

脾癌細胞同所注入モデルによる脾内の臓器特異的
免疫反応と免疫寛容に関する研究

森 兼 啓 太

膵癌細胞同所注入モデルによる膵内の臓器特異的

免疫反応と免疫寛容に関する研究

森 兼 啓 太

[研究目的、研究の背景]

ムチン蛋白は上皮細胞により産生される高分子量の糖蛋白で、細胞接着や上皮の潤滑化と保護に関係しているとされている。現在までに8種類のムチン遺伝子が同定されている。最初にクローニングされたのがMUC1で[1]、その1次構造は、20アミノ酸からなる反復配列(PDTRPAPGSTAPPAHGVTS)を20から100個もつ反復配列領域とそのC末端側の膜貫通領域と細胞質内領域からなる。MUC1は種により異なる。ヒトMUC1(以下MUC1)とマウスMUC1(通常Muc1と記される)の反復配列にはアミノ酸レベルで34%の相同性を認めるのみである。MUC1分子の反復配列には1反復配列あたり5個のセリン、スレオニンが含まれ、これらのアミノ酸はMUC1分子において高度にo-グリコシル化されている。

MUC1は膵、乳腺、腎臓尿管、肺、消化管などの上皮細胞に発現されている。それらの正常上皮細胞はMUC1を管上皮側に発現し、基底膜側には発現しない[2]。このことは、正常組織のMUC1は全身を巡流しているリンパ球が認識しにくい場所にあることを示している。一方、悪性化した上皮細胞は正常細胞に比し多くのMUC1を発現し[3]、また前述の正常細胞にみられた極性は失われる。さらに、膵癌や乳癌などでは、MUC1のo-グリコシル化が低下することが知られている[4-6]。腫瘍抗原には腫瘍特異的抗原(正常細胞に発現されていない抗原)と腫瘍関連抗原(正常細胞、腫瘍細胞共に発現されているが量的、質的に発現の差異がある)がある。腫瘍免疫療法を考えるにあたり、腫瘍関連抗原は基本的には自己抗原であり、ヒトは腫瘍関連抗原に対して通常免疫学的寛容である。従って腫瘍特異的な免疫系の攻撃を得るためには一般的には免疫系の若干の修飾が必要である。また、正常細胞に発現されている腫瘍関連抗原を攻撃する可能性、すなわち自己免疫疾患の発生を常に念頭に置く必要がある。この点、MUC1は、悪性化した上皮細胞には正常細胞に比し非常に多くのMUC1が発現され[7]、また、膵癌や乳癌などでは、MUC1のo-グリコシル化が低下することが知られているので、通常では免疫系の認識・攻撃から逃れているMUC1のコア蛋白が露呈されて腫瘍免疫の標的となりうると考えられている。一方で、正常上皮細胞においては管上皮側に発現し基底膜側には発現されていないことによりリンパ球による認識・攻撃を受けにくい。この様に、MUC1に対しては正常細胞への障害を最小限に押さえつつ腫瘍特異的免疫応答を誘導し得ると考えられている[8]。

MUC1に対する免疫療法の可能性を示唆する臨床所見として、膵癌、乳癌、卵巣癌の患者の癌所属リンパ節細胞から、MUC1特異的細胞障害性T細胞がin vitroで誘導されていることがある[9-11]。これらのT細胞はMHC非拘束性で、MUC1分子の反復配列中にある抗原決定基をT細胞受容体が直接認識し、また隣接する反復配列内抗原決定基を認識するT細胞受容体同士の架橋現象により強力にT細胞が刺激されることが知られている[12,13]。これらの事は、ドナーからのMUC1反応性T細胞をHLA型の異なる受容者(=癌患者)に移植し抗腫瘍効果を発揮する養子免疫の理論的可能性を示しており、MUC1に対する免疫療法を考える上で有力な所見である。一方、MUC1に対する液性免疫であるが、膵癌、乳癌、卵巣癌患者の血清中に

