

私の α -フェトプロテイン小史(5)

香川医科大学 名誉教授 西岡 幹夫



実験肝癌とその移植

実験肝癌は、周知のように佐々木、吉田のアゾ色素肝癌の成功によって開拓されたが、私が留学した1970年頃も癌研究の大きな分野であった。私は肝癌モデルとしてよく使われているアゾ色素肝癌、さらに、芳香族アミン誘発肝癌を研究対象として、腫瘍免疫学的アプローチを始めることにする。

バッファロー近交系ラットに誘発された可移植性肝細胞癌株を、Dr. Shearer (Pacific North Research Foundation) より貰い受け、5%牛胎児血清加Waymouth培養液を用いて肝細胞癌(肝癌)細胞の培養を始める。先にも述べたように、Billはラウス肉腫の研究に従事し、細胞培養法やその移植法をマスターしている¹⁾。彼のおかげで肝癌細胞の移植などの基礎的なことを習得できた。

培養肝癌細胞を同系ラットの大腿部内側に皮下注射し、その生着率や増殖速度を検討すると、これらは肝癌株によって異なる。宿主への感作条件を揃えるために、移植する肝癌細胞の数を調整して、注入し、生着した細胞が1週間後には硬結として触れ、2週間後には5-10mmとなるようなモデルを作る。3-4ヵ月後には腫瘍径は約30-40mmとなり、しばらくすると、ラットの多くは悪液質となる。移植10日後、ラット大腿部にみられる肝癌硬結の組織像を示す(写真1)。

予備実験と並行して、AFP抗体を作製する。移植肝癌と同系の近交ラットを妊娠させ、羊水を採取する。その羊水はFreund complete adjuvantとともに家兎に免疫する。1ヵ月後には羊水タンパク抗体が産生され、正常ラット血清で吸収する。極めて簡便な方法で、短期間に作成されたAFP抗体であったが、いろいろ役立った。

実験動物に関することは、その購入、飼育、その経過観察、さらには、材料の提供などすべて動物舎に依頼する。これらの仕事は、日本のわれわれの研究室においてはすべてを研究者自身がおこなっており、その差に驚く。動物舎はいつも綺麗に整備され、農学部や理学部卒と思われるが、animal doctorと呼ばれる人もおり、何でも相談ののってくれる。また、彼らは研究室のカンファレンスにはいつも出席し、専門家としての意見も述べる。動物舎に入った日は培養実験をしないことと決められている。実験日には臓器などの取り出しなどすべて依頼しておけば、約束をした日時には自分の研究室に届くシステムで、研究者には好都合といえよう。

動物舎の主任のリンダは、ご主人とともに岩国米軍基地に数年間、滞在していたという。岩国は私の故郷に近く、彼女は錦帯橋など覚えており、何かと話があう。美しいワシントン湖畔にある彼女の自慢の自宅にも招待される。この地域の住民のほとんどは大きなヨットを所有していると聞き、われわれの生活とはレベルが違うと痛感する。ボスのHellström夫妻も同じ地域に住んでおり、何度か御邪魔した。夏はヨットの上で構想を練らしい。美しい金髪の姉弟の子供がいたので、ヨーロッパ映画を観ると彼らの家庭を思い出す。

肝癌移植ラットにおける免疫学的アプローチ

移植肝癌株の中から、3'-methyl-dimethyl DABならびにN-2-fluorenyl-acetamide (2FAA)により誘発された肝癌を選ぶ。

当時は、抗原に対する宿主の免疫応答に関して、体液性免疫応答のみならず細胞性免疫の側からのアプローチが始まった時代であった。宿主には悪性化

した細胞に対して免疫監視機構が存在し、抗リンパ球血清の投与や胸腺摘出などの処置は悪性細胞の増殖を容易にする、さらに、担癌動物のリンパ球移入による腫瘍抵抗性の導入、つまり、腫瘍抗原に対する免疫応答が注目されていた。

細胞性免疫反応を解析する手段として、リンパ球と標的細胞を *in vitro* で培養し、標的細胞の障害性を検索する方法が今回のアプローチに最適と思えた。この方法としては、Hellström らの開発した Colony inhibition test や Microcytotoxicity test (MCT) がある。シャーレに生着した肝癌細胞にその感作リンパ球様細胞 (lymph node cell, LNC) を加え、1 日間培養すると LNC のコロニー形成が認められる (写真 2)。私は手軽で、多数の検体を同時に処理できる MCT を選び、Microtest plate (Falcon #3041) を使用した。

