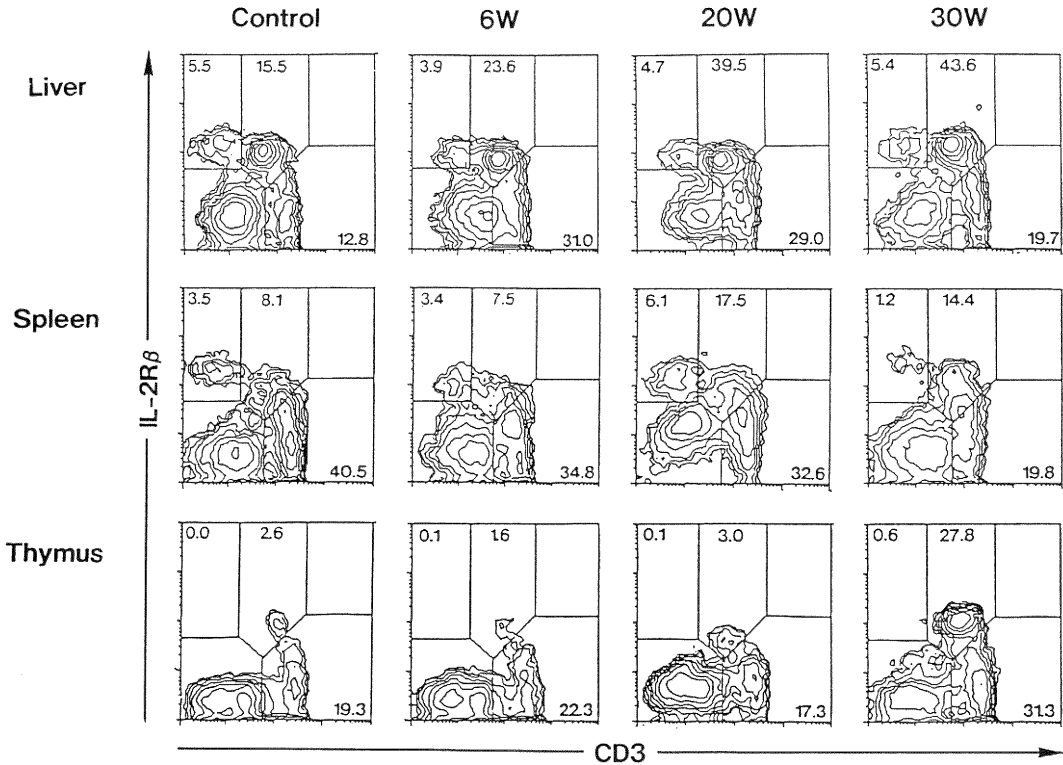


図 2 各週令のメラノマトランスジェニックマウスの単核球の CD3 と IL-2R $\beta$  抗体による二重染色。

発癌するにしたがい、肝臓の intermediate T 細胞の割合は、増加してくる。胸腺でも、末期になると、intermediate T 細胞が、目立ってくる。

脾臓、胸腺より単核球を取り出し、上記の方法で解析した。肝単核球数は、メラノマが発症するに従い増加していった。しかし、末期(40週)にはむしろ減少していた。一方、胸腺細胞数は、癌の進行にともない減少していった。

これらの細胞を、CD3 と IL-2R $\beta$  抗体で二重染色を行うと、肝臓では intermediate T 細胞の割合が増加していった(23.6%→43.6%)。脾臓でも若干の増加が認められた(7.5%→14.4%)。また、癌の進行にともない胸腺皮質は萎縮するが、相対的に intermediate T 細胞が増加した(図 2)。

TIL (tumor infiltrating lymphocyte) を調べてみると、その T 細胞の50%以上が intermediate T 細胞であった。

#### 4. 考察ならびに今後の展望

今回、メラノマトランスジェニックマウスを用いた

実験で、胸腺外分化 T 細胞が腫瘍免疫に大きな役割を示している事がわかった。特に、発癌すると肝臓での T 細胞の胸腺外分化は活性化され、脾臓等の末梢臓器にも出現していた。また、これらの細胞は、腫瘍にも浸潤しており、腫瘍に直接作用していることをうかがわせた。我々は、同系腫瘍をマウスに皮下接種した実験でも同様な結果を得ている。この実験では、同時に腫瘍で免疫したマウスの肝臓と脾臓より取り出した単核球をエフェクターとし、腫瘍細胞に対する細胞障害試験を行なった。その結果、胸腺外分化 T 細胞を多く含む肝単核球は脾単核球よりも強い抗腫瘍活性がある事がわかった。

T 細胞と腫瘍免疫に関しては、今まで数多くの報告があるが、それらは胸腺内分化している T 細胞についての研究である<sup>7)-9)</sup>。元来、胸腺内分化 T 細胞は、系統発生的にも新しく外来抗原を排除するために生まれてきた細胞である。これらの細胞は、自己に反応しないようにその成熟段階で negative selection を受ける。一方、

