

## CDDP 前処理ヒト腫瘍細胞株 PH101のエフェクター リンパ球に対する感受性の増強

広島大学原爆放射能医学研究所腫瘍外科

山口 佳之 野間 浩介 宮原 栄治  
船越 真人 高島 郁博 峠 哲哉

CDDP 処理によるヒト腫瘍細胞株の抗腫瘍エフェクター細胞に対する感受性の増強に関し, *in vitro* にて検討した。PH101は IFN- $\gamma$  および CDDP 処理により LAK 細胞に対する感受性が増強された。フローサイトメトリーでは, IFN- $\gamma$  処理により HLA class 1 および ICAM-1 の発現が増強されたが, CDDP 処理ではこれらの細胞表面抗原の変化は認められなかった。CDDP 処理 PH101細胞の障害活性は, CDDP 処理 PH101細胞を cold target として effector phase に添加することで有意に抑制されたが, CDDP 非処理 PH101細胞ではほとんど抑制されなかった。以上より, CDDP は PH101細胞の抗腫瘍性エフェクター細胞に対する感受性を増強し, この背景として, CDDP によるなんらかの target determinant のモジュレーションが示唆された。このような機序の解明により, 化学療法と免疫療法の理論的かつ具体的な併用の方向性が示され, より効果的な治療法が開発されよう。

**Key words:** CDDP, HLA-class 1, ICAM-1, LAK, IFN-gamma

### はじめに

消化器癌性腹水に対する治療として OK-432 と interleukin (以下 IL)-2 を併用投与する局所療法を臨床応用し, その有用性について報告してきた<sup>1)2)</sup>。OK-432 により局所に効率よくエフェクター細胞の浸潤が誘導され, それが IL-2 により活性化される機序を報告している。しかし治療無効症例においては, 局所におけるエフェクター細胞の誘導を抑制する腫瘍由来の因子の存在が認められ<sup>3)4)</sup>, 効果増強にはさらなる工夫が必要と考えられた。BRM/サイトカイン投与前に制癌剤 CDDP を投与すると効果が増強されることが, 動物モデル<sup>5)</sup>および臨床症例<sup>6)</sup>において認められた。そこで本報においては, CDDP 併用による効果増強機序を解析する目的で, CDDP 前処理ヒト腫瘍細胞のエフェクターリンパ球に対する感受性の増強について, *in vitro* において検討した。

### 材料と方法

#### 1. 試薬

CDDP (プリストル), interferon-gamma (TRP-2, ロッシュ), interleukin-2 (TGP-3, 武田薬品), 抗 HLA

class 1 (IOT2, Immunotech S.A.), class 2 (HLA-DR, Becton Dickinson), ICAM-1 (CD54, Becton Dickinson) 抗体を用いた。

#### 2. 腫瘍細胞

使用した腫瘍細胞は, 白血病細胞株 CEM, Daudi (JCRB より供与), ヒト大腸癌細胞株 Colo320DM およびヒト膀胱癌細胞株 PH101<sup>7)</sup>である。いずれも 10% FCS 加 RPMI-1640 培養液にて週 2 回継代された。薬剤処理の条件は CDDP では 2 $\mu$ g/ml, 2 時間, IFN- $\gamma$  では 100U/ml, 3 日間を用いた。

#### 3. MTT assay

CDDP および IFN- $\gamma$  処理による生細胞への影響は MTT assay によった。すなわち, 処理細胞を培養液にて 3 回洗浄後 triplicate に分注し, 0.5mg/ml の MTT を添加培養し, 上澄を除去後 DMSO にてフォルマザン結晶を融解し, 540nm の吸光度を測定した。

#### 4. リンパ球の採取と LAK 細胞の誘導

健康者末梢静脈血をヘパリン加採血し, Ficoll 比重遠心法にてリンパ球を得, 3 回洗浄後  $1 \times 10^6$ /ml に調整した。LAK 細胞の誘導は 400JRU/ml の IL-2 存在下に 10% 自己血清加 PRMI-1640 培養液にて 4~10 日間培養して行った。

