

外来性インターフェロン-ガンマ遺伝子導入による悪性 脳腫瘍に対する新しい免疫療法に関する実験的研究

京都大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 菊池晴彦教授)

西 原 毅

〔原稿受付: 昭和63年10月28日〕

A Novel Experimental Approach to Immunotherapy against Malignant Brain Tumor with the Mouse IFN- γ Gene Transfer

KIYOSHI NISHIHARA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HARUHIKO KIKUCHI)

Abstract

To investigate the effect of interferon-gamma (IFN- γ) on the immunotherapy, we used the autocrinally stimulated system in which a mouse IFN- γ cDNA was transferred by infection with a chimeric retrovirus containing the IFN- γ gene. First, we established a tumor specific CTL clone (E-4) against 203-glioma cells (a 20-methylcholanthrene induced mouse ependymoblastoma line of C57BL/6 mouse origin), and then transferred murine IFN- γ cDNA into E-4 by using retroviral vector (pSVN(Mu γ Δ A)). Out of five gene-transferred subclones, E γ -4, E γ -5, E γ -6, E γ -7 and E γ -9, two subclones (E γ -6 and E γ -9) constitutively produced 8- to 10-fold amounts of IFN- γ as compared with the parental E-4. Moreover, these two subclones exhibited two to three times higher killing activity against 203-glioma than the parental cells; The enhancement of the killing activities was abrogated by an adequate addition of anti-IFN- γ antibody.

No alteration was seen after the gene transfer in cell surface phenotypes, Thy-1⁺, Lyt-1⁻, Lyt-2⁺3⁺ and asialo-G_{M1}⁻. Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis showed that the surface expression of major histocompatibility complex (MHC) Class I antigen, H-2K^b, of parental E-4 was augmented remarkably, and it was not altered by the IFN- γ gene transfer,

Key words: Interferon- γ , Gene transfer, Brain tumor, Cytotoxic T lymphocyte, Major histocompatibility complex, Immunotherapy.

索引語: インターフェロン-ガンマ, 外来遺伝子導入, 脳腫瘍, 細胞障害性T細胞, 主要組織適合抗原, 免疫療法.

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

but the Class II antigen, I-A^b, was slightly enhanced on the two IFN- γ -producing sublines.

Since it is considered that in the vicinity of the constitutively IFN- γ -producing CTL cells, tumor cells are exposed to a high concentration of IFN- γ and may be stimulated to induce or enhance the expression of surface antigens including MHC antigens as well as tumor associated antigens in relation to immune recognition. The 203-glioma cells pretreated with IFN- γ were more efficiently killed by both the parental E-4 and the gene-transferred sublines. It was thus suggested that the specific tumor killing activity of the gene-transferred CTLs was augmented by the constitutive production of IFN- γ derived from the exogenous gene.

As the next step, a mouse IFN- γ cDNA was transferred into a neuroblastoma line C1300 of A JAx mouse origin. Two infected subclones C γ 3 and C γ 22, were obtained as a low and a high producers, respectively. Both IFN- γ gene transferred cells remained unchanged as regards in vitro cell growth, morphological appearance and differentiation antigen expression such as neurofilaments after the IFN- γ gene transfer. On the other hand, expression of MHC Class I antigens of both subcloned lines was extremely augmented at the surface expression level as well as at the transcription level, regardless difference in amounts of their IFN- γ production. However, the MHC Class II antigen was not detected.

We examined the tumorigenicity of these IFN- γ gene transferred sublines. The tumor formation in the high IFN- γ -producer cells C γ 22 was limited and the tumor was often rejected, but the low IFN- γ -producing cells C γ 3 whose MHC Class I antigen expression level was the same as C γ 22 was not rejected so often. The in vivo tumor growth induced by C γ 3 and C γ 22 cells in the syngeneic mice following s.c. injection was strongly suppressed, as compared with the parental cells. It was therefore indicated that the suppression of tumor formation might more closely associated with constitutive IFN- γ production rather than MHC antigen expression and the reduced in vivo tumor growth might be affected by the high expression of surface antigens.

On immunohistochemical examination, the tumors produced by the IFN- γ gentransferred cells showed a necrosis, hemorrhage and lymphocytic infiltration of Thy-1⁺ cells containing Lyt-2⁺ or L3T4⁺ subsets in the early tumor stage, whereas there were extremely few lymphocytes around the tumors induced by the parental cells. There was significant difference in the degree of lymphocytes infiltration between the tumors induced by the gene transferred sublines. From these results, it was considered that the reduced growth-activity of the tumors was due to the activation of the effector cells surrounding the tumors by the high expression of any tumor surface antigens induced by the IFN- γ gene transfer and additional local immunomodulatory effects of IFN- γ in the vicinity of the tumors.

It is expected that the IFN- γ gene transfer system could be used as a novel therapeutical approach to tumors. As the strategy for cancer therapy, we tried to augment the immune reaction to tumors by an active immunization using IFN- γ -gene transferred tumor cells. Survival times of tumor bearing mice were prolonged by the active immunization of C γ 22 cells. It was suggested that retrovirus-mediated transfer of cytokine genes would be applied to a modified immunotherapy for cancer in the future.

はじめに

インターフェロン (IFN) の生物学的役割は完全に解明されているわけではないが、ある種の腫瘍細胞に対して直接的細胞障害作用や免疫活性をもつことが知られており、免疫療法を考慮する上で注目されている。とくにインターフェロン-ガンマ (IFN- γ) は IFN のなかでも MHC 拘束性 cytotoxic T lymphocyte (CTL) を介した細胞障害性の増強^{1,2,48,49,54,55)}、CTL の分化、誘導³⁾、さらにはマクロファージの antigen-presenting 作用の増強効果⁴⁾ や抗腫瘍液性因子の放出^{47,52)}、また natural killer (NK) 細胞の活性化^{26,43)} など種々の免疫活性が最も強く⁵⁸⁾、また腫瘍免疫応答において、標的細胞の主要組織適合抗原 (MHC)^{13,43,52,60)} や腫瘍関連抗原^{6,8,14,17,18,22,31)} をはじめとする細胞表面抗原の発現を高めることなどが報告されており、さまざまな免疫担当細胞を介した抗腫瘍効果が期待される。しかしこのような IFN- γ の効果を臨床的に十分に発揮させることは、全身の投与では副作用が強く¹⁹⁾、また生体内ではその半減期が短い⁷⁾ ため困難であった。そのため腫瘍内局所投与による効果的な IFN- γ の治療法が注目を浴びている¹⁹⁾。ところで脳腫瘍は局所療法が可能な腫瘍のひとつであり、IFN- γ の局所投与による抗腫瘍効果あるいはその作用発現のメカニズムを知ることには脳腫瘍治療に意義があると考えられる。本研究は IFN- γ を腫瘍周囲に持続的に作用させるために、マウス IFN- γ cDNA をレトロウイルスベクターを用いて CTL あるいは腫瘍細胞に組み入れ、これを IFN- γ の局所免疫療法のモデルとして、エフェクター側、および標的細胞側の両面よりその抗腫瘍効果を検討することを目的とした。さらに表面抗原の発現が高まった IFN- γ 遺伝子導入腫瘍細胞で宿主を能動免疫し、新しい免疫療法としての効果を検討した。

Part I: インターフェロン-ガンマ遺伝子導入による CTL の殺細胞効果の増強

研究材料および方法—I

(1-A) 実験動物

静岡県実験動物農業協同組合より供給された 6-8 週令の雄 C57BL/6 マウスを使用した。

(1-B) 細胞培養

203-glioma 細胞は、C57BL/6 マウスより 20-methylcholanthrene にて誘発された malignant endependymoblastoma 株である。 ψ 2 細胞は Mann らに

より樹立された ecotoropic murine retrovirus を産生する packaging cell line である³⁶⁾。これらの細胞は 10% 非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS, GIBCO, Grand Island, NY) 添加 Dulbecco's modified MEM (日水製薬, 東京) (ストレプトマイシン 50mg/l およびペニシリン G 20万単位/l 添加) の培養液 (D'MEM 完全培地) にて維持した。

(1-C) CTL 用完全培地の調整

Wister 系ラットの脾臓および腸間膜リンパ節細胞 5×10^6 /ml を、10% FCS および $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ Concanavalin A (Con A, Pharmacia, Uppsala, Sweden) を含む RPMI-1640 (日水製薬) の培養液中で、 37°C , 5% CO_2 下にて培養した。その培養上清を 18 時間毎、2 度採取した。Con A を取り除くために Sephadex G-75 のカラムを通過させ、10,000 rpm で 20 分遠沈したあと $0.45 \mu\text{m}$ の nitrocellulose filter (ACRODISC®, Gelman Sciences, Michigan) にて濾過し、除菌を行った。CTL 用完全培地は RPMI-1640 にこのリンパ球培養上清 20%, 遺伝子組み換え型ヒトインターロイキン-2 (rIL-2) (武田製薬より供与) 10ng protein/ml ($\approx 0.3 \text{ U}/\text{ml}$), 10% FCS, ストレプトマイシン, ペニシリンを加えて調整した。

(1-D) 皮下腫瘍の作成

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.2) に 0.01% EDTA を含む 0.05% トリプシン溶液で浮遊細胞とした 203-glioma 細胞を PBS で 2 度洗浄した後、 2×10^6 個/200 μl の濃度で両側鼠径部皮下に接種した。また養子免疫療法モデルの腫瘍の作成には、 1×10^6 個/100 μl の 203-glioma 細胞を右の鼠径部に接種した。この細胞数は 203-glioma 細胞が 100% 腫瘍形成するのに十分な量である。

(1-E) CTL クローンの樹立

CTL クローンの樹立には教室の山崎らの方法⁶⁴⁾ を改良して用いた。すなわち 203-glioma 細胞を皮下接種し、あらかじめ免疫した 5-6 週目の腫瘍担体マウスの局所リンパ節細胞を、X 線照射 (3000R) した同マウスの脾細胞 (antigen-presenting cell) と IL-2 を含まない培地で混合培養した。混合培養 2 日後、芽球化細胞を 96 穴プレート (96 Well/Flat Bottom, Corning, N.Y.) に 1 cell/well の割合で希釈、プレーティングを行い、IL-2 を含む CTL 用完全培地で培養した。その際、 2×10^5 個/well の X 線照射脾細胞を feeder 細胞として上記プレートに加えた。この限界希釈法によるクローニングで 20 個のクローンを得たが、最も 203-

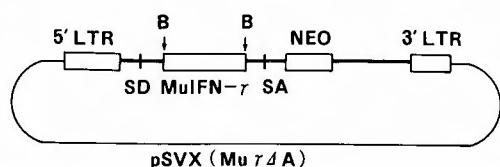


Fig. 1 The construction of a retroviral vector pSVX (Mu γ 4A) for introduction of murine IFN- γ cDNA into the target genome. The vector was derived from pZIP. Neo. SV(X)I by insertion of IFN- γ cDNA at the Bam HI site. Murine IFN- γ cDNA was driven from LTR of Moloney leukemia virus by splice between SD and SA. B, Bam HI; SD, splice donors; SA, splice acceptors.

glioma に対して細胞障害性を示し、線維芽細胞株である L 細胞には細胞障害性を示さなかった CTL クローン E-4 を以下の実験に用いた。

(1-F) レトロウイルスベクターによる IFN- γ 遺伝子導入

渡部らにより構成されたレトロウイルスベクター pSVX (Mu γ 4A) は、G418 耐性遺伝子 neomycin phosphotransferase gene (neo)¹⁰⁾ を含む pZIP-Neo-SV(X)I⁹⁾ に、murine IFN- γ cDNA を挿入したものである (Fig. 1)。これをカルシウムリン酸沈澱法²⁰⁾ にて ψ 2 細胞に導入したクローン ψ 2 (Mu γ 4A) 細胞は感染能力のあるレトロウイルスベクターを産生することができる。

E-4 細胞と ψ 2 (Mu γ 4A) 細胞を G418 50 μ g/ml を含む CTL 用完全培地で 1 週間培養し、さらに 2 週間の間で G418 の濃度を 800 μ g/ml まで徐々に上昇させ、生存細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 個/well でプレーティングした。この方法により 288 穴中、9 穴に単一集落を得た。このうち 5 個のクローンに IFN- γ 遺伝子が挿入されていることがサザンブロッティングにて確認された (Fig. 2)。以下、これら IFN- γ 遺伝子導入クローンは E γ -4, E γ -5, E γ -6, E γ -7, E γ -9 と命名した。

(1-G) サザンブロッティング法とノザンブロッティング法

操作法は標準的方法によった^{35,53)}。すなわち 10 μ g の DNA を Moloney murine leukemia virus (Mo-MuLV) の long terminal repeats (LTR) 間で切断する制限エンドヌクレアーゼ XbaI で処理後、1% アガロースゲルにて電気泳動で分離し、ニトロセルロース膜

に転写した。また総細胞 RNA の調整には guanidine isothiocyanate/cesium chloride (GTC/CsCl) 法によった³⁵⁾。サンプルは denature 後 2.2 M formaldehyde を含む 1.3% アガロースゲルで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。

核酸転写後のニトロセルロース膜は 80°C で 2 時間ベイクン後、プレハイブリ溶液 (5 $\times$ SSC, 3 $\times$ Denhart's solution) (SSC=0.15 M NaCl/0.015 M sodium citrate, pH 7.4, Denhart's solution=0.04% polyvinylpyrrolidone/0.04% Ficoll/0.04% bovine serum albumin) で 65°C, 24 時間インキュベートした。その後 ³²P でラベルしたプローブを 6 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhart's 溶液, 50% formamide, 12.5 μ g/ml denatured calf thymus DNA を含む溶液中で 42°C, 24 時間、ハイブリダイゼーションを行った。ニトロセルロース膜は 65°C, 0.4 $\times$ SSC/0.1% SDS で、30 分を 3 回洗浄し、X 線フィルムに -70°C で 1-3 日間感光した。分子サイズ (キロベース, kb) は Hind III 処理した λ phage DNA 断片で算定した。

(1-H) IFN 活性 (bio-assay)

