

Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の悪性ヒトグリオーマ固形腫瘍に対する浸潤能と融解能及びその細胞障害機構に関する研究 —— 3 次元 spheroid モデルを用いた電子顕微鏡学的解析 ——

京都大学医学部脳神経外科教室 (指導: 菊池晴彦教授)

岩 崎 孝 一

〔平成元年10月1日〕

Infiltrative and Cytolytic Activities of Lymphokine-Activated Killer (LAK) Cells Against a Human Glioma Mass: Ultrastructural Analysis Using a Three-Dimensional Multicellular Spheroid Model

KOUICHI IWASAKI

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. Haruhiko Kikuchi)

In the present study, we have investigated not only the infiltrative and cytotoxic activities of lymphokine-activated killer (LAK) cells on a tumor mass, but also the ultrastructural cell-to-cell interaction between LAK effector cells and target tumor cells during the cytolytic process within a three-dimensional solid tumor. A multicellular tumor spheroid (MTS) of a human malignant glioma cell line (U-251MG) was utilized as a solid tumor model. LAK cells were generated from peripheral blood lymphocytes (PBL) of a healthy donor after 4-day culture in the presence of interleukin-2 (IL-2). MTSs of 500 μ m diameter were cocultivated with either LAK cells or non-activated PBL, and then time-sequential kinetic, morphological, and ultrastructural examinations were carried out.

It was demonstrated that the number of viable tumor cells present within MTSs gradually decreased in parallel with the increase in the number of LAK cells. Morphological analyses revealed that LAK cells directly infiltrated toward the inner areas of MTSs and caused a progressive tumor destruction. In contrast, PBL hardly exhibited such activities. Ultrastructurally, it was found that the infiltrating LAK effector cells were composed of heterogeneous subpopulations, T-like cells and large granular lymphocyte (LGL)-like cells, and that both types of lymphocytes tightly adhered to the tumor cells and extended their cytoplasmic extensions deeply into the targets which underwent a progressive degeneration. Concerning the cellular interaction, it was found that these two kinds of LAK cells displayed some distinct ultrastructural feature in the process of target cell killing. Particularly, it should be stressed that LGL-like LAK cells exhibited a significant development of the intracytoplasmic secretory granules, suggesting an association with the lethal hit of target cell lysis.

Key words: LAK cells, Glioma, Spheroid, Cytolysis, Electronmicroscopy.

索引語: LAK 細胞, グリオーマ, Spheroid, 細胞障害, 電子顕微鏡.

Present Address: Kyoto University Medical School, Department of Neurosurgery, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

は じ め に

1982年に Grimm らにより報告されて以来, lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の悪性腫瘍に対する細胞融解能に関しては多くの報告がある^{7,8,9,30)}. また近年では, LAK 細胞を各種悪性腫瘍の治療(養子免疫療法)に応用する試みもなされているが, その結果に関しては必ずしも *in vitro* でみられるような顕著な抗腫瘍性を反映するものではない^{10,17,28,29)}. *in vitro* の実験系では, LAK 細胞の標的には主に mono-layer あるいは single cell type の腫瘍細胞が用いられるが, 養子免疫療法のエフェクター細胞に用いることを前提とすれば, 3次元構造を持った腫瘍に対する抗腫瘍効果も調べる必要があると考えられる.

multicellular tumor spheroid (MTS) は間質や血管を持たないものの, その3次元構造より固形腫瘍モデルとして有用と考えられている^{22,35)}. このため MTS モデルは, monolayer あるいは single cell suspension type の標的細胞ではとらえられない化学療法や放射線療法の固形腫瘍に対する効果を評価するために用いられてきた^{18,25)}. さらに Lord^{19,20)} や Wilson³⁷⁾ らは, MTS モデルは免疫細胞と固形腫瘍との相互作用を解析することにも適しているとしている. そこで本研究では固形腫瘍モデルである MTS と LAK 細胞を混合培養し, 浸潤能を含めた LAK 細胞の固形腫瘍に対する細胞融解能を評価することを目的とした.

さらに, LAK 細胞の腫瘍内浸潤, 腫瘍細胞融解の過程を形態学的に解析した. 特に電子顕微鏡学的解析により, 固形腫瘍内での LAK 細胞と腫瘍細胞間の相互作用が明らかとなった. このことにより, LAK 細胞集団の中で実際に細胞融解に働くエフェクター細胞サブセットの特徴, さらには細胞融解の mechanism についても考察を加えた.

研究材料および方法

1) 標的腫瘍細胞と multicellular tumor spheroid (MTS) の作成

ヒト悪性グリオーマ由来細胞株 U-251MG を実験に用いた. U-251MG は GFAP 陽性であることを始め, 多くの悪性クリオーマの性質を有している³⁾. MTS の作成はまず, subconfluent の状態の単層培養 U-251MG 細胞を 0.1% トリプシンおよび 0.01% EDTA で処理し, phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄した後, $5 \times 10^5/\text{ml}$ の single cell suspension とした. 続いて, 10 ml の single cell suspension を密栓をした 50-ml 三角フラスコを用いて, 37°C, 100 rpm で振盪培養した. 3-5 日後に得られた MTS のうち, 直径が約 500 μm のものを実体顕微鏡下で選び以下の実験に供した (Fig. 1).

2) Effector の調製

健常人の末梢血を Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, AB Uppsala, Sweden) 比重遠沈法にて分離

< Materials >

target ; U-251MG (malignant astrocytoma derived cell line)

effectors ; LAK
PBL

< Methods >

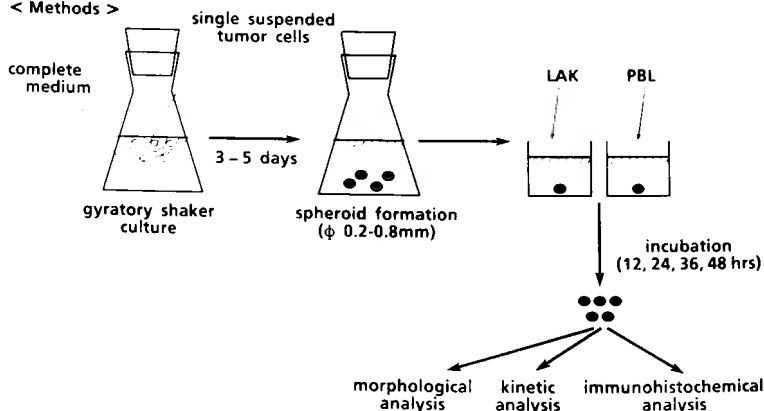


Fig. 1 Experimental design.

した後、これを plastic dish で培養することにより adherent 細胞を除き、non-adherent な細胞を末梢リンパ球分画 (PBL) とした。PBL を 2U/ml の interleukin 2 (IL-2) (武田製薬) 存在下で 4 日間培養したものを LAK 細胞として用いた。LAK 細胞と PBL の細胞障害能は U-251MG の他、erythroleukemia 由来の K562 (NK-sensitive と考えられている) および Burkitt lymphoma 由来の Daudi (NK-resistant) を標的とした 4 時間 ^{51}Cr -遊離法により測定した (Fig. 2)。

また LAK 細胞の表面抗原の解析は、T cell マーカーに対する抗 CD3 (OKT3) (Ortho Pharmaceutical Co., Raritan, NJ, USA) モノクローナル抗体および Natural Killer (NK) cell マーカーに対する抗 CD16 (Leu 11b) (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) モノク

ローナル抗体を 1 次抗体として染色し、フローサイトメータ (FACS 440, Becton Dickinson, USA) により施行した。

3) 培養液及び培養条件

U-251MG 細胞の培養には、10% 非燻化牛胎児血清 (FCS) およびペニシリン G 20 万単位/ml を添加した Dulbecco's modified MEM (日水製薬) (D'MEM 完全培地と呼ぶ) を用いた。また、リンパ球と K562, Daudi の培養には同様の FCS と抗生物質を含む RPMI 1640 (日水製薬) (RPMI 完全培地と呼ぶ) を用いた。培養条件は 37°C, 95% air/5% CO₂ とした。

4) MTS とリンパ球との混合培地

96 穴 microplate (Corning, NY, USA) の各 well に MTS 1 個と LAK 細胞 1×10^6 個を入れ、2 U/ml の