MUC1反復配列に対する抗体が見出されている[14-16]ほか、癌患者のMUC1特異的抗体の抗体価と予後の間に相関関係があるとの報告がある[17]。しかしながら、多くの実験系において腫瘍拒絶の主な要因は細胞性免疫であり[18]、MUC1に対する液性免疫による免疫療法の可能性は細胞性免疫ほどには有力視されていない。臨床研究では、進行癌の患者に対してMUC1の反復配列を含むペプチドにて免疫する試みが行なわれている[19]が、抗腫瘍効果については未だ報告されておらず、成果が上がっていないのが現状である。免疫方法としてはペプチドの他にcDNA、精製MUC1蛋白、不活化したMUC1発現腫瘍細胞などが検討されている[20]。細胞株を用いた腫瘍免疫の研究は通常細胞株を皮下に注入することで行なわれる。皮下注入は、注入手技が容易である、注入後の腫瘍の大きさの観察にも適している、腫瘍を摘出することが容易、などの利点がある。しかし、肝癌研究において、皮下注入のモデルを用いる事は必ずしも適切でない。脾における周囲の環境（ホルモン、血流、リンパ流など）が皮下と異なっているからである。肝癌におけるMUC1に対する免疫機構を研究する上で、免疫系による提示されたMUC1の認識およびMUC1発現腫瘍に対する拒絶反応が皮下と脾組織内で同じ様に機能しているであろうか、皮下のモデルで得られた結果が必ずしも肝癌には当てはまらず、治療に結びつかないのではないかと考えた。本研究の目的は、（1）上記の問題を解決するための細胞株同所移植モデルの樹立 - 同系肝癌細胞株を用い、腫瘍細胞懸濁液を直接脾内に注入すること - である。そのモデルを使用し、（2）脾特有の微小環境における腫瘍抗原MUC1に特異的な免疫応答の検討を行なった。また、臨床応用を念頭におき、（3）皮下において惹起したMUC1特異的な免疫反応が脾におけるMUC1発現腫瘍細胞に対する免疫拒絶をひき起こすかどうかの探究、そして、（4）液性免疫、細胞性免疫いずれの免疫機構がMUC1発現脾内腫瘍に対する拒絶反応を司っているかを探究することである。

[対象と方法]

目的（1）に対して

(a) 実験動物

8-10週齢のC57BL/6 雌性マウスを用いた。

(b) 細胞株

C57BL/6由来のmethylcholanthrene誘発肝癌細胞株 - Panc02 - を用いた。当細胞株[22]はNelson博士 (University of Texas, M. D. Anderson Cancer Center, USA) の好意により分与を受けた。細胞培養液は McCoy's 5A media に 10% Fetal Bovine Serum を添加した物を使用し、37度、5% CO₂ incubator にて培養した。適宜トリプシン処理をして細胞を継代した。

(c) 細胞株への遺伝子導入

Panc02 に対する MUC1 cDNA の遺伝子導入を行なった。発現ベクターとして

pHB Apr1-neo を用い、これにMUC1 cDNAを組み込んで [23]、Lipofectin (Gibco, Gaithersburg, Maryland, USA) を用いたリポフェクション法にて遺伝子導入を施行した。導入後はネオマイシン耐性遺伝子の発現により導入遺伝子発現株を薬剤選択した。同様の方法にてMUC1 cDNAを含まないpHB Apr1-neo ベクターのみの遺伝子導入 Panc02 株を作成した。

(d) ウェスタン・ブロッティング

培養細胞からのタンパク質抽出は Tri-Reagent (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) を用いて行なった。抽出物は7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル内の電気泳動にて分離し、PVDF膜 (Immobilon-P, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) に転写した。転写後の膜は5%スキムミルク加Tris緩衝食塩水 (以下blottoと略す) にて4度で一晩ブロッキングした。以下すべて常温にて行なった。HMFG-2を1時間反応させ、blottoで洗浄後、horseradish過酸化酵素結合ヤギ抗マウスIgG抗体 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, USA) を1時間反応させた。blottoおよびTris緩衝食塩水にて洗浄後、SuperSignal Chemiluminescence (Pierce, Rockford, Illinois, USA) を用いて発光させ、Hyperfilm ECL (Amersham, Arlington Heights, Illinois, USA) に露光した。

(e) 皮下腫瘍注入

in vitroにて培養中の腫瘍細胞をトリプシン処理にてフラスコ底から剥がし、遠心して集め、至適量のMcCoy's 5A media に懸濁させ、目的の濃度の腫瘍細胞懸濁液を作成した。マウスの背面、両肩甲骨間の皮下に50 μ Lの腫瘍細胞懸濁液を注入した。

この方法で 1×10^6 から 3×10^7 個の MUC1発現Panc02 または 1×10^4 から 3×10^5 個の対照細胞を皮下注入し、マウスの生存曲線を見た。

(f) 脾内同所注入

上記と同様の手法で目的の濃度の腫瘍細胞懸濁液を作成した。マウスをKetamineとXylazineの混合液の腹腔内注入にて麻酔し、仰臥位に置いた。約1 cmの上腹部正中切開をおき、胃を摂子にて引き出した。胃の尾側に位置する脾胃葉を摂子にて把持し、27G針付き1 ccツベルクリン用注射器にて腫瘍細胞懸濁液を30 μ L 脾内に注入した。脾と胃を元の位置に戻し、Chromic Catgut 5-0を用いて2層に閉鎖した。この方法で、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 個の MUC1発現Panc02細胞 または対照細胞を脾内同所注入し、マウスの生存曲線を見た。

(g) 実験経過後のマウスの処理、生存曲線に関するデータ処理

腫瘍細胞を脾内同所注入したモデルでは後述のごとくまず腹部膨満が明らかになった。この時点で「死亡」と判定した。そして数日以内に犠死させた。腫瘍細胞を皮下注入したモデルでは腫瘍径が10 mmを超えた時点で「死亡」と判定し、15mmを超えた時点で犠死させた。生存曲線の有意差の判定はGraphPad Prismを用い