IFN- γ 遺伝子導入細胞の IL-2 存在下, 非存在下, Con A 刺激時の培養上清中の IFN 産生量は L 細胞を用いた抗ウイルス活性で測定した⁵²⁾。L 細胞を単層培養した 96 穴プレートに 4 段階に 3 倍希釈したサンプルを加え、24 時間後サンプルを除去したのち vesicular stomatitis virus を含む培養液で培養する。さらに約 24 時間後、クリスタルバイオレットで染色し、ウイルスの cytopathic 効果を判定した。IFN 活性はマウス IFN- α/β 標準液 (NIH G002-904-511) で補正して国際単位 (I.U.) で表示した。また組み換え型 IFN- γ (rIFN- γ)⁴⁰⁾ は塩野義製薬より供与を受けた。ラビット抗 IFN- γ 抗体 (渡部氏より供与) は中和試験に用いた。

(1-I) 細胞障害性試験

CTL による細胞障害性試験は 2 つの方法で行った。まずスクリーニング試験は 1×10^4 の 203-glioma 細胞あるいは L 細胞を 96 穴プレートにプレーティングし、24 時間後 2×10^5 から $1.25 \times 10^4/100 \mu$ l の 5 段階に調節した CTL を加えた (エフェクター細胞/標的細胞 (E/T) 比 = 20/1-1.25/1)。24 時間混合培養後、PBS にて洗浄し、ギムザ染色をして残存細胞より標的細胞の障害性を評価した。203-glioma にのみ強い細胞障害性を示した CTL は、⁵¹Cr 遊離法により細胞障害活性を算出した²¹⁾。すなわち ⁵¹Cr でラベルした $1 \times 10^4/$

100 μ l の標的細胞を96穴U型プレート(96 Well/Round Bottom, Corning) に用意し, この上に, E/T 比を50:1から3:1に応じてエフェクター細胞(CTL)を添加後, 37°C, 5%CO₂ 下で12時間インキュベートした. その後, プレートを 1500 rpm, 10分間遠沈し, その培養上清を 100 μ l 回収し, ガンマカウンター (ANSR Gamma Counter, Abbot Laboratories, North Chicago) にて放射活性を計測した. 全てのアッセイはトリプレットで行い, 細胞障害活性は次式より算出した.

$$\text{細胞障害活性(\%)} = \frac{(\text{計測値} - \text{自然解離})}{\times 100 / (\text{最大解離} - \text{自然解離})}$$

最大解離, 自然解離はエフェクター細胞浮遊液の代わりに, 1% Nonidet P-40 (半井薬品) あるいは hepes 緩衝 RPMI 完全培地をそれぞれ 0.1 ml ずつ添加し, その培養上清を測定したものである.

(1-J) 表面マーカーおよび MHC 抗原の発現

E-4 および IFN- γ 遺伝子導入クローンの表面マーカーを間接蛍光抗体法でアッセイした. ラット抗 Thy-1, L_{yt}-1, L_{yt}-2, L3T4 モノクローナル抗体 (Becton, Dickson, California) およびラビット抗 asialo-G_{M1} ポ

リクローナル抗体 (Wako, Osaka) を一次抗体とし, 二次抗体は fluorescence isothiocyanate (FITC) ラベルの抗マウス IgG あるいは FITC ラベルの抗ラビット IgG 抗体 (DAKOPATTS Denmark) を用い, 検鏡により判定した. また MHC 抗原の解析は一次抗体にマウス抗 H-2^b 抗体 (Class I) あるいはマウス抗 I-A^b 抗体 (Class II) をもちい, 二次抗体に FITC ラベル抗マウス IgG 抗体 (DAKOPATTS) をもちて間接蛍光抗体法により染色し, PBS にて洗浄後 fluorescence-activated cell sorter (FACS; FACS-440) にて解析した.

(1-K) 皮下腫瘍中和試験 (Winn-type assay)

E-4 および E-4 に IFN- γ 遺伝子を組み入れたサブクローンのうち細胞障害活性の高い2つのクローン (E γ -6, E γ -9) の in vivo での抗腫瘍効果をウーインタイプアッセイで判定した. すなわち 2 $\times$ 10⁶ の 203-glioma 細胞と E/T 比を10/1あるいは1/1に調整した CTL を混合して, 右鼠径部皮下に接種した. その後の腫瘍生着率および腫瘍増大曲線より抗腫瘍効果を判定した.

(1-L) 養子免疫療法モデル

1 $\times$ 10⁶ 個の 203-glioma 細胞を右鼠径部皮下に接種

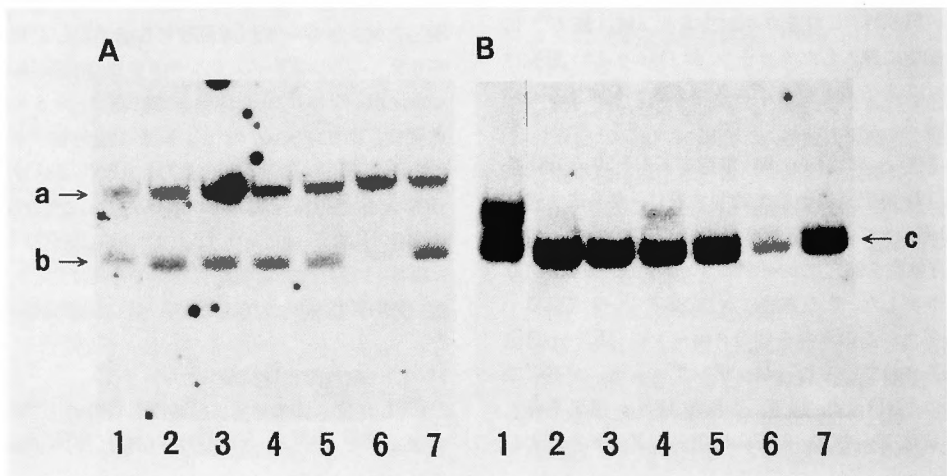


Fig. 2 Southern blot analysis of G418-resistant subclones and packaging cell line ψ 2(Mu γ 4A). After digestion with the restriction enzyme XbaI, the DNA fragments were electrophoresed on a 0.75% agarose gel, and then transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were hybridized with ³²P-labeled IFN- γ (A) or neo(B) cDNA probes. Lane 1, ψ 2(Mu γ 4A); lane 2, E γ -4; lane 3, E γ -5; lane 4, E γ -6; lane 5, E γ -7; lane 6, E γ -8; lane 7, E γ -9. Arrow (a) indicates the 18kbp genomic IFN- γ fragment and arrows (b) and (c) indicate the 5.0kbp proviral DNA fragments which integrated in the DNA of CTL except E γ -8.

し、5日目に尾静脈より 5×10^6 個/100 μ l あるいは 1×10^6 個/100 μ l のエフェクター細胞 (CTL) を移入した (単治療群)。またエフェクター細胞を 203-glioma 接種5日目、および10日目に同数のエフェクター細胞を尾静脈より移入した (複治療群)。エフェクター細胞には細胞障害活性が最も増強されていた E γ -9 とコントロールとして E-4 を用い、各グループは5匹ずつのマウスを使用してアッセイを行った。

結果-1

CTL クローンへの IFN- γ 遺伝子の導入

203-glioma に対するマウス CTL クローン E-4 ゲノムへの外来 IFN- γ 遺伝子の導入は、感染処置を行

った G418 耐性 E-4 クローンを制限エンドスクレアーゼ XbaI で処理したのち、IFN- γ cDNA フラグメントをプローブとしたサザンブロッティング法にて確認した (Fig. 2)。E γ -4 (lane 2), E γ -5 (lane 3), E γ -6 (lane 4), E γ -7 (lane 5), および E γ -9 (lane 7) は 5kb と 18kb に2つのバンドをもつが、5kb に導入した IFN- γ 遺伝子を含み、これらはいずれも再構成や欠損部分はなく完全な 5kb のプロウイルス DNA が1コピー組み入れられたことを示す。しかし E γ -8 (lane 6) は G418 に耐性であったにもかかわらず IFN- γ 遺伝子は組み込まれていなかった。

次に外来 IFN- γ からの mRNA の発現量を IFN- γ

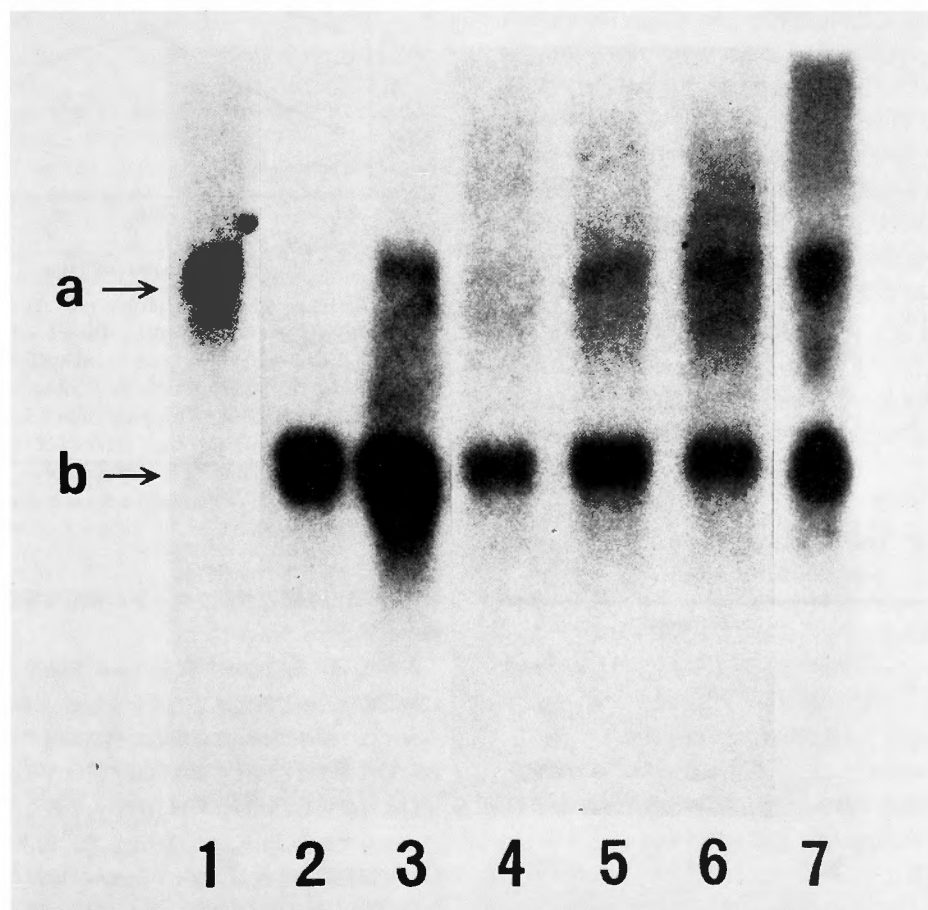


Fig. 3 Characterization of the IFN- γ specific transcripts expressed in individual clones infected with retroviral vector by Northern blot analysis. Lane 1, ψ 2(Mu γ Δ A); lane 2, parental CTL E-4; lane 3, E γ -4; lane 4, E γ -5; lane 5, E γ -6; lane 6, E γ -7; lane 7, E γ -9. Arrows represent the exogenous (a) and the endogenous (b) IFN- γ specific transcripts, respectively.

プローブを用いてノザンブロッティング法で検討した (Fig. 3). IFN- γ 遺伝子が組み入れられたクローンは2種類の mRNA を作る. つまり大きい 5.6kb のバンドは 5'LTR をプロモーターとして転写されたもので, 1.5kb のバンドは endogenous IFN- γ 遺伝子より転写されたものである. それに対して, 未感染の E-4 は短いバンドすなわち endogenous IFN- γ 遺伝子の転写のみしか現れない. さらに長期継代培養後や凍結保存処理によっても宿主ゲノム内の外来 IFN- γ 遺伝子は安定しており, その発現も変化はなかった (データ未提示).

IFN- γ 遺伝子導入 CTL クローンの IFN- γ 産生量

rIL-2 下で E-4 を培養すると上清中にごくわずかの量の IFN 活性が得られた (15 I.U./ml/10⁵cells/day). 一方 E γ -6 および E γ -9 は E-4 や他の IFN- γ 遺伝子導入クローンに比べて8-10倍の産生量を示した (Table 1). また IL-2 非存在下では E-4 や他のサブクローンの IFN 産生を検出できないのに対し, E γ -6 および E γ -9 は少量ながらも常時産生していた. さらに Con A 刺激時では rIL-2 刺激時と同様に E γ -6 および E γ -9 で産生量が最も高かった.

また IL-2 非存在下で 203-glioma 細胞と E-4 を混合培養すると IFN 活性はごくわずかにみられるのみであったが, それに対して E γ -6 および E γ -9 と標的細胞との混合培養では IL-2 刺激ほどではないが非刺激時の2-3倍の IFN 活性を認めた (データ未提示).

Table 1. IFN- γ production of E-4 and the IFN- γ gene-transferred sublines.

	Treatment		
	None	IL-2	IL-2+ConA
E-4	<5	15	15
E γ -4	<5	14	28
E γ -5	<5	20	25
E γ -6	20	118	145
E γ -7	<5	24	28
E γ -9	22	107	128

IFN- γ activity (I.U./ml/10⁵ cells/24 hours) was measured under the following conditions: None, rIL-2 free medium; IL-2, rIL-2 (10 ng/ml) containing medium; IL-2+ConA, rIL-2 (10 ng/ml) and Con A (2 μ g/ml) containing medium. Each value represents the means of triplicate assays.

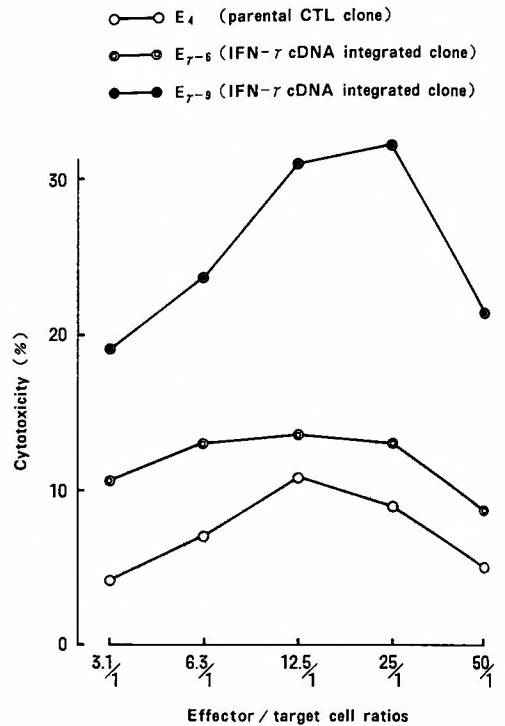


Fig. 4 In vitro % lysis of target cells by E-4(○), E γ -6(◐) and E γ -9(●). Target cells were labeled with ⁵¹Cr and incubated for 12h with the effector cells at various effector/target (E/T) ratio ranging from 3:1 to 50:1. The values are the means of triplicate determinations. The spontaneous release was 20.2% of maximal release induced with 1% NP-40.

