

原 著

Biological response modifiers 投与による Interleukin-12 産生誘導と実験的転移抑制

高 橋 基 能

東北大学歯学部口腔外科学第二講座

(指導: 手島貞一名誉教授)

(指導: 熊谷勝男名誉教授)

(兼担主任: 鹿沼晶夫教授)

(平成8年9月12日受付, 平成8年11月11日受理)

Biological response modifiers inhibit experimental metastases and induce interleukin-12 production

Motoyoshi Takahashi

Department of Oral and Maxillofacial Surgery II,

Tohoku University School of Dentistry, Sendai

(Director: Emeritus Prof. Teiichi Teshima)

(Director: Emeritus Prof. Katsuo Kumagai)

(Chief: Prof. Akio Kanuma)

Abstract: Administration of lipopolysaccharide (LPS) to mice activates cells with NK1.1 and intermediate CD3 (NK1.1⁺CD3^{int} cells) and inhibits hepatic metastases of intravenously-injected metastatic lymphoma cells in C57BL/6 mice. These effects are ascribable to the action of interleukin-12 (IL-12) induced by LPS.

Thus, I investigated the effects of ONO-4007, a newly synthesized analogue of lipid A which is main active site of LPS, with respect to inhibition of experimental metastases and the induction of IL-12 and compared these effects with those mediated by other biological response modifiers (BRM), penicillin-killed *Streptococcus pyogenes* (OK-432), and polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C). Administration of ONO-4007 induced increase in NK1.1 expression of NK1.1⁺CD3^{int} cells and acquisition of high cytotoxicity of these cells against NK-resistant targets. Furthermore, OK-432 and polyI:C also induced high cytotoxicity of hepatic mononuclear cells against NK-resistant targets. All of these BRM induced IL-12 mRNA in hepatic mononuclear cells.

These results suggest that systemic administration of the BRMs tested induces cytotoxicity against tumor cells by activating NK1.1⁺CD3^{int} cells or NK cells through the effects of IL-12 produced by Kupffer cells or macrophages.

Key words: biological response modifiers (BRM), Kupffer cells, macrophages, interleukin-12 (IL-12), experimental metastases

緒 言

顎口腔領域も含めた悪性腫瘍の予後を規定する大き

な要因として、原発巣の再発および転移があげられる。近年、再建外科手術の進歩に伴い、原発巣の広範な切除が可能となったことにより、原発巣の再発症例は著

しく減少する傾向にある。一方、顎口腔領域の悪性腫瘍の転移に関しては、所属リンパ節転移の場合、適切な診断に基づいた頸部郭清術を施行することにより、制御できる症例が多い。しかし、肺や肝臓などへの遠隔転移については、制御が困難であり、仮に、遠隔転移が早期に発見されたとしても、予後不良である場合が多い。したがって、現在、顎口腔領域の悪性腫瘍の予後を規定する最大の要因は、遠隔転移であると言える¹⁻⁴⁾。

悪性腫瘍の転移形成は、腫瘍細胞の原発巣からの遊離、基底膜の破壊、間質への浸潤、浸潤組織内の脈管への侵入・移動、遠隔臓器への到達、遠隔臓器での脈管内皮細胞への接着・着床、遠隔臓器組織内への浸潤、および遠隔臓器での増殖という一連の過程を経ると考えられている⁵⁻⁷⁾。さらにこれらの過程において、サイトカイン、接着分子、増殖因子などの関与が報告されている⁸⁾。現在、interleukin-2 (IL-2) や interferon- γ (IFN- γ) や tumor necrosis factor- α (TNF- α) などのサイトカイン投与による、抗腫瘍および抗転移作用が検討されている⁹⁻¹¹⁾。

免疫賦活作用を有し、代表的な biological response modifier (BRM) と言われる lipopolysaccharide (LPS) は、腫瘍に対する治療効果の検討が行われており、近年、TNF- α 、IFN、colony stimulating factor (CSF)、interleukin-12 (IL-12) などのサイトカインの産生を誘導することが報告されている¹²⁾。しかし、LPS は古くから致死毒性、発熱、Shwartzman 反応を惹起する細菌内毒素として知られるため^{13,14)}、LPS の臨床応用は困難とされている。最近では、LPS の毒性を減じた細菌成分製剤の開発が試みられ、活性部位とされる Lipid-A の誘導体が作られ、腫瘍に対する治療効果が検討されている¹⁵⁻¹⁸⁾。

筆者らのグループは、これまでに、IL-12 をマウスに投与すると、肝臓や肺に腫瘍細胞に対し高い細胞障害活性を有するリンパ球を誘導し、同時に腫瘍細胞の肺転移や肝転移を顕著に抑制することを見出ししている¹⁹⁾。また、LPS 投与によっても、IL-12 投与と同様に肝臓に腫瘍細胞に対し高い細胞障害活性を有するリンパ球が誘導されることを見出し、それが TNF- α を介するものではないという知見も得ている²⁰⁾。

このような背景の下に、筆者は、LPS の活性部位とされる Lipid-A の誘導体で、抗腫瘍効果が認められている ONO-4007 や、従来より BRM として用いられてきた OK-432 および polyI:C の効果を検討し、さら

に、それらの作用機序解明を目指して、Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いて BRM による IL-12 の mRNA 発現作用についても解析した。

研究方法

1. 実験動物

C57BL/6, BALB/c, BALB/c-*nu/nu* および C57BL/6-*nu/nu* 系マウス (6~8 週齢, 雄) を使用した。C57BL/6-*nu/nu* 系マウスは、新潟大学医学部医動物免疫学講座の安保徹博士より供与して頂き、他は CLEA Japan より購入した。

各々のマウスには飼料として、ラット・マウス用固形飼料、F-1 (船橋農場, 千葉; カルシウム: 1.26 g, リン: 0.95 g, ビタミン D3: 300 IU/100 g) を与え、飲料水を十分に摂取させながら specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。また、実験動物の取り扱いに関しては、東北大学医学部付属動物実験施設の内規に従い、動物に不必要な苦痛を与えぬように配慮した。

2. BRM と mIL-12 の調製

Escherichia coli 026: B6 より熱フェノール水抽出した LPS を Difco Japan より購入し、生理食塩水で溶解して使用した。ONO-4007 (sodium 2-deoxy-2-[3S-(9-phenylnonayloxy)tetradecanoyl]-amino-3-O-(9-phenylnonanoyl)-D-glucopyranose 4-sulfate) (小野薬品工業株式会社) は、50% エタノールに溶解して 10 mg/ml に調製後、使用直前に 5% グルコース溶液で希釈した。OK-432 (中外製薬株式会社) は *Streptococcus pyogenes* (A 群 3 型) Su 株ペニシリン処理凍結粉末で、生理食塩水で溶解して使用した。polyI:C (生化学工業株式会社) は、生理食塩水で溶解して使用した。マウスリコンビナント IL-12 (mIL-12) は Genetics 研究所 (USA) の小林路子博士より供与された。

