

抗腫瘍免疫応答におけるリンパ球機能分子の分子遺伝学的解析

1. 目的

近年、MHC 拘束性を有するヘルパーT 細胞あるいはキラーT 細胞による抗原提示（標的）細胞の認識とそれに続く活性化過程において、T 細胞抗原レセプター自身が抗原特異性とMHC 拘束性をともに担うことが示されると同時に、T 細胞上の CD2、LFA-1、CD4、CD8 等のリンパ球機能関連抗原（lymphocyte function-associated antigen, LFA）と総称される一群の膜分子が補助分子として重要な役割を果たしていることが示されてきた。一方、NK 細胞、lymphokine-activated killer (LAK) 細胞に代表される MHC 非拘束性のキラー細胞による腫瘍細胞の認識とそれに続く活性化機序については、未だ不明な点が多い。NK 細胞は、腫瘍発生に対する一次的な免疫監視においてその重要性が示されており、また、LAK 細胞は腫瘍の養子免疫療法に広く応用が試みられている。本研究においては、これらの抗腫瘍性を有するキラー細胞による腫瘍の破壊機構を、1) 腫瘍細胞の認識に関わる LFA、2) キラー活性発現に関わるシグナル伝達様式、3) 細胞障害性機序とそれに対する腫瘍の抵抗性、4) 細胞障害性の誘導とその調節機序、を対象として、細胞生物学的あるいは分子生物学的手法を用いて総合的に解明し、より有効な腫瘍の免疫療法を基礎とする。

2. 組織

順天堂大学医学部免疫学教室の研究者を中心に以下の分担で研究を遂行した。

代表	教授	奥村 康 (医博)	モノクローナル抗体を用いたリンパ球機能分子の生物活性の解析
分担	助教授	八木田秀雄 (薬博)	リンパ球機能分子をコードする遺伝子のクローニング
	助手	小端哲二 (医博)	キラー細胞株を用いたリンパ球機能分子のシグナル伝達機序の解析
	助手	中村哲也 (医博)	リンパ球機能分子に対するモノクローナル抗体の作製
	助手	真貝洋一 (医博)	パーフォリン遺伝子のクローニングとパーフォリンに対する腫瘍抵抗性の解析

3. 計画及び材料と方法

- 1) 既に樹立した LAK 細胞株、LAK クローン等を用い、その腫瘍細胞認識に関わる T 細胞受容体の発現を分子生物学的に解析するとともに、他の機能分子の役割を明らかにする。
- 2) 高濃度の IL-2 により、MHC 非拘束性の細胞障害性を獲得した $\alpha\beta$ 型 T 細胞レセプターを有する CTL クローンにおいて、種々の機能分子の発現及びそのシグナル伝達機構の変化の有無を FACS 解析、細胞障害性の抑制、Ca 流入 mRNA レベル等で明らかにする。
- 3) T 細胞受容体を有しない NK 細胞の細胞障害性を活性化しうるモノクローナル抗体を reverse ADCC 法等により、スクリーニングし、NK 細胞の活性化に関わる分子を同定す

る。

- 4) 既に我々によってクローニングされているマウス CD2 遺伝子を利用し、マウス CD2 抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、その NK、LAK 活性の増強あるいは抑制効果を検討することにより、CD2 分子の重要性を明らかにする。
- 5) キラー細胞による腫瘍細胞破壊の最終的なメディエーターと目されているパーフォリンキラー細胞より精製し、perforin に対する腫瘍細胞による抵抗性の違いを明らかにする。
- 6) 精製パーフォリンのアミノ酸分析を行い、その結果から推定されるオリゴヌクレオチドプローブを用いて、パーフォリン遺伝子を単離し、その構造上の特徴を明らかにする。
- 7) 単離したパーフォリン遺伝子の発現システムを樹立し、大量の組み換えパーフォリンを作製する。
- 8) マウス perforin cDNA をプローブとして、ヒト及びラット perforin cDNA をクローニングする。得られたマウス、ヒト、ラット perforin cDNA を発現ベクターを用いた遺伝子移入により真核細胞あるいは大腸菌で発現させ、大量の組み換え体を作製し、それに対する単クローン中和抗体を作製する。単クローン抗体を用いて種々の細胞における perforin の発現調節機序を解析する。
- 9) IL-2、INF- γ 等のリンフォカインあるいは各種の薬物による *in vivo* あるいは *in vitro* でのキラー活性の増強を perforin の発現誘導を指標にし、Northern blotting あるいは免疫染色により検討する。