IFN- γ 遺伝子導入 サブクローンの細胞障害活性の増強

203-glioma 細胞に対する in vitro 細胞障害活性は12時間の ⁵¹Cr 遊離法にてアッセイした. 12時間のアッセイは「トリプシン処理をした標的細胞が最大の殺細胞効果をうけるのに必要な時間」という至適条件の検討より設定した. Fig. 4 は IFN- γ を最も産生するクローンである E γ -6 および E γ -9 で, 各 E/T 比において細胞障害活性がコントロールの E-4 に比べて2-3倍上昇したことを示す. しかしながら IFN- γ 産生量が E-4 とかわらなかった IFN- γ 遺伝子導入サブクローン (E γ -4, E γ -5, E γ -7) では細胞障害活性の増強は得られなかった (データ未提示). また IFN- γ 遺伝子導入細胞は親株の E-4 同様に 203-glioma に細胞障害

活性を示したがL細胞には全く細胞障害活性を示さなかった。

腫瘍細胞に対する IFN-γ の作用を確認するため、抗 IFN-γ 抗体を CTL クローンより産生された IFN-γ を中和するのに十分量添加すると、E-4 では変化ないものの Eγ-9 の細胞障害活性の増強は E-4 レベルまで抑制された (Table 2)。また E-4 の細胞障害活性

Table 2. In vitro % lysis of E-4 and Eγ-9 in the presence of anti-IFN-γ antibody.

Effector	% of ⁵¹ Cr release*	
	No treatment	Anti-IFN-γ‡
E-4	7.0±0.8	6.0±0.2
Eγ-9	13.8±1.2	7.5±1.4**

‡ Enough titer of anti-IFN-γ antibody to neutralize 10³ U of IFN-γ was added.

* % of specific lysis against 203-glioma target cells was determined in a 12 h-⁵¹Cr-release assay at 10:1 E:T ratio.

** Significantly decreased cytotoxicity compared to the untreated Eγ-9: p<0.05 (paired Student's t test).

Table 3. Effect of IFN-γ treatment on the in vitro cytotoxic activity of E-4 against 203-glioma.

Pretreatment*		% of ⁵¹ Cr release**	
Effector	Target	IFN-γ (-)	IFN-γ (+)
-	-	10.2±0.6	19.4±0.6***
-	+	18.2±0.5***	N.D.****
+	-	9.4±0.8	18.0±1.2***
+	+	17.3±0.3***	N.D.

* E-4 or 203-glioma was pretreated with IFN-γ (10³ U/ml) for 24 h prior to assay.

-, not pretreated; +, pretreated with IFN-γ.

** % of specific lysis against 203-glioma target cells was determined in a 12 h-⁵¹Cr-release assay in the absence(-) or presence(+) of IFN-γ at 13:1 E:T ratio.

Values represent means±S.D. for triplicate culture.

*** Significantly increased cytotoxicity compared to the no pretreatment control: p<0.05 (paired Student's t test).

**** Not done.

は 203-glioma 細胞を 1,000U/ml の rIFN-γ で前処理した場合1.5倍増強した。しかしエフェクターである E-4 を rIFN-γ で前処理しても細胞障害活性に変化はなく (Table 3), Eγ-6 および Eγ-9 の細胞障害活性の増強は IFN-γ の産生の増強による 203-glioma に与える影響が最も大きいものと考えられる。

IFN-γ 遺伝子導入細胞の表面抗原の発現

E-4 細胞の表面マーカーは Thy-1⁺, Lyt-1⁻, 2⁺, 3⁺, asialo-G_{M1}⁻を示した。これは IFN-γ 遺伝子導入クローンにおいても同様であった。また50代以上継代培養した後も表面マーカーに変化はみられなかった。ノザンプロテイング法で MHC Class I (H-2K) 抗原における mRNA レベルでの発現をみると、E-4 および IFN-γ 遺伝子導入クローンとも高レベルの発現を認め、差異は認めなかった (データ未提示)。さらに FACS による MHC 抗原の膜発現性をみると Class I 抗原は親株 E-4 で既に非常に発現しており IFN-γ 遺伝子導入クローンの間に明らかな差異は認めないものの、I-A^b に対するモノクローナル抗体をもちいた Class II 抗原の発現は Eγ-6 および Eγ-9 においてわずかな増強がみられた (データ未提示)。

皮下腫瘍細胞中和試験 (Winn-type assay)

IFN-γ 遺伝子導入 CTL の in vivo における抗腫瘍効果を検討するため 2×10⁶ の 203-glioma 細胞と E/T 比10/1あるいは1/1で遺伝子導入 CTL と混合し皮下接種した。203-glioma 細胞のみのコントロールおよびエフェクター細胞に E-4 を使用したものでは100%の腫瘍形成がみられたが、E/T 比を10/1で混合した Eγ-6 および Eγ-9 で腫瘍形成率が低下した。IFN-γ の産生量の高い Eγ-9 では腫瘍形成はみられずより強い抗腫瘍効果が得られた (Fig. 5A)。

また生着後の腫瘍増大曲線をみると、E-4 処置群でもわずかながらの増大抑制効果が認められたが、Eγ-6 および Eγ-9 処置群で CTL の量依存的に、またエフェクターの IFN-γ の産生量に比例した腫瘍増大の抑制効果がみられた (Fig. 5B)。

IFN-γ 遺伝子導入 CTL を使った養子免疫療法

Fig. 6 は 1×10⁶ 個の 203-glioma 細胞を右鼠径部皮下に接種後5日目あるいは5日目と8日目に CTL を尾静脈より静注したときの腫瘍形成曲線を示す。各群5匹のマウスに 1×10⁶ 個あるいは 5×10⁶ 個の E-4 または Eγ-9 で治療を行った (E:T 比=5/1-1/1)。その結果、未治療のコントロールあるいは E-4 治療群はすべて腫瘍形成したものの、Eγ-9 治療群、特に複治

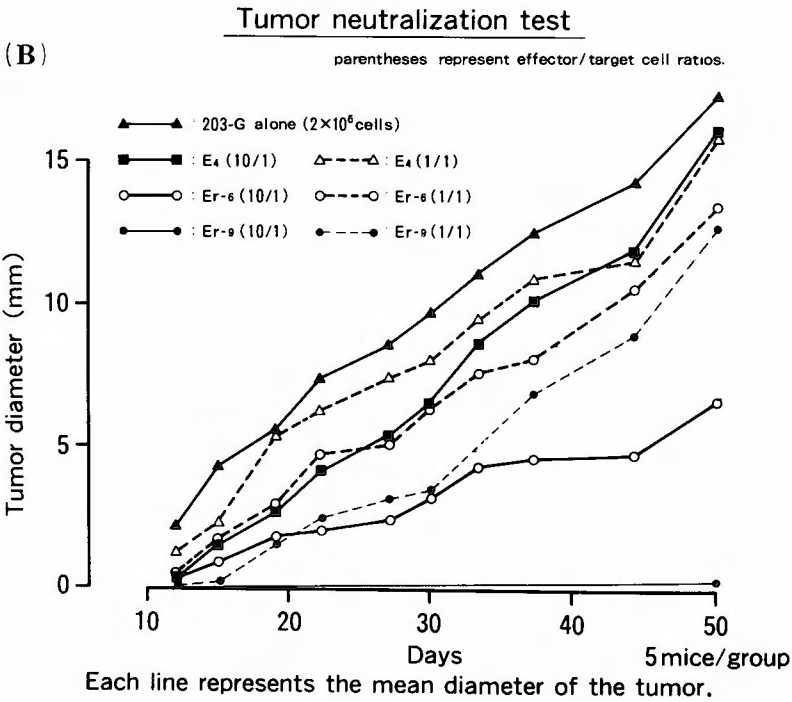
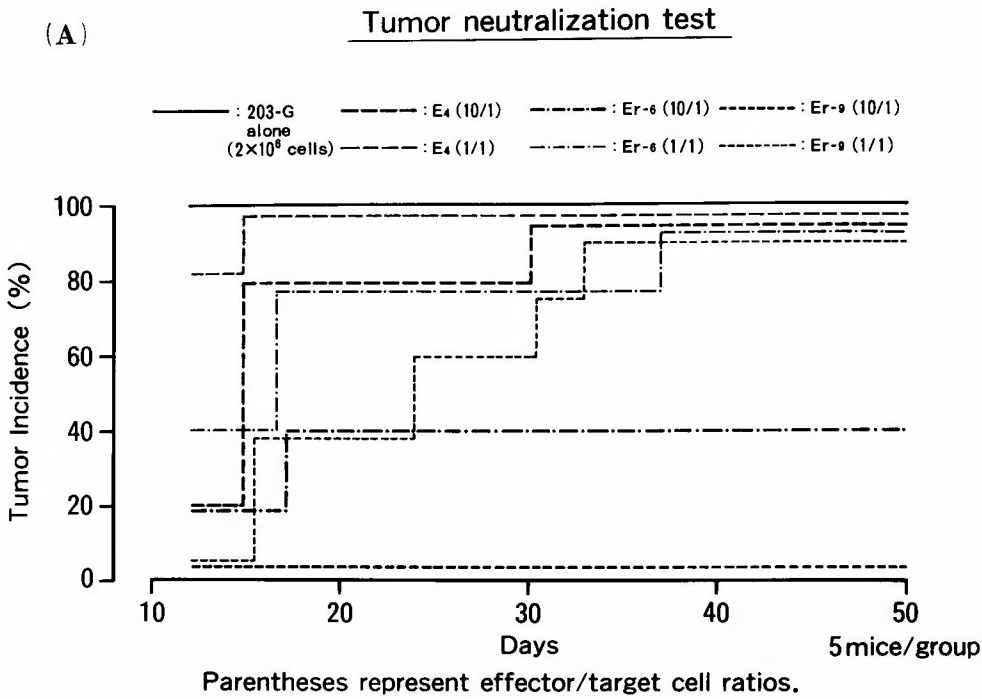


Fig. 5.

Adoptive Immunotherapy

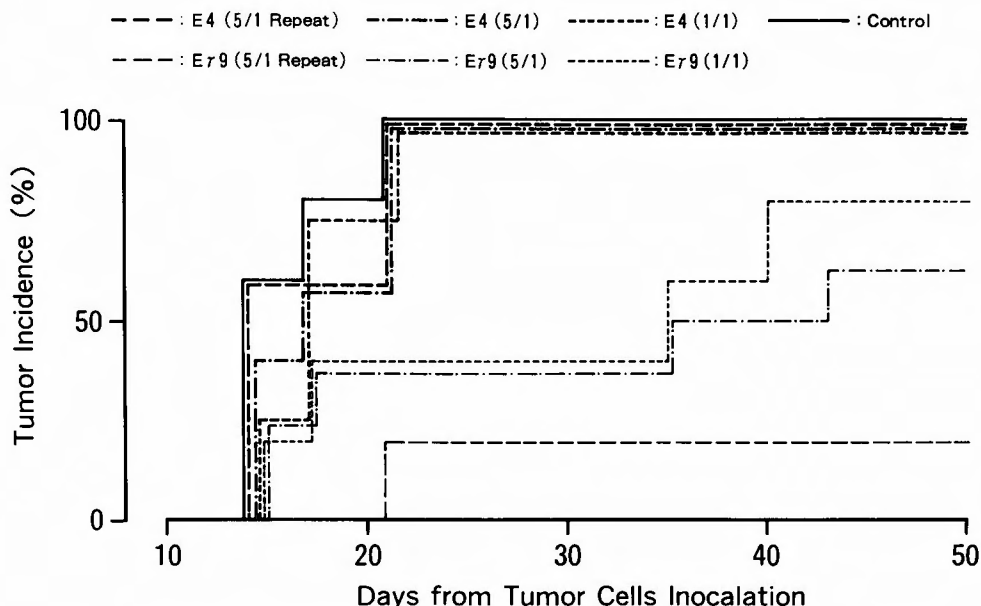


Fig 6. Effects of adoptive transfer of E γ -9 cells on tumor formation. Various doses (E/T ratio=5/1 or 1/1) of E γ -9 or parental E-4 cells were injected from the tail vein on Day 5 after s.c. inoculation of 1×10^6 cells of 203-glioma. In the double treatment group the same number of effector cells was injected i.v. after 5 days from first treatment. The curve shows the rate of tumor formation (%) following tumor cell injection.

療群ではその移入細胞数に応じて腫瘍形成率は低下し明らかな抗腫瘍効果がみられた。

考察—1

IL-2 の発見以来悪性腫瘍に対する養子免疫療法は新しい治療法として注目されている^{14, 31, 37, 38, 44, 45, 64}。これには IL-2 で活性化したリンパ球 (LAK) がエフェクターとして使用されることが多いが、LAK 細胞は IL-2 の供給がなければ抗腫瘍効果は不十分である。一方、腫瘍関連抗原を認識する CTL は強い抗腫瘍効果をもつが^{2, 10, 15, 45}、その強い細胞障害活性を保ちつつ治療に足る量の CTL を得るのは必ずしも容易ではない。

最近レトロウイルスベクターが宿主の DNA の外来遺伝子を導入するために利用されるようになった。

このベクターの利点は導入遺伝子が細胞分裂時にも比較的安定して保存され、脱落や再構成が少ない点である。我々は遺伝子組み換え技術を用いて CTL に IFN- γ 遺伝子を導入して CTL の腫瘍特異的細胞障害活性を維持するだけでなく、さらに活性を増大することを試みた。

IFN- γ 遺伝子導入操作を 203-glioma に対する CTL クローン、E-4 に対して行い、得られた 5 つの遺伝子導入クローンの中で特に 2 つのクローン E γ -6 と E γ -9 が親株の E-4 より 8-10 倍の IFN- γ 産生能力をもっていた。これら IFN- γ 産生量が増加し、また非刺激時にも IFN- γ を常時産生しているサブクローンで 203-glioma に対する特異的細胞障害活性は親株に比べ 2-3 倍の増強が得られた。IFN- γ 遺伝子を導入した他の 3

Fig. 5 Winn-type neutralization assay. The incidence (%) of the tumors (A) and tumor growth curve (B). 203-glioma cells were injected subcutaneously mixed with the effector cells at various doses (E/T ratio=10/1 or 1/1). The tumors were confirmed by touch and measured in size (mm). Each group assayed in 5 mice.