#### 5. <sup>51</sup>Cr 放出細胞障害試験

<1994年10月12日受理>別刷請求先: 山口 佳之  
〒734 広島市南区霞 1-2-3 広島大学原爆放射  
能医学研究所腫瘍外科

腫瘍細胞に<sup>51</sup>Crを添加し2時間培養して3回洗浄後, hot target とし, 各 well あたり  $5 \times 10^3$ 個の腫瘍細胞を triplicate に分注した. 新鮮リンパ球および LAK 細胞を effector/target ratio=2,10 となるように混合培養し, 4 時間後に上澄を採取した. Maximal release は 0.1% Triton  $\times 100$  を用い, 以下の計算式にて細胞障害活性を算出した. Cytotoxicity (%) = (experimental release-spontaneous release)/maximal release-spontaneous release)  $\times 100$

Cold target inhibition assay においては, effector/hot target 比10の条件において, hot target に対して cold target を 0, 1, 5, 20の割合に添加して, 細胞障害活性の変化を検討した.

6. フローサイトメトリ

無処理および各種処理後の腫瘍細胞を洗浄後, 適量の標識抗体を添加し, 4°C, 30分間反応させた. 再度洗浄後 Cytoron (Ortho) にて表面抗原を解析した.

結果

1. 薬剤処理による腫瘍細胞の viability に対する影響

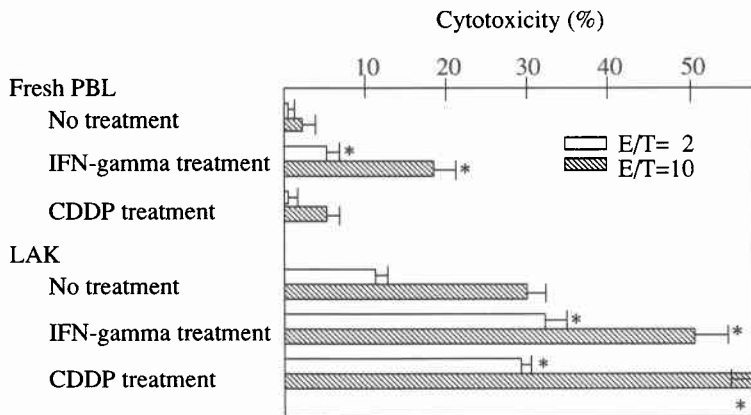
CDDP および IFN- $\gamma$  処理による腫瘍細胞の viability に対する影響を, MTT アッセイにて検討した (Table 1). IFN- $\gamma$  では Daudi 細胞と Colo320DM 細胞において薬剤処理による viability の低下が認められた. CDDP 処理では colo320DM において低下が認められた. 以後の検討では IFN- $\gamma$  および CDDP 処理にて viability に影響の認められないヒト膵癌細胞株 PH101を用いることとした.

Table 1 Effect of IFN-gamma or CDDP treatment on human tumor cell lines

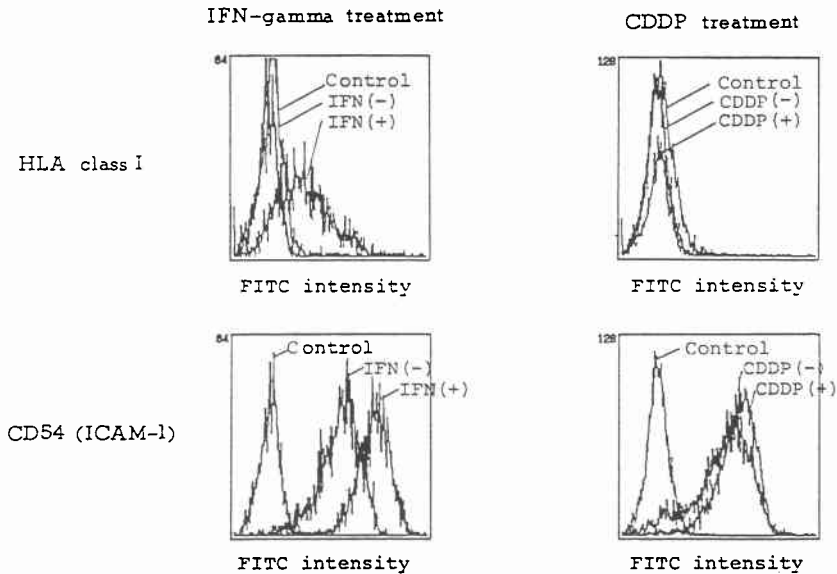
Cell lines	Treatments					
	IFN-gamma		p value	CDDP		p value
	(-)	(+)		(-)	(+)	
CEM	0.504 $\pm$ 0.008	0.466 $\pm$ 0.025	NS	0.674 $\pm$ 0.045	0.661 $\pm$ 0.009	NS
Daudi	0.233 $\pm$ 0.003	0.220 $\pm$ 0.005	<0.05	0.452 $\pm$ 0.024	0.467 $\pm$ 0.004	NS
PH101	0.538 $\pm$ 0.003	0.543 $\pm$ 0.003	NS	0.508 $\pm$ 0.013	0.537 $\pm$ 0.011	NS
Colo320DM	0.695 $\pm$ 0.004	0.520 $\pm$ 0.004	<0.01	0.717 $\pm$ 0.038	0.532 $\pm$ 0.043	<0.01