胸腺外分化T細胞は、胸腺が発生する以前より存在し、より primitive な細胞である。この細胞は、negative selection を受けず、異常自己を認識し排除するための細胞であると考えている。腫瘍は異常自己であり、その認識、排除の中心となるのは胸腺外（肝）分化T細胞であろう。このことは、今回の実験の結果とも一致する。

しかし、TIL には胸腺外分化T細胞と同時に胸腺内分化T細胞も存在するし、また腫瘍免疫したマウスの胸腺内T細胞にも抗腫瘍作用が弱いながらもある。胸腺外分化T細胞と胸腺内分化細胞との相互作用が考えられるが、今後の研究の課題である。

最近、ヒトでも胸腺外分化するT細胞を明らかにしつつある。この細胞は、T cell receptor の他に NK マーカーである CD56 を持っている細胞であり、肝臓や、癌患者の末梢血に多く存在する。

以上の事をさらに発展させていき、胸腺外分化T細胞を、癌の診断や、治療に役立てていきたいと思っている。

### 参 考 文 献

- 1) Abo, T., Ohteki, T., Seki, S., Koyamada, N., Yoshikai, Y., Tsubasuda, T., Rikiishi, H. and Kumagai, K.: The appearance of T cells bearing self-reactive T cell receptor in the livers of mice injected with bacteria. *J. Exp. Med.*, **174**: 417, 1991.
- 2) Ohteki, T., Seki, T., Abo, T. and Kumagai, K.: Liver is a possible site for the proliferation of abnormal CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> double negative lymphocytes in autoimmune MLR lpr-lpr mice. *J. Exp. Med.*, **172**: 7, 1990.
- 3) Seki, S., Abo, T., Masuda, T., Ohteki, T., Kanno, A., Takeda, K., Rikiishi, H. and Kumagai, K.: Identification of activated T cell receptor  $\gamma\delta$  lymphocytes in the liver of tumor bearing hosts. *J. Clin. Invest.*, **86**: 409, 1990.
- 4) Ohteki, T., Abo, T., Seki, S., Kobata, T., Yagita, H., Okumura, K. and Kumagai, K.: Predominant appearance of  $\gamma\delta$  lymphocytes in the liver of mice. *Eur. J. Immun.*, **21**: 1733, 1991.
- 5) Iwamoto, T., Takahashi, M., Itoh, K., Hamatani, M., Ohbayashi, W., Wajjwalku, K., Isobe, I. and Nakashima, I.: Aberrant melanogenesis and melanocytic tumor development in transgenic mice that carry a metallothionein/ret fusion gene. *EMBO J.*, **10**: 3167, 1991.
- 6) Watanabe, H., Ohtsuka, K., Kimura, M., Ikarashi, Y., Ohmori, K., Kusumi, A., Ohteki, T., Seki, S. and Abo, T.: Details of isolation method for hepatic lymphocytes in mice. *J. Immunol. Methods.*, **146**: 145, 1992.
- 7) Sigel, M.M., Lopez, D.M. and Ortiz-Munitz, G.: In vitro immune responses to viral and tumor antigens in murine breast cancer. *Cancer Res.* **36**: 748, 1976.
- 8) Fu, Y., Paul, R.D., Wang, Y. and Lopez, D.M.: Thymic involution and thymocyte phenotypic alteration induced by murine mammary adenocarcinoma. *J. Immunol.* **143**: 4300, 1989.
- 9) North, R.J.: Down regulation of the antitumor immune response. *Adv. Cancer. Res.* **45**: 1, 1985.

司会 ありがとうございます。只今のご演題にご質問、ご意見ございませんでしょうか。どうぞ。

本山 非常に面白いお話で、聞きたいことがたくさんあるんですが、まずひとつ、トランスジェニックマウスのメラノーマでも、肝タイプの T cell が増加して活性化されるということは現象としてわかるのですが、肝で分化するT細胞を活性化するようなものをメラノーマ細胞が出しているような証拠はあるんですか。私、自分の実験で、ヒトの腫瘍で意外とサイトカイン、例えば IL-6 を出しているようなものがあるので、そういうようなことがメラノーマの場合にも、あるのでしょうか。

渡部 メラノーマ細胞が IL-6 を産生するかということでしょうか。

本山 いいえ。IL-6 は単なる例で、T細胞の分化を促すようなサイトカインを出しているかということです。

渡部 肝臓タイプのT細胞がどういうサイトカインを出しているかということは、現在検討中です。肝臓タイプのリンパ球の各種インターロイキンに対する反応性は調べてあります。

本山 いや、そうではなくて、メラノーマ細胞自身が T cell に作用する factor を出している可能性についてです。

渡部 IL-6 以外の、他の factor を出して肝臓のリンパ球が activate されるということですか。それに関しては、具体的なデータは現在のところ持っていません。