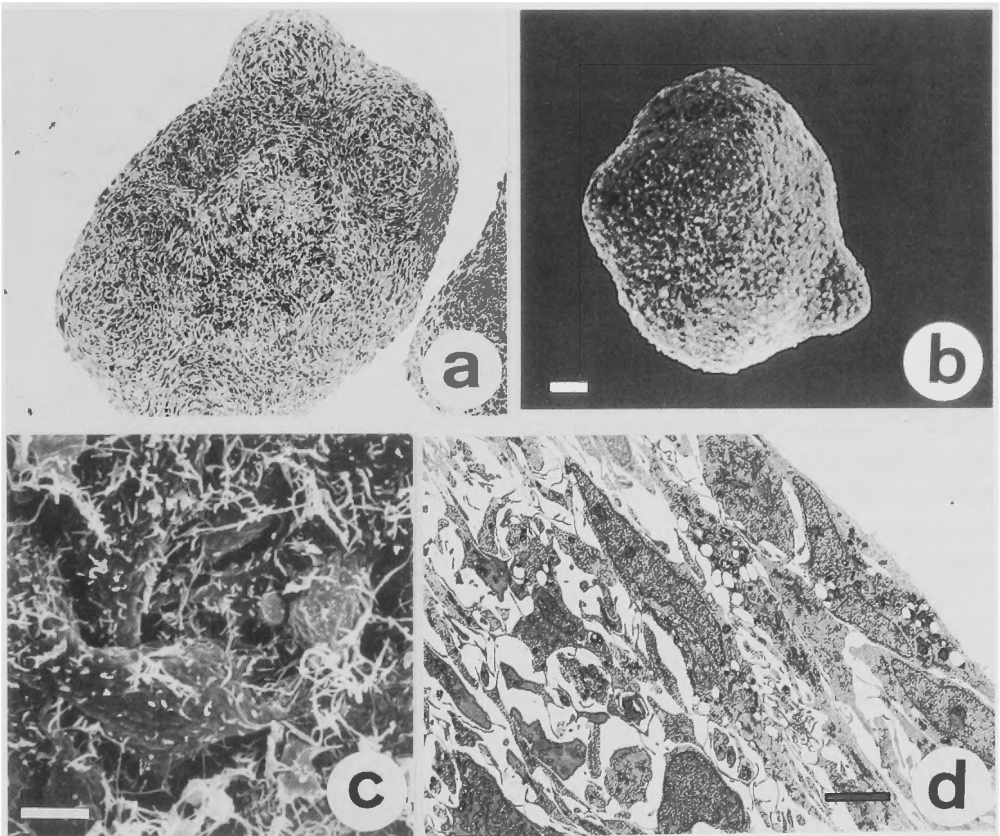


Fig. 2 Morphology of a control MTS.

In a, a toluidine blue-stained cross section shows that a control MTS of approximately 500- μm diameter consists of multiple tumor cells arranging in multilayers. Light microscopy, $\times 180$. In b, MTS has a spherical appearance and a smooth surface. SEM, bar = 50 μ . In c (a higher magnification of b), the surface of MTS is covered by numerous tumor cells with multiple cell processes. SEM, bar = 5 μ . In d, spindle-shaped tumor cells are seen in MTS. Each tumor cell is characterized by an elongated and bizarre nucleus and a variety of cell extensions. TEM, bar = 5 μ .

IL-2 を含む RPMI 完全培地中で混合培養した (LAK-MTS 群). 同細胞数の PBL と同様に, IL-2 を含まない RPMI 完全培地中で混合培養した (PBL-MTS 群). 経時的 (12, 24, 36, 48時間後) に MTS を取り出し PBS で洗浄した後, 以下の解析を行った.

5) 動的解析

混合培養した MTS を trypsin 処理にて single cell 化し, trypan-blue 染色によりその中に存在する生細胞数 (腫瘍細胞とリンパ球を含む) を hemocytometer で計測した. さらに, この single cell suspension (1×10^4 個/ml) を cytospin につけ, Giemsa 染色を施し腫瘍細胞とリンパ球の鑑別計数をおこなった. この割合から MTS 内に存在する腫瘍細胞とリンパ球の絶対数の変化を計算した. 各 stage について最低10個以上の MTS を解析した.

6) 形態学的解析

混合培養後の MTS は型通り 2% glutaraldehyde および 1% osmium tetroxide で各1時間固定, ethanol 系列で脱水後アミルで置換し, 臨界点乾燥をおこなった. その後, 金による蒸着を施し, 走査型電顕 (SEM; Hitachi S-430) にて観察した. また上記のごとく固定, 脱水した試料を epoxy resin に包埋し, microtome にて薄片 (400-500 nm in thickness) および超薄切片 (80-100 nm in thickness) を作成した. 薄片は slide glass 上に mount し, toluidine-blue (T-B) 染色して光顕にて観察した. さらに超薄切片はウラン, 鉛の二重電子染色を施し透過型電顕 (TEM; Hitachi HU-11) にて観察した.

7) 免疫組織学的解析

MTS を OCTcompound (Miles Inc, USA) に包埋し, 液体窒素中で急速凍結した後, 型通り凍結切片を作成した. 凍結切片は slide glass 上に mount し PBS で洗浄した後, CD3 および CD16 モノクローナル抗体および FITC 標識 2 次抗体を用いた間接蛍光抗体法にて染色し, 浸潤リンパ球の表面マーカーを解析した.

結 果

1) 正常 MTS の形態

正常 MTS はほぼ球形であり, 多数の U-251MG 細胞が層状に配列して形成されていた. 尚, $500 \mu\text{m}$ の MTS を構成する腫瘍細胞数は約 5.5×10^4 であった. その表面は腫瘍細胞が魚鱗状に配列し, 比較的平滑であった (SEM). 個々の腫瘍細胞は紡錘形で, 多形性に富んだ核と多くの細胞突起を有していた (TEM).

Table 1 Cytotoxic and phenotypic characteristics of LAK cells and PBLs.

	% cytotoxicity against ^a			% positive for ^b	
	U-251MG	Daudi	K562	CD3	CD16
LAK	62.0	57.5	90.5	85.0	16.4
PBL	9.8	7.2	41.2	ND	ND

^a Assessed by a standard 4-hr ⁵¹Cr release assay at effector: target cell ratios of 20:1. Each value represents the mean of triplicate determination.

^b Analyzed with FACS as described in "Materials and Methods"

ND: not done

LAK: lymphokine-activated killer

PBL: peripheral blood lymphocyte

Table 2 Classification of the grades representing the destructive changes in MTSs after coculture with LAK cells or PBL

Grade	Histological Findings
I	Effectors are in contact with MTS surface, with little destructive changes observed within the MTS.
II	Effectors have infiltrated and destroyed up to the outer third of the MTS.
III	Effector-infiltration and MTS-destruction are extended up to the middle third of the MTS.
IV	Effector-infiltration and MTS-destruction are extended up to the inner third of the MTS.

MTSs: multicellular tumor spheroid (s)

MTS 内では各々の腫瘍細胞が複雑にからみあっていたが, desmosome 等の細胞接着装置や間質は認めなかった (Fig. 2).

2) LAK 細胞の性質

⁵¹Cr-遊離法にて, LAK は U-251MG, Daudi, K562 の全てに強い細胞障害能を示した. 一方 PBL は, K562 のみを融解したが, Daudi と U-251MG に対しては弱い細胞障害能しか示さなかった. FACS による表面抗原解析では, LAK 細胞を構成する細胞は85% が CD3 陽性で, 16% が CD16 陽性であることがわかった (Table 1). また, LAK 細胞集団を構成するリンパ球を形態学的特徴^{21,31,36} により分類すると大きく2つのグループに分けられた. 即ち, 円形の核を持ち比較的 organella に乏しい T 細胞の特徴を持つリンパ球