4. 成果

- 1) キラーT 細胞や NK 細胞の標的との結合に関与する分子 CD2 の役割を、主に我々がクローニングしたマウスの遺伝子と、マウス CD2 に対するモノクローナル抗体を用いて解析した。

CD2 を表現していないハムスターの細胞に CD2 の遺伝子移入を行って、その表面に CD2 を発現させた場合、標的細胞に LFA-3 分子のメッセンジャーの多い細胞、例えば P815 との結合は著しく促進されることが判明した。そしてこの結合は抗 CD2 によって制御を受け、CD2 のライガンドである LFA-3 の標的細胞上での発現がキラーの活性を大きく左右することが明らかになった。

ヒトに比べマウスにおいては、抗 CD2 の有する免疫応答の抑制効果が異なり、例えば少量の ConA や PHA に反応したり、MLR を弱く起こさせたりした場合には CD2 の関与が強いが、反応を大きくした場合は CD2 の関与よりもむしろ LFA-1 分子の関与が著しいことが、マウスを用いた *in vitro* の反応系で明らかにすることができた。同様の現象が、MHC 拘束性のキラーT 細胞でも見られ、マウスにおいては、リンパ球が機能する際の CD2 と LFA-1 の関与の比率がヒトと異なることが明らかになった。

マウスの CTL、NK 細胞の *in vitro* の実験系に、抗 CD2 と同時に抗 LFA-1 を加えてその抑制効果を調べると、いずれのキラー活性も完全に抑制されることはないので、まだ未知の機能分子を介した標的融解過程があることも明らかになった。

CD2 分子の役割をさらに明確にするため、CD2 を欠くキラー細胞株 SPB2.4 を用いて遺伝子移入の実験を行った。特に CD2 分子のキラー細胞活性化の細胞内機序を明らかにす

るため、CD2 遺伝子のうち細胞内に存在する分子をコードするものを欠くものを用い、完全な CD2 遺伝子に移入した場合と比べた。細胞内部位を欠く CD2 遺伝子も、完全な CD2 遺伝子と同様に SPB2.4 の細胞膜上に CD2 を発現させることができた。そして細胞内部位を欠く CD2 遺伝子でも充分 SPB2.4 のキラー活性を増強することが明らかになった。しかし、その増強の程度は完全な CD2 遺伝子に移入したものに比べると 60-70%であり、CD2 分子のキラー細胞内での活性化に関与する役割も明らかになった。また、CD2 の発現は標的との結合効果を増強させることを FACS を用いて明らかにし、この結合効果の増強は抗 CD2 抗体で完全に抑制させうることも明らかにした。

- 2) CD2、LFA-1 は、キラー細胞の活性化のための重要な機能分子であるが、抗 CD2 と抗 LFA-1 で抑制できないキラー活性も存在することが明らかとなり、未知の機能分子でキラー活性に関与するものを明らかにした。特に、キラー抑制効果を有する新しいモノクローナル抗体 (RMV-7) を確立し、その抗体を用いてキラーに関与する新しい膜分子の性状を解析した。その結果 RMV-7 と反応する分子は、マウスのインテグリンファミリーに属する分子で、標的細胞の表面上のファイブロネクチン、フィブリノーゲン、ヴィトロネクチン等、いわゆる細胞外マトリックスと反応することが明らかになった。また、この RMV-7 と反応する分子は、リンパ球を長時間かけて活性化したときに発現してくることも判明し、ヒトの VLA 分子と同等のものであることが明らかになった。そして免疫生化学的解析でも、VLA 分子に特徴的な α 、 β 鎖より成ることも明らかにすることができた。
- 3) 我々がクローニングに成功したマウスパーフォリン (PFP) 遺伝子を用いて、ヒト、ラットの PFP 遺伝子のクローニングとその遺伝子解析を行った。そして、PFP 遺伝子は種を越えてもかなり近似の遺伝子であることが明らかになった。得られた遺伝子を用いて、大腸菌で組み換え PFP を産生させ、その PFP をマウス、ラット等に免疫することによってモノクローナル抗体を作製することに成功した。
- 4) PFP の cDNA、モノクローナル抗 PFP を用いて PFP の産生調節機序を解析した。特に、IL-2 によるキラー活性増強効果は IL-2 による PFP メッセージャーの増量と相関することが明らかになった。リンパ球のうち特に CD8 陽性の T 細胞はその表面の IL-2 レセプター β を介したシグナルにより PFP 産生が増強するが、NK 細胞はすでに大量の PFP を産生しており、特に IL-2 を添加して増強する現象は見られないことや CD4 陽性細胞に PFP を産生させることができないことも明らかとなった。
- 5) ヒト、マウスにおける分化した $\gamma\delta$ T 細胞に PFP を証明し、 $\gamma\delta$ T 細胞の機能を考察するのにキラー細胞としての役割が重要であることも明らかにすることができた。