3. BRM と mIL-12 の投与量と投与方法

精製 LPS はマウス一匹あたり 2.5 μ g を腹腔内投与した。ONO-4007 は 750 μ g, OK-432 は 50 μ g をそれぞれマウス一匹あたり尾静脈より静脈内投与した。また、polyI:C は 100 μ g, mIL-12 は 0.5 μ g をそれぞれマウス一匹あたり腹腔内投与した。

4. 単核球細胞の調製

マウスの脾臓および肝臓より単核球を採取するため、エーテル麻酔下で腋窩動静脈を切断して脱血死させた後、それぞれの臓器を摘出した。滅菌したガーゼで脾細胞を浮遊化し、1,500 rpm, 5分間遠心したペレットに、Lysing Buffer (0.75% 塩化アンモニウム, 0.21% トリス液 pH 7.65) を加えて赤血球を溶血除去した細胞分画を単核球分画として用いた。肝臓の単核球の調製は、Watanabe ら²¹⁾ や Goossens ら²²⁾ の方法により以下のように行った。肝臓を滅菌した 200 ゲージのステンレスメッシュで断片化後、5% 牛胎児血清 (FCS) 含有 RPMI 1640 培地 (日水製薬株式会社) にて浮遊し、1,800 rpm, 10 分間、4°C の条件で細胞を 2 度洗浄した。ついで同培地で 35% に調製した Percoll 液 (Pharmacia Biotech, Sweden) に洗浄した細胞を再浮遊させ、2,000 rpm, 15 分間、室温で遠心して肝実質と単核球の分画とに分離した。分離した単核球の分画に Lysing Buffer を加えて赤血球を溶血除去し、前述同様に 5% FCS 含有 RPMI 1640 培地で洗浄した。この方法で調製した肝臓の単核球には、クッパー細胞や肝細胞の混入は認められない²³⁾。

5. 免疫蛍光染色

脾臓および肝臓の単核球の細胞表面抗原の変化を検討するため、Fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した抗マウス CD3 モノクローナル抗体 (PharMingen, USA) と、Phycoerythrin (PE) 標識した抗マウス NK1.1 モノクローナル抗体 (PharMingen, USA) を用いた二重染色を行い、蛍光染色細胞は FACSscan (Becton Dickinson, USA) にて解析した。

6. 細胞障害試験

標的細胞としてナチュラルキラー (NK) 非感受性のマウス肥満細胞系細胞株 P815 細胞を使用した。同細胞 3×10^6 個を $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 液 (1 mCi/ml) 0.2 ml に浮遊させ、37°C で 1 時間二酸化炭素培養器に静置後、10% FCS 含有 RPMI 1640 培地で 3 回洗浄して使用した。標的細胞を 96 穴マイクロプレートにて、BRM で刺激したマウスの脾臓単核球または、肝臓単核球と混合した。プレートを 37°C で 4 時間二酸化炭素培養器に静置後、その培養上清中の ^{51}Cr の線量をガンマ線測定器を用いて測定した。細胞障害活性は ^{51}Cr の遊離の割合を percent specific lysis で示し、次の式で計算

した。

$$\text{percent specific lysis} = (a - b / c - b) \times 100$$

ここで、a = effector 細胞 + 標的細胞の上清中の cpm

b = 標的細胞のみの培養上清中の cpm

c = 1N HCl で標的細胞を破壊した後の上清中の cpm

7. 腫瘍細胞の調整

高頻度に肝臓へ転移することが知られている BALB/c 系マウスリンパ腫由来の RL 1 細胞と、C57BL/6 系マウス T 細胞腫由来の EL-4 細胞を用いた²⁴⁾。各々の腫瘍細胞は、37°C の二酸化炭素培養器内で 10% FCS 含有 RPMI 1640 培地にて培養維持した。

8. 腫瘍転移実験

腫瘍細胞を脱 Ca^{2+} , Mg^{2+} リン酸緩衝液 (0.01 M, pH 7.2; PBS と略称) にて遠心洗浄 (800 rpm, 1~2 分) を 3 回行い、 2.5×10^5 個/ml に調製した。調製した腫瘍細胞浮遊液を同系のマウスの尾静脈より 0.2 ml (5×10^4 個) 接種した。腫瘍接種の 2 週間後に臓器を摘出し、Bouin の固定液にて固定後、肉眼的に転移結節数を計数した²⁴⁾。

9. クッパー細胞の調製と RNA の抽出

エーテル麻酔下で脱血致死させたマウスから肝臓を摘出した後、岸江や和気²⁵⁾ の方法に準じてクッパー細胞を調製した。すなわち、摘出した肝臓をハサミで細切し、肝臓一つにつき 1,000 U の Dispase (合同酒精株式会社) を 5 ml 加えて、37°C で 2 時間加温した。その後、酵素処理液を遠心 (500 rpm, 5 分間) して肝細胞除去後、Lysing Buffer を加えて赤血球も除去してクッパー細胞を含む細胞分画を得た。その分画を 10% FCS 含有 RPMI 1640 培地に浮遊させてから、collagen-coated plastic dish (Falcon, USA) に移し、37°C の二酸化炭素培養器に 2 時間静置し、クッパー細胞を主とする付着性の細胞 (adherent cell) と非付着性の細胞 (nonadherent cell) とに分けた。それらを 4 M guanidinium thiocyanate 溶液中に回収後、超音波ホモジナイザーでホモジナイズし、AGPC 法²⁶⁾ で RNA を抽出した。

10. IL-12 の mRNA の検索

RNA を 10 U の RAV-2 reverse transcriptase (宝酒造株式会社) と 0.1 nmol の oligo (dT) primer (Promega, USA) を用いて, complementary DNA (cDNA) に逆転写 (reverse transcription: RT) した。その後, 1.25 U の Taq DNA polymerase (宝酒造株式会社) とマウス IL-12 の mRNA に対するプライマーを用い, 逆転写により得られた cDNA を鋳型として, polymerase chain reaction (PCR) を行った。増幅には thermal cycler を用い, 条件は 94°C での熱変性を 1 分間, 60°C でのアニーリングを 1 分間, 72°C での DNA 合成を 1 分間にし, これを 1 サイクルとして 35 サイクル行った。増幅後は, 1.5% のアガロースゲルを用いて電気泳動し, エチジウムブロマイドで発色させて IL-12 の mRNA の発現を検討した。なお, 総 RNA を確認するため, 対照としてマウスの house keeping gene である β -actin (Clontech, USA) を用いた。

合成プライマーの配列を以下に示す。

マウス IL-12 p 35

sense ; 5'-GGCTACTAGAGAGACTTCTT-
CC-3'

antisense ; 5'-GTGAAGCAGGATGCAGAG-
CTTC-3'

マウス IL-12 p 40

sense ; 5'-CGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG-
3'

antisense ; 5'-CTTCATCTGCAAGTTCTTG-
GGC-3'