MCT では 10% 牛胎児血清加培養液に肝癌細胞を懸濁し、その 0.2ml (細胞数は 100 個) を Plate の各 Well に加え、数時間培養する。その Plate の培養液を除き、担癌ラットの LNC (頸部、腋下、鼠頸部、腸間膜のリンパ節からステンレスメッシュを通して調整)、ならびに対照の正常ラット LNC を各 Well (標的細胞対 LNC 比は 1 : 100) にそれぞれ加え、約 2 日間、培養する。その後、Well を磷酸緩衝液で洗浄し、残存細胞を染色し、顕微鏡で算定する (写真 3)。

肝癌特異抗原の解析

担癌ラット LNC の肝癌細胞への細胞障害性はなかなか認められず、MCT の方法をいろいろ変えてみる。また、ラットに抗原感作を強めるために、①上肢と下肢に肝癌細胞を 5、6 ヶ所に移植、②頰回の再移植、また、③ Hellström の指示で増殖した腫瘍の摘出などなど、try and error が続いた。その結果、増殖した腫瘍を摘出し、1 週間程度経過したラット LNC が細胞障害性を示すことが判明した。これら細胞障害性は同系ラット横隔膜から培養した線維芽細胞では認められず、肝癌細胞に特異的な現象と考えられた。DAB ならびに 2FAA のいずれの肝癌株においても、移植したラットの LNC はその培養肝癌細胞のみに細胞障害性を示し、腫瘍特異移植

抗原 (TSTA)、つまり、固有な腫瘍特異抗原の存在と、これに対する免疫応答が確認できた。なお、AFP 産生肝癌 DB-1 においては、移植後 10 日前後には血清 AFP が陽性となり、その後、徐々に増加した。

AFP による免疫応答阻止の検討

AFP は胎児の主要な血清タンパクで、その機能は不明であり、Uriel²⁾ はエストロゲン結合性タンパクとしていた。1971年、妊婦血清による PHA リンパ球反応や混合リンパ球培養の抑制、また、胎児抗原感作ハムスターにおける腫瘍移植片の拒絶なども報告され、AFP は胎児母体間の免疫応答の回避、また、肝細胞癌においても immunosurveillance の回避に関連するのではないかと私は考えていた³⁾。

早速、高い細胞障害性 LNC を有する移植 DB-1 ラットについて、その LNC 活性が AFP によって阻止されるか否かを検討する。Well に生着した DB-1 肝癌細胞に、細胞障害性 LNC、さらに、各種濃度の AFP を加え、2 日間、培養する。各群における LNC の細胞障害性活性を検討すると、添加した AFP は LNC の細胞障害活性に有意な影響を与えない。そこで、DB-1 ラットの LNC に最初、AFP を加え、2 時間培養し、つまり、より効果的に LNC に AFP を反応させて、MCT をおこなうが、その抑制作用は認められない。さらに、DB-1 肝癌は高 AFP 産生株であり、培養中に産生される AFP の影響が懸念されるので、AFP 非産生性の DAB 肝癌株移植のラットにおいて、同様な方法で AFP の影響を検索する。しかしこの系においても、AFP は LNC 障害活性に影響を与えない。したがって、われわれの肝癌モデルから、AFP は LNC の特異的 TSTA 免疫応答を抑制しないと考えた。

これらは、AFP の immunosurveillance を解析したいと研究を始め、1 年間を経過した頃のデータである。いささか失望すると同時に別のシステムによる検討を考える日々であった。また、当時、マウスにおいて T 細胞が抗 theta 抗体を用いて分離され、また、suppressor T 細胞も注目され始め、われわれのラット肝癌モデルも T 細胞による解析が望まれた。