てLog-rank法にて施行した。

目的(2)に対して

(a) 実験動物

野生マウスとして、8-10週齢のC57BL/6 雌性マウスを用いた。MUC1トランスジェニック-C57BL/6 (以下、MUC1.Tgと略記) マウスの作製、樹立は共同研究者のGendler博士ら (Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona, USA) によって行なわれ [21]、University of Nebraska Medical Center (Omaha, Nebraska, USA) において飼育が行なわれた。本研究にはその飼育群から8-10週齢の雌性マウスを手し使用した。

(b) 細胞株

目的(1)に対する実験より得られたMUC1遺伝子導入株、およびその対照細胞株を用いた。

(c) 皮下腫瘍注入、脾内同所注入

「目的(1)に対して」の項にて述べた。

(d) 免疫組織化学

犠死させたマウスから摘出した腫瘍を10%ホルマリン加リン酸緩衝食塩水 (PBS) にて固定し、パラフィン包埋したのち切片を作成した。以下の反応はすべて常温で行なった。パラフィンをキシレン溶液内で除去し、キシレンは100%エタノールにて除去した。次いで80%エタノールにて加水し、0.3% 過酸化水素水加メタノールを30分反応させて内因性ペルオキシダーゼを除去した。PBSで洗浄後、非特異的反応制御のため10%正常ヤギ血清を30分反応させ、その後MUC1の反復配列に対するモノクローナル抗体、HMFG-2を1時間反応させた。PBSで洗浄後、2次抗体のビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA) を1時間反応させた。PBSで洗浄後、ストレプトアビジン-過酸化酵素溶液を45分反応させ、PBSで洗浄後、0.03%過酸化水素水加チアミノベンジジン溶液にて発色反応を行なった。鏡検はヘマトキシリン染色を加えて施行した。陽性、陰性等の判定は100倍視野にて肉眼で行ない、全細胞数の90%以上が陽性のとき「陽性」、全細胞数の10%以下が陽性のとき「陰性」、そのいづれでもないとき「heterogeneousに陽性」とした。

(e) 実験経過後のマウスの処理、生存曲線に関するデータ処理

「目的(1)に対して」の項に述べた。

目的(3)に対して

(a) 実験動物

「目的（２）に対して」の項に述べた。

(b) 細胞株

目的（１）に対する実験より得られたMUC1遺伝子導入株、およびその対照細胞株を用いた。

(c) 脾内同所注入

「目的（１）に対して」の項に述べた。

(d) MUC1発現細胞による皮下免疫

1×10^5 個のMUC1遺伝子導入Panc02細胞を免疫原として使用した。放射線照射による不活化は施行しなかった。皮下腫瘍注入の項に記した方法にて皮下免疫し、3週間または5週間後に腫瘍細胞の脾内同所注入を施行した。

(e) 養子免疫

ドナーマウス（各群4匹または5匹、野生またはMUC1.Tg）に 1×10^6 個のMUC1遺伝子導入Panc02細胞を皮下注入して免疫した。3週間または5週間後に犠死させ、脾臓とリンパ節を摘出し、用手のおよび機械的に処理して単細胞浮遊液を作成した。受容者マウス（各群8匹または10匹、野生またはMUC1.Tg）1匹あたりドナーマウス0.5匹相当（約 1×10^6 個のリンパ球を含む）の単細胞浮遊液を腹腔内注入した。同時に、非免疫（皮下免疫なし）の対照ドナーマウス（実験群が野生なら野生、実験群がMUC1.TgならMUC1.Tg）の脾・リンパ節細胞を対照群受容者マウス（同様に実験群受容者マウスと種別を一致させた）に養子免疫した。1日後、受容者マウスに対して腫瘍細胞の脾内同所注入を施行した。本研究においては、ドナーと受容者の組み合わせとして、野生-野生、野生-MUC1.Tg、MUC1.Tg-野生の3つの実験を行なった。

(f) 実験経過後のマウスの処理、生存曲線に関するデータ処理

「目的（１）に対して」の項に述べた。

目的（４）に対して

(a) 実験動物

「目的（２）に対して」の項に述べた。

(b) 細胞株

目的（１）に対する実験より得られたMUC1遺伝子導入株を用いた。

(c) 脾内同所注入

「目的（１）に対して」の項に述べた。

(d) 定量的ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) による液性免疫の検討

野生マウスに 1×10^6 個のPanc02-MUC1を脾内注入し、28日後に血清を採取した。血清中のMUC1の反復配列2コピー分(40残基)に対する抗体価を以下に記す定量的ELISA法にて測定した。

