

---

---

原 著

---

---

## 腫瘍免疫に対する胸腺外T細胞分化経路の関与

—— 同系腫瘍担癌時の肝内胸腺外分化経路の特異的活性化と  
抗腫瘍活性の検討 ——

新潟大学医学部第一外科 (主任 武藤輝一教授)

大森克利

Association of Extrathymic Pathway of T Cell  
Differentiation with Anti-tumor Immunity  
—— Specific Activation of the Hepatic Extrathymic  
Pathway and Analysis of Anti-tumor Cytotoxicity  
in Mice Bearing with Syngeneic Tumors ——

Katsutoshi OHMORI

*1st Department of Surgery, Niigata  
University School of Medicine, Niigata  
(Director: Prof. Terukazu MUTO)*

The thymus is the major central organ for T cell differentiation in the body. However attention was recently focused on an association of extrathymic T cells with various immune response. The liver is a major site for such extrathymic T cell differentiation. Cumulative evidences revealed that extrathymic T cells in the liver comprise cells with TCR of intermediate intensity and contain autoreactive clones. These extrathymic T cells were activated with aging and under conditions of bacterial stimulation and autoimmune diseases. In the present study, it was investigated how regular T cells were activated in mice injected with viable syngeneic tumors. It was demonstrated that specific activation of extrathymic T cells in the liver and acquisition of anti-tumor cytotoxicity were induced in these mice. The present results suggested that extrathymic T cells played an important role on tumor immunity in the host-defense mechanisms.

---

Key words: Extrathymic T cells, Anti-tumor cytotoxicity, MCA105

胸腺外分化T細胞, 抗腫瘍活性, MCA105

---

Reprint requests to: Katsutoshi OHMORI,  
1st Department of Surgery, 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  
新潟大学医学部第一外科学教室  
大森克利

## 緒 言

胸腺はT細胞分化の主要な場としての最大の免疫担当器官であるが、近年各種の免疫反応時に胸腺外分化T細胞の関与が注目されている。特に最近の研究では胸腺外分化T細胞に自己応答性T細胞が認められることが言われている<sup>1)2)</sup>。これらのうち肝臓は生体における最大の胸腺外分化器官であることがヒトやマウスで報告されている<sup>2)~5)</sup>。この肝臓でのT細胞の分化は肝類洞で集中的に起こっており、マウスではこのT細胞は、 $\gamma \delta$  T細胞が比較的多い、double-negative (DN)  $CD4^- CD8^-$ 細胞が存在する、double-positive (DP)  $CD4^+ CD8^+$ 細胞が存在しない、 $\alpha \beta$  T細胞は膜上の T cell receptor (TCR) の数が比較的少ない intermediate TCR 細胞である<sup>6)</sup>、という特徴を持つ。機能についても加齢<sup>5)</sup>、細胞感染<sup>2)</sup>、自己免疫疾患<sup>3)</sup>時に活性化されること等が次第に明らかになりつつある。その時には胸腺が萎縮していることが多く、T細胞の胸腺と肝類洞での分化は相拮抗していると考えられている。この研究ではさらに担癌時の胸腺と肝内胸腺外分化機能の関与をマウスの腫瘍を用いて調べた。

## 材料と方法

### 1. マウス

C57BL/6 雌マウス 6 週令を日本チャールズリバー(株)

(厚木, 神奈川) より購入し, SPF (specific pathogen-free) にて飼育した。実際には, 8~10週令のものを使用した。

### 2. 腫瘍細胞

C57BL/6 由来で methylcholantrene により化学発癌させた fibrosarcoma である MCA105<sup>7)</sup> を用いた。腫瘍細胞は, 10%ウシ胎児血清 (FCS) 加 RPMI1640 (Gibco 社) 培養液を用いて in vitro で継代維持した。

MCA105 細胞は, C57BL/6 雌マウスの背部皮下に  $1 \times 10^6$  個以上接種する事により 100%の生着率を示した。

### 3. 細胞調整

マウスは, エーテル麻酔し, 腋下動静脈より脱血し屠殺した。肝臓, 脾臓, 胸腺を取り出し, 以下の方法で細胞浮遊液を調整した。肝臓は鉄で細切し, ステンレスメッシュ (200 メッシュ) 上で圧べいすることにより細胞分散を行った。2% FCS 加 Eagle's MEM 培地 (日本製薬株式会社, 東京) に浮遊させ, 2,000 rpm, 10分間で室温で遠心した。得られた cell pellet をこの培地 30 ml に再浮遊させ Ficoll-Isopaque (比重 1.090) に重層し, 2,500 rpm, 30分の比重遠心を行った。培養液と Ficoll-Isopaque の境界より細胞を回収して遠心洗浄を行い, 肝のリンパ球 (mono-nuclear cells) として調整した。この方法では, 肝実質細胞や Kupffer 細胞や肝細胞の混入は, 4%以下に抑えられる<sup>8)</sup>。脾細胞, 胸腺細胞は, 同様にステンレスメッシュ上で細切, 圧べいし,