11. 統計処理

得られたデータは, means \pm SD で表示した。また, 各群間有意差検定は, 分散の F 検定を行い, 等分散である場合には Student-t-test を用い, 等分散でない場合には Welch-t-test を用い, $p < 0.001$ をもって有意とした。

結 果

1. ONO-4007 前投与による肝転移の抑制

腫瘍細胞の接種 24 時間前に, IL-12 を投与すると,

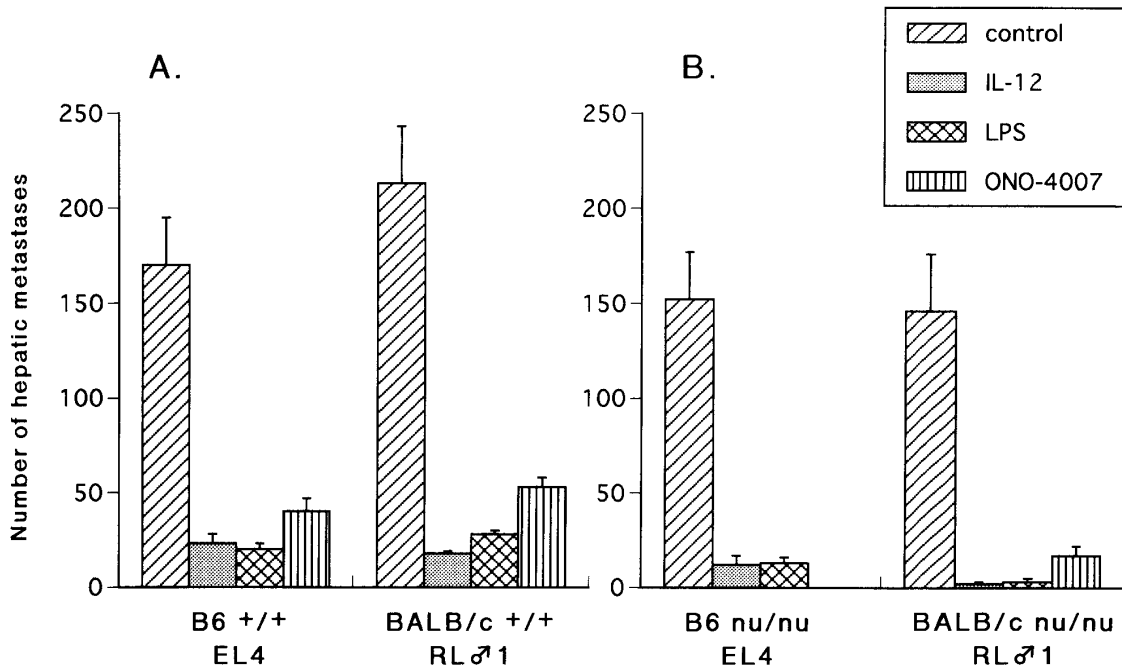


図 1 ONO-4007 前投与による腫瘍転移の抑制

腫瘍接種 1 日前に 0.5 μ g の mIL-12 を腹腔内投与または 2.5 μ g の LPS を腹腔内投与した。腫瘍接種 3 日前と 1 日前に 750 μ g ずつの ONO-4007 を尾静脈より投与した。腫瘍細胞 5×10^4 個を同系マウスの尾静脈より接種し, 接種後 14 日目に肝臓を摘出・Bouins 溶液で固定後, 転移結節を計数化した。A, euthymic mice での転移結節数。B, athymic mice での転移結節数。結果は, それぞれ 5 匹のマウスを用いたもので, 平均値 (means) と標準偏差 (SD) で示す。

肝転移が著しく抑制される¹⁹⁾。そこで、抗腫瘍効果のある LPS と ONO-4007 の効果を検討した (図 1)。その結果、IL-12 と同様に、LPS および ONO-4007 を前投与することにより、いずれの実験系においても、腫瘍細胞の肝転移が著明に抑制された。また、IL-12, LPS, ONO-4007 を前投与したマウスの転移結節数は、コントロールに比べて統計学的に有意に減少していた ($p < 0.001$)。

2. ONO-4007 投与による NK1.1⁺CD3^{int} 細胞の変化

IL-12 および LPS 投与により、肝臓の単核球のうち、NK1.1 positive, CD3 intermediate の細胞群 (NK1.1⁺CD3^{int}細胞と略称, 図 2 の ↓) から NK マーカーの発現が増強された NK1.1 high, CD3 intermediate の細胞群 (NK1.1^HCD3^{int}細胞と略称, 図 2 の ↓↓) が誘導されることが、報告されている^{19,20)}。そこで、ONO-4007 を投与した C57BL/6 マウスの肝臓と脾臓の単核球の表面マーカーの変化を検討した (図 2)。その結果、肝臓において、IL-12 および LPS 投与時と同様に ONO-4007 でも NK1.1^HCD3^{int} 細胞 (図 2 の ↓↓) の誘導を認めたが、脾臓では IL-12, LPS と同様に変化は認められなかった。

3. ONO-4007 投与による細胞障害活性試験

IL-12 および LPS 投与マウスでは、肝臓において NK1.1^HCD3^{int} 細胞が出現するとともに腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強が認められている^{19,20)}。そこで、細胞障害活性の測定を ONO-4007 を投与した C57BL/6 マウスの肝臓と脾臓の単核球でも行った (表 1)。その結果、肝臓において、IL-12 および LPS 投与群と同様に腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強が得られたが、脾臓での活性は肝臓に比べて低かった。従って、肝臓での NK1.1^HCD3^{int} 細胞の出現と細胞障害活性の上昇との間に、重要な関わりのあることが強く示唆された。

4. ONO-4007 投与による IL-12 産生誘導の検討

ONO-4007 投与による細胞表面マーカーの変化ならびに腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強は IL-12 投与によるものと非常に類似している。IL-12 産生細胞としては B 細胞やマクロファージが知られている^{27,28)}。さらに、LPS 投与により B 細胞の IL-12 の産生誘導が報告されている²⁹⁾。従って、NK1.1^HCD3^{int} 細胞の出現と腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強には、IL-12 を介する経路の関与が予想される。そこで、ONO-4007 を投与した C57BL/6 マウスの肝臓より採