MUC1反復配列(20残基)を2個連結した40残基のペプチド

(GVTSAPDTRPAGSTAPPAHGVTSAPDTRPAGSTAPPAH)を作成した。このペプチドの $10 \mu\text{g/mL}$ 溶液をELISAプレートにコートし、37度で2時間反応させた。ペプチド溶液を除去し、blotto(上述)にてブロッキングした。blottoを除去し、血清希釈液を37度、1時間反応させた。以降洗浄はすべて0.05%Tween-20加PBSにて行った。洗浄後、免疫グロブリンクラス・サブクラス特異的ウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体(Zymed, San Francisco, California, USA)を37度、1時間反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体(Zymed, San Francisco, California, USA)を37度、1時間反応させた。洗浄後、0.1%リン酸基質加10%ジエタノラミンpH9.8にて発色させた。発色反応は0.5N水酸化ナトリウムにて停止させ、405 nmにおける吸光度を測定した。

クラス、サブクラス特異的標準曲線を作成するため、ミエローマ蛋白(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM) (Litton Bionetics, Kensington, Maryland, USA)の段階希釈液を作成し、上記の血清希釈液の段階のみを省略した反応を施行した。段階希釈濃度と吸光度をグラフ化し、直線部分のみを血清抗体価の決定に使用した。

(e) CD4+ / CD8+ T細胞除去

抗マウスCD4, CD8抗体により実験マウス中のCD4+ / CD8+ T細胞を除去した。ラット抗マウスハイブリドーマ、GK1.5(抗CD4)、53-6.72(抗CD8)、SFR3-DR5(クラスマッチ対照抗体)をATCC(Rockville, Maryland, USA)から入手した。これらの細胞の培養上清からProtein G sepharose Fast Flow System (Pharmacia Biotech, Sweden)を用いて抗体を精製した。抗体濃度は前述のELISA法に準じた方法により測定した。

実験群をCD4+除去、CD8+除去、CD4+ / CD8+ 共除去、クラスマッチ対照抗体(=T細胞非除去)とした。それぞれの群(各群12匹、うち4匹はT細胞除去状態の確認に用いた)のすべてのマウスに、0.5mgづつの対応する抗体溶液を第-6、-4、-2日に腹腔内注入した。第-1, 6, 13, 20日には、各々の群の代表のマウス1匹を犠牲させ、Flow CytometryにてT細胞の除去状態を確認した。第0日に、すべての群のマウスにMUC1発現Panc02細胞の脾内同所注入を施行し、以後7日ごとに上記抗体の腹腔内注入を実験終了まで続けた。また、第0日には抗体溶液を注入しないMUC1.Tg(8匹)にMUC1発現Panc02細胞の脾内同所注入を行ない、実験群に編入した。

同様の実験を皮下注入モデルを用いて施行した、すなわち、同様の4つの実験群(各群6匹)を設定し、抗体溶液で指定された細胞分画を除去したのち、第0日に

MUC1発現 Panc02 細胞の皮下注入を施行した。以降、抗体溶液の腹腔内注入は7日ごとに実験終了まで続けた。また脾内注入モデルの場合と同様に、第0日にMUC1.Tg (6匹)に対してMUC1発現 Panc02 細胞の皮下注入を施行し、実験群に編入した。

(f) 実験経過後のマウスの処理、生存曲線に関するデータ処理
「目的(1)に対して」の項に述べた。

[結果]

(1) 細胞株同所注入モデルの確立

(a) 遺伝子導入

方法の項に記したPanc02細胞の遺伝子導入、ネオマイシン耐性による選択により得られたクローンに対して、MUC1の発現をウエスタンブロット法にて確認した。Figure 1は、得られたクローンのうち3つのクローン(AA1, AA2, AA3)のMUC1発現を示している。ウエスタンブロット膜上の位置がクローン間で異なっているが、これはMUC1タンパクが様々な転写後修飾を受けると考えられているためである。以下の実験においては、クローンAA3を使用することとした。また以下においてこのクローンを単にPanc02-MUC1と記す。Figure 1には同時にMUC1 cDNAを含まないベクターのみの導入株(以下Panc02-neo)のMUC1発現がないことも示されている。

(b) 腫瘍細胞脾内同所注入後の経過

同所注入は方法の項に記したごとく行なわれた。平均手術時間は5分で、リークなしに注入し得る腫瘍懸濁液の最大量は30 μ Lであった。術後のマウスの経過は良好で、急性合併症は見られなかった。Figure 2に脾内同所注入前後の写真を示した。腫瘍の腹腔内生育を示す初発症状として多くのマウスが示したのは、腹水による腹部膨満であった(Figure 3a)。初期の実験において、この症状を示したマウスは7日以内に死亡した。従って、以下の実験において、腹部膨満が明らかになってから5日以内にマウスを犠牲させた。この方法はUniversity of Nebraska Medical CenterにおけるInstitutional Animal Care and Use Committeeによる動物実験の倫理性に関する承認を得ている。また、腹部膨満が明らかになったマウスをその時点で「死亡」と判定し、これに基づいて生存曲線を求めた。これらのマウスの剖検所見は、1-7 mLの腹水と直径10-15 mmの脾内易出血性腫瘍であり(Figure 3b)、若干の症例では直径1-10 mmの腹膜播種性腫瘍が認められた。従って、脾内同所注入モデルにおいて腹水による腹部膨満が明らかになった時点での脾内腫瘍径は約10mmと考えられた。脾内同所移植モデルと皮下注入モデルとの比較を行なうために、皮下モデルの場合は腫瘍径が10mmを超えた時点で「死亡」と判定した。