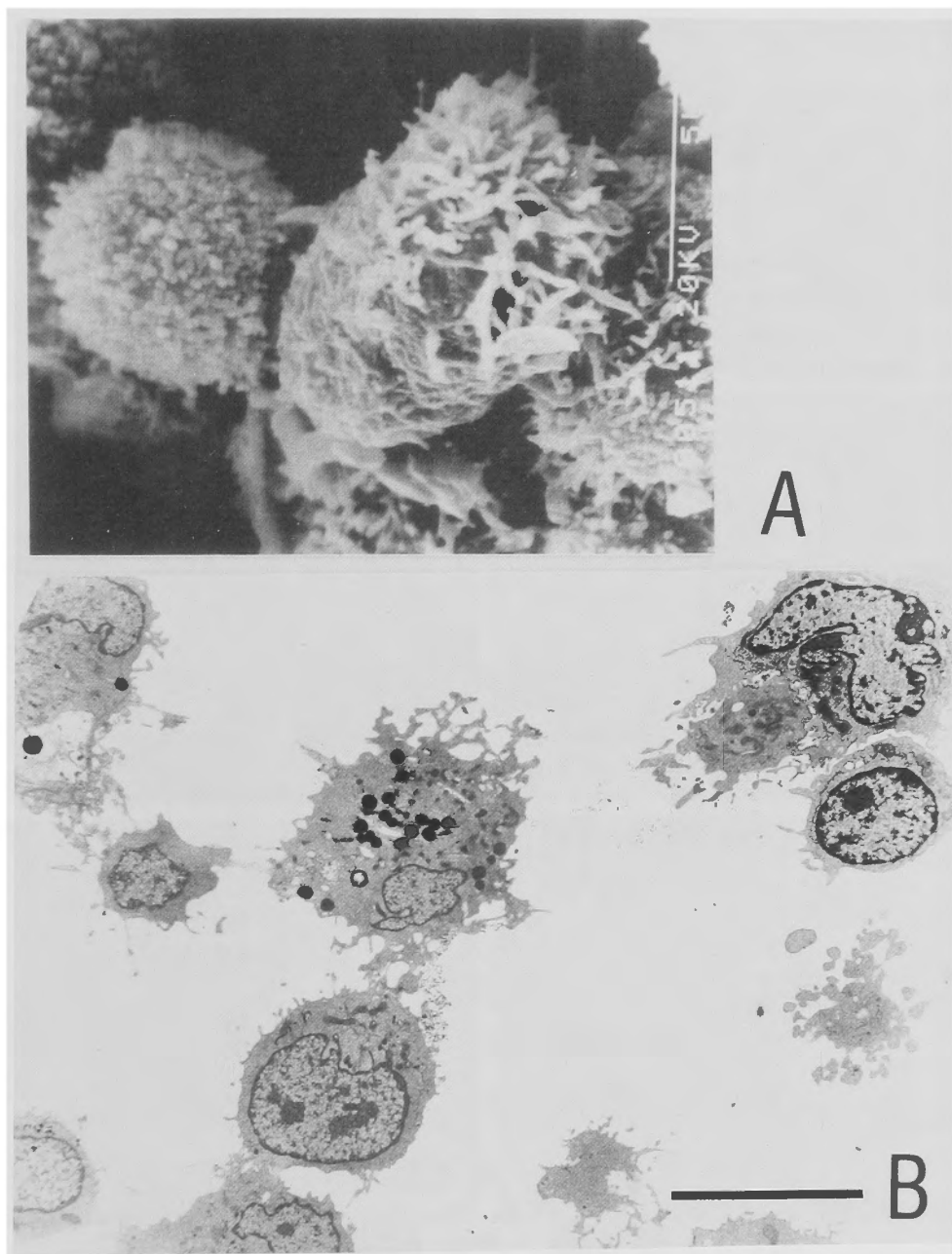


Fig. 3 Morphological characteristics of LAK population before coculture.

In a, LAK cells are fairly heterogeneous in the size and the surface appearance. They have numerous microvilli which considerably vary in density, length, and thickness. SEM, bar = 5μ . In b, LAK cells are divided into two distinct types, based on the intracytoplasmic appearance. The lymphocytes in the center and left upper corner of this figure is similar to LGL (LGL-like cell). The others have the characteristics of T lymphocytes (T-like cells). TEM, bar = 5μ .

(T-like LAK) 群と、三日月状の核と Golgi 小体や粗面小胞体等の organella, 電子密度大な分泌顆粒などを有し large granular lymphocyte (LGL) (NK 細胞分画の大部分を占めると考えられている) の特徴を有するリンパ球 (LGL-like LAK) 群であった (Fig. 3). T-like LAK と LGL-like LAK はそれぞれ全体の80-90%, 10-20% を占め, ほぼ FACS による解析の結果を反映していると考えられた.

3) リンパ球の浸潤と腫瘍細胞の融解

LAK 細胞と混合培養した MTS 群 (LAK-MTS 群) においては, 経時的に MTS 内に存在するリンパ球の絶対数は増加し, これとは反対に生腫瘍細胞の絶対数は減少した. 全体的に見ると, 増加するリンパ球数よりも減少する腫瘍細胞数の方が相対的に多いため MTS 内に存在する全生細胞数は減少した. このことは, 経時的により多くの LAK 細胞が MTS 内に浸潤し, 腫瘍細胞の融解をおこなった結果と考えられた.

これに対し PBL と混合培養した MTS 群 (PBL-MTS 群) では, MTS 内に存在する生腫瘍細胞数, リンパ球数共に僅かながら増加した. しかしながら, リンパ球数の増加は LAK-MTS 群に比較して極めて少数であった. このことは, PBL はほとんど MTS 内に浸潤せず, 融解される腫瘍細胞数よりも自然増殖する数の方が多かったことによるものと考えられた

(Fig. 4).

4) MTS の経時的形態学的変化

① SEM による観察

SEM では経時的な MTS 表面構造の変化が観察された. LAK-MTS 群では, 混合培養後 MTS 表面に付着するリンパ球が増加し, MTS 表面には進行性の破壊像が認められた. 混合培養後期 (48時間後) には MTS は原型をとどめないまでに破壊され, 所々クレータ状の穴も散見された (Fig. 5). SEM 強拡大で観察すると, この穴の中にも多くのリンパ球が存在することがわかった (Fig. 6). これに対し PBL-MTS 群では, かなりの数のリンパ球が MTS 表面に付着するものの, 表面構造破壊は同時期の LAK-MTS 群に比し極めて軽微であり, 48時間後でも比較的原型をとどめているものも存在した.

② T-B 染色標本による観察

T-B 染色標本では MTS の内部構造の変化を観察した. LAK-MTS 群では, MTS 内への著明な円形細胞 (リンパ球) の浸潤像とともに MTS の破壊像を認めた. 浸潤するリンパ球の深度及び数は経時的に増大し, 培養後期 (48時間後) には MTS の中央部にまで及ぶものも多く認めた. これに対し PBL-MTS 群では, リンパ球の浸潤及び MTS の破壊は表面に局限しており, 培養後期でも MTS の中央部には変化を認めなか

Kinetics of lymphocyte infiltration and tumor cell killing

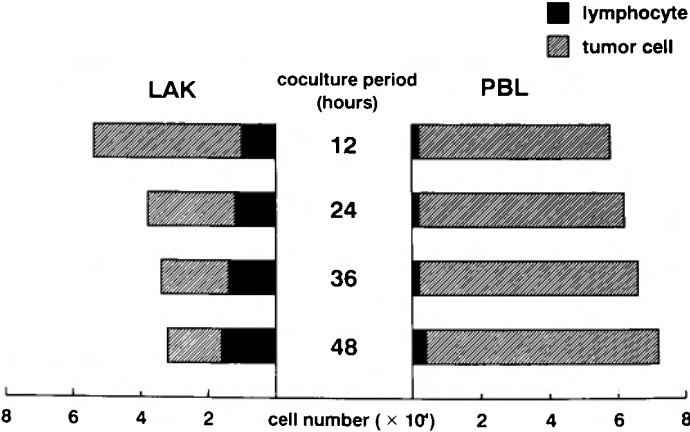


Fig. 4 Kinetics of effector cell infiltration and tumor cell killing in the cocultured MTSs. 500- μ m MTSs were cocultured with 1×10^6 LAK cells or PBLs. After various periods of incubation (12-48 hours), the MTSs were dissociated into single cells by trypsinization. Numbers of total viable cells including tumor cells and lymphocytes present within the MTSs were counted as described in "Materials and Methods".