つのクローン (E γ -4, E γ -5, E γ -7) では IFN- γ 産生量も E-4 とほとんど同じく, 細胞障害活性も増強はみられなかった. このように IFN- γ の産生量が各遺伝子導入クローンで異なる理由は宿主 DNA に組み込まれた部位により, 5'LTR のプロモーター活性に変化があることに起因する可能性が考えられるが現時点ではこの現象に対する正確な理由はわからない. この増強した特異的細胞障害活性は長期継代培養後も E γ -6 および E γ -9 で増強されており, IL-2 に対する依存性や反応性も長期培養で変わらなかった. また CTL の IFN- γ 産生量が特異性細胞障害活性と強く関係していることは, 最も細胞障害活性が増強した E γ -9 に抗 IFN- γ 抗体を加えるとその活性が低下することで示めされた. しかしながら IFN- γ はリンホトキシンや tumor necrosis factor (TNF) を含むさまざまな因子を発現する能力をもつことが知られているので, 外来 IFN- γ 遺伝子の発現により細胞内で未知の蛋白合成や代謝が活性化されている可能性もあり, このような IFN- γ 以外の因子については今後の検討を要する点である.

IFN- γ を常時, 多量に産生することによる細胞障害活性の増強は標的細胞の表面抗原の発現の増強がその一因と考えられるが, 203-glioma 細胞を IFN- γ 存在下で培養すると CTL の免疫応答に必要な MHC Class I 抗原の発現が IFN- γ 処理3-5時間後にはすでに高まっていることが免疫蛍光抗体法とノザンブロットング法により確かめられた (データ未提示). この Class I 抗原の増強した細胞を標的細胞とする E-4 の細胞障害活性は 1.5 倍増強した. これらの結果より IFN- γ 遺伝子導入細胞から常時 IFN- γ が産生されることが MHC 抗原や glioma 細胞の腫瘍関連抗原の発現の増強をもたらす, 細胞障害活性が増強されたと考えられる. In vitro において, 1,000 I.U./ml の IFN- γ 下で培養しても 203-glioma 細胞の増殖には影響はなく (データ未提示), IFN- γ の直接的作用の影響は少ないと考えられるが, CTL と標的細胞間近傍には非常に高濃度の IFN- γ が存在するものと考えられ, 高濃度 IFN- γ で直接的細胞障害作用が細胞障害活性の一因となっている可能性もある. この直接的細胞障害作用についての詳細な機序は不明であるが IFN- γ の細胞障害活性以外にも腫瘍細胞分裂周期のすべての段階を延長し, その結果細胞分裂時間を延長させるという IFN- γ の細胞増殖抑制効果も知られている^{30,43,52)}.

E-4 に IFN- γ 遺伝子を導入すると細胞障害活性が

上昇することは, in vivo においても腫瘍細胞中和試験 (Winn-type assay) 並びに養免疫療法モデルにて確認した. まず 203-glioma 細胞と E γ -6 あるいは E γ -9 細胞を混合し皮下接種すると, その生着率や腫瘍形成後の腫瘍増大が大きく抑制された. また 203-glioma を皮下接種し腫瘍形成後, E γ -9 細胞を静注すると E-4 を静注した場合と比べ, 腫瘍は高率に消退, 消失した. これらの結果より in vivo においても IFN- γ 遺伝子導入細胞が抗腫瘍効果を発揮することが確かめられた. この様な in vivo における効果は IFN- γ 遺伝子導入細胞が直接的に標的細胞に細胞障害活性を示しただけでなく, IFN- γ を常時産生することによりマクロファージや NK 細胞をはじめとする免疫担当細胞の活性化を促し, 腫瘍細胞障害活性が相乗的に働いたためと考えられる. しかし NK 細胞は IFN- γ で活性化されるものの MHC 抗原の発現した標的細胞には活性が弱いことが報告されており (後述), その関与については今後検討を要する.

Part II: インターフェロン-ガンマ遺伝子導入による腫瘍細胞の tumorigenicity の低下とその機序

研究材料および方法-2

(2-A) 実験動物

京都大学実験動物センターより入手した 5-6 週令の雄 A/JAx マウスを specific-pathogen-free room で飼育した.

(2-B) 腫瘍細胞

A/JAx マウス由来の神経芽細胞腫株 C1300⁴⁵⁾ を用いた. この細胞株は D'MEM 完全培地で培養した.

(2-C) IFN- γ 遺伝子導入

前述の方法に準じて行った. すなわち ψ 2(Mu γ 4A) 細胞の培養上清を 0.45 μ m の nitrocellulose filter (ACRODISC[®], Gelman Sciences) を通したのち 8 μ g/ml の Polybrene (Sigma) とともにあらかじめ用意した C1300 細胞の培養液に加え, 24時間インキュベートした. 次に培養液に 800 μ g/ml の G418 を加え 7日間インキュベートした. このセレクションにより増殖した細胞を限界希釈法にてクローニングし, 低 IFN- γ 産生株 C γ 3 および高 IFN- γ 産生株 C γ 22 を得た. また C1300 細胞に IFN- γ cDNA を含まないレトロウイルスベクター pZIP-Neo-SV(X)I の組み込まれた C1300(neo) をコントロール細胞に用いた. C1300 および C1300(neo), C γ 3, C γ 22 の増殖能は

trypan blue exclusion 法により算定した。すなわち各細胞を24穴プレートに 10^4 個/ml でプレATINGしたのち24時間毎、トリプシンにて浮遊細胞とし血球計算盤にてカウントした。算定は各トリプリケートにて行った。

(2-D) 腫瘍性試験 (tumorigenicity assay)

前述したごとく、トリプシンにて浮遊細胞とした 2×10^6 個の C γ 3, C γ 22 あるいは C1300 細胞を両側鼠径部皮下に接種した。その腫瘍径の増大を長径+短径/2(mm) で表し腫瘍増大曲線を描いた。さらにそのマウスの生存期間(日)を比較した。

(2-E) IFN- γ 遺伝子導入細胞を用いた能動免疫

後述するように IFN- γ 遺伝子導入細胞は MHC Class I 抗原の発現が高く、宿主の免疫応答を活性化することが示された。この IFN- γ 遺伝子導入細胞を免疫源として宿主を能動免疫することを試みた。1) (免疫源としての有効性) 3×10^5 個の C1300 細胞あるいは C γ 22 細胞を右鼠径部皮下に接種し一次免疫とした。その6-8週間後両鼠径部に生着十分量である 2×10^6 個の C1300 細胞を接種し、その後の腫瘍生着率を算定した。2) (能動免疫による抗腫瘍モデル) 右鼠径部に C1300細胞を 5×10^5 個、左鼠径部皮下に 5×10^5 個または 2×10^6 個の C γ 22 細胞を同時に接種した(同時免疫群)。または C1300 細胞接種5日後すなわち腫瘍生着後に反対側の鼠径部に C γ 22 細胞を接種した(後免疫群)。その後、生着した親株腫瘍の増大率、生存期間を算定し評価した。この際、左側に接種した C γ 22 細胞の腫瘍形成はほとんど認めなかったため問題としなかった。3) (腫瘍局所免疫療法モデル) 右鼠径部皮下に C1300 細胞を 5×10^5 個接種し、5日後同部位に C γ 22 細胞を 5×10^5 個または 2×10^6 個接種し、腫瘍増大率、生存期間を算定した。

(2-F) 免疫組織学的検索

poly-L-lysine でコートしたスライドガラスに $8 \mu\text{m}$ の凍結切片をのせ、 -20°C アセトンで15分間固定した。PBS で洗浄後、1%過ヨウ素酸水溶液で10分間処理し、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。その後、0.1%BSA (bovine serum albumin) を含む PBS で1時間インキュベートし、ラット抗マウス Thy 1.2, Lyt-1, Lyt-2, L3T4 モノクローナル抗体で処理した。以降、ビオチン標識の抗ラット IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて、Avidin-Biotin-Complex (ABC) 法にて染色した。asialo-G M_1 抗原に対しては、ラビット抗マウス asialo-G M_1 (Wako,

Osaka) ポリクローナル抗体を一次抗体として使用し、ペルオキシダーゼラベルの抗ラビット IgG 抗体で処理した。その後 PBS に 1 mg/ml の 3,3'-diaminobenzidine および 0.03% H_2O_2 を含むペルオキシダーゼ基質で発色させ、メチルグリーンにて核染色を行った。この際、脾臓を各サブセットのポジティブコントロールとして使用した。

培養細胞および腫瘍組織内での MHC Class I 抗原の発現は上記固定後の凍結切片に、マウス抗マウス H-2K k 抗体で処理した後、二次抗体に FITC ラベルの抗マウス IgG 抗体を用いた間接免疫蛍光抗体法により検索した。

培養細胞のニューロフィラメントの検索には培養フラスコ内でスライドガラスに付着させた細胞を 1:1 acetone/methanol にて固定し、抗ニューロフィラメントモノクローナル抗体(160kDa; Immunotek, France) を一次抗体とした ABC 法にて染色させた。

(2-E) サザンブロッティング法、ノザンブロッティング法、IFN 活性は前述の方法に従った。

結果一2

C1300 細胞へのマウス IFN- γ 遺伝子の導入

G418 $800 \mu\text{g/ml}$ を含む D'MEM 完全培地で増殖したクローンのうち IFN- γ 産生量が最も高い C γ 22 と培養液中に IFN- γ が検出できない C γ 3 (Table 4) を以下の実験に使用した。

まず制限エンドスクレアーゼ XbaI で処理後、IFN- γ (Fig. 7A) と neo (Fig. 7B) cDNA の断片をプローブとしてサザンブロッティング法にて導入レトロウイルスゲノムを確認した。すなわち C γ 3 および C γ 22 いずれにもレトロウイルスベクターのサイズに一致する 5.0kb のバンドがみられ、両株ともに再構成なく宿主の DNA に組み入れられていることが確かめられた。IFN- γ プローブでハイブリダイゼーションを

Table 4. Production of IFN- γ in the gene transferred subclones.

clone	IFN titer
C1300	<5
C γ 3	<5
C γ 22	40
C1300(neo)	<5
ψ 2(Mu γ 4A)	108

IFN- γ activity of the supernatants in 25 cm^2 flask was measured. The titer represents I.U./ml/ 10^5 cells/day.

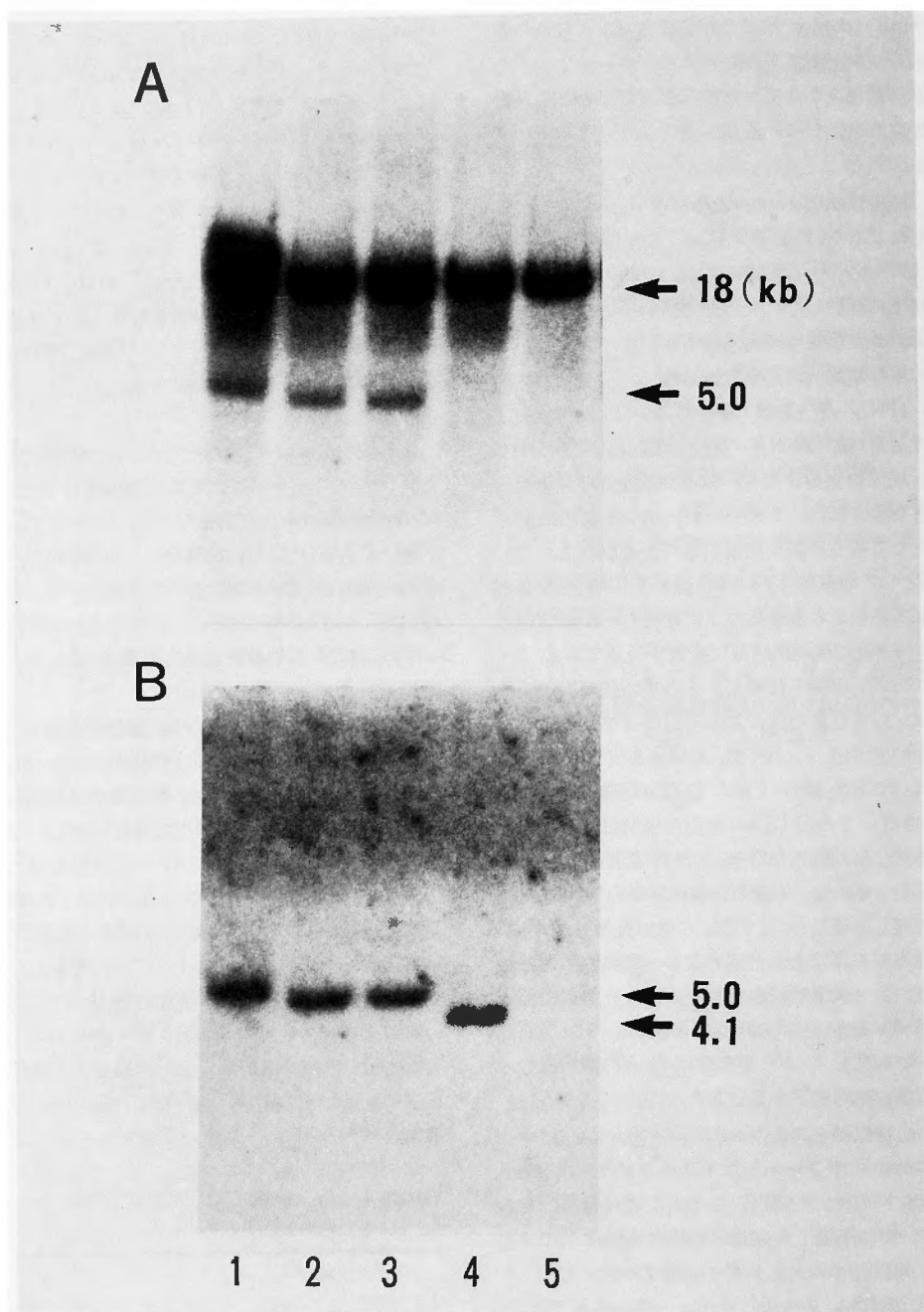


Fig. 7 Identification of the mouse IFN- γ cDNA integrated into C1300 subclones. Ten-microgram samples of cellular DNA were digested with XbaI, and then analyzed by Southern blot using ^{32}P -labeled IFN- γ (A) and neo (B) probes. The 5.0 kb or 4.1 kb bands are represented the integrated genome with or without IFN- γ cDNA. Lanes 1, $\psi 2(\text{Mu } \gamma \Delta A)$; 2, C $\gamma 3$; 3 C $\gamma 22$; 4, C1300(neo); 5, C1300. C1300(neo) is infected by the retrovirus vector without IFN- γ cDNA. Numbers at right sizes in kb were calibrated from the fragments of HindIII-digested λ phage DNA.

