

新しい細胞傷害性マクロファージの研究

所属機関 (財) 大阪バイオサイエンス研究所
研究者名 吉田 龍太郎

《研究の概要》

がんは、我が国における死亡原因の第一位である。今迄予想もしなかった作用を持つウイルスによる感染、環境汚染物質、食品添加物や農薬・医薬品など、私達は、日々、発がんに関わりつぎうる環境に暴露されている。そして、今後もその傾向が強くなることが予想されるので、このままでは、発がん率は上昇し続けるだろう。一方、治療はというと、最近では、がんを闘うと言われる放射線科医もおられ、それを討論する新しいセッションが、今年の日本がん学会で設けられたことに象徴される如く、がんは、やっぱり不治の病だとの感が強い。従って、今後数年あるいは、数10年にわたって、がんが、我が国の死亡原因第一位であり続けるだろうと予想される。がんを闘う唯一(?)の強力な武器は、認識と傷害に特異性をもった免疫だと思われるが、残念なことに、がん細胞は、自己/非自己を認識。傷害する免疫監視機構から逸脱したものと考えられている。

がんの治療に於いて、がんを闘うと言われるゆえんは、従来、がんを闘ってきた免疫賦活剤や抗がん剤あるいは感作リンパ球療法などに共通に見られることは、がん細胞を特異的に認識出来ない免疫担当細胞に、無理矢理がん細胞を認識させようとしている点である。従って、共に特異性が欠けるため、正常細胞をも傷害し、強力な副作用が生じる。従って、がんで死亡したのか副作用で死亡したのか判らないこともある。我々は、正常細胞上とがん細胞上の抗原量の差では、副作用が必ず出るので、正常細胞にはなくがん細胞にはある抗原を認識し、がん細胞だけを傷害する免疫監視細胞があるのかどうかを調べた。そして、我々が目的とした細胞を昨年度単離し、その性状を明らかにした。すなわち、我々は、同種異系(アロ)移植がん細胞を直接傷害するエフェクター細胞の中に、種々の同種同系がん細胞を、移植アロがん細胞と同程度に非常に強く(8時間で約70%)傷害する新しい細胞傷害性マクロファージを見つけたのである。本マクロファージは、自己正常細胞を、まったく傷害しなかった。この新しい細胞傷害性マクロファージは、i) 従来の非特異的活性化マクロファージとは異なり、標的細胞の傷害に cell-to-cell contact が必要であり、ii) その傷害機構は、Fas/FasL やパーフォリンとは異なる第3のメカニズムによるものであり、iii) 標的細胞のアポトーシスをひきおこし、傷害する。iv) この細胞傷害活性を阻害するモノクローナル抗体も樹立できたので、近い将来、自己/非自己認識分子の構造や性質が判明するものと期待される。また、これら、in vitro での実験に加え、マウスを用いた in vivo の実験系で、Winn test やがん性腹膜炎の治療モデルも確立した。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
吉田 龍太郎	(財)大阪バイオサイエンス研究所・第4研究部・部長	新しい細胞傷害性マクロファージの分化・誘導機構の解析
滝川 修	(財)大阪バイオサイエンス研究所・第4研究部・研究員	新しい細胞傷害性マクロファージ上の自己/非自己認識受容体の
田中 義正	(財)大阪バイオサイエンス研究所・第4研究部・研究員	新しい細胞傷害性マクロファージのクローン化
横倉 隆和	(財)大阪バイオサイエンス研究所・第4研究部・特別研究員	新しい細胞傷害性マクロファージによる傷害活性を阻害するモノクローナル抗体の樹立
田頭 浩子	(財)大阪バイオサイエンス研究所・第4研究部・特別研究員	新しい細胞傷害性マクロファージによるがん細胞傷害機構の解析
V. V. Verkhusha	(財)大阪バイオサイエンス研究所・第4研究部・特別研究員	新しい細胞傷害性マクロファージの大量培養法の開発
A. Sanchez-Bueno	(財)大阪バイオサイエンス研究所・第4研究部・学術振興会奨励研究員	マウスでのがん治療モデルの確立