5. 考察

キラー細胞が標的と結合し、最終的に標的を融解するに至るまでの過程に関与する種々の分子性状が急速に明らかになりつつある。我々は、*in vitro*、*in vivo* での実験系が遂行しやすいマウスのリンパ球機能分子に焦点を当て、解析を進めている。すでに知られている標的との結合に関与する分子 CD2 や、LFA-1 の発現を人為的に変化させ、キラー活性との直接の相関を明らかにすることができた。また、遺伝子移入の実験から、標的とキラーが結合さえすればその後種々の機能分子が相乗的に関与し、いわゆる *alternative* な過程

でキラー細胞が活性化されることも考えられ、未知の機能分子の解明の重要性も示唆された。また本研究において、元来リンパ球の組織へのホーミングや、慢性炎症におけるリンパ球の、膜表面への発現分子として注目されている VLA 分子がリンパ球のキラー活性発現にも関与することが明らかにされ、インテグリンファミリー分子の持つキラー細胞での役割の解析の重要性が今後の課題となることも示唆された。

キラー細胞の融解分子パーフォリンに焦点を当てて、その融解機序を解析してきたが、PFP だけでは説明できないキラー作用、特に CD4 陽性のキラー細胞等も判明し、PFP 以外の標的殺傷分子の解析が今後の研究を進める上で極めて大切であることが示唆された。

6. 発表

本助成を受けて行った癌に関連した研究成果のうち、国際誌に発表した論文リストを別紙に添付した。

1. Yagita, H., Okumura, K., and Nakauchi, H. Molecular cloning of the murine homologue of CD2: Homology of the molecule to its human counterpart T11. *J. Immunol.*, 140: 1321-1326, 1988.
2. Shinkai, Y., Ishikawa, H., Hattori, M. and Okumura, K. Resistance of mouse cytolytic cells to pore-forming protein-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*, 18: 29-33, 1988.
3. Shinkai, Y., Takio, K. and Okumura, K. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature*, 334: 525-527, 1988.
4. Yagita, H., Nakamura, T., Karasuyama, H. and Okumura, K. Monoclonal antibodies specific for murine CD2 reveal its presence on B as well as T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86: 645-649, 1989.
5. Yagita, H., Nakata, M., Azuma, A., Nitta, T., Takeshita, T., Sugamura, K. and Okumura, K. Activation of peripheral blood T cells via the p75 interleukin-2 receptor. *J. Exp. Med.*, 170: 1445-1450, 1989.
6. Nitta, T., Yagita, H., Azuma, T., Sato, K. and Okumura, K. Bispecific F(ab')₂ monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytotoxicity of human T cells. *Eur. J. Immunol.*, 19: 1437-1441, 1989.
7. Nitta, T., Yagita, H., Sato, K. and Okumura, K. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J. Exp. Med.*, 170: 1757-1761, 1989.