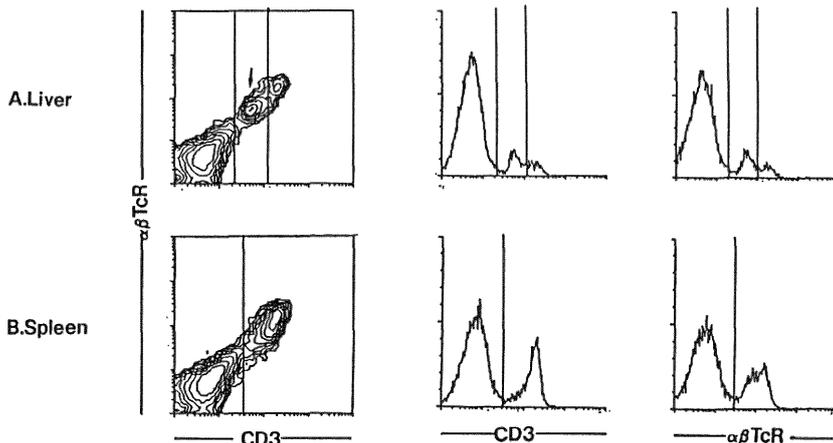


Fig. 1 正常8週令 C57BL/6 雌の A. 肝 MNC と B. 脾リンパ球

TCR  $\alpha \beta$  染色でも CD3 染色でも脾リンパ球は2つの分画に分けられるのに対して, 肝 MNC は3つの分画に分けられる。CD3 と TCR  $\alpha \beta$  の二重染色では, intermediate TCR の分画は, intermediate CD3 の分画と一致する (矢印)。

遠心洗浄を行い調整した。なお、脾細胞は0.83% NH<sub>4</sub>Cl トリス緩衝液にて溶血させて用いた。

4. フローサイトメトリ解析

得られた細胞の染色に用いたモノクローナル抗体 (mAbs) は、FITC 標識抗 TCR- $\alpha\beta$  抗体 (H57-597)<sup>9)</sup>、PE あるいは FITC 標識 CD3 抗体 (145-2C11)<sup>6)</sup>、phycoerythrin (PE) あるいはビオチン標識抗 CD4 抗体 (L3 T4), FITC あるいはビオチン標識抗 CD8 抗体 (Lyt2)., ビオチン標識抗 LFA-1 抗体 (FD448.1)<sup>8)</sup> である。

細胞を TCR- $\alpha\beta$ /CD3, CD3/LFA-1, CD3/CD4+CD8, CD8/CD4, CD3/CD4/CD8 の組み合わせで二重染色あるいは三重染色した細胞を FACSscan (Becton-Dickinson 社) で解析した<sup>8)</sup>。なお、ビオチン標識抗体には、phycoerythrin (PE) 標識アビディンまたは RED 613 標識アビディン (Becton-Dickinson 社) を用いて解

析した。

5. 細胞障害試験

細胞障害試験は、<sup>51</sup>Cr release assay 法を用いた<sup>11)</sup>。あらかじめ、マイトマイシン処理<sup>12)</sup>した MCA105 1×10<sup>7</sup> 個で初回免疫し、1週間後に無処理の同じ腫瘍細胞を 1×10<sup>6</sup> 皮下接種したマウスを5日後に屠殺し、その肝臓、脾臓よりリンパ球を分離して effector cell とした。target cell (MCA105) は、Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (NEN Research Product 社) で標識した。

effector/target (E/T) 比 25:1 から 100:1 までの割合で96穴U底マイクロプレートを用い、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で16時間培養した後、上清中の放射活性をガンマカウンターで測定し、以下の式より% cytotoxicity を計算した。