研究報告

I 研究目的

がんは我が国における死亡原因の第一位である。ウイルス感染や突然変異などが原因で、正常細胞のがん化を含む altered self 化が、我々の体のいたるところで生じているものと予想され、特に最近では、環境汚染物質、食品添加物や農薬・医薬品など、我々は、日々、これらのがん化促進物質に暴露されている。また、平均寿命の高齢化により、がん患者数は、今後益々増えるであろう。しかし、治療法はと言うと、他の疾患と比べて大きな進展が見られない。がんの治療には、特異性のある免疫を利用することが、最も強力な治療法と考えられるが、一方では、がんが免疫監視機構から逸脱したものと考えられてきたために、免疫以外のがん治療への道を模索しているのが現状である。我々は、がんを免疫で制圧するためには、従来が発想（免疫賦活剤、抗がん剤、感作リンパ球、NK細胞の養子免疫療法など）では限界があり、発想の転換が必要と考えた。すなわち、正常細胞とがん細胞を識別し、がん細胞を傷害する細胞は、通常不活性で、その機能発現のためには活性化が必要であり、担がん患者さんの体内では、その活性化が従来の方法では起こらず、エフェクター細胞が誘導されないのがんが治らないのではないかと。従って、何らかの刺激により、自己正常細胞は傷害せず、がん細胞を特異的に傷害するエフェクター細胞を担がん患者で誘導する方法が見つかれば、がん制圧への道が開けると考えた。そして、その誘導

法を見つけた。その手掛りは、同種異系がん細胞を少量移植すると拒絶排除されるが、比較的少量移植すると、拒絶排除出来ず死亡するという実験事実であった。このとき、移植部に浸潤する細胞は、自己の株化細胞やがん細胞に非常に強い細胞傷害活性を示したが、自己正常細胞には、まったく傷害活性を示さないことが判明した。さらに、その細胞傷害活性が、新しいタイプの細胞傷害性マクロファージによることが示唆されたので、本研究課題では、このマクロファージによるがん細胞の認識・傷害機構と本マクロファージの分化・誘導機構を分子レベルで明らかにすることを目的としている。

II 研究計画及び材料と方法

1 株化細胞やがん細胞に強い細胞傷害活性を示し、自己正常細胞には、まったく細胞傷害活性を示さない新しい細胞傷害性マクロファージの性格づけ

- a. 移植アロがん細胞を傷害するエフェクター細胞が、マクロファージ系細胞であることを確認する目的で、マクロファージ系細胞を *in vivo* で特異的に eliminate する Dichloromethylene Diphosphonate (DMDP) -リポゾームで処理し、実際にマクロファージ系細胞が eliminate されることを脾臓の marginal zone に分布するマクロファージ系細胞の消失で確認すると同時に、移植アロがん細胞が、アロであるにも拘わらず局所で増殖しつづけるか否か？また、移植局所に浸潤する細胞種及び細胞数の変化についても詳細に検討する。
- b. C57BL/6 マウス (主要組織適合性抗原 H-2 のハプロタイプは b: H-2^b) の腹腔内に 3x10⁶ 個の BALB/c マウス (H-2^d) で継代した Meth A 線維肉腫細胞を移植し、移植後 0~8 日に腹腔内細胞を集め、プレート上で 37°C 2 時間 CO₂ インキュベーターで培養し、よく洗滌して、マクロファージ rich 画分を得た。全 RNA は、TRIzol 試薬を加えて回収した。本 RNA を用い、活性化マクロファージのマーカーとして知られる inducible nitric oxide synthase (iNOS)、interleukin-12 (IL-12)、interferon- γ inducing factor (IGIF) の発現が見られるかどうか、それぞれのプライマーを用い PCR で増幅し検討する。また、インターフェロン- γ は、マクロファージの活性化に重要な役割を果たすことが予想されるので、インターフェロン- γ ノックアウトマウスで、それらの発現がどう変化するか親株との結果と比較検討する。
- c. 我々は、最近、新しい細胞傷害性マクロファージに特異的に発現し、常在性マクロファージや炎症マクロファージには発現していない抗原と反応するモノクローナル抗体、K16.5 の樹立に成功した。本抗原の性質を知る目的で、上記 b. で準備した全 RNA より mRNA を合成し、さらに、cDNA ライブラリーを合成した。この cDNA ライブラリーを COS-7 細胞にトランスフェクションし、K16.5 抗体と反応する抗原の発現をパンニング法により増幅、単離し、その構造を明らかにする。
- d. 上記 C. で樹立した K16.5 抗体は、本マクロファージに特異的に反応したが、本マクロファージの細胞傷害活性をまったく阻害しなかった。そこで、新しい細胞傷害性マクロファージの細胞傷害活性を阻害するモノクローナル抗体を樹立する。
- e. 新しい細胞傷害性マクロファージによる細胞傷害機構を明らかにする目的で、従来のマクロファージが、cell-to-cell contact 非依存性に標的細胞を傷害するのに対して、