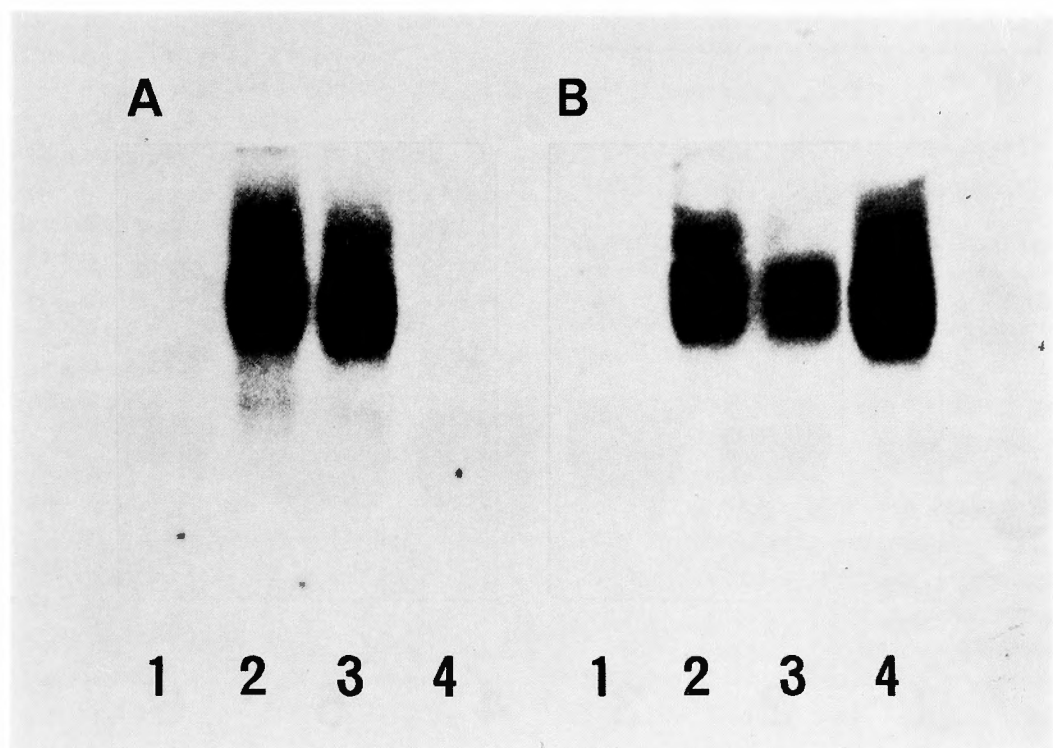


Fig. 8 Identification of the mouse IFN- γ (A) and neo (B) mRNA transcripts in C1300 subclones. Total cellular RNA (10 μ g) was evaluated by RNA blot analysis. Shown are data from parental C1300 (lane 1), C γ 3 (lane 2), C γ 22 (lane 3) and C1300(neo) (lane 4).

行くと 18kb と 5.0kb の 2 種類のバンドが得られたが、大きいバンドは genomic IFN- γ 遺伝子に相当し、短い 5.0kb のバンドがレトロウイルスベクターに由来するものである。4.1kb のバンド (lane 4) は IFN- γ cDNA を含まないレトロウイルスベクターが組み入れられたクローンを示す (C1300(neo))。

また導入遺伝子からの IFN- γ mRNA の転写量をみると、C γ 3 と C γ 22 は IFN- γ の産生量が異なるにもかかわらず mRNA 量としては変化がないことがわかった (Fig. 8)。この原因については現在のところ明確にはされていないが、post-transcriptional regulation や IFN- γ の transport system に相違があるのかもしれない。

C1300 細胞は IFN- γ の直接的な腫瘍増殖抑制作用には抵抗性を示し、1,000 I.U./ml の IFN- γ 存在下で in vitro での細胞倍化時間に有意差は認めないだけでなく、IFN- γ 遺伝子を導入した C γ 3, C γ 22 あるいはコントロールの C1300(neo) も親株 C1300 の細胞

増殖曲線と有意な差はなかった。さらに位相差顕微鏡下で形態の変化を観察したが C1300 細胞と IFN- γ 遺伝子導入細胞の間に差を認めず、またニューロフィラメントを免疫組織化学的手法を用いて検索したが、親株同様 C γ 3 あるいは C γ 22 でも検出できなかった。これらの結果により IFN- γ は C1300 細胞に分化や細胞増殖に関して効果がないことが示されたが、以下に述べる MHC Class I の発現は非常に増強されていた。

IFN- γ 遺伝子導入細胞の MHC 抗原発現性

ノザンプロット法によりニトロセルロース膜に転写した mRNA を H-2K cDNA の断片をプローブとしてハイブリダイゼーションすると (Fig. 9)、親株 C1300 ではごくわずかにしかバンドがみられず H-2K の発現が少ないのに対して、IFN- γ 遺伝子を組み入れた細胞は IFN- γ 産生量に関係なく C γ 3 および C γ 22 とともに C1300 に比べ 10 数倍と著しく発現が増強していた。また C1300 細胞を IFN- γ 1,000 I.U./ml

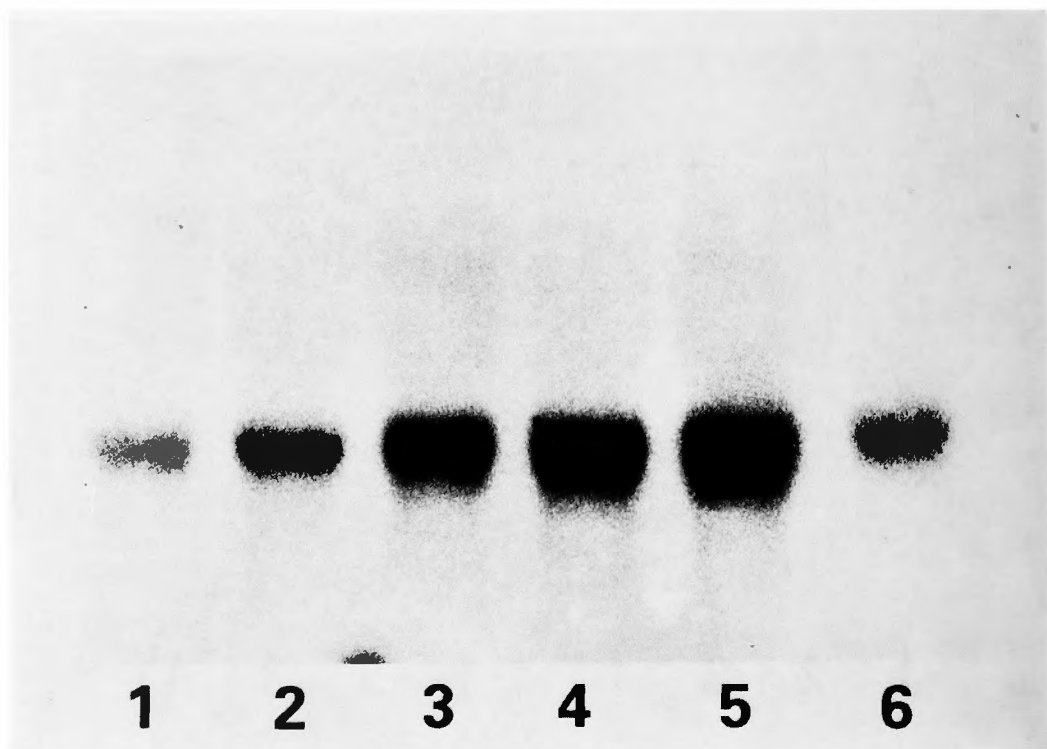


Fig. 9 Characterization of mRNA expressed in the IFN- γ gene transferred C1300 subclones by Northern blot analysis. Total cellular RNA obtained from parental C1300 (lane 1), IFN- γ -pretreated-C1300 (lane 2), Cy3 (lane 3), Cy22 (lane 4), anti-IFN- γ antibody treated Cy22 (lane 5) and C1300 (neo) (lane 6), was hybridized with a 32 P-labeled H-2K probe.

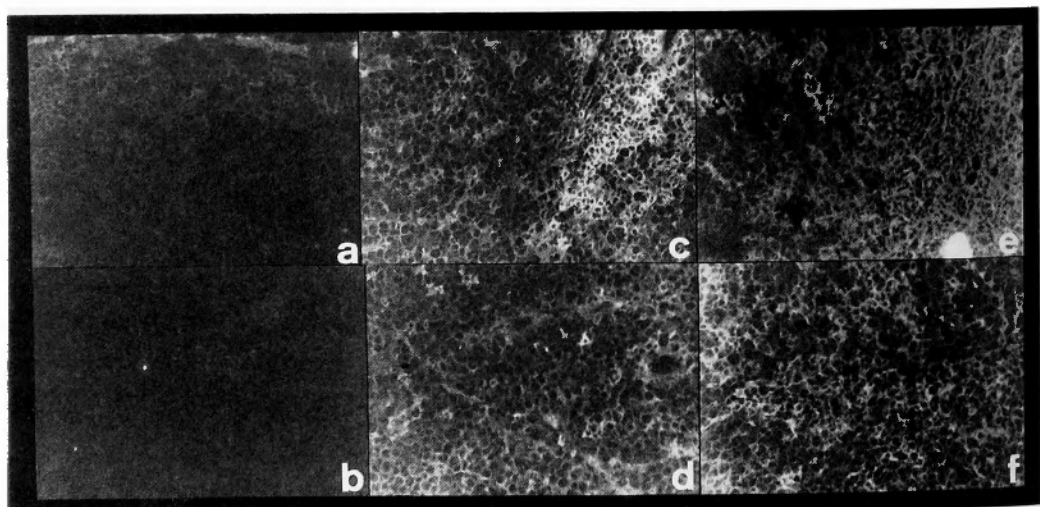


Fig. 10 Immunofluorescence staining with monoclonal antibody against MHC Class I H-2 K^k on tumor cells. Sections of subcutaneous tumors (day 14) induced by C1300 cells (a,b), Cy3 cells (c, d), and Cy22 cells (e, f). a,c,e were marginal portions of tumors, b,d,f were central portions of tumors.

で24時間処理すると H-2K の発現は5-6倍増強したが, IFN- γ 遺伝子導入細胞ほどの増強はみられなかった. また IFN- γ 遺伝子導入細胞を, 産生した IFN- γ を中和するのに十分量の抗 IFN- γ 抗体で処理しても, H-2K の発現は変化なかった. さらに H-2D のプローブを用いて, 再ハイブリダイゼーションを行ったが結果は H-2K と同様であった. (データ未提示).

また表面抗原として MHC 抗原の発現が高まっているかどうか皮下腫瘍並びに培養細胞の H-2K の発現を蛍光抗体法にて解析すると, ノザンブロッティング法の結果と同様 IFN- γ 遺伝子導入細胞は IFN- γ 産生量と相関なく H-2K 表面抗原の発現が高まっていた. 皮下腫瘍組織内では (Fig. 10), 辺縁部ではその発現は高まっており, 中心部では H-2 抗原の発現は辺縁部に比べると弱かった.

IFN- γ 遺伝子導入細胞の tumorigenicity の変化

IFN- γ 高産生株 C γ 22 と低産生株 C γ 3 および親株 C1300 細胞の皮下腫瘍形成能および腫瘍増大, 生存期間を検討した. まず 2×10^6 個の細胞を接種した場合, 接種後3週間での腫瘍形成率は C1300 では95%, C γ 3 で80%, C γ 22 で15%であった. 接種する細胞を 5×10^5 個に減じると, C1300 と C γ 3 は80%であったが C γ 22 では腫瘍を形成しなかった (Table 5). これらすべての腫瘍は腫瘍細胞接種後1週間目では触れる程度の大きさにまで成長したが, 腫瘍が拒絶されるものは接種後10-20日で触れなくなり, 解剖による確認によっても腫瘍は消失していた. また腫瘍細胞生着性に関する IFN- γ の直接的効果を検討するため 1,000 I.U. の IFN- γ を腫瘍細胞と混合して接種したが腫瘍形成率には変化なく(データ未提示), 常時 IFN- γ を産生していることが腫瘍形成率の低下に関係があると考えられた.

Table 5. The rates of the tumor formation.

cell doses	No. of inoculation	C1300	C γ 3	C γ 22
5×10^5	20	80	80	0
2×10^6	20	95	80	15

The tumor cells transplanted subcutaneously into the right flank of syngeneic mice. 3 weeks later, the tumor formation was decided by touch. The rates of the tumor formation (%) were the mean of two experiments.