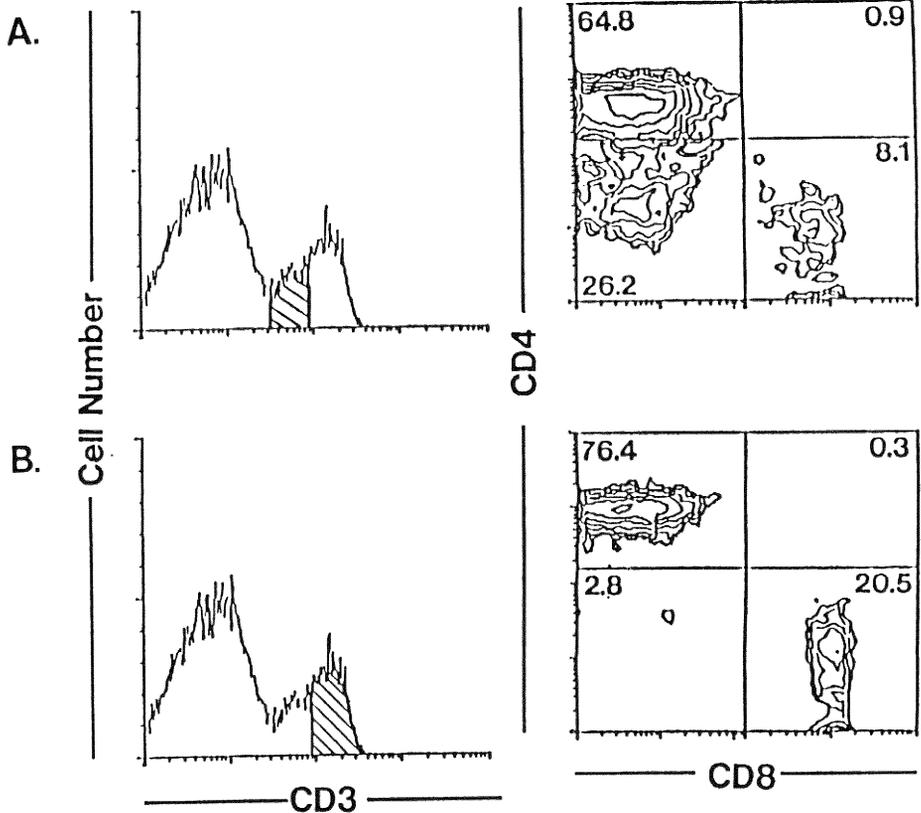


Fig. 2 肝 MNC の CD3/CD4/CD8 三重染色

A. intermediate TCR 細胞は、CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> 細胞、CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> 細胞、CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 細胞からなる。

B. bright TCR 細胞は、CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> 細胞、CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> 細胞からなる。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{(\text{Experimental cpm} - \text{Control cpm})}{\text{Total incorporated cpm} - \text{Spontaneous release cpm}} \times 100$$

## 結 語

### 1. 肝内胸腺外分化 T 細胞の同定

以前より報告<sup>6)</sup>のある肝内固有の胸腺外分化T細胞分画と脾の胸腺由来のT細胞分画を正常8週令 C57BL/6 雌マウスにおいて示した (Fig. 1 矢印で示してある).

TCR- $\alpha\beta$  の発現において肝内の MNC は3つの分画より成り立っていた (Fig. 1-A). 一方脾臓のリンパ球は、2つの分画より成り立っていた. 肝臓の分画には、脾臓で認められる negative, bright positive の分画 (Fig. 1-B) に加え、その発現程度が中間に位置する分画がある (Fig. 1-A). この分画は肝固有の細胞であり、胸腺の未熟な dull TCR- $\alpha\beta$  と成熟した bright-TCR- $\alpha\beta$  細胞の中間の TCR を発現しているため、intermediate TCR 細胞と名付けられている<sup>6)</sup>. CD3 の発現についても同様であった (Fig. 1-A). TCR- $\alpha\beta$  と CD3 の二重染色では、肝内固有の中間型の TCR- $\alpha\beta$  あるいは CD3 を発現している細胞は、同一の分画であることを示した (Fig. 1-A).

CD3, CD4, CD8 の三重染色では、肝の intermediate CD3 を発現する分画は、CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> 細胞 (65%) と CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> 細胞 (8%) の他に、CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 細胞 (double negative 細胞) (26%) を含むことを特徴としており、CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 細胞 (double positive 細胞) は含まれていなかった (Fig. 2-A). 一方、肝の bright CD3 を発現する分画は、脾臓の bright CD3 を発現する分画と同様に、CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> 細胞あるいは CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> 細胞より成り立っていた (Fig. 2-B).

### 2. 担癌時における各臓器の細胞数

C57BL/6 雌マウスに同系腫瘍 MCA105  $1 \times 10^6$  個を背部皮下に接種し、その後60日まで経時的に各臓器から得られる単核細胞数 (MNC) を調べた. 未処理 C57BL/6 雌マウス 1 匹あたりの各臓器の細胞数はそれぞれ以下の通りであった. 肝臓  $1.8 \pm 0.5 \times 10^6$  個, 脾臓  $1.6 \pm 0.5 \times 10^8$  個, 胸腺  $11.5 \pm 2.0 \times 10^7$  個 (Fig. 3).