組織学的には、脾内にて生育した腫瘍は明らかな腺管構造を持たない未分化癌であ

り(Figure 4a)、腫瘍内出血を伴っていた。皮下にて生育した腫瘍は同様に未分化であり(Figure 4b)、腫瘍内出血は伴わなかった。

(c) 脾における注入腫瘍細胞数の腫瘍生育に対する影響

Figure 5 に示す通り、Panc02-MUC1、Panc02-neo (対照細胞) いずれの場合も注入する細胞数を増加させると生存曲線が悪化する傾向が見られた($p=0.013$)。また、すべての腫瘍細胞数において、Panc02-neo はすべてのマウスを死に至らしめたが、Panc02-MUC1 を注入されたマウスの一部分は腫瘍を拒絶した。

(d) 皮下における注入腫瘍細胞数の腫瘍生育に対する影響

Figure 6 に示す通り、Panc02-MUC1、Panc02-neo いずれの場合も細胞数を増加させると生存曲線が悪化する傾向が見られた($p=0.005$)。なお、 1×10^6 個以下の Panc02-MUC1 を用いた実験では腫瘍増生は見られなかった。

(2) 脾におけるMUC1に対する免疫機構の認識の有無、および皮下におけるMUC1に対する認識との比較

(a) Panc02-MUC1 と Panc02-neo の腫瘍増生における相違

Figure 7a は、 1×10^6 個の Panc02-neo または Panc02-MUC1 細胞を脾内同所注入したマウスの生存曲線である。Panc02-neo 細胞の腫瘍増生は速く、マウスは第35日までにすべて死亡した。一方、Panc02-MUC1 細胞も腫瘍増生を示したが、Panc02-neo より遅く、生存曲線は Panc02-neo のそれよりも有意に良好であった($p=0.005$)。

同様の結果が皮下注入モデルにおいても得られた(Figure 7b)。Panc02-MUC1 細胞によるマウスの生存曲線は Panc02-neo のそれよりも有意に良好であった($p=0.040$)。

(b) 皮下注入と脾内注入の腫瘍増生に対する相違

1×10^6 個の Panc02-neo 細胞を皮下または脾内に注入した。Figure 8a に両者の生存曲線を示した。脾内注入マウスは第35日までに腫瘍増生により死亡したが、皮下注入マウスでは第35日に腫瘍径が10mmを超えたものはなかった。

同様の結果が Panc02-MUC1 細胞を用いた実験にて得られた。 1×10^6 個の Panc02-MUC1 細胞を皮下または脾内に注入した。Figure 8b に両者の生存曲線を示した。脾内注入マウスは第45日までに腫瘍増生により70%が死亡したが、皮下注入マウスは第45日には腫瘍径が10mmを超えたものはなかった。

(c) 腫瘍の免疫組織化学的検討

Panc02-MUC1 の皮下および脾内注入モデルから得られた腫瘍におけるMUC1の発現を免疫組織化学的に検討した。Figure 9 にその代表的な組織所見を、またTable 1 に結果を示す。対象としたのは Figure 5b および Figure 6b の実験に使われたマウスのうち代表的なものである。皮下モデルから得られた7標本はすべて MUC1

陰性であったが、脾内注入モデルから得られた12標本はすべてMUC1陽性であった。

(d) MUC1トランスジェニック(MUC1.Tg)マウスの脾におけるMUC1に対する免疫機構の認識

すでに述べたように、野生マウスにおいては、Panc02-MUC1 細胞脾内注入後の生存曲線は Panc02-neo のそれよりも有意に良好であった(Figure 7a)。同様の実験を MUC1.Tg マウスを用いて行なった。本実験において腫瘍細胞数は 1×10^5 個とし、野生マウス、MUC1.Tg マウス双方が Panc02-MUC1 または Panc02-neo の脾内注入を受けた。Figure 10 に結果を示す。MUC1.Tg マウスにおいては、Panc02-MUC1 と Panc02-neo がほぼ同様の生存曲線を示した。このことから、MUC1.Tg マウスは脾内に提示されたMUC1に対して免疫学的に無反応(寛容)であることを示している。また、野生マウスに見られる Panc02-MUC1 と Panc02-neo の生育の違いはMUC1に対する野生マウスの免疫反応によるものと考えられる。すなわち、Panc02-MUC1 の腫瘍増生は免疫反応によって抑制され、Panc02-neo は抑制されなかった。