生存期間でみると腫瘍形成率に差異のない C1300 と IFN- γ 低産生株 C γ 3 のマウスの50%腫瘍死期間 (TD₅₀) は親株が33日に対して C γ 3 が61日であった. さらに IFN- γ 高産生株の C γ 22 は84日と有意に (P < 0.01) 延長した (Table 6). また腫瘍増大曲線でみると C1300 ではほぼ一定の増大を示すが 5×10^5 個で接種した C γ 3 ではS字状カーブを描いた. これは腫瘍に対する宿主の反応が14-20日目に高まり腫瘍増大が抑制されたと考えられる. この反応は細胞数を 2×10^6 個に増加するとみられなくなった (Fig. 11). また C γ 22 はこの接種量で腫瘍形成したがその増大はゆるやかで, 腫瘍増大の抑制は IFN- γ の産生量に相関していると考えられた.

IFN- γ 遺伝子導入細胞を免疫源とした能動免疫

C1300 細胞に IFN- γ 遺伝子を導入すると, MHC 抗原の発現が高まり, 宿主の免疫応答が亢進することが考えられたのでこの細胞を能動免疫の免疫源としての可能性を検討した. まず IFN- γ 遺伝子導入細胞の免疫源としての有効性を検討するために IFN- γ の産生量の高い C γ 22 を1次感作として用い, 4-6週後に

Table 6. Comparison on mean survival times of the tumor bearing mice.

	No. of inoculation	tumor cell clone			
		C1300	C γ 3	C γ 22	C1300 (neo)
Exp. 1	4	32 $\pm$ 2	69 $\pm$ 4	77 $\pm$ 6	42 $\pm$ 10
Exp. 2	6	35 $\pm$ 6	60 $\pm$ 5	86 $\pm$ 5	N.D.
Exp. 3	5	32 $\pm$ 3	60 $\pm$ 3	N.D.	N.D.
means		34 $\pm$ 3	62 $\pm$ 3	82 $\pm$ 4	42 $\pm$ 10
TD ₅₀		33	61	84	36

2×10^6 of the tumor cells inoculated subcutaneously into the bilateral flanks of syngeneic mice. The mean survival time is calculated from bilaterally tumor-formed mice. Each values are days $\pm$ S.D. TD₅₀ is the day of 50% death of the mice.

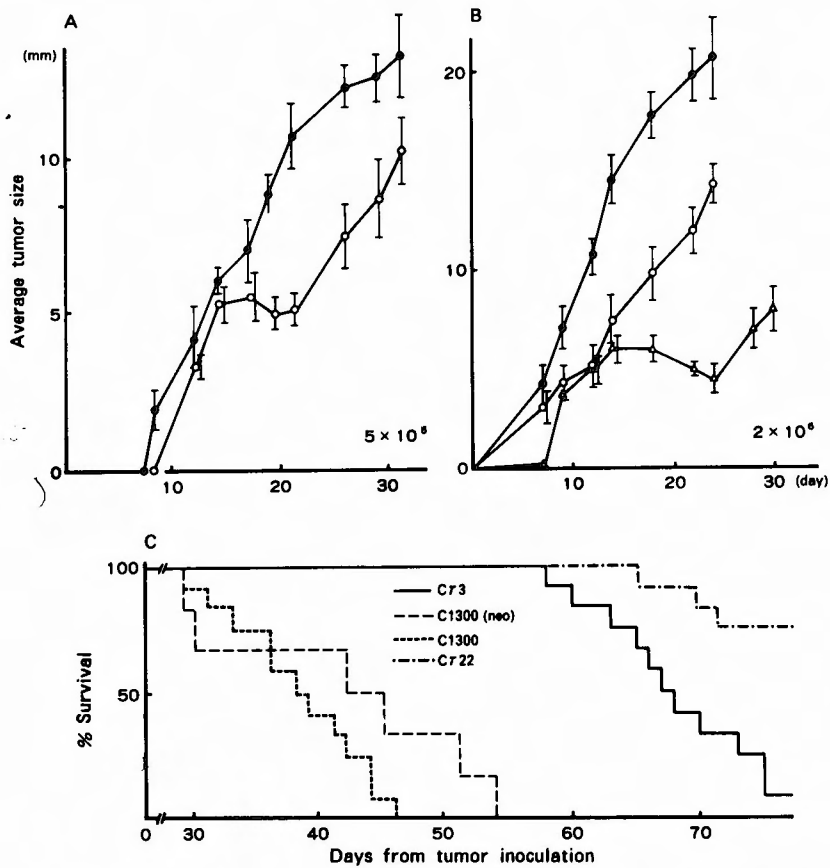


Fig. 11 Survival range and average tumor size of C1300 (●), C γ 3 (○) and C γ 22 (△). Following a subcutaneous injection in the right flank at fixed cell-doses of 5×10^5 (A) or 2×10^6 , the diameter of the tumor mass in each animal was measured every day until the animal's death. Results (A or B) are expressed as means(mm)±SD (bars) from tumor formed ten mice. The tumor rejected mice are excluded from the mean value. The survival range (C) was described from 2×10^6 injected mice. The survival times in means (days)±SD were 34 ± 3 for C1300, 42 ± 9 for C1300(neo), 62 ± 3 for C γ 3 and 72 ± 4 for C γ 22.

Table 7. The rates of tumor formation after pre-immunization by C γ 22 or C1300 cells.

(n)	tumor incidence*		Mean survival time (days)**
	Immunized side	Non-immunized side	
C1300 (18)	50%	75%	48
C γ 22 (10)	0%	20%	74

* Pre-immunization was performed by the injection of 3×10^5 cells into the right flank of 5-6 weeks mice. 5 weeks after pre-immunization, 2×10^6 cells of C1300 were inoculated into the bilateral flanks and then tumor incidence was estimated.

** Mean survival time was calculated by tumor formed mice.

Table 8. The survival time of C1300-tumor bearing mice after treated by simultaneous or delayed immunization of C γ 22.

(n)	(-)*	immunization ‡			Delayed**
		C1300 5 $\times$ 10 ⁵	C γ 22 5 $\times$ 10 ⁵	C γ 22 2 $\times$ 10 ⁶	C γ 22 5 $\times$ 10 ⁵
Exp. 1 (5)	39 $\pm$ 1	38 $\pm$ 5	55 $\pm$ 7*	47 $\pm$ 5	53 $\pm$ 3+
Exp. 2 (5)	48 $\pm$ 3	36 $\pm$ 2	N.D.***	48 $\pm$ 5	N.D.
Exp. 3 (5)	39 $\pm$ 5	N.D.	54 $\pm$ 3+	50 $\pm$ 4	58 $\pm$ 3+
Exp. 4 (6)	49 $\pm$ 1	N.D.	54 $\pm$ 2	53 $\pm$ 4	N.D.
Exp. 5 (10)	43 $\pm$ 2	31 $\pm$ 3	58 $\pm$ 4*	52 $\pm$ 2	55 $\pm$ 2+
Mean (31)	45 $\pm$ 2	34 $\pm$ 3	57 $\pm$ 4+	50 $\pm$ 5	55 $\pm$ 3+

‡ 2 $\times$ 10⁶ of C1300 cells were injected into the right flank of A/JA $\times$ mice and each dose of immunogen (C1300 or C γ 22) were injected into the left flank. All values shows mean $\pm$ S.D (days).

* PBS was injected into the left flank instead of immunogen.

** Five days after C1300 cells inoculation, the immunogen was injected into the other side.

*** not done.

+ p<0.05, compared with the control values (Student's T test).

親株 C1300 接種し、その生着率を C1300 を1次感作に用いた場合と比較した。一次感作には通常マイトマイシン処理や放射線処理をした増殖能を抑制した細胞を用いることが多いが、この実験では IFN- γ 遺伝子導入細胞よりの IFN- γ の産生の低下が予想されたため生着下限量の生細胞を用いた。その結果免疫した部位に親株 C1300 を生着十分量の 2 $\times$ 10⁶ 個接種すると免疫しないマウスでは95%が生着するのに対し、C1300 で感作した群では50%、C γ 22 で感作すると生着した腫瘍はなかった (Table 7)。また親株を免疫した部位と異なる部位に接種して比較すると、C1300 感作群では75%、C γ 22 感作群で20%であった。さらに腫瘍が生着したマウスの生存期間をみるとコントロールの C1300 が48日に対して C γ 22 感作群では74日と有意な延長がみられた。これは C1300 細胞に対する免疫応答が免疫した局所だけでなく全身的に抗腫瘍活性が高められたことを示すものである。

次に親株 C1300 と免疫源としての C γ 22 を解剖学的に異なる部位に接種し、C γ 22 の接種により免疫応答が増強され、親株に対する抗腫瘍効果が発揮されるかどうかを検討した。つまり C1300 のみを接種したコントロールの生存期間が45 $\pm$ 2日であるのに対し、C γ 22 を免疫源として 5 $\times$ 10⁵ 個接種した群では57 $\pm$ 4日と有意に延長した (P<0.05)。しかし C γ 22 を2 $\times$ 10⁶ 個接種した群では50 $\pm$ 5日とコントロールと有意差は得られなかった (Table 8)。この際免疫源として接種

した C γ 22 の腫瘍が生着したものは IFN- γ の産生量が問題となってくるため除外した。また C γ 22 を接種しても C1300 の生着性には変化なく、C γ 22 の腫瘍が消失する時期に C1300 の腫瘍に対しては拒絶するほどの反応は生じなかった。

次にさらに免疫効果をあげるために親株 C1300 を接種後腫瘍形成した5日目に同部位に C γ 22 を接種した。この場合生存期間が43 $\pm$ 4日のコントロール群に対し、C γ 22 を 5 $\times$ 10⁵ 個接種した群では66 $\pm$ 2日と有

Table 9. The survival time of mice after local implantation of C γ 22 cells.

(n)	control*	C γ 22 cells local implantation ‡	
		5 $\times$ 10 ⁵	2 $\times$ 10 ⁶
Exp. 1 (5)	48 $\pm$ 3	N.D.**	73 $\pm$ 5+
Exp. 2 (5)	39 $\pm$ 5	66 $\pm$ 2+	55 $\pm$ 2++
Mean (10)	43 $\pm$ 4	66 $\pm$ 2	64 $\pm$ 4

‡ Five days after inoculation 2 $\times$ 10⁶ of C1300 cells, each dose of C γ 22 cells was locally injected into the tumors. All values show mean $\pm$ S.D. (days).

* PBS was injected instead of C γ 22.

** not done.

+ p<0.01, compared with the control values (Student's t test).

++ p<0.05, compared with the control values (Student's t test).

意な ($P < 0.01$) 延長がみられた。また 2×10^6 個接種群では 64 ± 4 日と延長し、局所接種群では 5×10^5 個接種した場合と同様に生存期間は延長した (Table 9)。この結果は $C\gamma 22$ から産生される $IFN-\gamma$ の量と関係しているかもしれない。

腫瘍内浸潤リンパ球の解析

皮下腫瘍に対する宿主の反応をみるために $IFN-\gamma$ 遺伝子導入腫瘍、または1次感作したマウスに接種した C1300 腫瘍の浸潤リンパ球の subset の解析を行った。腫瘍細胞接種後2週間目の腫瘍と比較すると $C\gamma 22$

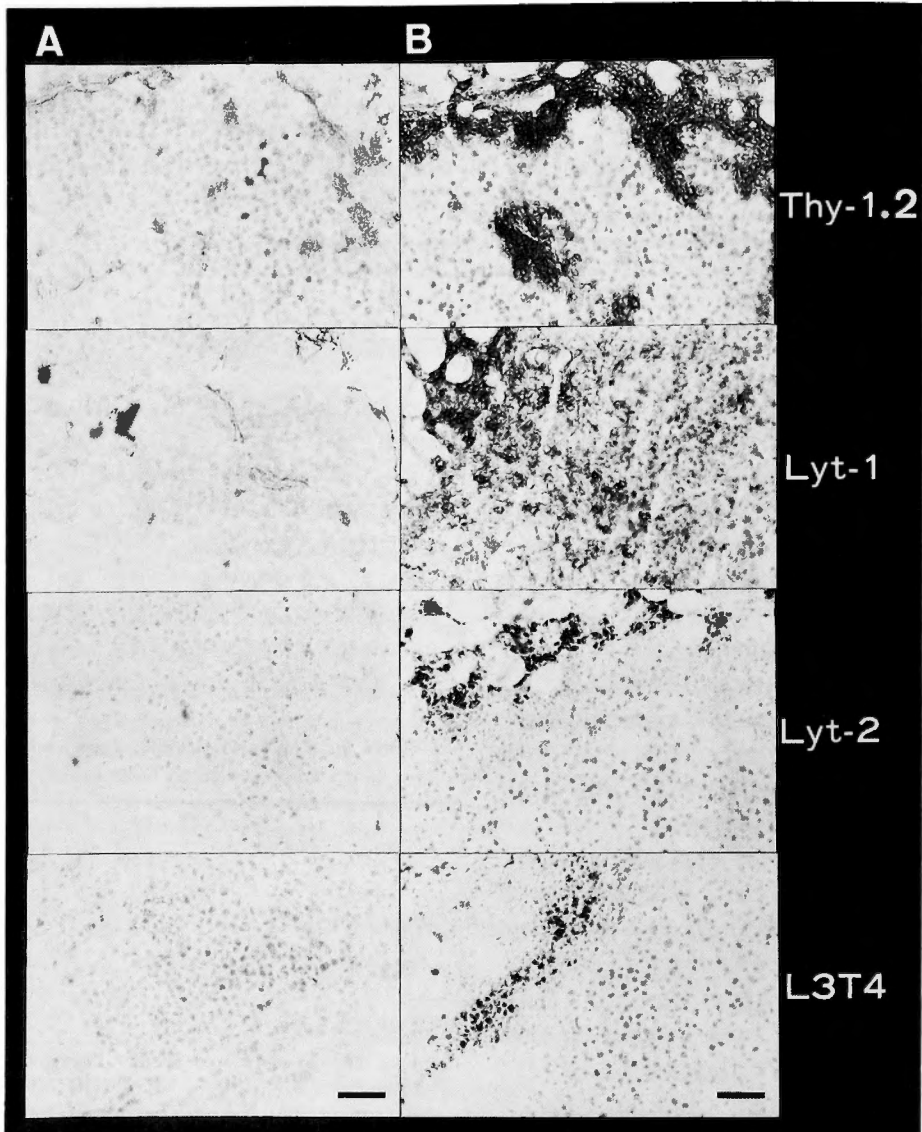


Fig. 12 Immunohistochemical analysis of the frozen sections of subcutaneous tumors. Anti-Thy-1.2 (mouse T cell marker), anti-Lyt-1 (mouse T cell differentiation antigen), anti-Lyt-2 (mouse killer/suppressor marker) and anti-L3T4 (mouse helper T cell marker) were used as the first antibodies. The tumors induced by C1300 cells (A) and $C\gamma 22$ cells (B) were obtained 2 weeks after injection.