新しい細胞傷害性マクロファージによる細胞傷害活性も cell-to-cell contact 非依存性かどうか Transwell を用いて検討する。

- f. もし、cell-to-cell contact 依存的に標的細胞を傷害するとき、細胞傷害性 T 細胞の場合は、Fas/FasL 及びパーフォリンで説明されているので、これらの関与があるかどうかを、FasL が不活性化している C3H/HeJ-gld/gld (H-2^k) マウスで新しい細胞傷害性マクロファージが、Meth A 細胞の移植で誘導出来るかどうか？また、パーフォリンの関与については、パーフォリンノックアウトマウスを用い、細胞傷害活性が消失するか否か？更に、これらの傷害機構に細胞内 Ca²⁺が必要かどうかでその傷害機構の区別も可能なので、これらの因子を用い、細胞傷害機構を明らかにする。

2 自己がん細胞及び株化細胞を特異的に認識し傷害する細胞種の同定とがん治療モデル

- a. 移植アロがん細胞移植拒絶時に移植局所に浸潤する細胞の中に、自己がん細胞や、株化細胞に対する非常に強い細胞傷害活性を見出したので、その細胞種を同定する目的で、全浸潤細胞を、T 細胞及び NK 細胞に対する特異抗体及び補体で処理し、細胞傷害活性を持つ細胞種の同定を試みる。
- b. がん治療モデルの確立への第一歩として、a. に於いて、in vitro でのがん細胞傷害に関与する細胞種の同定とその傷害活性を測定した。実際の治療モデルへの次のステップとして、がん細胞と共に、アロ移植腫瘍細胞拒絶部に浸潤する細胞をどれぐらいの細胞数共存させれば、移植自己がん細胞は、増殖・浸潤・転移することなく消失するのか？また、アロ移植細胞は、腫瘍細胞でないと効果がないのか？正常アロ移植細胞ではどうか？それらの膜成分ではどうか？自己正常細胞は効果がないのか？など、Winn assay の系で詳細に検討する。
- c. がん性腹膜炎は、腹腔内臓器のがん患者の terminal stage でよく見られるが、時には、原発巣がはっきりしないで、がん性腹膜炎が起こることもある。特に胃がんや卵巣がんでは、腹壁をつたって浸潤し易い。残念ながら現在のところ、抗がん剤による治療だけが残されているが、まず治癒することはない。我々は、マウスの系で、がん細胞を腹腔内に移植すると、腹腔内で増殖し、周囲へ播種・浸潤後、2 次腫瘍を形成し、30~40 日後に死亡する。ここに、がん細胞と同時あるいは数日後に、Allografted tumor-induced leukocytes を移植し、がん細胞の増殖・播種・浸潤・転移への効果を調べる。

III 研究成果

1 株化細胞やがん細胞に強い細胞傷害活性を示し、自己正常細胞には、まったく細胞傷害活性を示さない新しい細胞傷害性マクロファージの性格づけ

- a. DMDP-リポゾームをマウスに投与すると、脾臓の marginal zone に分布するマクロファージ系細胞は消失した。また、移植局所での DMDP-リポゾーム投与の影響を調べたところ、マクロファージ系細胞数だけが特異的に減少し、他の細胞群、リンパ球や多核白血球の数は相対的に増加した。この条件下で、アロ腫瘍細胞移植部への全浸潤細胞は、移植アロ腫瘍細胞にほとんど傷害活性を示さず、移植腫瘍細胞はアロであるにもかかわらず、移植局所で増殖し続け、ついには、動物を死に至らしめた。以上の結果と T 細胞や NK 細胞をそれぞれの表面抗原に対する特異抗体と補体で特異的に除

