

扁平上皮癌の TA-4 産生に及ぼす末梢血単核球の影響

山口大学産科婦人科学教室 (主任: 加藤 紘教授)

小 林 正 幸

Effects of Cytokine on Expression of Tumor Antigen
TA-4 in Squamous Cell Carcinoma

Masayuki KOBAYASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi
(Director: Prof. Hiroshi Kato)

概要 扁平上皮癌細胞における腫瘍マーカー TA-4 産生能に対する宿主の末梢血単核球の影響を検討した。人末梢血より Ficoll 比重遠心法にて分離した単核球をコンカナバリン A (Con A) にて 3 日間刺激し、その培養上清を扁平上皮癌由来細胞株 SKG-IIIa 細胞とともに 4 日間培養した。Con A で刺激された単核球培養上清は SKG-IIIa 細胞の TA-4 放出を明らかに増加させたが、一方では細胞数減少などの細胞障害性も認められた。単核球培養上清を作用させた SKG-IIIa 細胞の TA-4 活性を TA-4 抗体を用いて免疫染色し、また細胞ホモジネートの TA-4 活性を測定したが、いずれもコントロールに比して明らかな TA-4 活性の増加を示した。さらに SKG-IIIa 細胞ホモジネートならびに培養上清中の TA-4 亜分画のパターンを等電点電気泳動法にて検討したが、両者には明らかに亜分画パターンの相違が認められた。すなわち培養上清中の TA-4 活性の増加が単に腫瘍細胞の崩壊によるものではないと考えられる。単核球由来の TA-4 産生刺激因子は gel filtration にては分子量 36,000, 61,000 および 82,000 の三つのピークを示したが、細胞障害性は主として分子量 61,000 の分画に出現し、TA-4 産生刺激因子は細胞障害因子とは同一のものではない可能性が示唆された。以上の結果より、腫瘍細胞の TA-4 産生は宿主の単核球由来物質の影響を受けていることが明らかにされた。

Synopsis The effects of peripheral mononuclear cells on the production of TA-4 were studied using SKG-IIIa cells, an established cell line of squamous cell carcinoma. The mononuclear cells were isolated from the heparinized peripheral blood from healthy donors and patients with uterine cancer, and were treated with Con A for 3 days. The supernatant of Con A treated mononuclear cells significantly increased TA-4 release from SKG-IIIa cells, but also induced apparent cytotoxicity. The cellular TA-4 content, which was determined by the specific RIA or by immunohistochemical staining using TA-4 antibodies, was also increased by the treatment. There was significant difference in stimulating activity from the mononuclear cells in healthy donors and malignant patients. These stimulating factors from the mononuclear cells had molecular weights of 36,000, 61,000 or 82,000 daltons on Sephadex G-100 column chromatography, whereas the cytotoxic activity was eluted in those fractions with molecular weight of 61,000 daltons.

These results indicated that the production of TA-4 in squamous cell carcinoma could be stimulated by some factors from the peripheral mononuclear cells.

Key words: TA-4 • Squamous cell carcinoma • Cytokine

緒 言

TA-4 は子宮頸部扁平上皮癌より Kato et al.¹²⁾ により分離、精製された物質であり、現在子宮頸癌を初めとする扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして臨床的に利用されている¹⁾²⁾⁶⁾。TA-4 は扁平上皮癌でも大細胞非角化型や角化型細胞に多く出現し、また正常扁平上皮でも主として中層領域に出現するなど、組織の分化に関連した物質であると報告

されているが¹⁾³⁾²⁰⁾、一方 TA-4 の局在についての免疫組織化学的検討では、腫瘍の内部でもとくに周辺の正常組織に隣接した先進部位と、腫瘍の後方部位の腫瘍細胞とでは出現する TA-4 の亜分画に差が認められており¹⁴⁾、また正常扁平上皮でもとくに腫瘍近傍では中層領域に TA-4 活性の強い大型細胞が出現しているなど²⁰⁾、TA-4 の発現には生体内における局所の環境因子が関係している可

能性も考えられる。そこで今回、その環境因子の一つとして宿主末梢血単核球を取り上げ扁平上皮癌の TA-4産生に対する影響を検討した。

実験方法

健常人ならびに担癌患者の正中静脈より末梢血をヘパリン添加試験管に採血し、Ficoll 比重遠心法にて単核球を分離し、 1×10^6 個/ml の濃度に調整してコンカナバリン A (Con A) $10 \mu\text{g/ml}$ とともに3日間培養し培養上清を採取した。培養液は10%FCS (Hazleton 社) 添加 RPMI1640である。