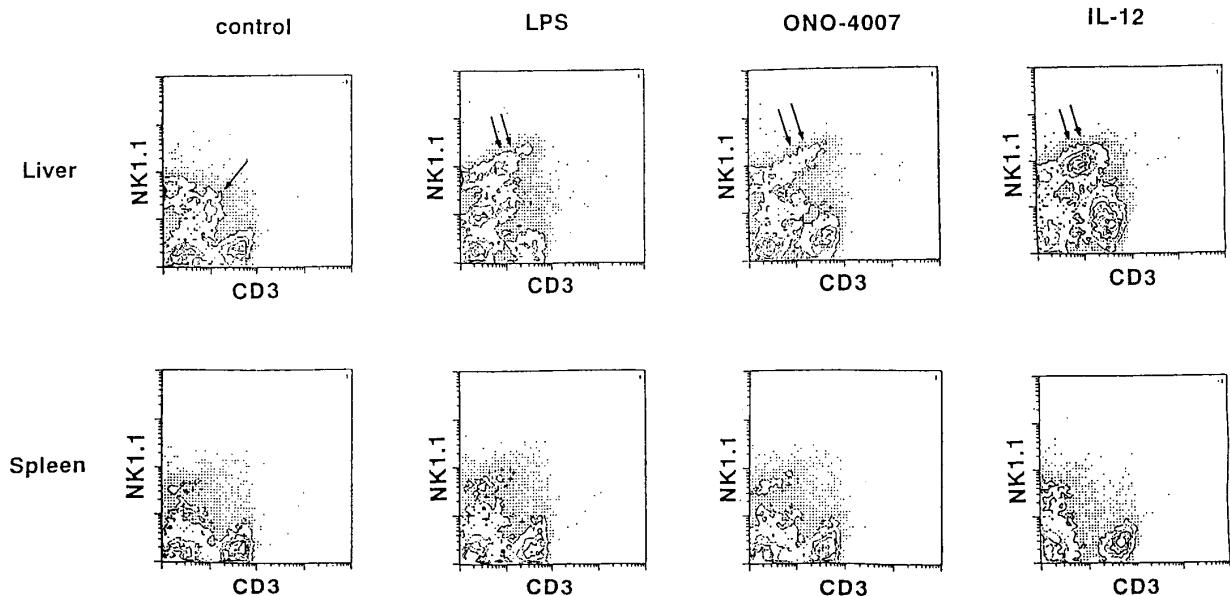


図 2 ONO-4007 投与マウスの肝臓および脾臓のリンパ球の変化
C57BL/6 マウスに 0.5 μ g の mIL-12 を腹腔内投与, 2.5 μ g の LPS を腹腔内投与, または 750 μ g の ONO-4007 を静脈内投与した。24 時間後, 肝臓と脾臓について CD3 (FITC) と NK1.1 (PE) の二重染色のパターンを比較した。↓は NK1.1⁺CD3^{int} 細胞, ↓↓は NK1.1^HCD3^{int} 細胞。

表1 ONO-4007 投与マウスの肝臓および脾臓の細胞障害活性

Organ	Treatment	% Cytotoxicity at different E/T ratio		
		50:1	25:1	12.5:1
Liver	PBS (-)	6.2±1.8	4.0±0.2	1.9±0.9
	IL-12	22.7±0.8	16.3±0.7	9.6±1.5
	LPS	25.4±3.6	17.8±2.9	11.2±1.3
	ONO-4007	29.8±5.2	21.3±2.3	16.6±1.4
Spleen	PBS (-)	2.4±1.5	0.7±0.4	0.1±0.2
	IL-12	5.2±1.3	3.2±0.3	2.1±0.3
	LSP	4.6±1.5	2.6±0.8	0.4±0.4
	ONO-4007	4.3±4.9	0.2±0.2	0

means±SD

C57BL/6 マウスに 0.5 μ g の mL-12 を腹腔内投与, 2.5 μ g の LPS を腹腔内投与, または 750 μ g の ONO-4007 を静脈内投与し, 24 時間後の肝臓と脾臓について細胞障害活性試験を行った。標的細胞として P815 細胞を用い, 51 Cr 遊離法で 4 時間の障害活性を測定した。なお, E/T ratio とは effector 細胞と標的細胞との比である。

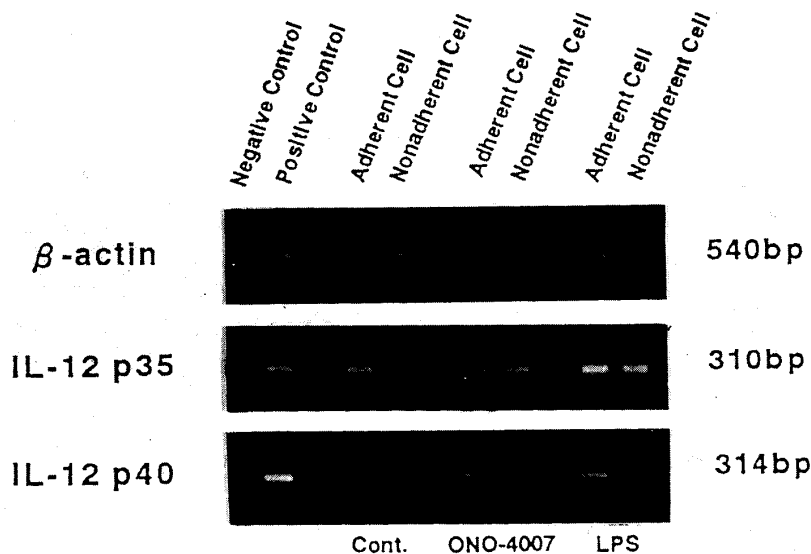


図3 LPS 投与および ONO-4007 投与マウスの肝臓付着性細胞での IL-12 mRNA の発現
C57BL/6 マウスに 2.5 μ g の LPS を腹腔内投与, または 750 μ g の ONO-4007 を静脈内投与し, 6 時間後に肝臓を摘出した。肝臓の細胞をプラスチック付着性細胞と非付着性細胞とに分離し, RNA を抽出した。RT-PCR により, 増幅された DNA を電気泳動した。また, IL-12 の positive control として ConA で 24 時間培養した脾臓のリンパ球の mRNA を用いた³⁴⁾。negative control は逆転写反応を行わなかった RNA を PCR の鋳型としたものである。

取したクッパー細胞の分画で IL-12 の mRNA が検出されるかどうかを RT-PCR 法により検討した。IL-12 は, 分子量約 70 kD の糖蛋白で, 互いに相同性のない分子量 35 kD (p 35) と 40 kD (p 40) の 2 つのサブユニットからなる異型二量体である。従って, p 35 と p

40 の両方の mRNA の発現が活性型 IL-12 の産生には必要である^{27,28,30-32)}。図 3 に示すように, ONO-4007 は, 投与 2~3 時間以後においてクッパー細胞の分画に p 35 と p 40 の発現をもたらした (図には投与 6 時間後の結果を示した)。