去してもほとんどの傷害活性が残った *in vitro* での結果などから、アロ移植腫瘍細胞を傷害するエフェクター細胞は、マクロファージ系細胞であると結論した。

- b. 新しい細胞傷害性マクロファージは、iNOS、IL-12、IGIF を発現しており、一種の活性化マクロファージと考えられる。また、これらの発現には、インターフェロン- γ が必須であり、インターフェロン- γ ノックアウトマウスでは、これらの発現が著しく阻害されることが明らかとなった。そして、従来、マクロファージの活性化には、IGIF が initial signal だと考えられてきたが、インターフェロン- γ ノックアウトマウスで、IGIF の発現が iNOS、IL-12 同様ほとんど見られなかったことから、インターフェロン- γ が initial signal である可能性を示唆している。
- c. K16.5 モノクローナル抗体は、本細胞傷害性マクロファージと特異的に反応するが、常在性マクロファージや炎症マクロファージ、骨髄細胞、胸腺やリンパ節 T 細胞、脾臓細胞とは反応しない。この K16.5 抗原をコードする 2 種類の cDNA の単離に成功し、一方は、Ly6C.2 と完全に一致したが、他方は、Ly6C.2 pre-mRNA であることが判明した。これらの cDNA をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションをやってみると、前述した K16.5 抗体の反応臓器分布と非常によく一致した。Ly6C.2 pre-mRNA を用い、皮フ移植片拒絶部で *in situ* ハイブリダイゼーションしてみると、新しい細胞傷害性マクロファージが移植片拒絶部に大量に浸潤していることが判明した。
- d. 移植アロ腫瘍細胞の拒絶部に 2 種類の細胞傷害活性を持つ細胞が浸潤することが最近判った。移植アロ腫瘍細胞に細胞傷害活性を持つ新しいタイプの細胞傷害性マクロファージと、移植アロ腫瘍細胞上の関連抗原を発現するリンパ芽球を傷害する cytotoxic T 細胞の 2 種類で、前者の浸潤が後者の浸潤より数日先行することが判った。そこで、新しい細胞傷害性マクロファージ上に特異的に発現し、移植アロ腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は阻害するが、リンパ芽球の活性は、阻害しないモノクローナル抗体の樹立を試み、最近その樹立に成功した。現在、その認識分子の性格づけを免疫沈降やウェスタンブロッティングで解析中である。
- e. 従来の活性化マクロファージによるがん細胞などに対する傷害は、活性化マクロファージからの TNF- α や NO などの可溶性因子によって媒介され、従って標的細胞とエフェクター細胞を coculture した時と、Transwell のように標的細胞とエフェクター細胞との間にしきりを設けた時とで、その細胞傷害活性にそれほど変化は認められない。しかし、我々の見出した新しい細胞傷害性マクロファージの場合は、coculture でのみ細胞傷害活性があり、Transwell のように間に細胞は通らないが分子は透過する膜でしきりを作るとまったく傷害活性が認められなかった。このことは、TNF- α に対する抗体や、NO 産生を阻害する N-monomethyl arginine (N-MMA) の添加効果がなかったことから確認された。
- f. FasL が不活性である C3H/HeJ-gld/gld マウスにアロ腫瘍細胞を移植したとき、その親株 (C3H/HeJ) あるいは C57BL/6 マウスにアロ腫瘍細胞を移植して誘導した浸潤細胞と同程度に、アロ腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が認められた。また、我々がアロ腫瘍細胞として用いた Meth A は、Fas 抗原を発現していなかったため、Fas/FasL 系の細胞傷害機構によらないことが明らかとなった。また、本マクロファージによる細胞傷害活性は、パーフォリンノックアウトマウスでも親株 (C67BL/6) とほぼ同様な活性