担癌時には接種後10日位 (早期) にかけて肝内 MNC が増加していた (Fig. 3-A). 一方、接種後30日目以降 (末期) では胸腺細胞数の急速な減少 (Fig. 3-C) を特徴としており胸腺組織も著明に萎縮していた. また脾臓における接種30日目以降 (末期) の細胞数の急速な増加も大きな特徴であったが、その大部分が免疫組織学的に

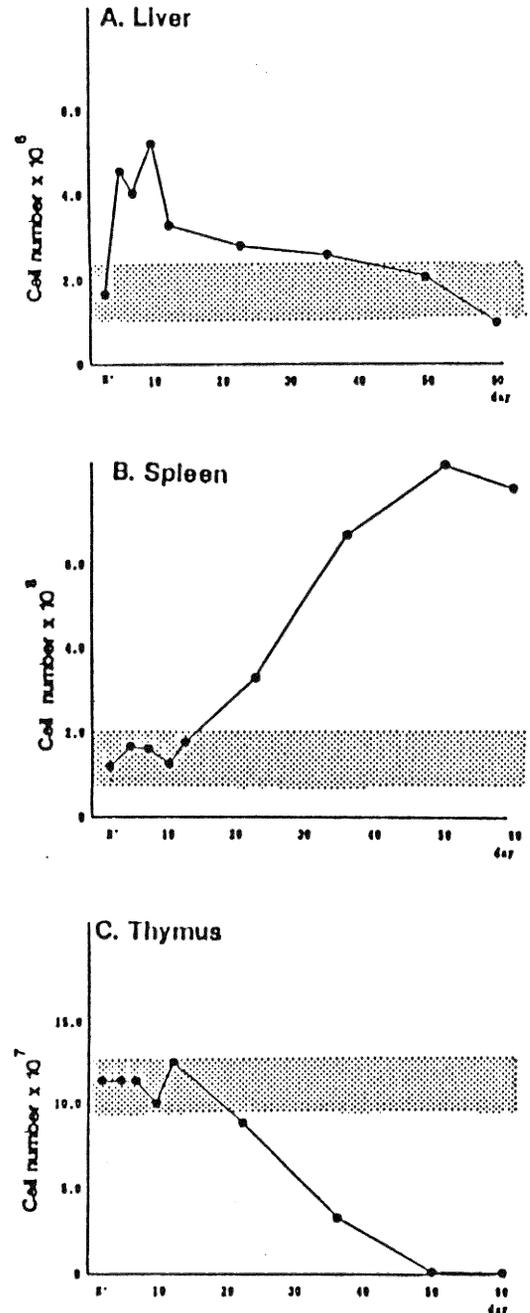


Fig. 3 MCA105  $1 \times 10^6$  接種時の A. 肝 B. 脾 C. 胸腺のリンパ球数の経時的変化  
正常範囲をスクリーントーンで示す.

Mac-1<sup>+</sup> 細胞であることからマクロファージであることが確認された。

3. 担癌時における各臓器のフローサイトメトリーによる解析

肝内 MNC 数の変化が著明に認められた担癌早期の各臓器の MNC 分画を FACScan によって解析した。まず、腫瘍接種後5日目の肝、脾、胸腺のリンパ球の CD3 と LFA-1 の発現を two colour analysis にて調べた (Fig. 4)。CD3 と LFA-1 の two colour analysis では、intermediate TCR 細胞は bright TCR 細胞よ

りも LFA-1 を比較的強く発現しており、bright TCR 細胞とよく区別できる。未処置マウスの肝臓では intermediate TCR 細胞の分画を含めた3つの分画が認められたが (Fig. 4-A)、腫瘍接種5日目には intermediate TCR 細胞分画の比率に特異的な増加が認められた (Fig. 4-B 矢印で示してある)。脾臓についても担癌時にはごく僅かではあるが肝臓の intermediate TCR 細胞分画にあたる intensity の部分に細胞分画の集積が認められた (Fig. 4-B)。一方、胸腺では正常と腫瘍接種後5日目では細胞分画のパターンに大きな変化は認められな