Tumor cells were treated with either 100/ml IFN-gamma for 3 days or 2 $\mu$ g/ml CDDP for 2 hours and their viabilities were assessed by MTT assay. NS; not significant

Fig. 1 Augmentation by IFN-gamma or CDDP of tumor cell susceptibility to lysis by effector lymphocytes. PH101 human pancreatic cancer cells were treated with either 100U/ml IFN-gamma for 3 days or 2 $\mu$ g/ml CDDP for 2 hours, labelled with <sup>51</sup>Cr after 3 washes, then subjected to cytotoxicity assay in which freshly isolated PBLs or LAK cells were used as effectors. Significant difference from the value of no treatment, \*p<0.05.



**Fig. 2** Flow cytometric analysis of HLA-class 1 and ICAM-1 molecules on IFN-gamma or CDDP-treated PH101 pancreas cancer cells. PH101 pancreatic cancer cells were treated with either 100U/ml IFN-gamma for 3 days or 2μg/ml CDDP for 2 hours, stained with anti-HLA-class 1 or ICAM-1 antibodies, then analyzed on Cytron.



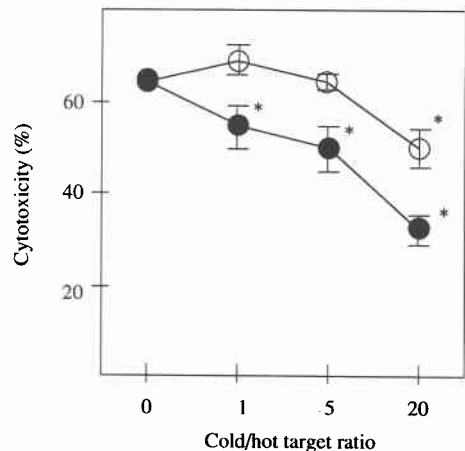
2. 薬剤処理による PH101細胞の抗腫瘍エフェクター細胞に対する感受性の変化

CDDP および IFN-γ 処理による腫瘍細胞の新鮮末梢血リンパ球および LAK 細胞に対する感受性について、<sup>51</sup>Cr 放出試験を用いて検討した (Fig. 1). 無処理 PH101細胞は新鮮末梢血リンパ球をエフェクター細胞とした場合は障害されず、NK 細胞抵抗性と考えられたが、IFN-γ 処理により感受性の増強が認められた。このような増強効果は LAK 細胞をエフェクター細胞とした場合に顕著となり、IFN-γ および CDDP 処理により有意な感受性の増強が認められた (p < 0.05).