(3) 皮下において惹起されたMUC1特異的免疫反応が脾内腫瘍細胞の拒絶に対して有効であるかどうかの検討

(a) Panc02-MUC1 による皮下免疫の、脾内注入された Panc02-MUC1 に対する免疫学的腫瘍拒絶への影響

野生マウスの免疫群と対照群に対して、 1×10^5 個の Panc02-MUC1 または Panc02-neo を脾内注入した。Figure 11a は Panc02-MUC1 の脾内注入を受けた群、Figure 11b は Panc02-neo の脾内注入を受けた群を示している。免疫群は Panc02-MUC1 の腫瘍増生を完全に拒絶したが、対照群は90%のマウスが腫瘍を拒絶できなかった($p < 0.001$)。Panc02-neo を脾内注入された群では、免疫群と対照群の間腫瘍増生に関する差を認めたが有意ではなかった($p = 0.09$)。同様の実験を、免疫と脾内注入の間隔を5週間に設定して施行した。すなわち、皮下免疫5週間後に免疫群と対照群に対して脾内注入を施行した。Figure 12 に結果が示されているが、皮下免疫の、Panc02-MUC1 に対する拒絶反応への効果が若干減少し(Figure 12a, $p = 0.0137$)、逆に、皮下免疫の、Panc02-neo に対する拒絶反応への効果が増加して、免疫群と対照群の生存曲線の差が有意となった(Figure 12b, $p = 0.0273$)。

(b) ドナー野生マウスから得られた免疫細胞の養子免疫が受容者野生マウスの脾内注入腫瘍細胞増生に及ぼす効果

Figure 13 に実験の概略を示した。養子免疫を受けた受容者野生マウスに 1×10^5 個の Panc02-MUC1 または Panc02-neo の脾内注入を行なった。Figure 14a は Panc02-MUC1 の脾内注入を受けた群、Figure 14b は Panc02-neo の脾内注入を受けた群を示している。免疫細胞の養子免疫を受けた群は Panc02-MUC1 の脾

内注入に対して対照群より有意に生存期間が長く($p=0.0044$)、養子免疫が臍内注入された Panc02-MUC1 に対する拒絶に有効に働いていることを示している。また、養子免疫の、臍内注入された Panc02-neo に対する拒絶への影響は、Figure 14b に示すように最小限であり、この養子免疫はMUC1特異的に有効であると考えられた。

同様の実験を、ドナーの免疫と養子免疫の間隔を5週間に設定して施行した。Figure 15a, 15b に示すように、Panc02-MUC1、Panc02-neo どちらの臍内注入に対しても養子免疫は有効には働かなかった。

(c) 野生マウスの免疫細胞の養子免疫が受容者MUC1.Tg マウスの臍内注入腫瘍細胞増生に及ぼす効果

Figure 16 に実験の概略を示した。養子免疫を受けた受容者MUC1.Tg マウスに 1×10^5 個の Panc02-MUC1 または Panc02-neo の臍内注入を行なった。Figure 17a は Panc02-MUC1 の臍内注入を受けた群、Figure 17b は Panc02-neo の臍内注入を受けた群を示している。野生マウスの免疫細胞の養子免疫を受けた群は Panc02-MUC1 の臍内注入に対して対照群より有意に生存期間が長く($p=0.045$)、養子免疫が臍内注入された Panc02-MUC1 に対して有効に働いていることを示している。また、この実験では、ドナー野生マウスから養子免疫されたMUC1特異的免疫細胞が受容者 MUC1.Tg マウスの組織が発現する内因性MUC1を認識し攻撃する可能性があるため、受容者MUC1.Tg マウスの肺、腎、脾を組織学的に検索したが、自己免疫反応の所見は認められなかった。

(d) ドナーMUC1.Tg マウスの免疫細胞の養子免疫が受容者野生マウスの臍内注入腫瘍細胞増生に及ぼす効果

Figure 18 に実験の概略を示した。養子免疫を受けた受容者野生マウスに 1×10^5 個の Panc02-MUC1 または Panc02-neo の臍内注入を行なった。Figure 19a は Panc02-MUC1 の臍内注入を受けた群、Figure 19b は Panc02-neo の臍内注入を受けた群を示している。両方とも受容者マウスと対照群の間に生存曲線の有意な差を認めなかった。従って、ドナーMUC1.Tg マウスの免疫細胞の養子免疫は、受容者野生マウスに臍内注入された Panc02-neo、Panc02-MUC1 に対して影響を及ぼさなかった。

(4) MUC1発現腫瘍細胞に対する拒絶反応を司っている免疫機構の検討

(a) MUC1に対する液性免疫の検討

Figure 20 は臍内注入後28日目のマウス血清抗体価と生存期間の関連を示したものである。各々の点が一匹のマウスの抗体価と生存期間を表している。Figure 20a はIgG1、Figure 20b はIgMクラスの抗体価である。

どちらの図においても、比較的高い抗体価を示したマウスは比較的早く死亡した一方で、比較的低い抗体価を示したマウスは比較的長期間生存した傾向が見られた。腫瘍を拒絶したマウス(図においては "No tumor" と示されている)の抗体価は