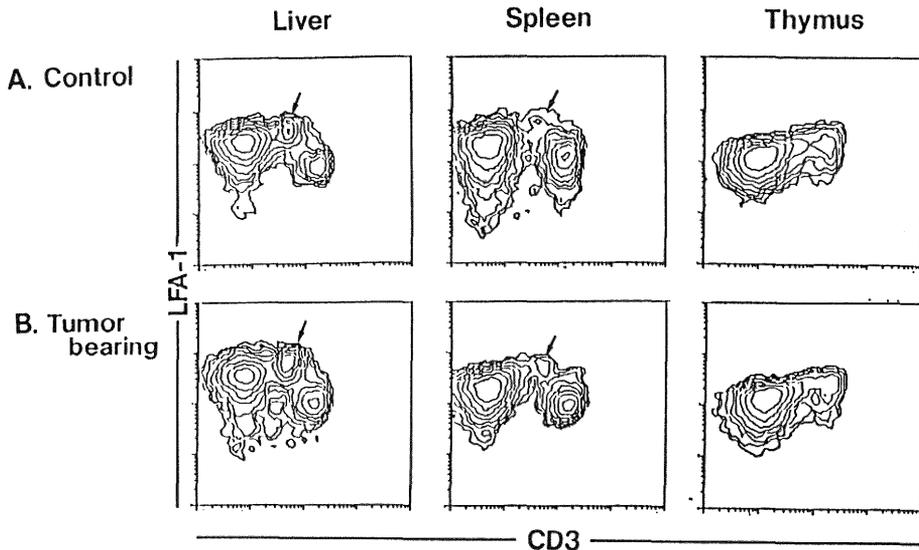


Fig. 4 肝、脾、胸腺のリンパ球の CD3/LFA-1 二重染色

A. 未処置マウス B. MCA105  $1 \times 10^6$  接種5日目のマウス 矢印は、intermediate TCR 細胞である。

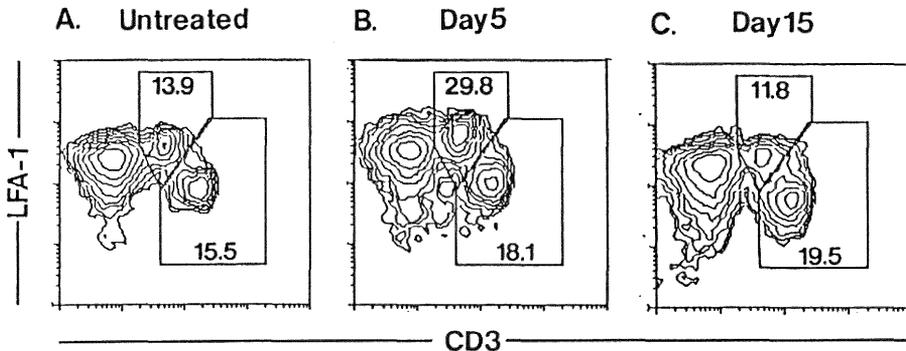


Fig. 5 MCA105  $1 \times 10^6$  接種時の肝 MNC の CD3/LFA-1 二重染色

A. 未処置群 B. 5日目 C. 15日目

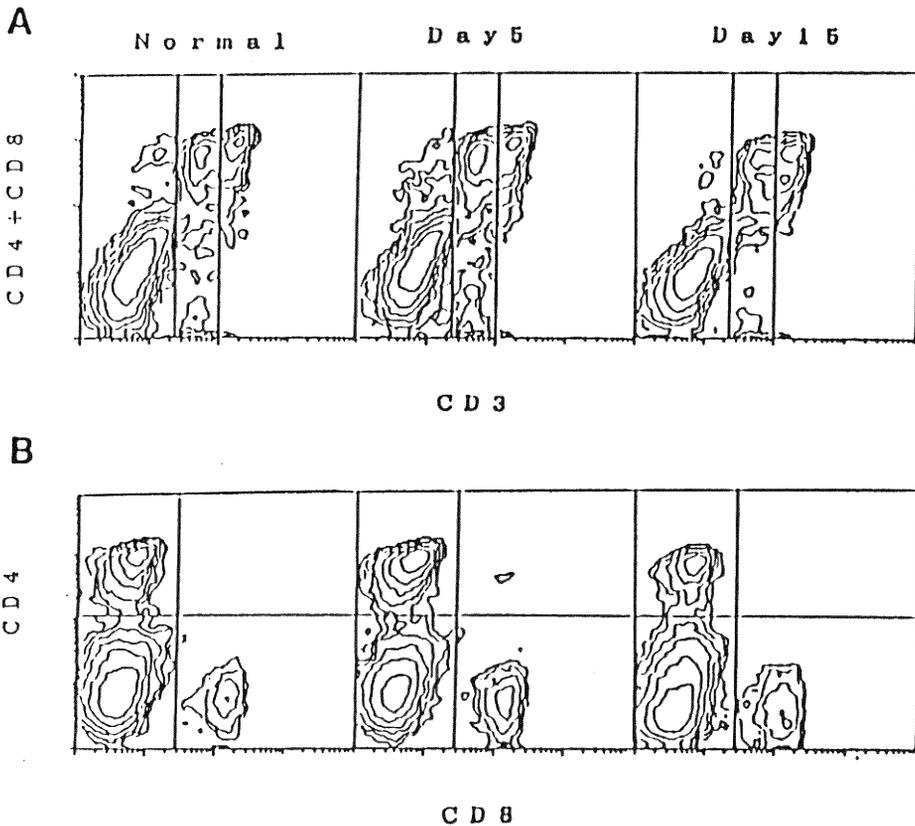


Fig. 6 MCA105  $1 \times 10^6$  接種時の肝 MNC の経時的变化

A. CD3/CD4+CD8 の二重染色

B. CD8/CD4 の二重染色

かった (Fig. 4).

次に、腫瘍接種後の時間経過と肝内T細胞分画の変化については詳細な解析を行った。腫瘍接種後5日目の intermediate TCR 細胞の増加 (13.9→29.8%) は特徴的であったが、この変化は15日目では消失していた (Fig. 5)。

CD3 と CD4+CD8 の two colour analysis では、同様に同系腫瘍接種後5日目の intermediate TCR 細胞分画の増加が認められ、intermediate TCR 細胞の特徴である CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 細胞 (double negative 細胞) の増加も認められた。しかし、15日目ではそのような変化は認められなかった (Fig. 6-A)。