子宮頸癌由来の細胞株 SKG-IIIa 細胞あるいは原田株細胞 (1×10^5 個/ml) を直径35mm の plastic dish に2ml ずつ植え込み2日間培養した後に、単核球培養上清を含む培養液2ml に交換しさらに4日間培養した。培養後、培養上清中 TA-4活性をダイナボット社より提供を受けた SCC RIA BEAD を用いて測定した。またトリパンプルーを用いて生細胞数を血球計算盤にて算出した。健常男子単核球を用いた予備実験では、単核球培養上清の添加量を0.2, 0.5, あるいは1.0ml/2ml/dish と増量するにつれ、SKG-IIIa 細胞の培養上清中 TA-4活性は 4.3 ± 0.1 , 6.4 , 9.9 ± 0.3 , あるいは $12.1 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$ と著明に上昇した (図1)。この結果より以後の実験では培養上清添加量は0.5 ml/dish とした。

免疫組織化学的検討

滅菌したプラスチックケース (12×8cm) にスライドガラスを並べ、その中に SKG-IIIa 細胞を 1×10^5 個/ml に浮遊させた培養液を一つのケースにつき20ml ずつ入れて2日間培養後、単核球培養上清5ml を含む培養液20ml に交換しさらに3～4日間培養した。その後スライドガラスを取り出し PBS にて培養液を洗い流した後に、95%エタノールにて固定し polyclonal TA-4抗体を用い PAP 法にて免疫染色した。コントロールには単核球培養上清を含まない培養液で同様に培養した SKG-IIIa 細胞を用いた。

等電点電気泳動

単核球培養上清を作用させた SKG-IIIa 細胞の培養上清と細胞ホモジネートを作製し、その TA-4活性を RIA にて測定するとともに、TA-4亜分画

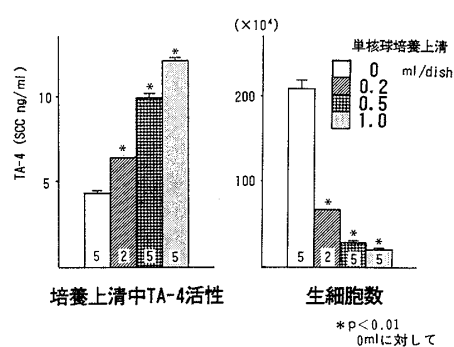


図1 末梢血単核球培養上清の SKG-IIIa 細胞への影響—濃度別作用—

パターンをカラム式の等電点電気泳動にて分析した¹³⁾。等電点電気泳動は LKB model 8100 isoelectric focusing apparatus (110ml) を用いて72時間泳動し、キャリアーにはアンホライト (LKB 社, pH 5～7) を用いた。泳動後0.5ml ずつに分画採取し、各分画の TA-4活性を RIA にて測定した。

セファデックス G-100カラムによる TA-4産生刺激因子の分画

単核球培養上清を生理食塩水で3日間透析し、コロジオンバックを用いて約100倍に濃縮した。0.01M 磷酸緩衝液 (含0.14M NaCl) で平衡したセファデックス G-100 (ファルマシア社) を用いて77×1.6cm のカラムを作製し、前述の培養上清濃縮液をのせて2ml/フラクションで溶出した。各分画をそれぞれ SKG-IIIa 細胞に作用させ、TA-4産生刺激活性と細胞障害活性について検討した。

担癌患者と健常人における末梢血単核球の TA-4産生刺激作用

対象は担癌患者として子宮頸癌患者4名、子宮体癌患者1名の計5名、健常人として女子4名、男子1名の計5名とした。担癌患者は症例2, 3は未治療であつたが、他は治療中もしくは治療後である。これらの人の末梢血より、同様の手技で末梢血単核球を採取し、いずれも 1×10^6 個/ml の濃度で Con A とともに培養した後に SKG-IIIa 細胞に作用させた。

単核球の細胞分画と TA-4産生刺激

末梢血より分離した単核球分画より T リンパ球と単球を分離した。まず、Ficoll 比重遠心法にて

採取した分画をプラスチックシャーレ法にて付着細胞と非付着細胞にわけ、付着細胞を単球分画とした。非付着細胞をナイロンウールカラムにてかけ通過細胞をT細胞とした。それぞれをCon Aとともに3日間培養しその上清をSKG-IIIa細胞に作用させた。コントロールとしてSKG-IIIa細胞に培養液のみを加えたものを用いた。