0または非常に低いものであった。これらの結果は、液性免疫がMUC1に対する腫瘍免疫の重要な要素ではないことを示している。

(b) MUC1に対する細胞性免疫の検討

野生マウスのCD4⁺、CD8⁺ T細胞を除去することによりどちらのT細胞がMUC1に対する細胞性免疫に関与しているかを検討した。第-1日に施行したFlow cytometryにて、指定された細胞分画が少なくとも97%は除去されていることが確認され、また第6、第13、第20日にも同様にFlow cytometryを施行して細胞分画の除去(97%以上)が持続している事を確認した。

脾内同所注入を受けた各群の生存曲線はFigure 21aに示す通りである。対照群(irrelevant Ab)に比し、CD4⁺除去群、CD8⁺除去群ともに生存曲線の悪化を示した(CD4⁺除去群 vs 対照群: $p=0.113$, CD8⁺除去群 vs 対照群: $p=0.0439$)。また、CD4⁺、CD8⁺両方を除去した群はMUC1.Tg マウスと同様の生存曲線を示し、CD4⁺、CD8⁺両者の除去でPanc02-MUC1に対する免疫応答がほぼ完全になつていけると言える。従って、CD4⁺、CD8⁺両成分とも脾内のPanc02-MUC1に対する細胞性免疫に関わっており、かつこの二つが主な免疫担当細胞であると考えられた。

皮下注入モデルを用いて行なった細胞分画除去実験の結果(Figure 21b)において、CD8⁺除去群は生存曲線が対照群に比べ悪化しており($p=0.0068$)、CD8⁺ T細胞は腫瘍拒絶に必要と考えられた。CD4⁺除去群は対象群と同じ様に腫瘍を拒絶しており、CD4⁺ T細胞はPanc02-MUC1の皮下における拒絶に必ずしも必要でないと考えられた。しかし、CD4⁺、CD8⁺両方を除去した群はCD8⁺のみを除去した群より生存曲線に有意な悪化を認めており($p=0.0009$)、CD4⁺細胞も何らかの働きをしていると考えられた。

[考察]

目的(1) C57BL/6マウスにおける脾癌腫瘍細胞の同所注入モデルの確立

脾内への同所注入モデルは以前に報告されている[24,25]が、これらの報告はT細胞を欠くヌード(無胸腺)マウスを使用しており、腫瘍免疫を研究するには適切な実験系とはいえない。本研究では、免疫学的修飾を受けていないC57BL/6マウスに、それと遺伝的背景の同一な脾癌腫瘍細胞株Panc02を同所注入したが、このようなモデルは今までに報告されていない。この脾内同所注入モデルを確立し、腫瘍免疫の研究において通常行なわれる皮下注入との比較を行なった。そして、腫瘍関連抗原MUC1の免疫原性およびMUC1を標的とするワクチンによる癌治療の可能性を探った。

腫瘍免疫の実験においては、腫瘍増生を容易に監視し測定できる点から皮下注入モデルが通常使用される。しかしながら、臓器特異的な腫瘍増生に伴う脾癌の病理学的特徴は皮下においては通常見られない。皮下に注入された腫瘍細胞は、脾癌患者

に見られる腫瘍の構造、腫瘍増殖速度、転移能などを示さない[26]。一方、ヌードマウスへの脾癌腫瘍細胞同所移植モデルでは急速な腫瘍増殖や転移などが見られている[27]。

in vitroで増殖している腫瘍細胞ではなく、腫瘍細胞を皮下に注入した後生育してくる腫瘍塊を摘出して細切し、別のマウスに同所移植する方法がいくつかのグループから報告されている[28-32]。この方法にはいくつかの問題がある。移植する腫瘍の量や細胞成分の片寄り、移植片の生着能力の片寄りなどが挙げられる。腫瘍細胞懸濁液を直接注入する方法はこれらの欠点を持たない。一方、同所注入モデルの欠点は、腫瘍細胞が注入した場所から漏れたり、遊走したりする可能性がある点である。初期の実験において我々は、腫瘍細胞同所注入から腫瘍増殖により死亡に至るまでの幾つかの時点でマウスを犠牲させ、腹腔内を検索した。その結果、主な腫瘍は脾に位置し、腹腔内の播種性腫瘍は若干数のマウスに見られたものの大きさは小さく、またその大きさは、腫瘍細胞懸濁液を腹腔内注入し同時期に犠牲させ検索したマウスの腹腔内腫瘍の大きさよりはるかに小さかった。このことから、本研究の同所注入モデルにおける腫瘍細胞の脾からの漏出や遊走は大きな問題ではないと言える。

剖検所見で肝、肺への転移を認めたマウスはなかった。転移能は本論文の主要な論点ではないが、転移を認めなかった理由として脾内注入する腫瘍細胞の数が多すぎ、転移をきたす前に死亡してしまったことが挙げられる。

目的(2) 脾の微小環境におけるMUC1に対する免疫機構の認識の有無の検索、および皮下におけるMUC1の認識との比較

免疫学的観点から皮下と臓器特異的な場所を比較すると、皮下は抗原提示細胞に富んでおり他の免疫反応担当細胞と共に常に外来異種抗原の侵入を監視している。一方、脾内には通常外来異種抗原は侵入しない。また、抗原提示細胞などの免疫細胞の分布は知られていない。故に、皮下における腫瘍注入に対する免疫学的反応は脾内における免疫学的反応を必ずしも正しく反映していない。