CD8 と CD4 の two colour analysis では、未処置群、腫瘍接種後5日目、15日目の間の CD4/CD8 比に変化はなかった (Fig. 6-B)。

次に、腫瘍接種量と肝内T細胞分画の変化について、

CD3 と LFA-1 の two colour analysis を用いて解析した。接種腫瘍数を  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^7$  個と変化させ、5日後の肝内T細胞分画の変化を調べると、接種腫瘍細胞数が増加するとそれに応じて intermediate TCR 細胞分画が増加していた (Fig. 7)。

#### 4. 肝内 T 細胞の抗腫瘍細胞障害性の検討

上記の結果より同系腫瘍接種時早期には intermediate TCR 細胞分画を主体として肝内T細胞の増加が明らかに認められることから、その機能として特に抗腫瘍活性を検討するために  $^{51}\text{Cr}$  release assay を行った。

未処置 C57BL/6 マウスでは肝内リンパ球、脾リンパ球ともに細胞障害性は見られなかった (Fig. 8-A)。同系腫瘍である MCA105 で免疫を受けた C57BL/6 マウスでは、肝内リンパ球、脾リンパ球とも MCA105 に対する細胞障害性を有していたが、明らかに intermediate TCR 細胞を多く含む肝内リンパ球のほうが強い細胞障