が認められた。さらに、新しい細胞傷害性マクロファージによるアロ腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は、細胞内 Ca^{2+} に依存し、腫瘍細胞にアポトーシスをひきおこしたが、その傷害機構は、Fas/FasL やパーフォリンとは別の第 3 の分子によって mediate されることが示唆された。しかし、アロ腫瘍細胞と related なリンパ芽球を傷害する cytotoxic T 細胞による細胞傷害活性は、パーフォリンノックアウトマウスではほぼ消失したので、パーフォリンによることが判明した。

2 自己がん細胞及び株化細胞を特異的に認識し、傷害する細胞種の同定とがん治療モデル

- a. 自己がん細胞及び株化細胞を cell-to-cell contact 依存的に傷害するエフェクター細胞は、T 細胞でも NK 細胞でもない、マクロファージ rich な分画の細胞であることが判った。
- b. 新しい細胞傷害性マクロファージは、アロ腫瘍細胞の粗抽出液や膜画分では、誘導されない。アロ腫瘍細胞のみならずアロ正常細胞の移植でも誘導される。従って、自己がん細胞とアロ正常細胞を同時移植し Winn test すると自己がん細胞は、増殖・浸潤・転移することなく消失したが、自己がん細胞と自己正常細胞を同時移植しても、何の変化もなく自己がん細胞は、増殖・浸潤・転移して個体を死に至らしめた。従って、新しい細胞傷害性マクロファージは、非特異的な炎症反応で浸潤するのではなく、cell-mediated immunity によることを示唆している。
- c. Winn test を発展させ、がん性腹膜炎治療モデルを作るために自己がん細胞と共に、新しい細胞傷害性マクロファージや allografted tumor-induced leukocytes を腹腔内に同時あるいは数日後に投与すると、7 匹全例でがん細胞は、播種・浸潤・転移することなく消失し、がん性腹膜炎は治癒した。

IV 考察

従来、がんの免疫療法には、非特異的活性化マクロファージ、がん細胞で感作した cytotoxic T 細胞や lymphokine-activated killer (LAK) 細胞などが用いられてきた。活性化マクロファージからの cytokines や NO などの分泌やいわゆる養子免疫療法は、それぞれに特徴があり、工夫もされてきたが、共通することは、副作用のわりには、あまり効果がないということである。後 2 者では、それぞれのがん細胞に対応した療法が必要であり、臓器や部位によりそのがん細胞の性質が異なること、また、一人のがん患者のがん腫瘍を形成するがん細胞にも herogeneity が見られることなどから、とてつもない手間がかかるという欠点もある。

我々は、がん細胞を特異的に認識出来る細胞を捜し、その誘導機構をあとで考えれば良いという考え方から出発し、新しい細胞傷害マクロファージを見つけた。その誘導機構も見い出したが、現時点では、この傷害機構に cell-to-cell contact が必須であることから、臨床への対応面としては、Winn test 的ながん性腹膜炎への治療モデルしか確立出来ていない。今後は、どこに転移しているかわからないがん細胞を、正常細胞を傷害することなく認識、傷害するために、全身性に且つ、長期間、本マクロファージを誘導する治療方法を開発したい。がんの基礎研究の面からすれば、マクロファージの傷害機構に、cell-

to-cell contact 依存性という新しい機構と、その傷害機構に Fas/FasL、パーフォリンに続く第 3 のメカニズムを提唱出来たし、傷害活性を阻害するモノクローナル抗体が樹立出来たことから、認識分子の単離、精製やその分子をコードする cDNA のクローニングも近い将来可能と考えられる。また、この分子に associate する分子として、前述のパーフォリン、FasL に続く傷害分子の本態も明らかになるかもしれない。これらの分子生物学的な解析結果より、最終的には、がん細胞上のがん細胞特異的分子の本態を明らかに出来るものと信じている。2 年間では、これらの新しいアプローチからの果実をすべて得ることは困難であったが、我々なりに成果はあがったと自負している。