Hela細胞による単核球のTA-4産生刺激

Hela細胞を25cm²のプラスチックフラスコにて培養し、対数増殖期にある状態で末梢血より分離した単核球 5×10^6 個を加え3日間培養して、その培養上清を前述の条件でSKG-IIIa細胞に作用させた。培養後SKG-IIIa細胞のTA-4産生能ならびに、細胞障害活性につきCon Aを用いた場合と同様に検討した。

有意差検定にはANOVAならびにDuncan's New Multiple Range Testを用い、場合によつてはStudent's t-testを用いた。

実験成績

1) 末梢血単核球培養上清のSKG-IIIa細胞への影響

Con Aで刺激した末梢血単核球培養上清をSKG-IIIa細胞に作用させた場合、培養上清中のTA-4活性は $9.9 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ とコントロールの $4.3 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$ に比して有意に($p < 0.01$)上昇した。この際細胞数は有意に($p < 0.01$)低下し細胞障害性も認められた。Con Aで刺激しない単核球培養上清を作用させた場合も、培養上清中のTA-4活性は $6.1 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$ とCon Aで刺激した場合よりも弱いもののTA-4活性はコントロールに比し有意に($p < 0.01$)上昇した。しかしこの場合は細胞障害性は認められなかつた(図2)。

2) 免疫組織化学的検討

写真1には単核球培養上清を作用させたSKG-IIIa細胞ならびにコントロール細胞の免疫染色像を示した。単核球培養上清を作用させた細胞はコントロールに比し、明らかにTA-4に対する染色性が強かつた。また細胞ホモジネート中のTA-4活性は単核球培養上清を作用させた細胞で $5.1 \text{ ng}/10^5$ 細胞であり、コントロールの $2.9 \text{ ng}/10^5$ 細胞に比し約1.7倍に増加していた。