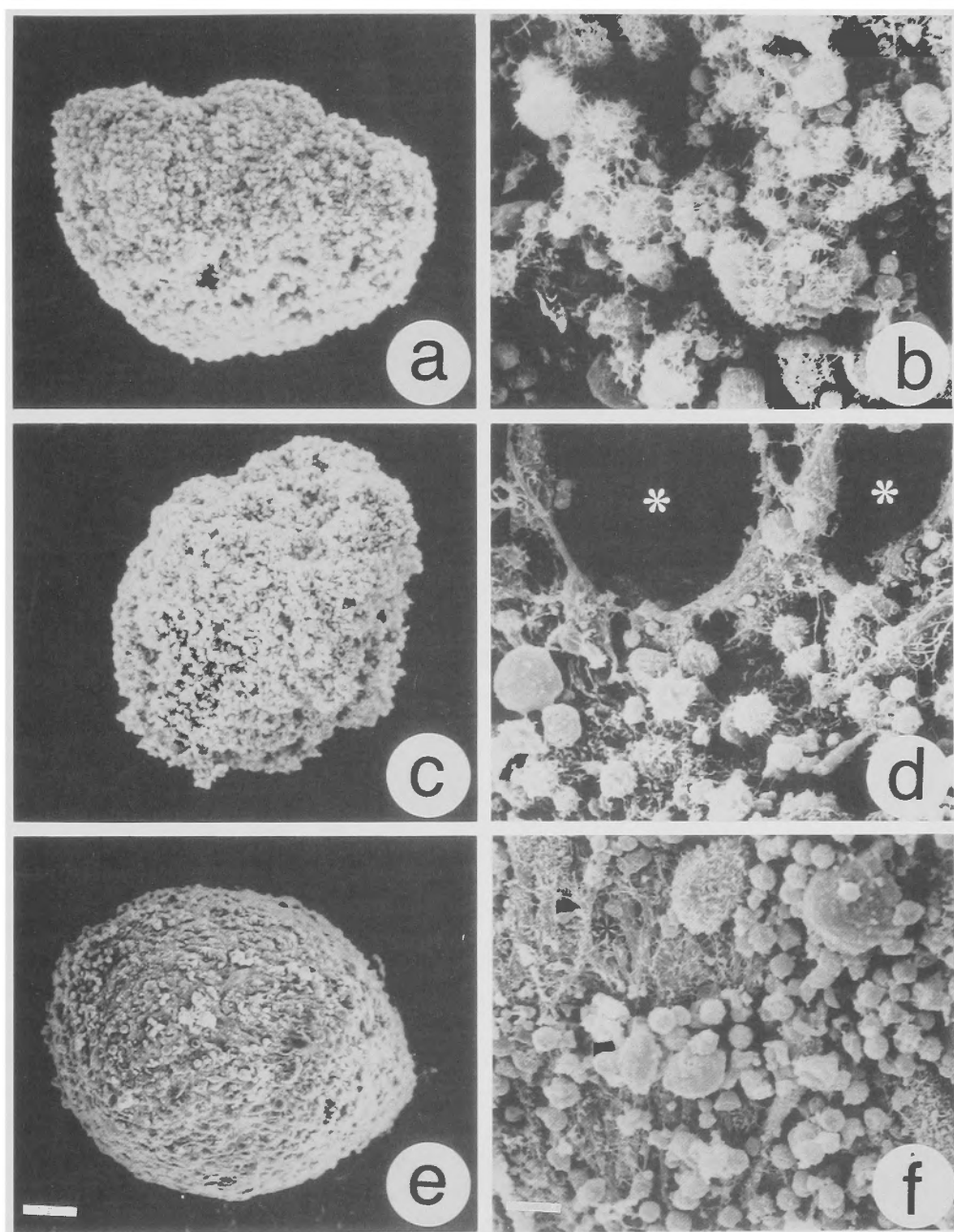


Fig. 5 Morphological changes of the MTS-surface after cocultures with each effector (SEM). (a and b; after 24 hrs with LAK cells, c and d; after 48 hrs with LAK cells, e and f; after 48 hrs with PBL). In a, MTS shows an irregular surface. In b (a higher magnification of a), numerous round cells (LAK cells) with microvilli are in a direct contact with the surface of the MTS. In c, destructive changes are so extensive that MTS is sponge-like in appearance. In d (a higher magnification of c), a larger number of LAK cells adhere to the surface, and irregularity of the surface is much more severe. Many crater-like holes are seen (asterisks). In e, MTS shows a relatively smooth surface. In f (a higher magnification of e), round cells (PBL) are in a direct contact with the surface. However, the number is much smaller, and the irregularity of the surface is much milder than that caused by LAK cells in the same stage. bar=50 μ (a, c, d) and 10 μ (b, d, f).

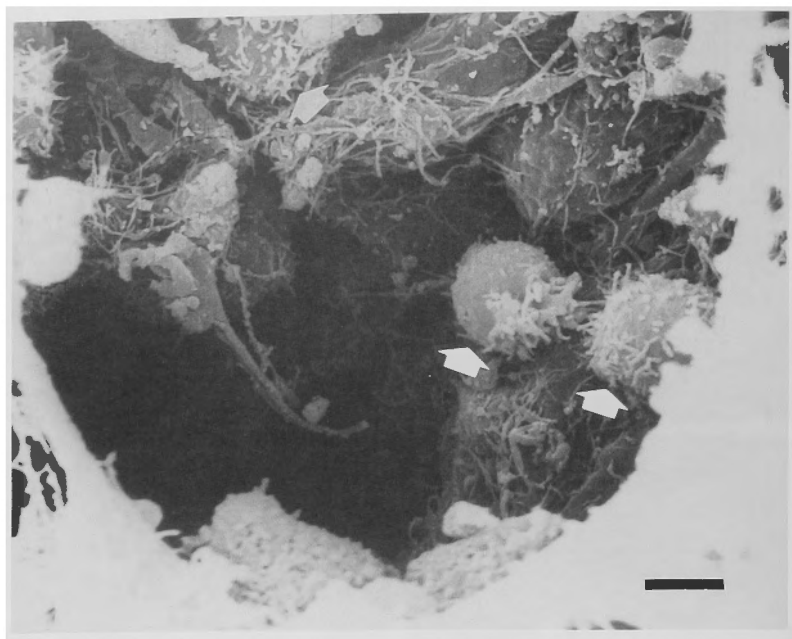


Fig. 6 Appearance in a crater-like hole of the MTS cocultured with LAK cells for 48 hrs (SEM, higher magnification). Many lymphocytes are seen to invade into the hole (arrows). bar=5 μ .

った (Fig. 7).

この MTS 破壊の程度を表わすために Table 2 に示す grade をもうけ、各混合培養時間後の MTS をこの grade に従って評価した。判定は T-B 染色連続切片標本を用いて行った。各 stage につき最低20個の MTS の観察をし、各 grade に属する MTS の数の割合 (%) で表した。LAK-MTS 群では経時的に破壊像が顕著になり、混合培養後期にはすべての MTS が grade III もしくは IV に属した。これに対し、PBL-MTS 群では48時間後でもすべての MTS が grade I もしくは II に属した (Table 3)。

③ TEM による観察

TEM では、特に LAK-MTS 群の破壊過程を解析した。リンパ球と腫瘍細胞は比較的容易に鑑別できた。LAK 細胞は腫瘍細胞間に細胞突起を伸ばしつつ、MTS 内に浸潤しており、個々の腫瘍細胞には様々な程度の変性像を認めた。変性は進行性で、特に混合培養後期では腫瘍細胞は ghost cell 様を呈するものが多くなった (Fig. 8)。

5) LAK 細胞と腫瘍細胞との相互作用

TEM による解析は、MTS 内に浸潤した LAK 細胞と腫瘍細胞間の相互作用を知るのに有用であった。

MTS 内には LAK 細胞を構成するサブセットである T-like LAK と LGL-like LAK の両者の浸潤が見られた。T-like LAK が浸潤リンパ球の約80%を占め、残りが LGL-like LAK であり、ほぼ母集団の割合を反映していると考えられた。これらのリンパ球は腫瘍細胞に直接密着し、細胞破壊を行っていると思われる像が各所で観察された。腫瘍細胞とリンパ球の接着像で特に注目すべき所見は、リンパ球から標的細胞内に伸ばされた細胞突起の存在であった。この細胞突起によりリンパ球と標的細胞間に強固な interdigitation が形成されていた (Fig. 9)。また LGL-like LAK においては、Golgi 小体や電子密度大な細胞内分泌顆粒の発達が著明で、特に分泌顆粒は混合培養前のものと比べその内容が heterogeneous で “immature” な形態をとるものも多く認めた。このことは、これらの細胞において細胞内分泌機能が著明に亢進していることを示唆するものと考えられた (Fig. 10)。