表2 OK-432 投与および polyI:C 投与マウスの肝臓と脾臓の細胞障害活性

Organ	Treatment	% Cytotoxicity at different E/T ratio		
		50:1	25:1	12.5:1
Liver	PBS (-)	6.2±1.8	4.0±0.2	1.9±0.9
	IL-12	22.7±0.8	16.3±0.7	9.6±1.5
	OP-432	27.1±1.1	20.1±2.1	14.8±0.4
	polyI:C	24.6±2.8	16.3±1.7	11.9±0.9
Spleen	PBS (-)	2.4±1.5	0.7±0.4	0.1±0.2
	IL-12	5.2±1.3	3.2±0.3	2.1±0.3
	OK-432	5.9±1.8	3.5±0.5	0.8±0.2
	polyI:C	3.3±1.5	2.2±0.6	0.5±0.4

means±SD

C57BL/6 マウスに 50 μg の OK-432 を静脈内投与, または 100 μg の polyI:C を腹腔内投与し, 24 時間後の肝臓と脾臓について細胞障害活性試験を行った。標的細胞として P815 細胞を用い, ⁵¹Cr 遊離法で 4 時間の障害活性を測定した。なお, E/T ratio とは effector 細胞と標的細胞との比である。

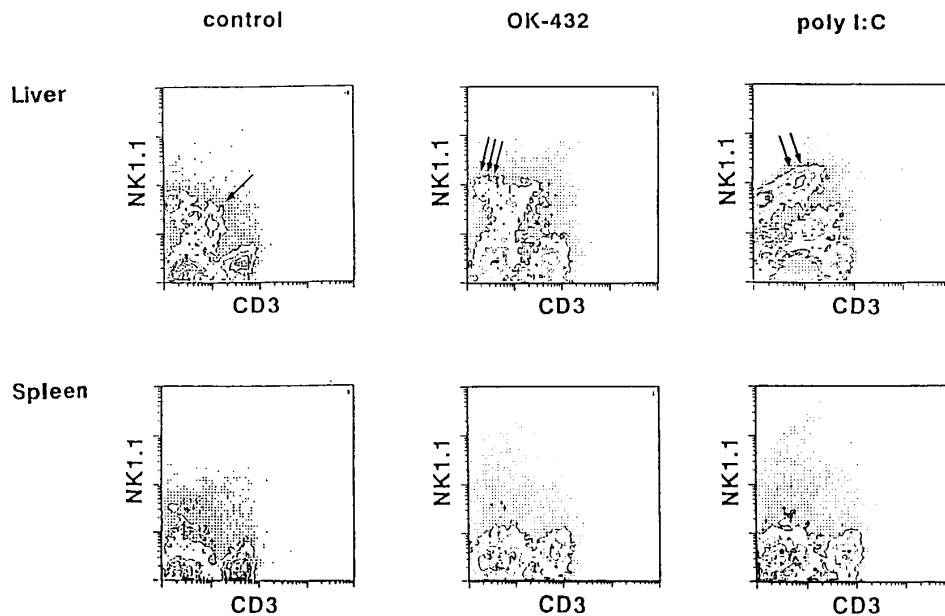


図4 OK-432 投与および polyI:C 投与マウスの肝臓および脾臓のリンパ球の変化

C57BL/6 マウスに 50 μg の OK-432 を静脈内投与, または 100 μg の polyI:C を腹腔内投与した。24 時間後, 肝臓と脾臓について CD3 (FITC) と NK1.1 (PE) の二重染色のパターンを比較した。↓は NK1.1⁺CD3^{int} 細胞, ↓↓は NK1.1^hCD3^{int} 細胞, ↓↓↓は NK 細胞。

5. OK-432 および polyI:C 投与による細胞障害活性試験

ONO-4007 以外の BRM においても肝臓の単核球で腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強が認められる

かどうかを検討した (表 2)。その結果, OK-432 および polyI:C にも肝臓由来の単核球による腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強が認められた。そこで, これら BRM についても細胞表面マーカーの変化を検討した (図 4)。polyI:C 投与では NK1.1^hCD3^{int} 細胞 (図

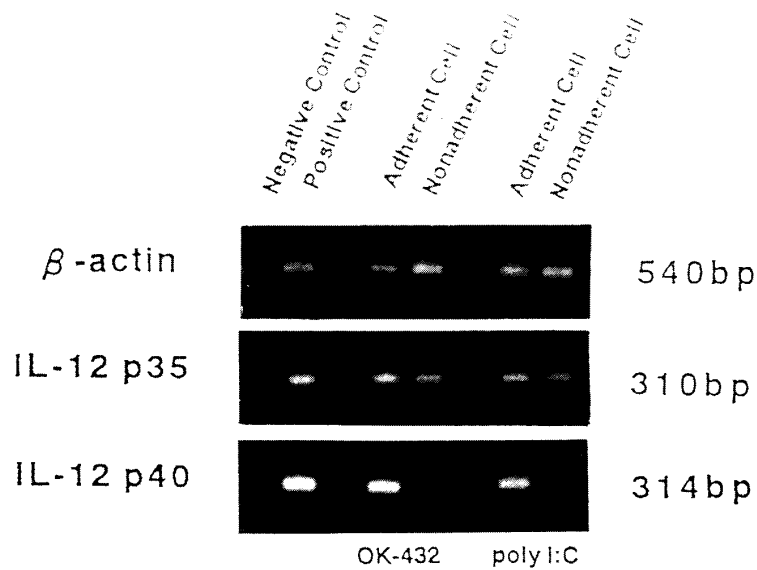


図5 OK-432 投与および polyI:C 投与マウスの肝臓付着性細胞での IL-12 mRNA の発現
C57BL/6 マウスに 50 μ g の OK-432 を静脈内投与, 100 μ g の polyI:C を腹腔内投与し, 6 時間後に肝臓を摘出した。肝臓の細胞をプラスチック付着性細胞と非付着性細胞とに分離し, RNA を抽出した。RT-PCR により, 増幅された DNA を電気泳動した。また, IL-12 の positive control として ConA で 24 時間培養した脾臓のリンパ球の mRNA を用いた³⁴⁾。negative control は逆転写反応を行わなかった RNA を PCR の鋳型としたものである。

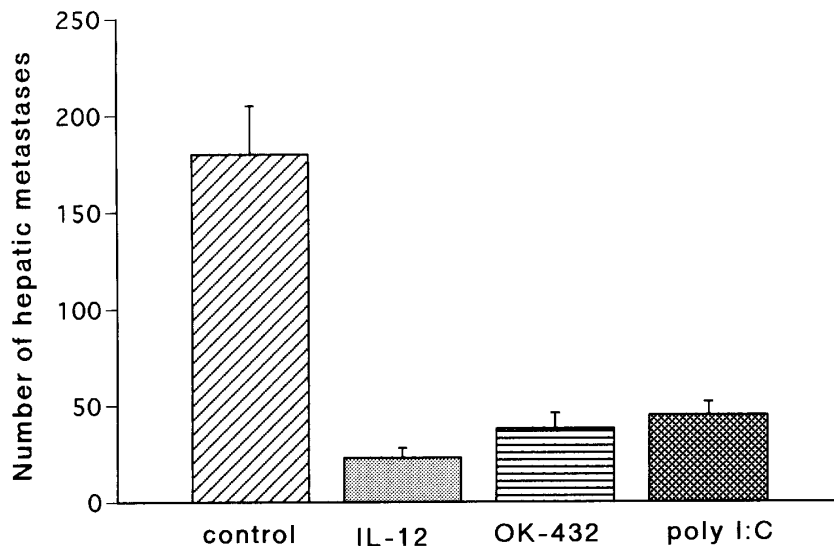


図6 OK-432 前投与および polyI:C 前投与による腫瘍転移の抑制
腫瘍接種 1 日前に 0.5 μ g の mL-12 を腹腔内投与, または腫瘍接種 3 日前と 1 日前に 50 μ g ずつの OK-432 を尾静脈より投与, 同様に 100 μ g の polyI:C を腹腔内投与した。腫瘍細胞 (EL4 lymphoma cell) 5×10^4 個を同系の C57BL/6 マウスの尾静脈より接種し, 接種後 14 日目に肝臓を摘出・Bouins 溶液で固定後, 転移結節を計数化した。結果は, それぞれ 5 匹のマウスを用いたもので, 平均値 (means) と標準偏差 (SD) で示す。