8. Ishikawa, H., Shinkai, Y., Yagita, H., Yue, C. C., Henkart, P. A., Sawada, S., young, H. A., Reynolds, C. W. and Okumura, K. Molecular cloning of rat cytolysin. *J. Immunol.*, 143: 3069-3073, 1989.
9. Yagita, H., Asakawa, J., Tansyo, S., Nakamura, T., Habu, S., and Okumura, K. Expression and function of CD2 during murine thymocyte ontogeny. *Eur. J. Immunol.*, 19: 2211-2217, 1989.
10. Nitta, T., Sato, K., Okumura, K. and Ishii, S. Induction of cytotoxicity in human T cells coated with anti-glioma x anti-CD3 bispecific antibody against human glioma cells. *J. Neurosurgery*, 72: 476-481, 1990.
11. Kobata, T., Yagita, H., Matsuda, H., Tansyo, S., Yakura, H., Katagiri, M. and Okumura, K. A novel homodimeric molecule involved in human T cell activation. *J. Immunol.*, 144: 830-835, 1990.
12. Oshimi, K., Shinkai, Y., Okumura, K., Oshimi, Y. and Mizoguchi, H. Perforin gene expression in granular lymphocyte proliferative disorders. *Blood*, 75: 704-708, 1990.
13. Nitta, T., Sato, K., Yagita, H., Okumura, K. and Ishii, S. Preliminary trial of specific targeting therapy against malignant glioma. *Lancet*, 335: 368-371, 1990.
14. Smyth, M. J., Ortaldo, J. R., Shinkai, Y., Yagita, H., Nakata, M., Okumura, K. and Young, H. A. Interleukin-2 induction of pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8⁺ T cell. *J. Exp. Med.*, 171: 1269-1281, 1990.
15. Tadakuma, T., Kizaki, H., Odaka, C., Kubota, R., Ishimura, Y., Yagita, H. and Okumura, K. CD4⁺CD8⁺ thymocytes are susceptible to DNA fragmentation induced by phorbol ester, calcium ionophore and anti-CD3 antibody. *Eur. J. Immunol.*, 20: 779-784, 1990.
16. Kawasaki, A., Shinkai, Y., Kuwana, Y., Furuya, A., Iigo, Y., Hanai, N., Itoh, S., Yagita, H. and Okumura, K. Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *Int. Immunol.*, 2: 677-684, 1990.
17. Kobata, T., Yagita, H., Matsuda, H., Seki, M., Ota, Y. Katagiri, M. and Okumura, K. Expression and function of a 90 kilodalton homodimeric molecule (10D1 antigen)

- on human thymocytes. *J. Immunol.*, 145: 1053-1058, 1990.
18. Smyth, M. J., Ortaldo J. R., Bere, W., Yagita, H., Okumura, K. and Young, H. A. IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *J. Immunol.*, 145: 1159-1166, 1990.
 19. Kobata, T., Shinkai, Y., Iigo, Y., Kawasaki, A., Yagita, H., Ito, S., Shimada, S., Stephen I. Katz and Okumura K. Thy-1 positive dendritic epidermal cells contain a killer protein perforin. *Int. Immunol.*, 2: 1113-1116, 1990.
 20. Eda T. Bloom, Umehara, H., R. Chris Bleackley, Okumura, K., Howard Mostowski and Jane T. Babbitt. Age-related decrement in cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity is associated with decreased levels of mRNA encoded by two CTL-associated serine esterase genes and the perforin gene in mice. *Eur. J. Immunol.*, 20: 2309-2316, 1990.
 21. Nakamura, T., Takahashi, K., Fukazawa, T., Koyanagi, M., Yokoyama, A., Kato, H., Yagita, H. and Okumura, K. Relative contribution of CD2 and LFA-1 to murine T and Natural Killer cell functions. *J. Immunol.*, 145: 3628-3634, 1990.
 22. Takahashi, K., Nakamura, T., Koyanagi, M., Kato, K., Hashimoto, Y., Yagita, H. and Okumura, K. A murine very late activation antigen-like extracellular matrix reseptor involved in CD2-and lymphocyte function-associated antigen-1-independent killer-target cell interaction. *J. Immunol.*, 145: 4371-4379, 1990.
 23. Nakata, M., Smyth, M. J., Norihisa, Y., Kawasaki, A., Shinkai, Y., Okumura, K. and Yagita, H. Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood γ/δ T cells: Implication for their cytotoxic role in vivo. *J. Exp. Med.*, 172: 1877-1880, 1990.
 24. Takayama, H., Shinohara, N., Kawasaki, A., Someya, Y., Hanaoka, S., Kojima, H., Yagita, H., Okumura, K. and Shinkai, Y. Antigen-specific directional target cell lysis by perforin-negative T lymphocyte clones. *Int. Immunol.*, 3: 1149-1156, 1991.
 25. Nakamura, T., Takahashi, K., Koyanagi, M., Yagita, H. and Okumura, K. Activation of a natural killer clone upon target cell binding via CD2. *Eur. J. Immunol.*, 21: 831-834, 1991.

26. Oshimi, K., Seto, T., Oshimi, Y., Masuda, M., Okumura, K. and Yagita, H. Increased lysis of patient CD10-positive leukemic cells by T cells coated with anti-CD3 Fab' antibody cross-linked to anti-CD10 Fab' antibody. *Blood*, 177: 1044-1049, 1991.