6) 浸潤 LAK 細胞の表面抗原

MTS 内に浸潤した LAK 細胞は主に CD3 陽性のリンパ球 (80-90%) であり、CD16 陽性のリンパ球は少数 (10-20%) であった (Fig. 11)。この結果は形態学的解析の結果に合致すると思われた。また、この

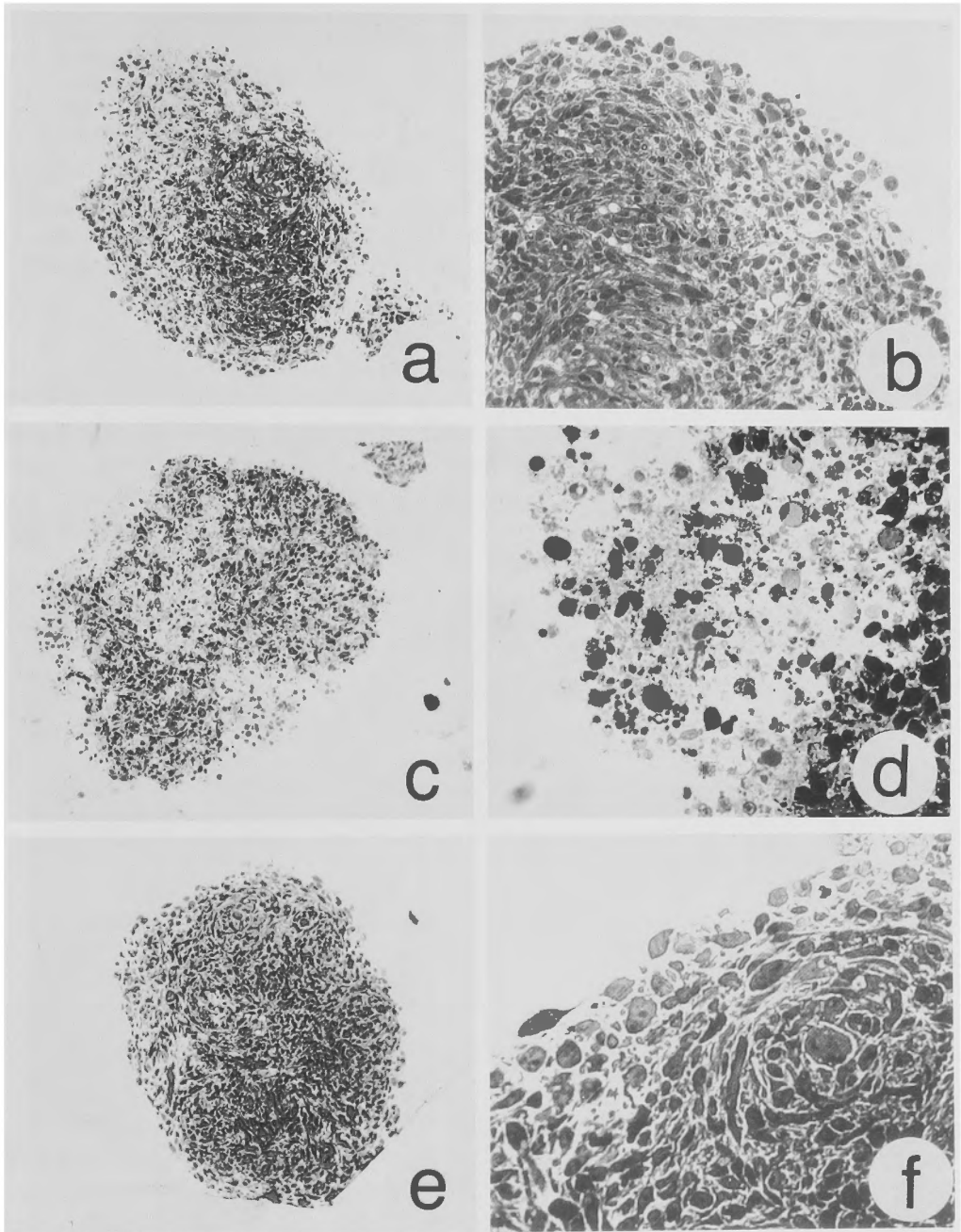


Fig. 7 Photomicrographs of the cocultured MTSs with each effector (toluidine blue-stained cross sections). (a and b; after 24 hrs with LAK cells, c and d; after 48 hrs with LAK cells, e and f; after 48 hrs with PBL). In a, the outer half of MTS is destroyed. This was designated as Grade III according to our grading of destructive changes. $\times 140$. In b (a higher magnification of a), among degenerative tissue, numerous lymphocyte-like round cells are seen. $\times 400$. In c, almost the whole MTS is changed into a mass of necrotic tissue, which is designated as grade IV. $\times 140$. In d (a higher magnification of c), destructive changes are much extensive, and the number of infiltrating round cells is larger. $\times 1000$. In e, destructive changes are confined to the outer third, which is designated as Grade II. $\times 140$. In f (a higher magnification of e), the destructive changes

Table 3 Results of grading

Effector		Grade (%) ^a			
		I	II	III	IV
LAK	12 hr	0	43	57	0
	24 hr	0	32	45	23
	36 hr	0	12	58	30
	48 hr	0	0	55	45
PBL	12 hr	90	10	0	0
	24 hr	82	18	0	0
	36 hr	78	22	0	0
	48 hr	74	26	0	0

^a 500- μ m MTSs were cocultured with 1×10^6 cells of each effector. After various periods of incubation (12-48 h), the MTSs were processed for a morphological analysis on the toluidine blue-stained serial cross-sections. At least twenty MTSs were prepared for each incubation stage of each effector. Each value represents mean of three separate experiments.

pattern は48時間までの混合培養時間内では変化はみられなかった。

考 察

今回の MTS モデルを用いた研究は、LAK 細胞の固形腫瘍に対する浸潤能と融解能を知るだけでなく、実際に LAK 細胞が固形腫瘍内に浸潤し腫瘍細胞を融解する過程を観察することにも極めて有用であった。標的として実際の手術標本を細切したものをを用いる事も考慮したが、この方法は①腫瘍の各場所により heterogeneity があること、②腫瘍細胞だけでなく大きな壊死や gliosis を含む可能性があること等の欠点があると考えられ、固形腫瘍モデルとして不適であった。一方 MTS は、血管や間質を含まない等実際の固形腫瘍塊とは異なる点も幾つかあるが^{22,35)}、その作製が簡単でしかも同一の腫瘍細胞のみから成る均一な腫瘍塊を得ることができ、固形腫瘍モデルとして適していた。

LAK 細胞は、固形腫瘍に対しても著明な浸潤能と

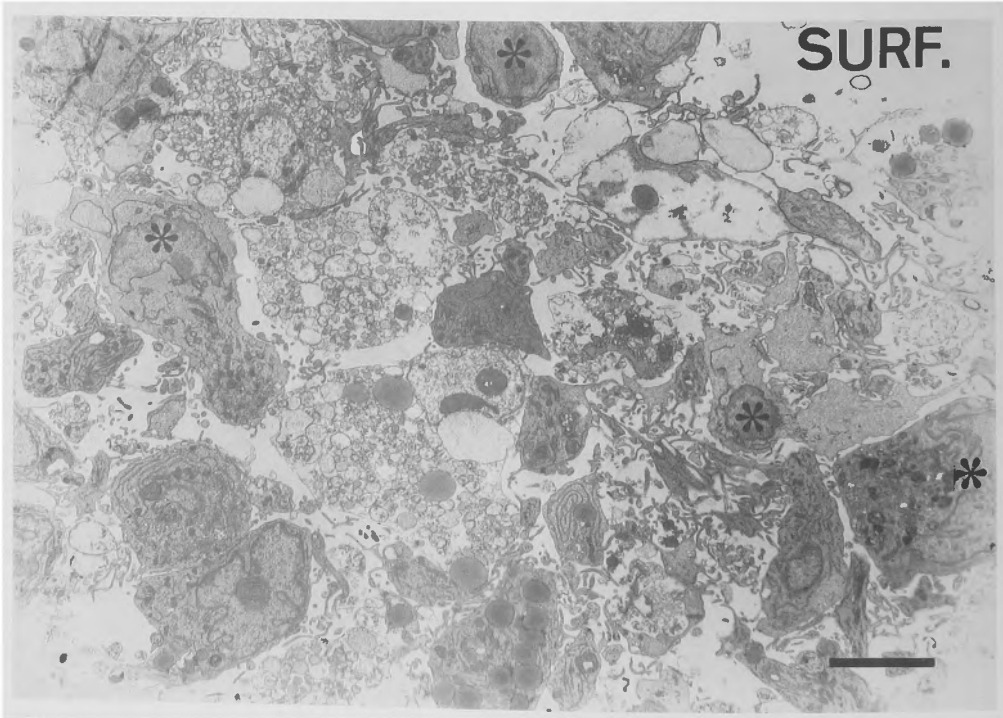


Fig. 8 Representative ultrastructural findings of the MTS cocultured with LAK cells (after 48 hrs). The right upper corner is the surface of this MTS (SURF.). Most of the tumor cells are lysed, and show a ghost cell-like appearance. In the left lower corner, still viable tumor cells are seen. At least three round cells, which have completely different morphological features from the tumor cells, are invading with their cell processes extending into the intercellular space of the tumor cells (asterisks). bar=5 μ .