V 研究成果の発表

- 1 R. Yoshida, O. Takikawa, Y. Ushio, N. Yamamoto, and A. Sanchez-Bueno, Recognition of MHC Class I Molecules on Allogeneic Cells as Nonself by a Novel Type of Macrophage., 9th International Congress of Immunology, p.529, 1995
- 2 O. Takikawa, T. Oku, N. Ito, Y. Ushio, N. Yamamoto, Y. Yoneda, J. Tsuji, A. Sanchez-Bueno, V. Verkhusha, and R. Yoshida, Characterization of a Specific Surface Marker of Macrophages Cytotoxic against Allogeneic Cells., 9th International Congress of Immunology, p.531, 1995
- 3 吉田龍太郎、移植片拒絶反応のメカニズム：新しいタイプの細胞傷害性マクロファージによる移植細胞上の MHC クラス分子の自己／非自己認識、日本生体防御学会シンポジウム、第 6 巻、12 頁、1995
- 4 滝川修、奥亨、牛尾由美子、山本直樹、米田幸生、辻淳子、吉田龍太郎、非自己（アロ）細胞傷害性マクロファージに特異的に発現される抗原の cDNA クローニング、日本生化学会大会発表抄録集、第 66 巻、687 頁、1994
- 5 滝川修、奥亨、牛尾由美子、山本直樹、米田幸生、辻淳子、吉田龍太郎、Allograft-induced macrophage に特異的に発現される抗原の cDNA クローニング、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 24 巻、667 頁、1994
- 6 吉田龍太郎、滝川修、牛尾由美子、山本直樹、米田幸生、辻淳子、Allograft-induced macrophage の自己癌細胞に対する強い細胞傷害活性、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 24 巻、673 頁、1994
- 7 牛尾由美子、安井浩明、山本直樹、滝川修、米田幸生、辻淳子、吉田龍太郎、Allograft-induced macrophage (AIM) の誘導機構、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 24 巻、673 頁、1994
- 8 山本直樹、滝川修、牛尾由美子、辻淳子、安井浩明、米田幸生、吉田龍太郎、Allograft-induced macrophage は、同種皮膚移植拒絶反応のエフェクター細胞である、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 24 巻、674 頁、1994
- 9 滝川修、奥亨、牛尾由美子、山本直樹、米田幸生、辻淳子、吉田龍太郎、Allograft-induced macrophage に特異的な表面抗原の性質、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 25 巻、288 頁、1995
- 10 牛尾由美子、山本直樹、吉田龍太郎、細胞傷害性 Allograft-induced macrophage (AIM) 除去による移植アロ腫瘍細胞の非拒絶、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 25 巻、