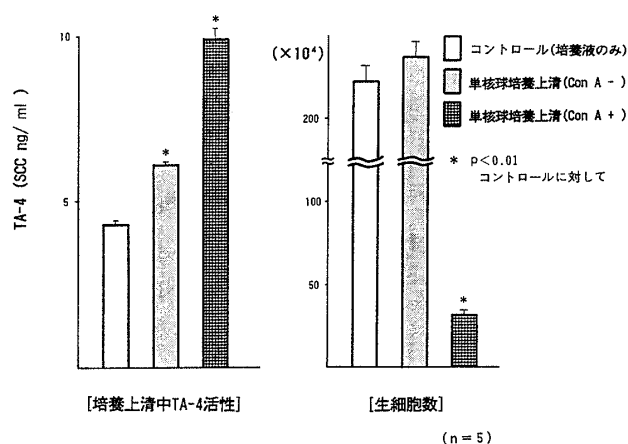


図2 末梢血単核球培養上清のSKG-IIIa細胞への影響

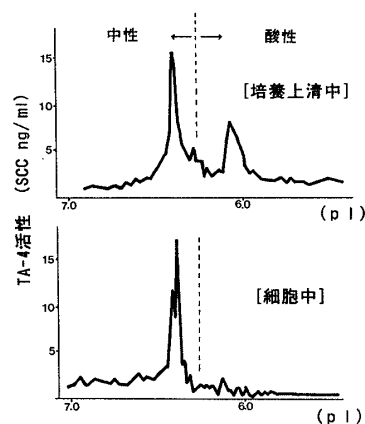


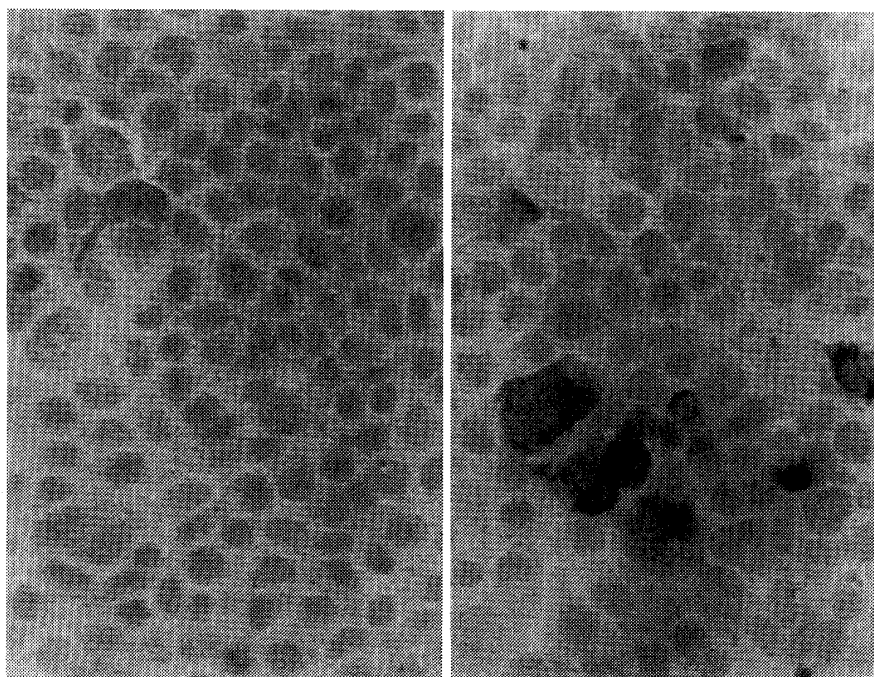
図3 等電点電気泳動パターン

3) 等電点電気泳動

単核球培養上清を作用させた際のSKG-IIIa細胞の細胞中ならびに培養上清中のTA-4亜分画パターンを図3に示した。細胞中のTA-4はほとんどが、中性分画であつたのに対し、培養上清中には中性分画とともに酸性分画が認められ、細胞中のTA-4分画と明らかに異なつたパターンを示した。

4) セファデックスG-100カラムによるTA-4産生刺激因子の分画

Con Aで刺激した単核球培養上清をセファデックスG-100カラムで分画した際のTA-4産生刺激能と細胞障害性の溶出パターンを図4に示した。細胞障害性は分子量61,000の部分にほぼ単一のpeakとしてみられた。一方TA-4産生刺激活性は細胞障害性と一致した分子量約61,000のピーク



コントロール

単核球培養上清

写真1 TA-4局在の免疫組織化学的検討

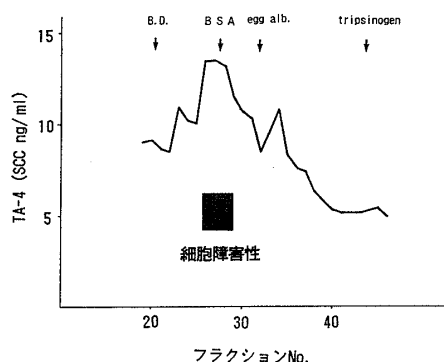


図4 セファデックス G-100カラムによる TA-4産生刺激因子の分画

のほかに分子量約82,000と36,000の領域に合計3個の分画として認められた。

5) 担癌患者と健常人における末梢血単核球のTA-4産生刺激作用

担癌患者ならびに健常人より採取した単核球を前述の方法にて Con A で刺激し、その TA-4産生刺激作用を検討した結果、担癌患者で平均 $17.9 \pm 6.3 \text{ ng/ml}$ 、健常人で平均 $17.1 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ と同程度の TA-4産生刺激作用が認められたが、担癌患者では症例間のばらつきが大きかった(図5)。最も TA-4産生刺激活性の弱かった担癌患者症例3

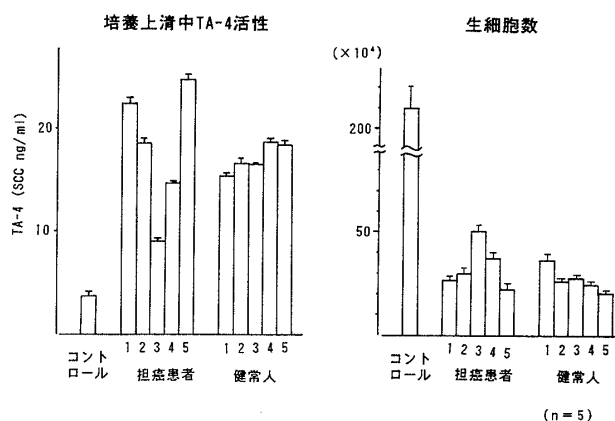


図5 担癌患者と健常人における末梢血単核球のTA-4産生刺激作用

は、子宮頸癌 Stage III の治療前であり、全身状態は良好であつた。一方、最も TA-4産生刺激活性の強かった担癌患者症例5は子宮頸癌の再発例で人工肛門を造設しており全身状態は不良であつた。