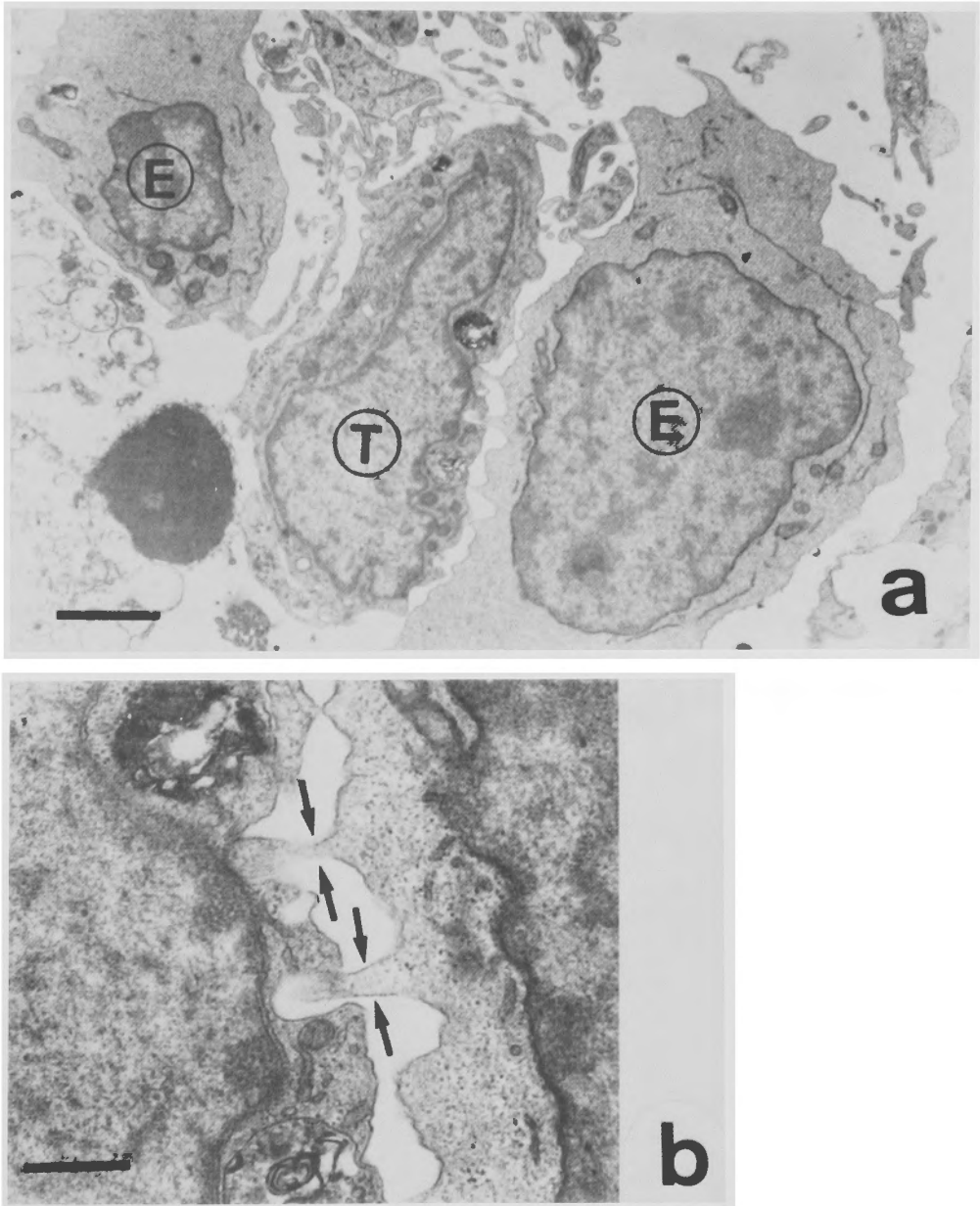


Fig. 9 Ultrastructure of the interaction of LAK effector cells (E) and a tumor cell (T) within a MTS. In a, typical T-like cells engaged in target cell killing are shown. The effector is in contact with a target cell via cell processes. bar=1 μ . In b (a higher magnification of a), the cell processes (arrows) of the effector are penetrated into the cytoplasm of the target cell. bar=0.3 μ .

融解能を有していることがわかった。従って、条件が揃えば LAK 細胞は養子免疫療法の有効なエフェクターになり得ることが示唆された訳である。但し、この結果も LAK 細胞にとっては好条件下で行われたも

のであり、養子免疫療法において良好な成績を得るには解決しなければならない幾つかの問題点があると考えられる。代表的なものは①エフェクターの数の問題と、② in vivo での抑制因子¹⁴⁾ の存在である。我々の