4の↓↓)の誘導が認められたが、OK-432投与では、NK1.1のみ陽性(NK1.1⁺CD3⁻)のNK細胞(図4の↓↓↓)が増加し、NK1.1⁺CD3^{int}細胞の誘導は確認できなかった。

6. OK-432, polyI:C投与によるIL-12産生誘導の検討

OK-432の代表的な生物活性としてNK細胞の増加および活性化が知られている³³⁻³⁵)。また、IL-12の生物活性として、NK細胞の活性化と、IFN- γ の産生誘導が知られている^{27,28})。したがって、OK-432投与によるNK細胞の増加には、IL-12の関与が予想される。さらに、polyI:C投与によりNK1.1⁺CD3^{int}細胞の出現が認められたことから、polyI:Cの作用にも、IL-12の関与が予想される。そこで、これらのBRMによるIL-12遺伝子の発現を検討した(図5)。その結果、OK-432, polyI:C, 投与全てにおいて、クッパー細胞の分画に、p35とp40の発現を確認した(図には投与6時間後の結果を示した)。

7. OK-432およびpolyI:C前投与による肝転移の抑制

OK-432およびpolyI:C投与により、肝臓のクッパー細胞からIL-12のmRNAが誘導されるという前項の結果から、肝転移性腫瘍の転移抑制がこれらBRMの前投与により認められるかどうかを検討した(図6)。その結果、ONO-4007前投与同様に(図1)、コントロールに比べて腫瘍細胞の肝転移を著しく抑制した($p < 0.001$)。

考 察

BRM (Biological Response Modifier) とは、免疫の賦活により、腫瘍の抑制をもたらす物質である³⁶)。これまで、多くのBRMが登場しているが、いずれも担癌宿主に共通して認められる低下した細胞性免疫能を賦活化することで、腫瘍を抑制するものである。作用機序の詳細は不明で、種々の要因が様々な経路を経て免疫系の賦活に関与していると考えられている³⁶)。本研究においては、これまで開発されてきたBRMであるONO-4007, OK-432, polyI:Cを対照として作用機序を検討してみた。

1. ONO-4007とIL-12の関連について

LPSの作用は分子内に含まれるLipid-Aによるとされる。LPSは致死毒性、敗血症、septic shock、汎発性血管内凝固症候群(DIC)、Shwartzman反応などの作用¹¹⁻¹³)と抗腫瘍作用や抗転移作用などの作用³⁷⁻⁴²)を有することが知られている。今回使用したONO-4007はLipid-Aの誘導體である。このONO-4007投与による実験的肝転移抑制は、マクロファージからのTNF- α の産生誘導による作用^{16,18})やクッパー細胞から産生されたIL-12によるものと考えられる。IL-12は分子量35kDaと40kDaの異型二量体^{27,28,30-32})で、NK細胞や細胞障害性T細胞(CTL)の活性を増強させ腫瘍増殖を抑える作用⁴³)がある。筆者らのグループは静脈内接種による転移モデルにはNK細胞やCTLとともに、IL-12により誘導されるNK1.1⁺CD3^{int}細胞も必要で、それらにより、肝転移抑制効果が生じていると考えている^{19,44,45})。以上から、ONO-4007やLPSによる今回の肝転移抑制効果は、単核球の細胞表面マーカーの変化や細胞障害活性の増強ならびにIL-12遺伝子の発現という観点からも、クッパー細胞から産生されるIL-12の作用が大きいと考えられる。

2. OK-432とIL-12の関連について

OK-432は、マクロファージや好中球、リンパ球などの各種免疫細胞に働いてIL-2やIFN- γ など多種のサイトカインの産生を促すとともに、CTLの機能を亢進し、また、NK細胞の増加と活性化を促進すると考えられている³³⁻³⁵)。OK-432投与では、ONO-4007投与やpolyI:C投与とは異なり、NK1.1⁺CD3^{int}細胞の誘導よりもNK細胞の増加が認められた。この結果は、図5の様に、上記の考えを支持するものであると思われる。

筆者は今回、OK-432がIL-12のmRNAを誘導することを確認した。IL-12はNK細胞を活性化し、さらにIFN- γ の産生を誘導することが知られている⁴⁴)ことから、筆者の結果は、OK-432がIL-12によるNK細胞の増加に関与していることを示唆するものである。

3. polyI:CとIL-12の関連について

polyI:Cは古くからIFN誘導剤^{46,47})として知られていたが、最近、naive CD4⁺T細胞(Th0細胞)を

IFN- γ や IL-2 を産生する helper T1 細胞 (Th1 細胞) へ誘導することが示された⁴⁸⁾。この過程で、重要なサイトカインとして IL-12 が考えられている⁴⁹⁾。筆者が今回、polyI:C 投与によりクッパー細胞の分画で IL-12 の遺伝子発現を確認したことは、上記の考えを支持するものである。また、今回の結果は、polyI:C 投与による腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強と NK1.1^H CD3^{int} 細胞の誘導および実験的肝転移抑制には、IL-12 が関与している可能性を示唆するものである。

4. BRM とマクロファージについて

ONO-4007, OK-432 や polyI:C は、マクロファージを活性化し、TNF- α の産生を誘導する^{18,34,47)}。また、LPS にも TNF- α の産生誘導が認められている¹²⁾。TNF- α の腫瘍局所への投与や腫瘍局所における TNF- α の産生は、腫瘍組織への直接的障害、炎症・免疫系細胞の活性化をもたらす反面、悪液質の誘導や接着分子の誘導による腫瘍細胞の運動性増強などにより、腫瘍細胞の転移を促進するという報告がある^{50,51)}。TNF- α の後者の作用は、LPS を腫瘍接種後に投与すると転移抑制効果が激減すること⁴⁵⁾に関与しているのかも知れない。杉浦²⁰⁾は肝臓における LPS による細胞障害活性の増強は、LPS によって誘導された TNF- α に基づく作用ではなく、IL-12 の誘導によるものと報告した。今回の結果にこのことを加味すると、今回使用した BRM による肝臓での細胞の活性化と腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強は、IL-12 による作用と考えた方がよい。また、これらの BRM は、クッパー細胞に加えて、腫瘍内マクロファージに対しても IL-12 の産生を誘導し、さらに腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) や NK 細胞をも活性化することによっても肝転移抑制効果をもたらした可能性もあると思われる。