6) 単核球の細胞分画と TA-4産生刺激

Con A による TA-4産生刺激能をみると、total 細胞分画が $21.2 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$ 、単球分画が $19.3 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ 、T 細胞分画が $12.8 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ といずれもコントロール群に比して有意の高値を示したが($p < 0.01$)、なかでも total 分画と単球分画が T

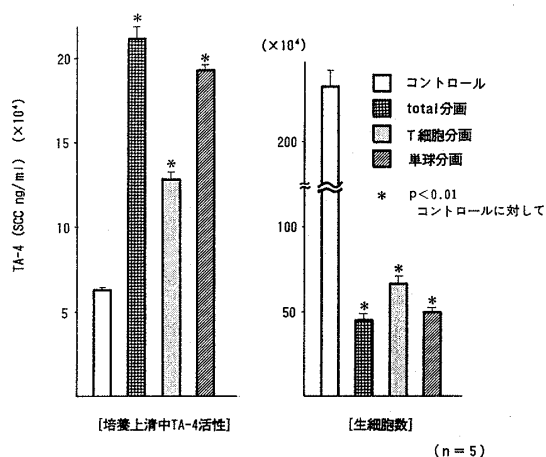


図6 単核球の細胞分画とTA-4産生刺激

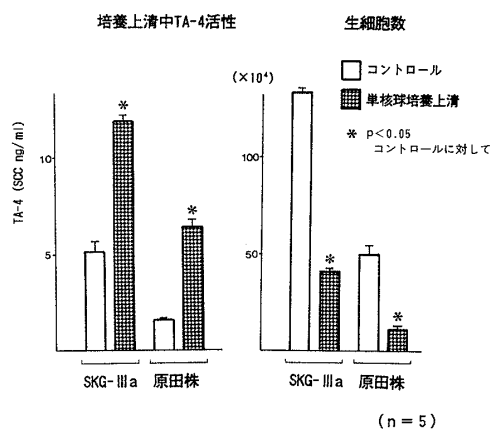


図7 原田株に対する単核球の影響

細胞分画に比して強い刺激作用を示した。一方細胞障害性はTA-4産生刺激活性が強くなるのに伴い、total分画、単球分画ならびにT細胞分画でいずれも亢進した(図6)。

7) 原田株に対する単核球の影響

原田株に対する単核球培養上清の影響を図7に示した。上清中のTA-4活性は単核球培養上清の添加により有意に($p < 0.01$)増加した。一方培養上清添加により生細胞数は明らかに減少し細胞障害性についてもSKG-IIIa細胞の場合と同様の傾向を示した。

8) Hela細胞による単核球刺激作用

単核球とHela細胞とを混合培養した際の培養上清のTA-4産生刺激作用($5.7 \pm 0.2 \text{ ng}/10^6 \text{ 細胞}$)は、単核球のみ培養した上清を作用させた場合($4.1 \pm 0.2 \text{ ng}/10^6 \text{ 細胞}$)に比して有意に($p < 0.01$)

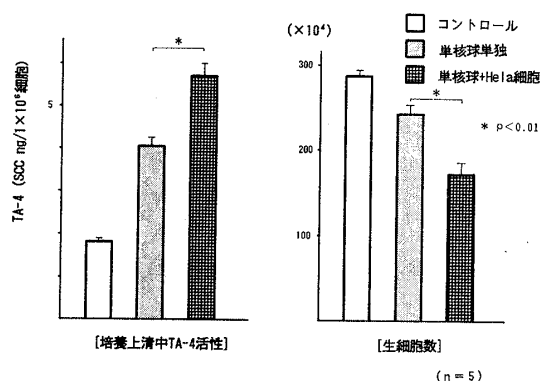


図8 Hela細胞による単核球刺激作用

亢進した(図8)。また細胞障害性も惹起された。

考 案

今回の成績より人末梢血単核球由来の物質が扁平上皮癌由来の細胞株SKG-IIIa細胞のTA-4放出を増加させることが明らかになった。単核球由来物質が細胞障害性も示したことから、培養液中TA-4活性の増加が細胞破壊に伴うTA-4遊出の結果であるとも考えられる。しかしCon Aで刺激した単核球培養上清を作用させたSKG-IIIa細胞の細胞中と培養上清中のTA-4亜分画が明らかに異なること、免疫染色、細胞ホモジネートにより単核球培養上清を作用させたSKG-IIIa細胞の単位細胞あたりのTA-4含量が増加することなどより、単核球培養上清はSKG-IIIa細胞のTA-4の産生を亢進させているものと考えられる。