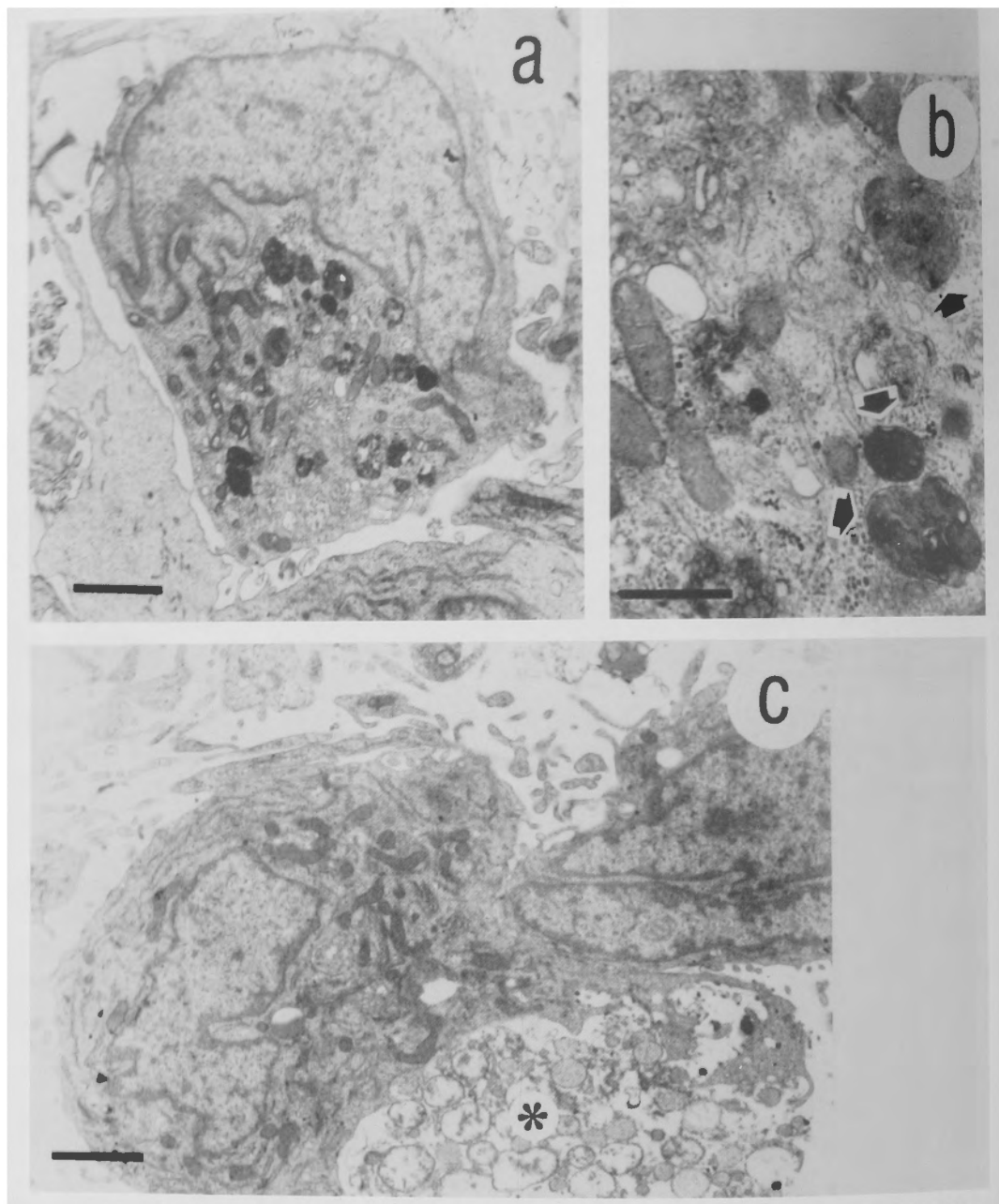


Fig. 10 Ultrastructure of infiltrating LGL-like cells. In a, a typical LGL-like cell infiltrating into a MTS is shown. The most striking feature is that its intracytoplasmic organelles are developed. bar=1 μ . In b (a higher magnification of a), the development of Golgi apparatus (in the left upper corner) and intracytoplasmic granules (arrows) is especially prominent. The intracytoplasmic granules are enlarged, and display more complex shapes. bar=0.3 μ . In c, a LGL-like cell is in contact with a target cell which has been completely lysed and shows a ghost cell-like appearance. bar=0.3 μ .

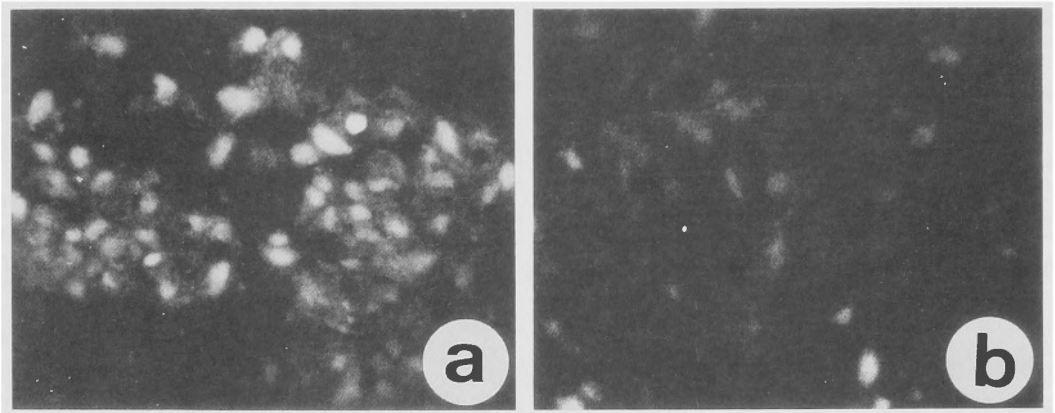


Fig. 11 Immunofluorescence microscopy of the cocultured MTS with LAK cells for 48 hrs (a and b: stained with anti-CD3 and anti-CD16 respectively). More than 80% of the infiltrating lymphocytes are positive for CD3, and 10–20% are positive for CD16.

実験系においては、*in vivo* での抑制因子の存在は考慮する必要は無く、十分な数の effector が存在した (MTS 1 個を構成する腫瘍細胞は約 5×10^4 個であったのでその20倍の数の LAK 細胞が存在したことになる)。特にエフェクターの数は、養子免疫療法の成績の良否を左右する重要な因子であり、十分な数を得るため様々な工夫がなされている³⁴⁾。

LAK 細胞の本体、特にその前駆細胞やエフェクター細胞に関する報告は数多くみられる。リンパ球表面抗原に注目した解析によれば、主に NK 細胞 (LGL) が関与しているとする報告¹⁵⁾ や、T 細胞と NK 細胞との両者が関与しているとする報告^{26,27)} があり、未だ統一した見解が得られていない。但しこれらの結果はすべて、⁵¹Cr-遊離法による single cell の標的細胞に対する細胞障害能とリンパ球表面抗原からの解析によるものである。これに対し、今回の我々の研究は、浸潤能を含めた固形腫瘍融解能とリンパ球の形態学的特徴からの解析であった。これによると、浸潤し細胞融解を行っていると考えられる LAK 細胞は形態学的に heterogeneous な集団であり、これらは主に T 細胞の特徴を持つリンパ球 (T-like LAK) と、LGL の特徴を持つもの (LGL-like LAK) との 2 グループから成ることがわかった。T-like LAK と LGL-like LAK が全体に占める割合は、それぞれ80–90%および10–20%でほぼその母集団の割合を反映していると考えられた。また免疫組織学的にも、浸潤したリンパ球には T 細胞と NK 細胞の抗原を持った細胞が存在することが確認できた。これらの結果より実際に腫瘍を融解する LAK 細胞のエフェクター細胞には、T 細胞と NK 細

胞との両者が関与していることが示唆された。細胞障害性 T リンパ球や NK 細胞の標的細胞融解のメカニズムに関してはある程度の知見が得られているが^{3,4,5,12,16,23,32,33,38,39)}、LAK 細胞の標的細胞融解のメカニズムを明確に解析した報告は見当たらない¹³⁾。今回の研究により、このメカニズムに関しても若干の知見を得ることが出来た。一般に、リンパ球による標的細胞融解過程は、①リンパ球と標的細胞との接着、②リンパ球からの lethal hit、③標的細胞融解の3段階に分けられる^{12,32,38)}。腫瘍内に浸潤した LAK 細胞もやはり、腫瘍細胞に直接附着して細胞破壊を行っている像が観察された。更に、LAK 細胞と腫瘍細胞間相互の超微形態学的解析により、②の lethal hit についても興味深い知見を得た。特に注目すべき所見は、リンパ球から標的細胞内に伸ばされた細胞突起の存在であった。形態学的にはこの細胞突起の意義は不明であったが、CTL や NK 細胞による標的細胞破壊の経過を電子顕微鏡により解析した文献によれば、標的細胞内に伸ばされた細胞突起と細胞融解との密接な関係を示唆するものが多い^{33,38)}。また、特に LGL-like LAK においては Golgi 小体や電子密度大な細胞質内分泌顆粒の発達が特徴的であった。これは標的細胞融解に際し、顆粒内液性因子の産生と分泌が亢進していることを示すものである。この所見は、LGL の細胞質内分泌顆粒内に液性の細胞融解因子が存在するという報告^{11,24)} に合致し、この因子が LAK 細胞、特に LGL-like LAK の lethal hit に密接な関係を持つことを示唆すると思われた。

以上、MTS モデルを標的にした LAK 細胞の腫瘍

融解過程を解析することにより、養子免疫療法のエフェクター細胞としての LAK 細胞の有効性、実際に細胞融解に働く LAK エフェクター細胞の性質、及びその細胞融解機構に関し多くの知見を得た。しかしながら、LAK 細胞による標的認識機構をはじめ未だ不明な点も多い。今後 LAK 療法を有効な治療法として確立するためには、臨床的および基礎的両面から総合的な研究が必要と考えられる。