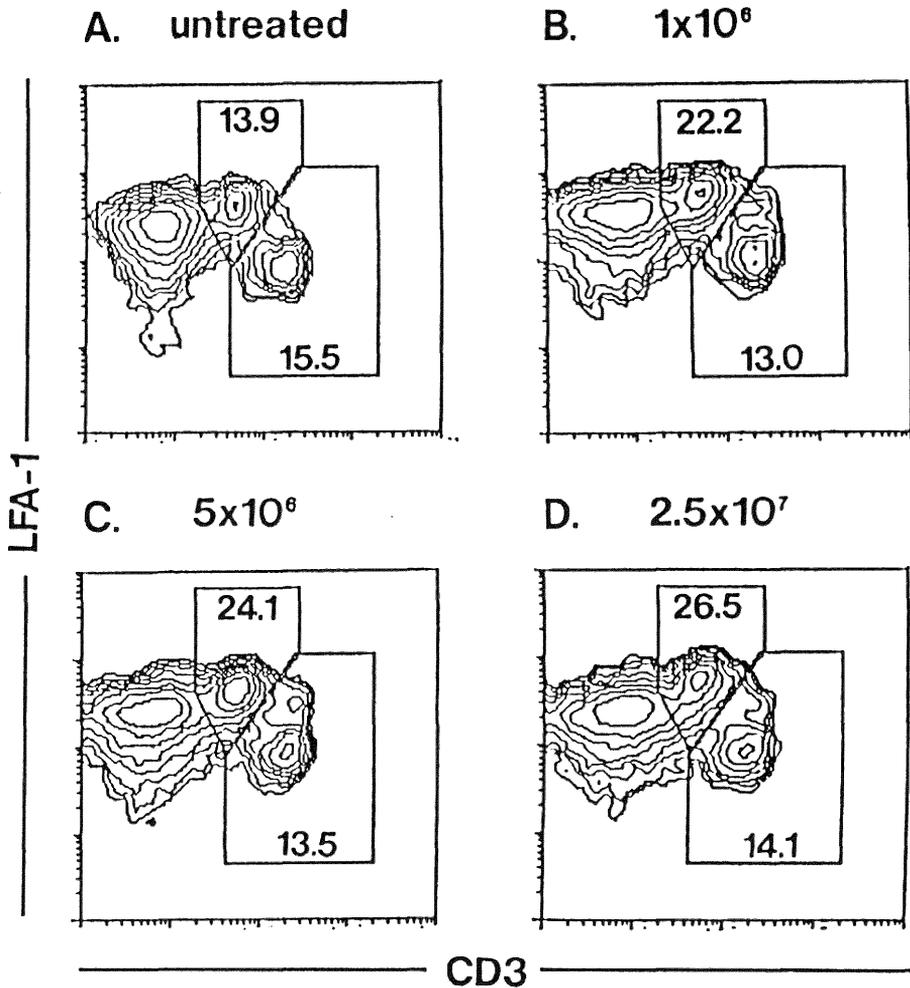


Fig. 7 肝 MNC の CD3/LFA-1 二重染色

A. 未処置群 B. MCA105  $1 \times 10^6$  接種したマウス C. MCA105  $5 \times 10^6$  接種したマウス D. MCA105  $2.5 \times 10^7$  接種したマウス

害性を示した (Fig. 8-B).

### 考 察

胸腺内分化の末梢T細胞の腫瘍免疫への関与については従来から多々報告がある<sup>13)-15)</sup>。一方、近年胸腺外分化T細胞が注目されている。胸腺外分化経路は、自己応答性の禁止クローンをも分化させることが特徴である<sup>1)</sup>。肝臓はその主要な場であり<sup>2)-5)</sup>、マウスではそこで分化するT細胞は intermediate TCR 細胞と報告されている<sup>6)</sup>。

本研究では、この肝臓で分化するT細胞の腫瘍免疫へ

の関与を、マウスに腫瘍を皮下接種し、その経時的変化を見ることで検討した。

同系腫瘍接種時は、その早期において肝での intermediate TCR 細胞の活性化が認められた。これは、その比率でも総数においても増加していた。このことは、腫瘍免疫にはその早期において、bright TCR 腫瘍細胞よりも intermediate TCR 細胞が重要な役割を果たしているということを示唆している。

外来抗原は、胸腺で negative selection を受けた bright TCR 細胞がそれを認識しその除去にあたるが、本実験で、bright TCR 細胞は腫瘍接種時には活性化

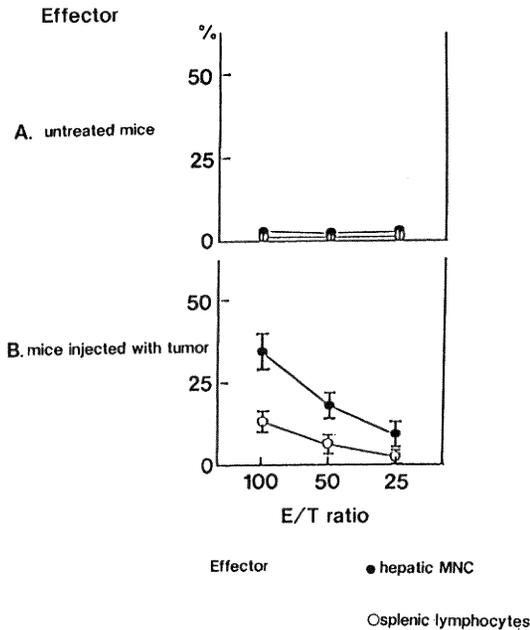


Fig. 8 肝 MNC と脾リンパ球の抗腫瘍活性

target は, MCA105 である。A. 未処置群 B. MCA105 で免疫したマウスの肝 MNC, 脾リンパ球を effector として用いた。●は肝 MNC, ○は脾リンパ球を示す。

されないことが明らかになった。腫瘍を非自己として認めなかったからであろう。一方, intermediate TCR 細胞は, 自己免疫疾患, 加齢時に活性化されることが明らかになっており<sup>3)5)</sup>, 異常自己を認識する細胞である。腫瘍も異常自己として認識され, その初期段階では intermediate TCR 細胞がその排除にあたと考えられた。