単核球培養上清中のTA-4産生刺激物質は分子量36,000, 61,000および82,000の蛋白であるが詳細はいまだ不明である。単核球由来の物質についてはすでに多くのサイトカインが報告されているが、細胞障害性を有するという点ではLymphotoxin (LT)とTumor necrosis factor (TNF)が注目される⁸⁾⁹⁾。LTとTNFの生物活性は酷似しており¹¹⁾¹⁸⁾、またアミノ酸配列にも約30%の相同性があると報告されている¹⁸⁾。両者の区別は産生細胞と抗体による中和試験により行われており¹⁶⁾¹⁸⁾、LTは主に活性化T細胞より産生され¹⁹⁾²¹⁾、TNFは活性化マクロファージより産生されるといわれている⁸⁾¹⁶⁾¹⁸⁾。本実験においてもT細胞分画、単球分画いずれも細胞障害性を示しており、これらの細胞の培養上清中にLT, TNFが

存在することは容易に推測される。単核球の刺激には一般には BCG, LPS などの endotoxin, OK-432 など^{7,8)}が用いられているが, Nedwin et al.¹⁶⁾は mitogen にても末梢血単核球が TNF を産生したと報告しており, 今回の Con A により TNF 産生が刺激されることも十分に納得できる。今回の実験では細胞障害性因子は分子量約61,000であった。LT の分子量は gelfiltration にて 10,000 ~ 200,000以上の heterogenous なものであり main の α LT は分子量70,000~90,000といわれている¹⁰⁾。また TNF は34,000~58,000^{15,17)}と報告されており分子量の面からこれらの物質を区別することは困難であった。もつとも、単核球培養上清をセファデックス G-100カラムで分画した際 TA-4産生刺激活性のみで細胞障害性を示さない分画があつたことや(図4)、単核球を Con A を加えず培養したときには細胞障害性はみられず、TA-4産生刺激作用のみがみられたこと(図2)からも、TA-4産生刺激には LT, TNF 以外の細胞障害性を有しない因子が関与している可能性が考えられる。

今回単核球の刺激には Con A を用いたが、生体内において単核球を刺激している因子については明らかではない。しかし興味あることに、単核球と Hela 細胞の混合培養による実験でも、細胞障害性と TA-4産生刺激活性が惹起された(図8)。したがって生体内においても癌細胞の出現により単核球が刺激され細胞障害あるいは TA-4産生刺激を誘発している可能性が十分に考えられた。

担癌患者と健常人の単核球で TA-4産生刺激作用に差が認められなかつたが、担癌患者では個体間のばらつきが激しく、その TA-4産生刺激能に差がみられた。担癌患者では癌が進行するにつれとくに細胞性免疫能が低下する傾向がみられるが^{4,5)}、単核球の TA-4刺激作用も患者の病状により大きく異なっているものと考えられる。今回の成績では症例数も少なく、患者の病状と単核球機能の具体的な関係は検討できなかつた。しかし担癌患者の単核球の TA-4産生刺激作用が症例により大きく異なつていたことは、腫瘍細胞の TA-4産生能が宿主側の状態により影響を受けているこ

とを示唆している。

以上の結果より活性化末梢血単核球由来の物質には細胞障害性とともな TA-4の産生・放出を刺激する因子が含まれていることが判明した。TA-4は正常扁平上皮でも中層領域に出現し、また悪性細胞でも角化傾向のある細胞で増加するなど、細胞自体の性質によりその発現が左右されることはすでに明らかであるが^{13,20)}、今回の成績より細胞の環境条件により TA-4の出現がさらに影響されとの結果が得られた。これは血中の腫瘍マーカー出現を評価する上でも、また細胞における腫瘍マーカー発現の機序を探る上でも極めて興味ある知見である。