288 頁、1995

- 11 吉田龍太郎、山本直樹、牛尾由美子、滝川修、A. Sanchez-Bueno、辻淳子、米田幸生、移植アロ腫瘍細胞拒絶時に誘導されるマクロファージ (AIM) 分画のアロ細胞傷害特異性、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 25 巻、289 頁、1995
- 12 A. Sanchez-Bueno, O. Takikawa, Y. Tanaka, V. Verkhusha, N. Yamamoto, Y. Yoneda, H. Tagashira, T. Yokokura, Y. Ushio, J. Tsuji, and R. Yoshida, Induction of nitric oxide synthase in an activated macrophage infiltrating into the transplantation site of an allogeneic tumor cell, 日本免疫学会総会・学術集会記録、第 25 巻、289 頁、1995
- 13 米田幸生、牛尾由美子、山本直樹、滝川修、吉田龍太郎、Allograft-induced macrophage 前駆細胞の活性化機構、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 25 巻、289 頁、1995
- 14 滝川修、刀禰重信、田川陽一、岩倉洋一郎、吉田龍太郎、IFN- γ 欠損マウスにおけるインドールアミン酸素添加酵素活性、日本生化学会大会発表抄録集、第 68 巻、850 頁、1996
- 15 山本直樹、内藤久仁子、栗山学、河田幸道、吉田龍太郎、皮フ移植片拒絶のメカニズム、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 26 巻、208 頁、1996
- 16 A. Sanchez-Bueno, V. Verkhusha, 田中義正、滝川修、吉田龍太郎、移植アロ腫瘍細胞拒絶時に誘導されるマクロファージ (AIM) での IFN- γ 依存性 iNOS、IL-12 及び IGIF の発現、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 26 巻、389 頁、1996
- 17 滝川修、田川陽一、岩倉洋一郎、吉田龍太郎、IL-12 の作用機序：IFN- γ を介したトリプトファン代謝酵素の誘導、日本免疫学会総会・学術集会記録、第 26 巻、134 頁、1996
- 18 H. Yasui, O. Takikawa, T. Oku and R. Yoshida, Induction in IFN- α/β -treated hepatocytes of the inhibition of the multiplication of IFN- α/β -resistant Friend leukemia cells., J. Interferon Res., 14, 245-250, 1994.
- 19 M. Fukui, H. Yasui, K. Watanabe, T. Fujimoto, T. Kakuma, R. Yoshida, M. Ohi and K. Kuno, Hypoxic contraction of contractile interstitial cells isolated from bovine lung., Am. J. Physiol., 270, L962-L972, 1996.
- 20 A. Sanchez-Bueno, R. Yoshida and F. I. Tsuji, Regeneration and luminescence of aequorin in chinese hamster ovary cells transformed with cDNA for apoaequorin., Int. J. Biochem. Cell Biol., 28, 1045-1049, 1996.
- 21 W-G. Yu, N. Yamamoto, H. Takenaka, J. Mu, X-G. Tai, J-P. Zou, M. Ogawa, T. Tsutsui, R. Wijesuria, R. Yoshida, S. Herrmann, H. Fujiwara, and T. Hamaoka, Molecular mechanisms underlying IFN- γ -mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12., Int. Immunol., 8, 855-865, 1996.
- 22 Y. Ushio, N. Yamamoto, A. Sanchez-Bueno, and R. Yoshida, Failure to reject an allografted tumor after elimination of macrophages in mice., Microbiol. Immunol., 40, 489-498, 1996.
- 23 A. Sanchez-Bueno, V. Verkhusha, Y. Tanaka, O. Takikawa, and R. Yoshida,

- Interferon- γ -dependent expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-12, and interferon- γ -inducing factor in macrophages elicited by allografted tumor cells., *Biophys. Res. Commun.*, 224, 555-563.
- 24 O. Takikawa, T. Oku, Y. Ushio, N. Yamamoto, Y. Yoneda, J. Tsuji, A. Sanchez-Bueno, V. Verkhusha, and R. Yoshida, Multiple expression of Ly-6C and accumulation of a Ly-6C pre-mRNA in activated macrophages involved in rejection of an allografted tumor., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 247-253, 1996.
- 25 R. Yoshida, A. Matsuura, K. Einaga, Y. Ushio, N. Yamamoto, and Y. Yoneda, Two distinct populations of primary cytotoxic cells infiltrating into allografted tumor rejection site: Infiltration of macrophages cytotoxic against allografted tumor precedes that of multiple sets of cytotoxic T lymphocytes with distinct specificity to alloantigens., *Microbiol. Immunol.*, In press.
- 26 N. Yamamoto, K. Einaga-Naito, M. Kuriyama, Y. Kawada, and R. Yoshida, Cellular basis of skin allograft rejection in mice: Specific lysis of allogeneic skin components by a macrophage-rich, non-T cell population., Submitted.
- 27 R. Yoshida, A. Sanchez-Bueno, N. Yamamoto, and K. Einaga-Naito, Ca²⁺-dependent, Fas- and perforin-independent apoptotic death of allografted tumor cells by a type of activated macrophage., Submitted.
- 28 Y. Ushio-Umeda, and R. Yoshida, The role of CD4⁺ and CD8⁺ cells in an allografted tumor rejection., Manuscript in preparation.
- 29 R. Yoshida, Y. Ushio, N. Yamamoto, and K. Einaga-Naito, Allograft-induced macrophage are highly cytotoxic against syngeneic tumor cells in vitro and in vivo: A new therapeutic approach to peritonitis carcinomatosa., Manuscript in preparation.
- 30 Y. Yoneda, Y. Ushio, N. Yamamoto, O. Takikawa, and R. Yoshida, Two activation steps are required to generate allograft-induced macrophage: Specific and nonspecific activation., Manuscript in preparation.