3. IFN-γ および CDDP 処理による腫瘍細胞膜抗原の変化

IFN-γ および CDDP 処理による腫瘍細胞表面抗原の変化について、フローサイトメトリを用いて検討した (Fig. 2). PH101細胞は HLA class 1 (-), class 2(-), ICAM-1(+)であった。IFN-γ 処理では HLA class 2抗原に変化はなかったが、HLA class 1および ICAM-1抗原の発現増強が認められた。しかし、CDDP 処理では上記細胞表面抗原の変化はまったく認められなかった。

**Fig. 3** Cold target inhibition assay on CDDP-induced augmentation of tumor cell susceptibility to lysis by LAK cells. CDDP-treated PH101 cells were subjected to <sup>51</sup>Cr-releasing cytotoxicity assay as a hot target. Either CDDP-untreated (○) or CDDP-treated (●) unlabelled cold PH101 cells were added into the assay at various cold/hot target ratios. Significant difference from the value of no cold targets, \*p < 0.05.



#### 4. Cold target inhibition assay

CDDP 処理 PH101細胞に対する LAK 細胞の障害活性が、CDDP 処理あるいは非処理 PH101細胞を cold target として effector phase に添加することにより、どのように影響されるか検討した (Fig. 3)。CDDP 処理 hot target の障害活性は、CDDP 処理 cold target の添加によって有意に抑制されたが、CDDP 非処理 cold target の添加では、cold/hot 比1,5では抑制は認められず、cold/hot 比20において認められるのみであった。

#### 考 察

エフェクター細胞がターゲット細胞を認識する場合に必要とされる、接着因子に属する細胞表面分子群の研究が注目されている。NK 細胞では ICAM-1 や LFA-3 が必要である一方、MHC 抗原の関与は低いことが示されている<sup>8)</sup>。さらに Ahrens ら<sup>9)</sup>は腫瘍細胞上の糖鎖と ICAM-1 などの接着因子との相互関係の問題にまで研究を進展させている。

LAK 細胞においては、その細胞障害活性発現には LAK 細胞と腫瘍細胞の結合が重要であるが、LFA-1, 3, ICAM-1 は中心となる分子ではないとする報告<sup>10)</sup>がある一方で、神経芽腫<sup>11)</sup>や Her2/new を overexpress した LAK 抵抗性の卵巣腫瘍<sup>12)</sup>が、IFN 処理によって ICAM-1 の誘導とともに LAK 感受性が増強することが示されている。

今回、CDDP 処理により腫瘍細胞のエフェクター細胞に対する感受性は増強された。Mizutani ら<sup>13)</sup>は同様の現象について報告し、詳細な検討から、CDDP 処理による腫瘍細胞のエフェクター細胞に対する感受性の増強は、処理された腫瘍細胞の膜表面の変化やサイトカインなどのエフェクター分子に対する感受性の増強によるものではないとし、エフェクター細胞と腫瘍細胞が結合した後の細胞障害過程に CDDP が影響することを考察している。われわれも HLA class 1, 2, ICAM-1 など、既知の重要な分子に関しては CDDP 処理による変化を指摘しえなかった。しかし、cold target inhibition assay によると、CDDP 非処理 cold target に比べ、CDDP 処理 cold target によって CDDP 処理 hot target の障害は有意に抑制され、これは、CDDP 処理により処理細胞と非処理細胞の細胞膜表面上の間になんらかの差異が生じることを意味している。動物腫瘍に関してわれわれは、CDDP 処理によって腫瘍細胞のエフェクター細胞に対する感受性が増強されるとともに、両者の結合が増加することを認めており<sup>3)5)</sup>、こ

のことからも CDDP による腫瘍細胞膜のモジュレーションが示唆される。

これには CDDP による新たな認識抗原の誘導のほかに、CDDP による、認識抗原をマスクする物質の除去も考えられる。Oz ら<sup>14)</sup>は、integrin 分子が腫瘍細胞によっては glycosilation に差があつて、転移能の違いとして出現することを示した。エフェクター細胞の腫瘍細胞認識に重要な接着因子表面の糖鎖の問題は重要であり、CDDP による影響の責任分子が糖鎖である可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