文 献

1. 加藤 紘：扁平上皮癌関連抗原 TA-4 の基礎的ならびに臨床的検討。日産婦誌, 39: 1204, 1987.
2. 望月真人, 丸尾 猛：TA-4 による頸癌の診断と管理。産と婦, 52: 590, 1985.
3. 野沢志朗, 小島雅彦, 蔡 篤仁, 酒依元子, 宇田川康博, 栗原操寿：子宮頸部扁平上皮癌の *in vivo* および *in vitro* における TA-4 産生能。臨産産, 39: 599, 1985.
4. 小川知子, 矢川裕一, 小川健治, 大谷洋一, 川田裕一, 芳賀駿介, 梶原哲郎, 榊原 宣：胃癌患者における Su-PS 皮内反応の有用性について。癌と化療, 11: 2221, 1984.
5. 田口圭樹, 五十嵐信一, 山田哲夫, 真木正博：婦人科悪性腫瘍におけるリンパ球サブセットと Su-PS 皮内テストの意義(第2報)。産婦の世界, 37: 1157, 1985.
6. 鳥越 正他：扁平上皮癌関連抗原 TA-4 RIA キットの臨床応用。産と婦, 51: 1199, 1984.
7. 渡辺直樹, 新津洋司郎, 根田 寛, 曾根久雄, 山内尚文, 漆崎一郎：OK-432 による癌患者血清及び腹水中への tumor necrosis factor (TNF) の誘導。医のあゆみ, 134: 285, 1985.
8. Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S. and Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Immunology, 72: 3666, 1975.
9. Granger, G.A. and Kolb, W.P.: Lymphocyte *in vitro* cytotoxicity: Mechanism of immune and non-immune small lymphocyte mediated target L cell destruction. J. Immunol., 101: 111, 1968.
10. Granger, G.A., Yamamoto, R.S., Fair, D.S. and Hiserodt, J.C.: The human LT system 1. Physical-chemical heterogeneity of LT mole-

- cules released by mitogen activated human lymphocytes *in vitro*. *Cell. Immunol.*, 38 : 388, 1978.
11. Gray, P.W., Aggawal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarrett, J.A., Leung, D.W., Moffat, L.B., Ng, P., Svedersky, L.P., Palladino, M.A. and Nedwin, G.E. : Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*, 312 : 721, 1984.
 12. Kato, H. and Torigoe, T. : Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer*, 40 : 1621, 1977.
 13. Kato, H., Nagaya, T. and Torigoe, T. : Heterogeneity of a tumor antigen TA-4 of squamous cell carcinoma in relation to its appearance in the circulation. *Gann*, 75 : 433, 1984.
 14. Kato, H., Suehiro, Y., Morioka, H., Torigoe, T., Myoga, A., Sekiguchi, K. and Ikeda, I. : Heterogenous distribution of acidic TA-4 in cervical squamous cell carcinoma : Immunohistochemical demonstration with monoclonal antibodies. *Gann*, 78 : 1246, 1987.
 15. Matthews, N. : Production of an antitumour cytotoxin by human monocytes. *Immunology*, 44 : 135, 1981.
 16. Nedwin, G.E., Svedersky, L.P., Bringman, T.S., Palladino, M.A. and Goeddel, D.V. : Effect of interleukin 2, interferon- γ , and mitogens on the production of tumor necrosis factors α and β . *J. Immunol.*, 135 : 2492, 1985.
 17. Nissen-Meyer, J. and Hammerstrom, J. : Physicochemical characterization of cytostatic factors released from human monocytes. *Infect. Immun.*, 38 : 67, 1982.
 18. Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayfick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B. and Goeddel, D.V. : Human tumour necrosis factor : Precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 312 : 724, 1984.
 19. Shacks, S.J., Chiller, J. and Granger, G.A. : Studies on *in vitro* models of cellular immunity : The role of T and B cells in the secretion of lymphotoxin. *Cell. Immunology*, 7 : 313, 1973.
 20. Suehiro, Y., Kato, H., Nagai, M. and Torigoe, T. : Flow cytometric analysis of tumor antigen TA-4 in cervical cytologic specimens. *Cancer*, 57 : 1380, 1976.
 21. Walker, S.M., Lee, S.C. and Lucas, Z.J. : Cytotoxic activity of lymphocytes IV. Heterogeneity of cytotoxins in supernatants of mitogen-activated lymphocytes. *J. Immunol.*, 116 : 807, 1976.

(No. 6502 昭63・12・6受付)