その後、Murgita & Tomasi はマウスモデルで、

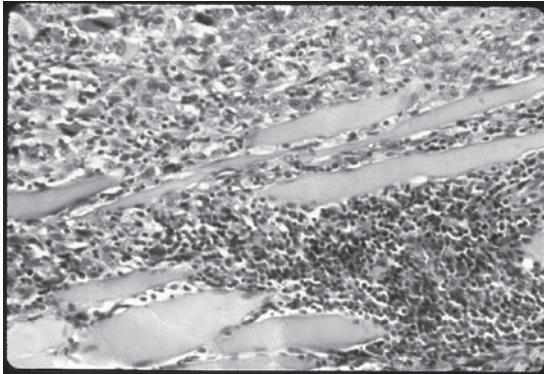


写真1 大腿部に移植した肝癌の組織像

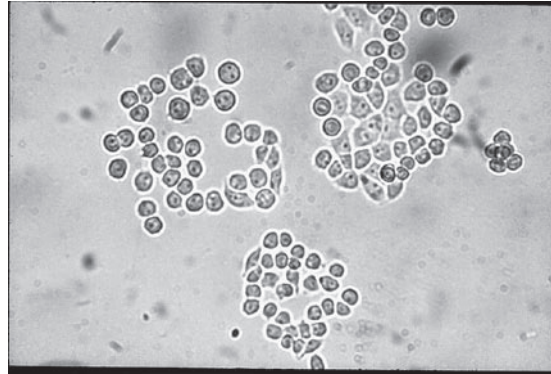


写真2 肝癌細胞の周辺に認められる LNC のコロニー形成

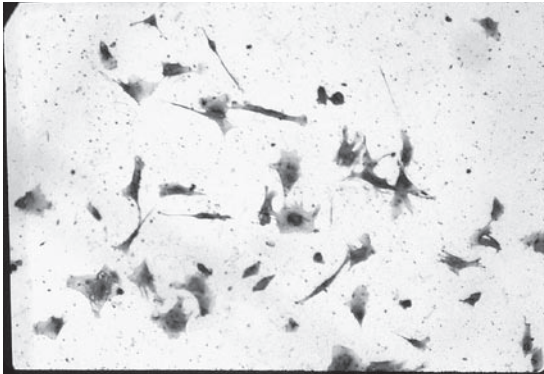
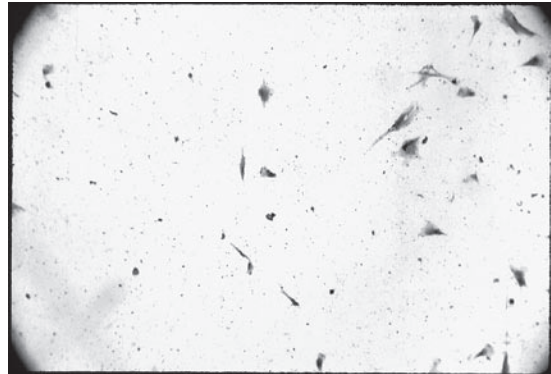


写真3 Well の中に残存している肝癌細胞 (クリスタルバイオレット染色)。左：対照 LNC 群、右：細胞障害性 LNC 群



非常に簡単な方法によって、非特異的なマイトゲン (PHA や Con) によるリンパ球幼若化反応が AFP によって抑制されることを報告した (1975年)。実験系はシンプルな方法が良いとつくづく考えたものだ。続いて、ヒツジ赤血球に対する IgM 抗体産生も AFP によって抑制されることが明らかになり、マウスモデルでは AFP は細胞性、体液性両面にわたる免疫応答の制御に関与するとされた。

その後、Murgita の研究は免疫抑制剤として、リコンビナントヒト AFP の臨床応用に発展した。先に紹介した西信三らは AFPcDNA 導入トランジェニックマウスにおいて、血清 AFP 高値で、胸腺萎縮や脾臓 T 細胞機能低下とともに実験的自己免疫病の発症が抑制されると報告した。最近では、AFP の免疫療法にも再び関心がもたれ、AFP を発現するプラスミッド DNA または AFP 発現樹状細胞を

接種し、AFP 特異的な CD8T 細胞反応を誘導し、この動物モデルでは AFP 陽性腫瘍細胞の増殖を阻止するという。臨床例においても、AFP ペプチド特異的な CD4T 細胞ならびに CD8T 細胞の存在が明らかとなり、肝癌治療との関連において研究が始まっている。

—つづく—

文献

- 1) 西岡幹夫。私の α -フェトプロテイン小史 (4), 日本癌病態治療研究会誌 (W' Waves), 14, 39-41, 2008.
- 2) 西岡幹夫。私の α -フェトプロテイン小史 (2), 同, 12, 55-57, 2006.
- 3) 西岡幹夫。私の α -フェトプロテイン小史 (3), 同, 13, 27-30, 2007.