の腫瘍で Thy-1⁺ 細胞が腫瘍周囲や腫瘍内血管周囲より多数浸潤していたが、この時点で C1300 の腫瘍への Thy-1⁺ 細胞の浸潤はごくわずかであった。また T 細胞サブセットの Lyl-2⁺ や L3T4⁺ 細胞の浸潤が層状に観察された (Fig. 12)。C γ 3 の腫瘍でも同様のリンパ球浸潤を認めた。また C γ 22 で 1 次感作を行った場合、免疫しなかった場合にはリンパ球浸潤の少ない親株 C1300 腫瘍でも同様に浸潤リンパ球が数多く認められたが、その subset の比率には大きな変化は認められなかった (データ未提示)。これは C γ 22 による感作で宿主の免疫応答が高まったことを示すものである。考察-2

神経芽細胞腫株 C1300 にレトロウイルスベクターを用いて IFN- γ 遺伝子を組み入れ、腫瘍細胞自身が IFN- γ を産生するようになると、その産生量は一般的臨床治療量に比してわずかであるにもかかわらず同系マウスで皮下接種時の腫瘍形成能や腫瘍増大と腫瘍死までの期間を指標とした tumorigenicity が劇的に低下した。これらの変化は IFN- γ 低産生クローン C γ 3 にくらべ IFN- γ 高産生クローン C γ 22 で顕著であり tumorigenicity の低下は IFN- γ の産生量と相関があると考えられた。

腫瘍の tumorigenicity に腫瘍細胞の MHC 抗原の発現が関与するということは、Class I 抗原の消失あるいは低下した腫瘍でその抗原を再発現させた研究^{1, 27, 55, 61)} で明らかであるが、ある腫瘍では MHC Class I 抗原の発現のみでは tumorigenicity の低下に不十分であると言われている¹⁰⁾。MHC 抗原の発現と tumorigenicity の関係は複雑であるが、一般的に神経芽細胞腫は MHC 抗原の発現と腫瘍の悪性度は逆相関の関係にある腫瘍の一つとされている³³⁾。このような腫瘍細胞の MHC Class I 抗原の発現の増強は腫瘍特異的 CTL などの免疫担当細胞の効果的な認識あるいは分化、誘導を助けるという数多くの研究がなされている²⁵⁾。C1300 細胞に IFN- γ 遺伝子導入した細胞は IFN- γ の産生量にかかわらず MHC Class I 抗原が H-2K および H-2D も同様に mRNA 転写レベルならびに表面抗原の発現として増強していたが、これは C1300 細胞に IFN- γ 処理を加えると MHC Class I 抗原が表面抗原として発現することより IFN- γ の発現によるものと考えられる。しかも MHC Class I 遺伝子の発現は IFN- γ の産生量にかかわらず非常に強く、また 1,000 I.U./ml の IFN- γ で 24 時間処理した以上に Class I 遺伝子の発現がみられ、

さらにこの増強した Class I 遺伝子の発現は、分泌された IFN- γ を中和するのに十分な量の抗 IFN- γ 抗体を加えても影響されなかった (データ未提示)。

IFN- γ 遺伝子導入腫瘍で腫瘍形成後、腫瘍の成長が著しく抑制され、また C γ 3 を 5×10^5 個接種後 14-20 日目に腫瘍がむしろ退縮するような現象が認められたが、IFN- γ 遺伝子導入腫瘍は MHC Class I 抗原の発現の増強しており、これが T 細胞への誘導、認識を高め、細胞性免疫応答を活性化したためと考えられる。さらに腫瘍内浸潤リンパ球の免疫組織学的検索において、接種後 14 日目の C1300 腫瘍に比べて IFN- γ 遺伝子導入腫瘍では Lyl-2⁺ や L3T4⁺ 細胞を含む Thy-1⁺ 細胞の浸潤が腫瘍血管や被膜周囲より顕著に多数みられ、この腫瘍増殖の抑制は T 細胞をはじめとする免疫担当細胞の活性化によるものであることを裏付けることができた。また IFN- γ 遺伝子導入細胞は MHC 抗原の他に特定はされていないがおそらく存在すると考えられる腫瘍特異抗原の発現も増強されている可能性も考えられ^{8, 17, 18, 22, 39)}、Lyl-2⁺ や L3T4⁺ 細胞が層状をなして集積しているのは IFN- γ 遺伝子導入腫瘍に対する免疫担当細胞の分化、エフェクター細胞の活性化といった免疫応答が腫瘍局所で行われていることを示唆するものである。

ところで tumorigenicity は宿主側のエフェクター細胞の違いにより腫瘍細胞接種後の腫瘍形成能と形成後の増大率に分けて考える必要がある。MHC 抗原の発現は腫瘍成立後の増殖抑制にかかわっていると考えられたが、初期腫瘍形成には腫瘍細胞そのものの性質と宿主側の異物除去に働く NK 細胞や好中球、マクロファージなどのバランスにより成立するものと考えられている²⁴⁾。IFN- γ 遺伝子導入腫瘍細胞側の要因として、前述したように MHC Class I の発現は非常に増強されていたが、C1300 細胞は IFN- γ で処理しても、また IFN- γ 遺伝子を組み入れて細胞内部で発現させても C1300 自体の細胞増殖に変化を認めず、また分化抗原の一つと考えられるニューロフィラメントの発現や細胞形態にも変化はみられず、C1300 に対する IFN- γ の直接的な抗腫瘍効果⁵⁾ や分化の誘導作用⁴⁶⁾ が認められないのは明らかであった。ところが MHC Class I 抗原の発現に差がみられないが IFN- γ の産生量の低い C γ 3 と比べて、IFN- γ の産生量の多い C γ 22 で腫瘍形成能は著しく低下していた。また IFN- γ を 1,000 I.U. 混合し C1300 細胞の MHC 抗原を発現させて皮下接種したのが、その腫瘍形成率は

C1300 細胞のみ接種した場合と差はみられなかった。このようなことから腫瘍形成率の低下には MHC 抗原の発現よりむしろ IFN- γ が常時産生され、宿主側のエフェクター細胞に与える影響が大きいかかわっていると考えられる。

腫瘍形成初期の免疫防衛機構には NK 細胞が重要な役割を果たしている報告があるが²⁴⁾ 腫瘍細胞を *in vitro* において IFN- γ で処理すると、いかえれば MHC Class I 抗原の発現が増強すると NK 細胞に抵抗性を示すようになり、*in vivo* においても NK 細胞を介する腫瘍細胞排除機構に反応性が消失するといわれている^{23,28,29,56,59,63)} また我々が確立した IFN- γ 遺伝子導入腫瘍細胞 Cy3 および Cy22 はいずれも MHC Class I 抗原は親株に比較して増強しており *in vitro* における脾細胞を使ったクロム遊離法による検索でも C1300 細胞の NK 感受性は極めて低いままであった (データ未提示)。このため IFN- γ 遺伝子導入細胞の腫瘍形成率の低下には NK 細胞の役割は少ないものと考えられる。一方、IFN- γ はマクロファージの活性化をうながすだけでなく MHC Class II 抗原を発現させ⁵¹⁾ マクロファージヘルパー T 細胞間の腫瘍抗原認識過程における antigen presenting 機能に影響を及ぼすものと考えられている^{4,42,57)}。このように腫瘍形成の低下には IFN- γ が常時産生されることによりマクロファージやその他の免疫担当細胞の活性化も大いに関係しているものと考えられる。

IFN- γ を腫瘍局所に投与した場合、IFN- γ 遺伝子導入腫瘍と同様の tumorigenicity に対する効果が現れるかどうかをみるために、腫瘍細胞接種時に rIFN- γ を 1,000 I.U. 混合した群、あるいは腫瘍細胞接種後 5, 7, 9 日目に 1,000 I.U. の IFN- γ を局注した群と比較したが、腫瘍形成率も腫瘍増大率も親株のみの未治療群と差は認められなかった (データ未提示)。腫瘍形成初期に繰り返し IFN- γ を投与しても効果的でなかったのは、IFN- γ の腫瘍局所からのクリアランスが比較的早いためではないかと考えられる。実際に IFN- γ は全身投与ではほとんど 2-3 時間で活性が認められなくなる⁷⁾。従って腫瘍局所に至適濃度状況下で常時 IFN- γ が存在することが腫瘍を治療する上での重要なファクターであると考えられる。

IFN- γ 遺伝子を C1300 細胞に導入することで tumorigenicity が低下することや浸潤リンパ球の解析より immunogenicity が高まることがわかった。そこで IFN- γ 遺伝子導入細胞を能動免疫に利用した免疫

療法を検討した。まず 3×10^5 個の IFN- γ 遺伝子導入細胞を viable な状態で同系マウスに皮下接種すると、次回親株の C1300 細胞を腫瘍形成に十分量接種しても生着しなくなった。この際 viable cell を用いたのは放射線処理などを行うと IFN- γ の産生が低下することが懸念されたためである。

また C1300 細胞接種時と同時にまたは 5 日後に能動免疫による抗腫瘍効果を期待して IFN- γ 遺伝子導入細胞を解剖学的に異なる部位に接種すると、そのマウスの生存期間には有意に延長した。この抗腫瘍効果は IFN- γ 遺伝子導入細胞が親株と同じ腫瘍特異抗原性を増強された形で保持発現し、さらに移入した免疫源から IFN- γ が絶えず産生されることより CTL が局所のみならず全身的に誘導されたと考えられる。しかしながら、IFN- γ 遺伝子導入細胞を免疫源とした場合、Table 8 で示したように 5×10^5 で最も生存期間の延長がみられたのに対し 2×10^6 に接種細胞数を増やすとむしろ生存期間は短縮した。これは抗原量が多くなるとサブプレッサー T 細胞の誘導が促されるという報告があり⁶⁵⁾、CTL の誘導には至適接種細胞数の検討が重要であることが示唆された。

さらに治療モデル実験として皮下に C1300 の腫瘍を形成した 5 日目に局所への IFN- γ の供給と免疫応答の活性化を期待して IFN- γ 遺伝子導入細胞 Cy22 を腫瘍局所に投与した。これにより未治療群に比べ有意に腫瘍増大を抑制しマウスの生存期間を延長させることができた (Table 9)。しかしながらこの場合でも腫瘍を拒絶するまでには至らなかった。さらに治療効果をあげる方法としては、BCG などにより非特異的免疫の活性化と IFN- γ 遺伝子導入細胞による特異的能動免疫を併用したり、IFN- γ 遺伝子導入細胞を腫瘍局所のみならず他の部位にも接種し、CTL などの抗腫瘍細胞を活性化する方法が考えられ、今後検討を加えたい。

総 括

T-T 細胞間相互作用における IFN- γ の効果を判定するのにエフェクター側あるいは標的細胞側に IFN- γ 遺伝子を組み入れてアッセイした。

まず腫瘍細胞特異的 CTL に IFN- γ 遺伝子を導入すると CTL の細胞障害活性が増強した。これは CTL より常時産生される IFN- γ により標的細胞の MHC 抗原などの表面抗原の発現が促進され、CTL の targeting 作用が増強したものと考えられた。また腫瘍細胞

胞に IFN- γ 遺伝子を導入すると、腫瘍増大は抑制され、特に IFN- γ の産生量の多いサブクローンでは腫瘍細胞の着生性も低下した。これは自らの表面抗原の発現が高まり抗原性が発揮され、さらに IFN- γ の産生も加わり、CTL やその他の免疫担当細胞を活性化したためと考えられた。

我々の用いた遺伝子を組み入れてアッセイする方法は、遺伝子導入腫瘍細胞が産生する IFN- γ で自ら常に刺激され、また一定レベルの IFN- γ が細胞周囲に存在することで、*in vitro* だけでなく *in vivo* において腫瘍に対する免疫応答での IFN- γ の役割を知のに適用することができる。またそれだけでなく、局所で生理的な量の IFN- γ を供給して理想的な免疫反応の調節を促す手段として重要と考えられる。たとえば頭蓋内腫瘍のように腫瘍局所に投与した IFN- γ 活性をその場に長時間保つことが困難な場合、腫瘍細胞や正常線維芽細胞などに IFN- γ 遺伝子を組み入れた、Seiden らの言う“transkaryocyte”を腫瘍局所に接種し、腫瘍局所で IFN- γ を常時産生する新しい試みを治療に応用することができる⁵⁰⁾。

また immunogenicity の亢進した IFN- γ 遺伝子導入細胞を用いて免疫すると、宿主の免疫応答をより活性化することができた。将来手術の際、採取した腫瘍細胞に IFN- γ 遺伝子を導入してそれを免疫源として接種することで特異的免疫活性が高まり、腫瘍再発を予防することができるかもしれない。このように IFN- γ 遺伝子導入細胞を用いた能動免疫は新しい免疫療法としての有用性が十分に期待される。

結 語

1. CTL 活性に及ぼす IFN- γ の効果を検討するためにマウス 203-glioma 細胞に対する CTL クローン (E-4) を樹立し、その宿主ゲノムにレトロウイルスベクターを用いてマウス IFN- γ cDNA を導入した。この方法により E-4 に比べ8-10倍も IFN- γ 産生量をもつサブクローン Ey-6 および Ey-9 が得られた。*In vitro* では IFN- γ の抗腫瘍効果に感受性をもたない 203-glioma 細胞に対して、これらのサブクローンは *in vitro* において E-4 より2-3倍の細胞障害活性をもっていた。

2. IFN- γ 遺伝子導入クローンの細胞障害活性の亢進は抗 IFN- γ 抗体で低下し、また 203-glioma を rIFN- γ で前処理すると CTL に対する感受性が高まることより IFN- γ の産生に起因するものと考えられ

た。

3. *In vivo* における腫瘍細胞中和試験 (Winn-type assay) および養子免疫療法モデルでの Ey-6 および Ey-9 の抗腫瘍効果は IFN- γ の産生量に応じて腫瘍形成能の低下ならびに腫瘍増大の抑制が得られた。このことより IFN- γ 遺伝子導入 CTL は細胞障害活性が高く、新しい免疫療法への応用が期待された。