結 語

3 次元腫瘍モデルを用いて、固形腫瘍に対する LAK 細胞の浸潤能と破壊能、及び腫瘍内での LAK 細胞と腫瘍細胞との細胞間相互作用を解析した。固形腫瘍モデルとしてはヒトグリオーマ由来細胞株 U-251MG より作成した multicellular tumor spheroid (MTS) を用いた。LAK 細胞としては、健康人の末梢リンパ球 (PBL) を IL-2 で刺激したものをを用いた。これらを混合培養することにより、MTS 内でのリンパ球と腫瘍細胞数の増減、および走査型電顕 (SEM)、透過型電顕 (TEM) 上での形態学的変化を調べ、PBL を effector に使用した場合と比較した。さらにリンパ球表面抗原に対する抗体を用いた免疫組織学的解析も行った。LAK 細胞と混合培養した MTS 内では、リンパ球数の増加と共に生腫瘍細胞数は経時的に減少した。形態学的には LAK 細胞は MTS 表面に付着し、表面構造を破壊しつつ中央部に向かって浸潤して行く像が観察された。一方、PBL と混合培養した MTS では、表面構造内および内部構造に大きな変化は認めなかった。これらの結果より LAK 細胞は固形腫瘍に対して強い浸潤能と破壊能を持つことが示唆された。浸潤した LAK 細胞は形態学的に T 細胞と large granular lymphocyte (LGL) に酷似した 2 種類に分類でき (T-like LAK と LGL-like LAK)、免疫組織学的にもこれを支持する結果が得られた。これらのリンパ球は共に腫瘍細胞に密着し、標的細胞内に細胞突起を伸ばすことにより細胞破壊を行っている像が観察された。また、特に LGL-like LAK においては細胞内分泌顆粒の産生亢進が観察され、この顆粒の lethal hit への関与が強く示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました京都大学脳神経外科菊池晴彦教授に厚きなる感謝の意を表します。また、終始御指導頂きました金沢大学脳神経外科山下純宏教授、京都大学脳神経外科織田祥史助教授、及び山崎俊樹、宮武伸一両博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Benson EM, Giorgi JV, Dvorak AM, et al: Cloned "anomalous" killer cells derived from allogeneic mixed leukocyte culture. *Cell Immunol* 107: 201-218, 1987.
- 2) Bigner DD, Bigner SH, Ponten J, et al: Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 40: 201-229, 1981.
- 3) Bykovskaja SN, Rytenko AN, Raushenbach MO, et al: Ultrastructural alteration of cytotoxic T lymphocytes following their interaction with target cells II. Morphogenesis of secretory granules and intracellular vacuoles. *Cell Immunol* 40: 175-185, 1978.
- 4) Carpen O, Virtanen I, Saksela E: The cytotoxic activity of human natural killer cells requires an intact secretory apparatus. *Cell Immunol* 58: 97-106, 1981.
- 5) Carpen O, Virtanen I, Saksela E: Ultrastructure of human natural killer cells: Nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion. *J Immunol* 128: 2691-2697, 1982.
- 6) Damle NK, Doyle LV, Bradley EC: Interleukin 2-activated human killer cells are derived from phenotypically heterogeneous precursors. *J Immunol* 137: 2814-2822, 1986.
- 7) Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, et al: Lymphokine-activated killer cell phenomenon; Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155: 1823-1841, 1982.
- 8) Grimm EA, Ramsey KM, Mazumder A, et al: Lymphokine-activated killer cell phenomenon II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes and natural killer cells. *J Exp Med* 157: 884-897, 1984.
- 9) Grimm EA, Robb AR, Roth JA, et al: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med* 158: 1356-1361, 1983.
- 10) Grimm EA, Jacobs SK, Lanza LA, et al: Interleukin 2-activated cytotoxic lymphocytes in cancer therapy. *Symposium on Fundamental Cancer Research* 38: 209-219, 1986.
- 11) Henkart PA, Millard PJ, Reynolds CW, et al: Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules

- from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J Exp Med* **160**: 75-93, 1984.
- 12) Henney CS: The mechanism of T-cell-mediated lysis. *Immunol Today* **1**: 36-41, 1980.
 - 13) Hook GR, Greenwood MA, Barba D, et al: Morphology of interleukin-2-stimulated human peripheral blood mononuclear effector cells killing glioma-derived tumor cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* **80**: 171-177, 1988.
 - 14) Itoh K, Tilden AB, Balch CM: Role of interleukin-2 and a serum suppressive factor on the induction of activated killer cells cytotoxic for autologous human melanoma cells. *Cancer Res* **45**: 3173-3178, 1985.
 - 15) Itoh K, Tilden AB, Kumagai K, et al: Leu-11⁺ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL-2)-induced activated killer (AK) cells. *J Immunol* **134**: 802-807, 1985.
 - 16) Iwasaki K, Miyatake S, Yamasaki T, et al: Ultrastructural analysis of cell to cell interaction between human glioma cell line and autologous tumor specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) clone. *Neuroimmunol Res* **1**: 256-262, 1988.
 - 17) Jacobs SK, Wilson DJ, Melin G, et al: Interleukin-2 and lymphokine activated killer (LAK) cells in the treatment of malignant glioma: clinical and experimental studies. *Neurol Res* **8**: 81-87, 1986.
 - 18) Kitahara M, Katakura R, Suzuki J, et al: Experimental combination chemotherapy of ACNU and 5-FU against cultured glioma model (spheroids) and subcutaneous rat glioma. *Int J Cancer* **40**: 557-563, 1987.
 - 19) Lord EM, Penny DP, Sutherland RM, et al: Morphological and functional characteristics of cells infiltrating and destroying tumor multicellular spheroids in vivo. *Virchows Arch B cell Pathol* **31**: 103-116, 1979.
 - 20) Lord EM, Burkhardt G: Assessment of in situ host immunity to syngeneic tumors utilizing the multicellular spheroid model. *Cell Immunol* **85**: 340-350, 1984.
 - 21) Lydyard P, Grossi C: Cells involved in the immune response. In: *Immunology* edited by Roitt I, Brostoff J, Male D, 2nd edition, pp. 2.2-2.10. New York: Gower Medical Publishing, Inc., 1988.
 - 22) MacDonald HR, Sordat B: The multicellular tumor spheroid: A quantitative model for studies of in situ immunity. *Contemp Top Immunobiol* **10**: 317-343, 1980.
 - 23) Matter A: Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol* **36**: 179-190, 1979.
 - 24) Millard PJ, Henkart MP, Reynolds CW, et al: Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *J Immunol* **132**: 3197-3204, 1984.
 - 25) Nederman T: Effect of vinblastine and 5-FU on human glioma and thyroid cancer cell monolayers and spheroids. *Cancer Res* **44**: 254-258, 1984.
 - 26) Ortaldo JR, Mason A, Overton R: Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med* **164**: 1193-1205, 1986.
 - 27) Phillips JH, Lanier LL: Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity. *J Exp Med* **164**: 814-825, 1986.
 - 28) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LA, et al: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *New Engl J Med* **313**: 1485-1492, 1985.
 - 29) Rosenberg SA: Lymphokine-activated killer cells. A new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* **75**: 595-603, 1985.
 - 30) Rosenstein M, Yron I, Rosenberg SA: Lymphokine-activated killer cells: lysis of fresh syngeneic natural killer-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin-2. *Cancer Res* **44**: 1946-1953, 1984.
 - 31) Saksela E, Timonen T, Ranki A, et al: Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. *Immunol Rev* **44**: 71-123, 1979.
 - 32) Sanderson CJ, Glauert AM: The mechanism of T cell mediated cytotoxicity. V. Morphological studies by electron microscopy. *Proc R Soc Lond B* **198**: 315-323, 1977.
 - 33) Sanderson CJ, Glauert AM: The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. VI. T-cell projections and their role in target cell killing. *Immunol* **36**: 119-129, 1979.
 - 34) Shimizu K, Okamoto Y, Tamura K, et al: Adoptive immunotherapy of human brain tumors with lymphokine-activated killer (LAK) cells and recombinant interleukin-2. *Neuroimmunol Res* **1**: 199-204, 1988.
 - 35) Sutherland RM, McCredie RE, Inch WR: Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **46**: 113-117, 1971.
 - 36) Timonen T, Ortaldo JR, Herberman RB: Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cell. *J Exp Med* **153**: 569-582, 1981.
 - 37) Wilson KM, Lord EM: Specific (EMT6) and non-

- specific T3H2-194 cytolytic activity by host cells inhibiting tumour spread. *Br J Cancer* 55: 145-148, 1987.
38. Zagury D, Bernard J, Jeannesson P, et al: Studies in the mechanism of T cell-mediated lysis at the single effector cell level. I. Kinetic analysis of lethal and target cell lysis in multicellular conjugates. *J Immunol* 123: 1604-1609, 1979.
39. Zagury D, Bernard J, Thierness N, et al: Isolation and characterization of functionally reactive cytotoxic T lymphocytes: conjugation, killing and recycling at the single cell level. *Eur J Immunol* 5: 818-822, 1975.