今回の研究では, 腫瘍免疫時の肝リンパ球と脾リンパ球の抗腫瘍活性についても調べてみた。同系腫瘍免疫時は, 肝リンパ球の抗腫瘍活性が脾よりも高く, その主要な分画を占める intermediate TCR 細胞の強い抗腫瘍活性をうかがわせた。

経時的変化を追ってみると, intermediate TCR 細胞の活性化は腫瘍接種後中期から末期にかけては認められなかった。末期になるにつれ胸腺は萎縮し, 肝リンパ球の数も減少していった。胸腺の萎縮は, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (double positive) 細胞の accelerated programmed death によるものと報告されているが<sup>11)</sup>, 肝リンパ球については明らかでない。

本研究の結果より, 肝由来の intermediate TCR 細胞が腫瘍早期に抗腫瘍活性を示すことが明らかになった。

その後の研究で, 腫瘍局所に浸潤するリンパ球 (いわゆる tumor infiltrating lymphocytes, TIL) の半数以上が intermediate TCR 細胞であることがわかってきている。以上のことから, 異常自己としての腫瘍細胞の排除には胸腺外分化 T 細胞が重要な役割を果たしていることが推察された。今後, 発癌のメカニズムの解明や癌治療へ応用して行きたいと考えている。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました武藤輝一教授に心から感謝の意を表します。また, 直接御指導をいただいた医動物学教室 安保 徹教授, 渡部久実博士に深く御礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) Murosaki, S., Yoshikai, Y., Ishida, A., Nakamura, T., Matsuzaki, G., Takimoto, H., Yuuki, H. and Nomoto, K.: Failure of T cell receptor V $\beta$  negative selection in murine intestinal intra-epithelial lymphocytes. *Int. Immunol.*, **3**: 1005, 1991.
- 2) Abo, T., Ohteki, T., Seki, S., Koyamada, N., Yoshikai, Y., Masuda, 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.
- 3) Ohteki, T., Seki, S., 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.
- 4) Seki, S., Abo, T., Masuda, T., Ohteki, T., Kanno, A., Takeda, K., Rikiishi, H., Nagura, 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.
- 5) Ohteki, T., Abo, T., Seki, S., Kobata, T., Yagita, H., Okumura, K. and Kumagai, K.: Predominant appearance of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in the liver of mice. *Eur. J. Immunol.*, **21**: 1733, 1991.
- 6) Seki, S., Abo, T., Ohteki, T., Sugiura, K. and Kumagai, K.: Unusual  $\alpha\beta$  T cells expanded

- in autoimmune lpr mice are probably a counterpart of normal T cells in the liver. *J. Immunol.*, **147**: 1214, 1991.
- 7) **Shu, S. and Rosenberg, S.A.**: Adoptive immunotherapy of newly induced murine sarcoma. *Cancer Res.*, **45**: 1657, 1985.
- 8) **Watanabe, H., Ohtsuka, K., Kimura, M., Ikarashi, Y., Ohmori, K., Kusumi, A., Ohteki, T., Seki, S. and Abo, T.**: Details of an isolation method for hepatic lymphocytes in mice. *J. Immunol. Methods*, **146**: 145~154.
- 9) **Kubo, T., Born, R.W., Kappler, J.W., Marrack, P. and Pigeon, M.**: Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine  $\alpha\beta$  T cell receptor. *J. Immunol.*, **142**: 1736, 1989.
- 10) **Abo, T. and Balch, C.M.**: A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol.*, **127**: 1024, 1981.
- 11) **Seki, S., Abo, T., Sugiura, K., Ohteki, T., Kobata, T., Yagita, H., Okumura, K., Rikiishi, H., Masuda, T. and Kumagai, K.**: Reciprocal T cell responses in the liver and thymus of mice injected with syngeneic tumor cells. *Cell. Immunol.*, **137**: 46, 1991.
- 12) **Masuda, T., Ohteki, T., Abo, T., Seki, S., Nose, M., Nagura, H. and Kumagai, K.**: Expansion of the population of double negative  $CD4^- CD8^- \alpha\beta$  T cells in the liver is a common feature of autoimmune mice. *J. Immunol.*, **147**: 2907, 1991.
- 13) **Sigel, M.M., Lopez, D.M. and Ortiz-Muniz, G.**: In vitro immune responses to viral and tumor antigens in murine breast cancer. *Cancer Res.*, **36**: 748, 1976.
- 14) **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.
- 15) **North, R.J.**: Down regulation of the antitumor immune response. *Adv. Cancer. Res.*, **45**: 1, 1985.

(平成4年2月25日受付)