4. C1300 細胞に IFN- γ 遺伝子を導入して IFN- γ 高産生株 Cy22 と IFN- γ 低産生株 Cy3 が得られた。これら遺伝子導入細胞は細胞増殖、分化や培養細胞の形態に関して親株と変化は認められなかったが、MHC Class I 抗原の発現が両クローンの IFN- γ 産生量の違いにかかわらず増強されていた。

5. MHC の発現は高いが IFN- γ 産生量の少ない Cy3 では腫瘍形成率が親株程度にみられたことより、皮下接種した細胞の腫瘍形成率には MHC 抗原の発現性の関与は少なく IFN- γ が常時産生されることによるエフェクター細胞の活性化が腫瘍排除機構に重要であると示唆された。

6. また形成した腫瘍の腫瘍増大率は IFN- γ 産生量にかかわらず IFN- γ 遺伝子導入クローンで著明に抑制され、MHC 抗原をはじめとする表面抗原の発現による T細胞の分化、誘導の関与が考えられる。これは皮下腫瘍の免疫組織学的解析において、IFN- γ 遺伝子導入腫瘍で親株の腫瘍に比して Lyl-2⁺, L3T4⁺ 細胞を含む Thy-1⁺ のリンパ球の浸潤が強いことでうらづけられた。

7. 表面抗原が発現した IFN- γ 遺伝子導入細胞を免疫源として用いて、マウスを免疫することで親株の腫瘍増大を抑制し、生存期間を延長することができた。この方法は接種抗原量を考慮する必要性が認められたものの、IFN- γ 遺伝子導入による能動免疫療法としての応用が期待できる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師菊池晴彦教授に深甚の謝意を表します。また終始御指導および御協力いただきました京都大学医学部脳神経外科、前助教授、山下純宏先生（現金沢大学医学部脳神経外科教授）に感謝の意を表します。そして、実験に関し御指導御協力頂きました京都大学ウイルス研病理部門花岡正男教授、難波雄二郎教授、同細胞ウイルス部門助手渡部好彦先生に感謝いたします。また実験に多くの御協力を頂きました京都大学医学部脳神経外科助手宮武伸一先生、山崎俊樹先生に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Bahler DW, Felinger JG, Harwell LW, et al: Reduced tumorigenicity of a spontaneous mouse

- lung carcinoma following H-2 gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4562-4566, 1987.
- 2) Barnards R, Schrier P, Houweling A, et al: Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature (London)* 305: 776-779, 1983.
- 3) Binz H, Fenner M, Engel R, et al: Studies on chemically induced rat tumor. II: Partial protection against syngeneic lethal tumors by cloned syngeneic cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer* 32: 491-500, 1983.
- 4) Birmingham JR, Chestnut RW, Kappler JW, et al: Antigen presentation to T cell hybridomas by a macrophage cell line: an inducible function. *J Immunol* 128: 1491-1492, 1982.
- 5) Brouty-Boye D: *Lymphokine Rep* 1: 99-112, 1980.
- 6) Bukowski JF, Welsh RM: Interferon enhances the susceptibility of virus-infected fibroblasts to cytotoxic T cells. *J Exp Med* 161: 257-262, 1985.
- 7) Cantell K, Fiers W, Hirvonen S, et al: Circulating interferon in rabbits after simultaneous intramuscular administration of human alpha and gamma interferons. *J Interferon Res* 4: 291-293, 1984.
- 8) Carrel S, Schmidt-Kessen A, Giuffre L: Recombinant interferon- γ can induce the expression of HLA-ABC and tumor-associated antigens. *Eur J Immunol* 15: 118-123, 1985.
- 9) Cepko CL, Roberts BE, Mulligan RC: Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 37: 1053-1062, 1984.
- 10) Colbère-Garapin F, Horodniceanu F, Kourilsky P, et al: A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J Mol Biol* 150: 1-14, 1981.
- 11) Cole GA, Cole GA, Clements VK, et al: Allogenic H-2 antigen expression is insufficient for tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8613-8617, 1987.
- 12) Dailey MO, Pillemer E, Weissman IL: Protection against syngeneic lymphoma by a long-lived cytotoxic T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5384-5387, 1982.
- 13) De Maeyer-Guignard J, DeMaeyer E: Immunomodulation by interferons: recent developments. In *Interferon* edited by Gresser I, New York, Academic Press, 1985, vol. 6, p. 69-86.
- 14) Doherty PC, Knowles BB, Wettstein PJ: Immunological surveillance of tumors in the context of major histocompatibility complex restriction of T cell function. *Adv Cancer Res* 42: 1-65, 1984.
- 15) Dunham LC, Stewart HL: A survey of transplantable and transmissible animal tumors. *J Natl Cancer Inst* 13: 1299-1377, 1953.
- 16) Engers HD, Glasebrook AL, Sorenson GD: Allogeneic tumor rejection induced by the intravenous injection of Lyt-2⁺ cytolytic T lymphocyte clone. *J Exp Med* 156: 1280-1285, 1982.
- 17) Giacomini P, Aguzzi A, Giuffre L: Modulation by recombinant DNA leukocyte(α) and fibroblast(β) interferons of the expression and seeding of HLA-and tumor-associated antigens by human melanoma cells. *J Immunol* 133: 1649-1655, 1984.
- 18) Giacomini P, Imberti L, Aguzzi A, et al: Immunochemical analysis of the modulation of human melanoma-associated antigens by DNA recombinant immune interferon. *J Immunol* 135: 2887-2894, 1985.
- 19) Goldstein D, Laszlo J: Interferon therapy in cancer: From imagination to interferon. *Cancer Res* 46: 4315-4329, 1986.
- 20) Gorman C: High efficiency gene transfer into mammalian cells. In *DNA cloning* edited by Glover DM, vol. 2, Oxford, IRL Press, 1985, p. 143-190.
- 21) Grabstein KH: Selected Methods in Cellular Immunology. In *Selected Methods in Cellular Immunology* edited by Mishell BB, Shiigi SM, San Francisco, Freeman, 1980, p. 124-137.
- 22) Greiner JW, Hand PH, Naguchi P, et al: Enhanced expression of surface tumor-associated antigens on human breast and colon tumor cells after recombinant human leukocyte α -interferon treatment. *Cancer Res* 44: 3208-3214, 1984.
- 23) Grönberg A, Kiessling R, Masucci G, et al: Gamma-interferon (IFN- γ) produced during effector and target interactions renders target cells less susceptible to NK-cell-mediated lysis. *Int J Cancer* 32: 609-616, 1983.
- 24) Hanna N, Burton RC: Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J Immunol* 127: 1754-1758, 1981.
- 25) Hayashi H, Tanaka K, Jay F, et al: Modulation of the tumorigenicity of human adenovirus-12-transformed cells by interferon. *Cell* 43: 263-267, 1985.
- 26) Herberman RB, Ortaldo JR: Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science (Wash. DC)* 214: 24-30, 1981.
- 27) Hui K, Grosveld F, Festenstein H: Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature (London)* 311: 750-752, 1984.

- 28) Kärre K, Ljunggren HG, Piontec G: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319: 675-678, 1986.
- 29) Kawano YI, Taniguchi K, Toshitani A, et al: Synergistic defense system by cooperative natural effectors against metastasis of B 16 melanoma cells in H-2-associated control: Different behavior of H-2⁺ and H-2⁻ cells in metastatic processes. *J Immunol* 136: 4729-4734, 1986.
- 30) Kirchner H: Interferons a group of multiple lymphokines. *Semin Immunopathol* 7: 347-374, 1984.
- 31) Klein G, Klein E: Immune surveillance against virus-induced tumors and on rejectability of spontaneous tumors: Contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc Natl Sci USA* 74: 2121-2125, 1977.
- 32) Lindahl P, Leary P, Gresser I: Enhancement by interferon of the expression of surface antigens on murine leukemia L 1210 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2785-2788, 1973.
- 33) Lampson LA, Fisher CA, Whelan JP: Striking paucity of HLA-A,B,C and β_2 -microglobulin on human neuroblastoma cell lines, *J Immunol* 130: 2471-2478, 1983.
- 34) Lotze MT, Linc BR, Mathisen DJ, et al: The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in T-cell growth factor(TCGF): implications for adoptive immunotherapy of tumors. *J Immunol* 125: 1487-1493, 1980.
- 35) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- 36) Mann R, Mulligan RC, Baltimore D: Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33: 153-159, 1983.
- 37) Matis LA, Ruscetti SK, Longo DL, et al: Distinct proliferative T cell clonotypes are generated in response to a murine retrovirus-induced syngeneic T cell leukemia: viral gp 70 antigen-specific MT 4⁺ clones and Lyt-2⁺ cytolytic clones that recognize a tumor-specific cell surface antigen. *J Immunol* 135: 703-713, 1985.
- 38) Matis LA, Shu S, Groves ES, et al: Adoptive immunotherapy of a syngeneic murine leukemia with a tumor-specific cytotoxic T cell clone and recombinant human interleukin 2: Correlation with clonal IL-2 receptor expression. *J Immunol* 136: 3496-3501, 1986.
- 39) 宮武伸一: キラーT細胞クローンによるヒトグリオサルコーマ関連抗原の解析. *Arch Jpn Chir* 57(1): 55-68, 1988.
- 40) Nagata K, Ohara O, Teraoka M, et al: Production and purification of recombinant mouse interferon- γ from E.coli. In *Lymphokines and interferons* edited by Clemens JM, Morris AG, Gearing AJH, Oxford, IRL Press, 1987, p. 29-52.
- 41) Nishihara K, Miyatake S, Sakata T et al: Augmentation of tumor targeting in a line of glioma-specific mouse cytotoxic T-lymphocytes by retroviral expression of mouse γ -interferon cDNA. *Cancer Res* 48: 4730-4735, 1988.
- 42) Pace JL, Russel SW, Torres BA, et al: Recombinant mouse γ interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J Immunol* 130: 2011-2013, 1983.
- 43) Paulnock DM, Borden EC: Modulation of immune functions by interferons. In *Immunity to Cancer* edited by Arnold E, New York, Academic Press, 1985, p. 545-559.
- 44) Rosenstein MT, Eberlein TJ, Rosenberg SA: Adoptive immunotherapy of established syngeneic solid tumors: role of T lymphoid subpopulations. *J Immunol* 132: 2117-2122, 1984.
- 45) Rosenstein M, Rosenberg SA: Generation of lytic and proliferative lymphoid clones to syngeneic tumor: in vitro and in vivo studies. *J Natl Cancer Inst* 72: 1161-1165, 1984.
- 46) Rossi G: In *Interferon*, edited by Gresser I, New York, Academic Press, vol. 6, p. 31-68, 1985.
- 47) Saito T, Berens ME, Welander EC: Characterization of the indirect autitumor clonogenic assay. *Cancer Res* 47: 673-679, 1987.
- 48) Schmidt W, Festenstein H: Resistance to cell-mediated cytotoxicity is correlated with reduction of H-2K gene products in AKR leukemia. *Immunogenetics* 16: 257-264, 1982.
- 49) Schrier P, Bernards R, Vaessen R, et al: Expression of Class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus type 12 in transformed rat cells. *Nature (London)* 305: 771-775, 1983.
- 50) Selden RF, Skoskiewicz MJ, Russell PS, et al: Regulation of insulin-gene expression: Implications for gene therapy. *N Engl J Med* 317: 1067-1075, 1987.
- 51) Steeg PS, Moore RN, Johnson HJ, et al: Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity. *J Exp Med* 156: 1780-1793, 1982.
- 52) Stewart WE, Blanchard DK: Interferons, cytostatic and immuno-modulatory effects. In *Immunity to Cancer* edited by Arnord E, New York,

- Academic Press, p. 295-307, 1985.
- 53) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517, 1975.
- 54) Tanaka K, Hayashi H, Hamada C, et al: Expression of major histocompatibility complex class I antigens as a strategy for the potentiation of immune recognition of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8723-8727, 1986.
- 55) Tanaka K, Isselbacher KJ, Khoury G, et al: Reversal of oncogenesis by the expression of a major histocompatibility complex class I gene. *Science (Wash. DC)* 228: 26-30, 1985.
- 56) Trincheri G, Santoli D: Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells: Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cell to lysis. *J Exp Med* 147: 1314-1333, 1978.
- 57) Varesio L, Blasi E, Thruman GB: Potent activation of mouse macrophages by recombinant interferon- γ . *Cancer Res* 44: 4465-4469, 1984.
- 58) Vilcek J, Kelke HC, Jumming LE, et al: Structure and function of human interferon gamma. In *Mediators in Cell Growth and Differentiation* edited by Ford RJ, Maizel AL, New York, Raven Press, 1985, p. 299-313.
- 59) Wallach D: Interferon induced resistance to the killing by NK cells: A preferential effect of IFN-gamma. *Cell Immunol* 75: 390-395, 1983.
- 60) Wallach D, Fellous M, Revel M: Preferential effect of γ interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNA in human cells. *Nature (London)* 299: 833-836, 1982.
- 61) Wallich R, Bulbuc N, Hammerling GJ, et al: Abrogation of metastatic properties of tumor cells by de novo expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. *Nature (London)* 315: 301-305, 1985.
- 62) Watanabe Y, Kawade Y: Induction, production and purification of natural mouse IFN- α and - β . In *Lymphokines and interferons: a practical approach* edited by Clemens JM, Morris AG, Gearing AJH, Oxford, IRL Press, p. 1-14, 1987.
- 63) Welsh RM, Kärre K, Hansson M, et al: Interferon-mediated protection of normal and tumor target cells against lysis by mouse natural killer cells. *J Immunol* 126: 219-225, 1981.
- 64) Yamasaki T, Handa H, Yamashita J, et al: Specific adoptive immunotherapy with tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte clone for murine malignant gliomas. *Cancer Res* 44: 1776-1783, 1984.
- 65) 山崎俊樹, 山下純宏, 半田 肇, 他: 腫瘍免疫における抑制的制御機構—サブレッサーT細胞の動態の解析. *脳神経* 35: 703-709, 1983.