結 語

腫瘍の転移形成は、数多くの段階を経て起こる現象であり、それに関与する機構は複雑なことが予想される。既存の BRM である OK-432 や polyI:C は、NK 細胞を主とした細胞性免疫の回復とその活性増強および TNF- α の作用により抗腫瘍効果を、ONO-4007 も TNF- α により抗腫瘍効果を発揮すると言われている。しかし今回の実験において、肝臓で見られた BRM の抗転移効果は、① クッパー細胞から産生された IL-12 による NK1.1^HCD3^{int} 細胞の誘導と ② IL-12 で誘導される IFN- γ や NK 細胞の増強作用の両方によることを示唆する。したがって今回の結果から、ONO-4007 を含む BRM の全身投与は、クッパー細胞やマクロファージからの IL-12 産生を誘導し、そして IL-12 を介することで抗転移作用に深く関わっている可能性を提唱するものである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御教示と御指導頂きました熊谷勝男東北大学名誉教授、順天堂大学医学部免疫学講座竹田和由博士、御指導を頂きました恩師手島貞一東北大学名誉教授、御校閲を賜りました東北大学歯学部口腔外科学第二講座鹿沼晶夫教授、同口腔外科学第一講座茂木克俊教授、同口腔生化学講座山田正教授、同歯科麻酔科岩月尚文教授、同口腔細菌学講座高田春比古教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、口腔外科学第二講座および口腔細菌学講座の教室員の皆様にあわせて厚く感謝いたします。

本研究の一部は、第 54 回日本癌学会総会 (1995 年 10 月京都)、第 55 回日本癌学会総会 (1996 年 10 月横浜) および第 24 回日本免疫学会総会 (1994 年 11 月京都)、第 25 回日本免疫学会総会 (1995 年 11 月福岡) にて発表した。

内容要旨: Interleukin-12 (IL-12) の実験動物における抗腫瘍効果はこれまでのサイトカインの中で最強であり、その臨床応用が期待されている。最近、IL-12 産生の誘導物質と IL-12 のエフェクター細胞について報告されている。特に、IL-12 の産生誘導物質としての lipopolysaccharide (LPS) と、エフェクター細胞としての NK1.1⁺CD3^{int} 細胞が注目されている。

本研究においては、LPS の活性部位と言われる Lipid-A の誘導體、ONO-4007 の抗腫瘍転移効果を NK1.1⁺CD3^{int} 細胞が多く存在するマウスの肝臓を用いて検討した。その結果、ONO-4007 投与による NK1.1⁺CD3^{int} 細胞の活性化により悪性リンパ腫腫瘍細胞に対する細胞障害活性の増強が見られ、肝転移の抑制が認められた。一方、既存の biological response modifier (BRM) である OK-432 や polyI:C 投与でも、同様の作用を確認した。これらの BRM の作用が、IL-12 投与による作用に類似していること

から, BRM 投与における IL-12 の関与についても検討した。その結果, 主として肝臓のクッパー細胞の分画において IL-12 の遺伝子発現を確認した。以上の結果より, BRM はクッパー細胞やマクロファージからの IL-12 産生をもたらし, この IL-12 が NK1.1⁺CD3^{int} 細胞や NK 細胞の活性化を誘導し, 抗腫瘍転移作用に深く関わっている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Papac, R.J.: Distant metastases from head and neck cancer. *Cancer* **53**: 342-345, 1984.
- 2) Kotwell, C., Sako, K., Razack, M.S., Rao, U., Bakamjian, V. and Shedd, D.P.: Metastatic pattern in squamous cell cancer of the head and neck. *Am. J. Surg.* **154**: 439-442, 1987.
- 3) 長田哲次, 大関 悟, 笹栗正明, 光石正子, 田代英雄: 顎口腔悪性腫瘍の肺転移例についての検討. *日口外誌* **36**: 2166-2173, 1990.
- 4) Korver, K.D., Graham, S.T., Hoffman, H.T., McCulloch, T. and Funk, G.F.: Liver function studies in the assessment of head and neck cancer patients. *Head Neck* **17**: 531-534, 1995.
- 5) Wooley, D.E.: Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **3**: 361-372, 1984.
- 6) Nicolson, G.L.: *Cancer Metastasis Rev.* **7**, Texas, USA, 1988, pp 143-188.
- 7) Duffy, M.J.: The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **10**: 145-155, 1992.
- 8) Liotta, L.A.: Gene products which play a role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Res. Treat.* **11**: 113-124, 1988.
- 9) 高橋 稔, 新津洋司郎: サイトカイン遺伝子導入による癌治療. *医学のあゆみ* **167**: 270-276, 1993.
- 10) Hock, H., Dorsch, M., Kunzendorf, U., Qin, Z., Diamantstein, T. and Blankenstein, T.: Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2774-2778, 1993.
- 11) Hwu, P., Yannelli, J., Kriegler, M., Anderson, W.F., Perez, C. and Chiang, Y.: Functional and molecular characterization of tumor-infiltrating lymphocytes transduced with tumor necrosis factor- α cDNA for the gene therapy of cancer in humans. *J. Immunol.* **150**: 4104-4115, 1993.
- 12) Raetz, C.R.H.: Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J. Bacter.* **175**: 5745-5753, 1993.
- 13) Raetz, C.R.H., Ulevitch, R.J., Wright, S.D., Sibley, C.H., Ding, A. and Nathan, C.F.: Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB. J.* **5**: 2652-2660, 1991.
- 14) Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seydel, U., Padova, F.D., Schreier, M. and Brade H.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB. J.* **8**: 217-225, 1994.
- 15) Sato, K., Saiki, I., Yoo, C.Y., Igarashi, Y., Kiso, M., Hasegawa, A. and Azuma, I.: DT-5461, a new synthetic lipid-A analogue, inhibits lung and liver metastasis of tumor in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **83**: 1081-1087, 1992.
- 16) Kobayashi, M., Nagayasu, H., Hamada, J., Takeichi, N. and Hosokawa, M.: ONO-4007, a new synthetic lipid A derivative, induces differentiation of rat myelomonocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Exp. Hematol.* **22**: 454-459, 1994.
- 17) Yang, D., Satoh, M., Ueda, H., Tsukagoshi, S. and Yamazaki M.: Activation of tumor-infiltrating macrophages by a synthetic lipid A analog (ONO-4007) and its implication in antitumor effects. *Cancer Immunol. Immunother.* **38**: 287-293, 1994.
- 18) Sato, K., Yoo, C.Y., Fukushima, A., Saki, F., Takahashi, A.T., Fujihara, M., Tono-oka, S. and Azuma, I.: A novel synthetic lipid A analog with low endotoxicity, DT-5461, prevents lethal endotoxemia. *Infect. Immun.* **63**: 2859-2866, 1995.
- 19) Hashimoto, W., Takeda, K., Anzai, R., Ogas-