なお、本論文の要旨は第42回日本消化器外科学会総会において発表された。

#### 文 献

- 1) 山口佳之, 佐藤幸雄, 高島郁博ほか: がん性胸腹水に対する OK-432/IL-2 併用局所療法. *Biotherapy* 7: 29-33, 1993
- 2) 山口佳之, 峠 哲哉: がん局所免疫療法. *日臨免疫会誌* 16: 249-254, 1993
- 3) 峠 哲哉: 癌性腹水に対する OK-432 局所投与の効果—CDDP, IL-2 による効果増強—. *Ther Res* 13: 207-214, 1992.
- 4) Hirte H, Clark DA: Generation of lymphokine-activated killer cells in human ovarian carcinoma ascitic fluid: identification of transforming growth factor-beta as a suppressive factor. *Cancer Immunol Immunother* 32: 296-302, 1991
- 5) 佐藤幸雄, 沢村明広, 水本一生ほか: マウスがんに腹膜炎モデルに対する BRM 人 CDDP の併用効果. *Biotherapy* 6: 101-104, 1992
- 6) 峠 哲哉, 山口佳之, 佐藤幸雄: がん性腹水に対する制がん剤と多剤 BRM 併用の理論と臨床. *Karinos* 5: 1285-1290, 1992
- 7) 西山正彦, 佐伯修二, 青儀健二郎ほか: Mitomycin と細胞内還元: NAD(N)H: キノン酸化還元酵素 (DT-ディアフォーゼ) 活性と DNA 障害および抗腫瘍効果. *癌と治療* 20: 1037-1041, 1993
- 8) Storkus WJ, Dawson JR: Target structures involved in natural killing (NK): characteristics, distribution, and candidate molecules. *Crit Rev Immunol* 10: 393-416, 1991
- 9) Ahrens PB: Role of target cell glycoprotein in sensitivity to natural killer cell lysis. *J Biol Chem* 268: 385-391, 1993
- 10) Quillet-Mary A, Cavarec L, Kermarrec N et al: Target lysis by human LAK cells is critically dependent upon target binding properties, but LFA-1, lfa-3 AND ICAM-1 are not the major adhesion ligands on target. *Int J Cancer* 47: 473-479, 1991

- 11) Naganuma H, Kessler R, Patarroyo M et al: Increased susceptibility of IFN-gamma-treated neuroblastoma cells to lysis by lymphokine-activated killer cells: participation of ICAM-1 induction on target cells. *Int J Cancer* 47: 527-532, 1991
- 12) Eady C, Gardner AM, Gera JF et al: Interferon-induced increase in sensitivity of ovarian cancer targets to lysis by lymphokine-activated killer cells: selective effects on HER2/new-overexpressing cells. *Cancer Res* 52: 764-769, 1992
- 13) Mizutani Y, Bonavida B, Nio Y et al: Enhanced susceptibility of cisplatin-treated K562 cells to lysis by peripheral blood lymphocytes and lymphokine activated killer cells. *Cancer* 71: 1313-1321, 1993
- 14) Oz OK, Campbell A, Tao T: Reduced cell adhesion to fibronectin and laminin is associated with altered glycosylation of beta1 integrins in a weakly metastatic glycosylation mutant. *Int J Cancer* 44: 343-347, 1989

**Augmented Susceptibility of CDDP-Treated Human Pancreatic Cancer Cell Line, PH101, to Lysis by Effector Lymphocytes**

Yoshiyuki Yamaguchi, Kousuke Noma, Eiji Miyahara, Mahito Funakoshi,  
Ikuhiro Takashima and Tetsuya Toge

Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine,  
Hiroshima University

Augmentation by CDDP of susceptibility of a human pancreatic cancer cell line, PH101, to lysis by effector lymphocytes was studied *in vitro*. Susceptibility of PH101 against lysis by lymphokine-activated killer (LAK) cells was significantly augmented after treatment of tumor cells with interferon (IFN)-gamma or CDDP. Flow cytometric analysis revealed that the HLA-class 1 and ICAM-1 antigens on PH101 cells were upregulated by IFN-gamma but not by CDDP treatment. Cold target inhibition assay showed that lysis of CDDP-treated PH101 cells was significantly suppressed by the addition of CDDP-treated, but less by CDDP-untreated cold targets at the effector phase of the cytotoxicity assay. It is suggested that modulation of unknown target determinant(s) on tumor cells was involved in the CDDP-induced augmentation of tumor cell susceptibility to lysis by anti-tumor effector lymphocytes.

**Reprint requests:** Yoshiyuki Yamaguchi Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University  
1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734 JAPAN

---