本山 先生はさっき、治療に関係してちょっと触れら

れましたけれども、メラノーマがあると増えるわけですね。そして浸潤しているところにあるということは、それは腫瘍に対して対抗するためにそこに行っているのか、それとも親近感をもって行っているのか、これは簡単には言えないと思うんですが。

**安保** 胸腺で分化するリンパ球のほとんどは、自己応答性のものは死滅して出てこないんです。最終的に成熟したリンパ球にどのような性質の違いがあるかという、ほとんど胸腺で分化して出てきたのは外来の抗原と反応するけど自己と反応できない、ところが、肝臓のリンパ球は autoimmune とかいろんな反応で全部、反応するのは自己なんです。結局メラノーマのようにほとんど正常細胞とあまり変わらないようなものが、どのような認識機構でもって自己応答性の胸腺外分化T細胞に認識されて accommodation しているときと、このメラノーマのトランスジェニックマウスはすごい経過が長いんですけどね、そういう経過の長さ、あの細胞の集まりの強さがわかったという、今後先生が疑問のいっぱいあるものを研究していきたい。そういう状況なんです。

**本山** もうひとつよろしいですか。このトランスジェニックマウスでは腫瘍が筋肉内にもできると先程おっしゃいましたけれども、病理で時々見るんですが、軟部の悪性黒色腫、clear cell sarcoma と我々は普通呼ぶんですが、本当にこれはメラノーマかなと病理では思うんですが、そういうものがでるんですか。皮膚にでると同じようなメラノーマがでるんですか。

**渡部** 病理組織像はまだ見ておりませんが、このトランスジェニックマウスを開発した先生方は、すでに報告してあり、一応 S100 抗体等で染色されるということです。

**司会** 最先端の研究をされてこれからということですが、何か他にございませんでしょうか。先生、ひとつだけ。治療ということに関して、ヒトの melanoma を治療するのに、どのようにこれを役立てるのか。腫瘍のところ集まるというのはわかりますが、それを治療に役立てるといえるのはどういうことなのでしょうか。

**安保** 結局、メラノーマは割とリンパ球の浸潤が見られる癌で、メラノーマとグラヴィッツ腫瘍は、TIL や LAK による治療にすごく反応しやすい症例があるので有名なんですよね。ところが、治療してもリンパ球を増やしても、すごく効く例と効かない例、あるいは培養しているとキラー細胞が出なくなる。そういう謎の本質は、この肝臓タイプのリンパ球が偶然入ったのを増殖させているかどうかにかかっているのではないかと。私共は、肝臓

のリンパ球というのは類洞にあって、血清が豊富な培地で培養すると、他の胸腺タイプのリンパ球は grow out してしまうのに、これらは増えてくるような現象をヒトで見つけており、そういう研究にも絶対つながってくると思っております。

**司会** 今後の研究のご発展をお祈りしまして、どうもありがとうございました。それでは長時間になりましたが、最後に本日のシンポジウムの特別講演としまして、神戸大学からわざわざお越し頂きました三嶋教授に、「悪性黒色腫とその前癌症 最新治療概念と今後の展望」ということでご講演して頂こうと思っております、その前に先生のご略歴をご紹介します。昭和4年、広島のお生まれで、29年に広島大学医学部を卒業されました。東大皮膚科大学院に進まれ、36年に医学博士を取られました。その時から米国のウェイン州立大学に留学され、そこで42年まで講師、助教授、準教授を務められ、皮膚科の研究をされてきたわけですが、38歳の若さで和歌山医科大学の皮膚科の教授に就任され、50年からは神戸大学医学部皮膚科の教授に遷られました。そして61年から、これが先生のメインの仕事でございますけども、神戸大学医学部の熱中性子捕足療法特別研究施設の長に併任されまして、メラニンの代謝・形態の最先端の研究とともに、melanoma の治療でも世界的に有名な先生で、本日ぜひともということをお願いしたわけです。実はこの3月31日をもってご退官され、現在は名誉教授になられ、神戸の海星病院の部長、その海星病院研究所の所長をされて、また、三嶋皮膚科学研究所を設立されて今月から所長になっておられます。数々の役職、業績がたくさんありますが、少し一部をご紹介しますと、先生も先程申されたのですが、国際色素細胞学会の理事長をされ、また、米国、スウェーデン、ドイツ、ポーランドなどの皮膚科学会の名誉会員でもいらっしゃいます。私も所属させて頂いてます日本研究皮膚科学会理事長を任せられて、その研究皮膚科学会を非常に発展させて頂いたということがございます。60年には日米合同研究皮膚科学会の事務総長をされ、平成元年には日米欧、三大陸合同の研究皮膚科学会の会頭を務められました。平成6年は、これからでございますが、第6回国際癌熱中性子捕足療法学会の会頭を任せられる予定でございます。いろいろな賞をたくさん受賞されてるのですが、省略させて頂きまして、世界的にトップの方をお呼びして、日本語でご講演を聞けるというのは非常にありがたいことだと思います。三嶋先生、よろしく申し上げます。