- awara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S. and Kumagai, K.: Cytotoxic NK1.1 Ag⁺ $\alpha\beta$ T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J. Immunol.* **154**: 4333-4340, 1995.
- 20) 杉浦慶太郎: *Porphyromonas gingivalis*, *E. coli* および LPS による新しいリンパ球群の誘導. 東北大歯誌 **13**: 37-50, 1994.
- 21) Watanabe, H., Ohtsuka, K., Kimura, M., Igarashi, Y., Ohmori, A., 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, 1992.
- 22) Goossens, P.H., Jouin, H., Marchal, G and Milon, G.: Isolation and flow cytometric analysis of the free lymphomyeloid cells present in murine liver. *J. Immunol. Methods* **132**: 137-144, 1990.
- 23) 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**: 1214-1221, 1991.
- 24) Takeda, K., Hatakeyama, K., Tsuchiya, Y., Rikiishi, H. and Kumagai, K.: A correlation between GM-CSF gene expression and metastases in murine tumors. *Int. J. Cancer* **47**: 413-420, 1991.
- 25) 岸江孝男, 和気健二郎: 肝クッパー細胞. 徳永徹, 吉田 彪, 赤川清子編: マクロファージ実験マニュアル. 講談社, 東京, 1992, pp 28-35.
- 26) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* **162**: 156-159, 1987.
- 27) Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B. and Trinchieri, G.: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 827-845, 1989.
- 28) Stern, A.S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.-C.E., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T., Chizzonite, R. and Gately, M.K.: Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 6808-6812, 1990.
- 29) Cassatella, A.M., Meda, L., Gasperini, S., D'Andrea, A., Ma, X. and Trinchieri, G.: Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1-5, 1995.
- 30) Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M., Kelleher, K., Herrmann, S.H., Clark, S.C., Azzoni, L., Chan, S.H., Trinchieri, G. and Perussia, B.: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* **146**: 3074-3081, 1991.
- 31) D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., Chizzonite, R., Wolf, S.F. and Trinchieri, G.: Production of natural killer cell stimulatory factor (Interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cell. *J. Exp. Med.* **176**: 1387-1398, 1992.
- 32) Schoenhaut, D.S., Chua, A.O., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., Mccomas, W., Familletti, P.C., Gately, M.K. and Gubler, U.: Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol.* **148**: 3433-3440, 1992.
- 33) Saito, M., Ichimura, O., Kataoka, M., Moriya, Y., Ueno, K., Sugawara, Y., Nanjo, M. and Ishida, N.: Pronounced antitumor effect of LAK-like cells induced in the peritoneal cavity of mice after intraperitoneal injection of OK-432, a killed Streptococcal preparation. *Cancer Immunol. Immunother.* **22**: 161-168, 1986.
- 34) Okamoto, M., Kaji, R., Kasetani, H., Yoshida, H., Moriya, Y., Saito, M. and Sato, M.: Purification and characterization of interferon- γ -inducing molecule of OK-432, a penicillin-killed streptococcal preparation, by monoclonal antibody neutralizing interferon- γ -inducing activity of OK-432. *J. Immunother.* **13**: 232-242, 1993.
- 35) Ozaki, O., Okazaki, T. and Nakao, K.: Biologi-

- cal response modifiers (BRM) as antigens III. T cell lines specific for BRM kill tumor cells in a BRM-specific manner. *Cancer Immunol. Immunother.* **40**: 219-227, 1995.
- 36) Oldham, R.K.: Biological response modifiers. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**: 789-796, 1983.
- 37) Coley, W.B.: The treatment of inoperable sarcoma with the mixed toxins of Erysipelas and Bacillus prodigiosus. *J. Am. Assoc.* **31**: 389-391, 1898.
- 38) Shapiro, C.J.: The effect of a toxic carbohydrate complex from S. enteritidis on transplantable rat tumors in tissue culture. *Am. J. Hyg.* **31(Sec.B.)**: 114-126, 1940.
- 39) Steinberg, W.R. and Stevens, D.: *Escherichia coli* endotoxin effect on a methylcholanthrene-induced sarcoma in the hamster cheekpouch. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **156**: 229-235, 1977.
- 40) Conti, P., Dempsey, R.A., Reale, R.C., Barbancone, R.C., Panara, M.R., Bongrazio, M. and Mier, J.W.: Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta tumor necrosis factor and interleukin-6. *Immunology* **73**: 450-456, 1991.
- 41) Reiner, S.L., Zheng, S., Wang, Z., Stowring, L. and Locksley, R.M.: Leishmania promastigotes evade interleukin-12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.* **179**: 447-456, 1994.
- 42) D'Andrea, A., Ma, X., Amezcua, M.A., Paganin, C. and Trinchieri, G.: Stimulatory and inhibitory effects of interleukin(IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor α production. *J. Exp. Med.* **181**: 537-546, 1995.
- 43) Brunda, M.J., Luistro, L., Warriar, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F. and Gately, M.K.: Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J. Exp. Med.* **178**: 1223-1230, 1993.
- 44) Gately, M.K., Warriar, R.R., Honasoge, S., Carvajal, D.M., Faherty, D.A., Connaughton, S.E., Anderson, T.D., Sarmiento, U., Hubbard, B.R. and Murphy, M.: Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of INF- γ in vivo. *Internatl. Immunol.* **6**: 157-167, 1994.
- 45) Takeda, K., Seki, S., Ogasawara, K., Anzai, R., Hashimoto, W., Sugiura, K., Takahashi, M., Satoh, M. and Kumagai, K.: Liver NK1.1⁺ CD4 $\alpha\beta$ T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J. Immunol.* **156**: 3366-3373, 1996.
- 46) Goldfeld, A.E. and Maniatis, T.: Coordinate viral induction of tumor necrosis factor α and interferon β human B cells and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 1490-1494, 1989.
- 47) Remels, L., Fransen, L., Huygen, K. and De Baetselier, P.: PolyI:C activated macrophages are tumoricidal for TNF- α -resistant 3LL tumor cells. *J. Immunol.* **144**: 4477-4486, 1990.
- 48) Manetti, R., Annunziato, F., Tomasevic, L., Gianni, V., Parronchi, P., Romagnani, S. and Maggi, E.: Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon- α and interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2656-2660, 1995.
- 49) Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. and Murphy, K.M.: Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**: 547-549, 1993.
- 50) Orosz, P., Echtenacher, B., Falk, W., Ruschoff, J., Weber, D. and Mannel, D.N.: Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **177**: 1391-1398, 1993.
- 51) Okahara, H., Yagita, H., Miyake, K. and Okumura, K.: Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res.* **54**: 3233-3236, 1994.