以前の研究において、メラノーマ細胞に遺伝子導入によって発現されたMUC1に対して、C57BL/6野生マウスの皮下に提示されれば腫瘍免疫反応を示すことがすでにわかっている[33]。本研究においては、脾内に提示されたMUC1に対するC57BL/6野生マウスの免疫反応、およびC57BL/6 MUC1.Tg マウスの免疫寛容を評価した。Panc02-MUC1 を皮下注入されたマウスは免疫学的腫瘍拒絶を示した。一方、Panc02-neo を皮下注入されたマウスにおいて腫瘍は増殖し、内因性の拒絶反応によって排除できなかった。これに対して、脾内に注入された Panc02-MUC1、Panc02-neo 双方ともに比較的速い腫瘍増殖を示した。この違いは次の二つの要素にて説明させる。(a) 脾内に提示されたMUC1は免疫系により認識されるが、その免疫反応はMUC1が皮下に提示された場合に比べ小さい (b) ホルモンや血流などの脾固有の微小環境がPanc02細胞に対して皮下におけるそれよりも好都合である。これら二つは相反するものではない。

(a) を支持する実験結果がある。Table 1 に示した免疫組織化学染色の結果、皮下

に注入された Panc02-MUC1 による腫瘍はMUC1陰性、脾内注入された Panc02-MUC1 による腫瘍はMUC1陽性であった。このことは、皮下ではMUC1発現細胞は除去されるかまたは発現が抑えられ、MUC1陰性の腫瘍細胞のみが生育して行く。一方、脾内ではMUC1発現細胞が除去できずに生育してくることを示唆している。(b)を支持する実験結果は、Figure 8a に示されており、脾内注入された Panc02-neo は皮下注入された Panc02-neo よりもはるかに速く腫瘍を増生した。Panc02 細胞の生育には脾内が皮下より適していると考えられる。

脾内に提示されたMUC1の免疫系による認識を調べたもう一つの実験がFigure 10 に示されているMUC1.Tg マウスを使用した腫瘍細胞脾内注入実験である。野生マウスは同数の Panc02-neo、Panc02-MUC1 を脾内注入したとき生存曲線に明らかな差を示したが、MUC1.Tg マウスにおいては生存曲線は近似していた。このことは、(1) MUC1.Tg マウスは脾内に提示されたMUC1に対して免疫学的に寛容であり、Panc02-MUC1 を免疫反応にて除去できない(2) 野生マウスは脾内の Panc02-MUC1 を免疫反応にて除去している(3) Panc02-neo と

Panc02-MUC1 はその一般的な *in vivo* における腫瘍増殖速度において差がないことを示している。MUC1.Tg マウスの免疫寛容に関しては、MUC1.Tg マウスに Panc02-MUC1 を脾内注入して得られた腫瘍の免疫組織化学染色において、検索した5例全例でMUC1陽性であったこと、それらのマウスで後述の液性免疫反応(血中抗MUC1抗体)が全く見られなかったことから示される。

目的(3) 皮下において惹起されたMUC1特異的な免疫反応が脾内腫瘍細胞の拒絶に対して有効であるかどうかの検討

この目的は臨床との関連においてワクチン療法の可能性に対する理論的根拠を得るために設定された。そして、その目的のために以下の二つのモデルを使用した。

- (a) 皮下に Panc02-MUC1 にて免疫し、一定期間経過後脾内に腫瘍を注入する
- (b) 皮下に Panc02-MUC1 にて免疫したドナーマウスを犠牲させ、その免疫細胞を受容者マウスに養子免疫し、受容者マウスに腫瘍を脾内注入する

まず(a)のモデルから得られた結果に関し、免疫反応のMUC1特異性に関する考察を述べる。免疫系は基本的にはあらゆる異種タンパクに対して拒絶反応を起こし得る。一般的に、腫瘍細胞に対する免疫学的拒絶反応は、その腫瘍細胞上の様々な異種タンパクに対するマウスの免疫系の反応をあわせた反応である。Panc02-MUC1 の場合であれば、この細胞株に対する免疫学的腫瘍拒絶反応は、Panc02-MUC1 上に発現されている様々な異種タンパクに対するマウスの免疫系の反応をあわせた反応と考えられる。従って、皮下免疫後 Panc02-MUC1 の脾内注入を施行した群とその対照群(皮下免疫なし)に見られる生存曲線の差(Figure 11a)は、皮下免疫の、Panc02-MUC1 上に発現されている様々な異種タンパクに対する脾内での免疫への効果を表している。同様に、Figure 11bに見られる差は、皮下免疫の、Panc02-neo 上に発現されている様々な異種タンパクに対する脾内での免疫に対する効果を表している。ここで、 $\text{Panc02-MUC1} = \text{Panc02-neo} + \text{MUC1}$ である

から、脾内におけるMUC1への免疫に対する皮下免疫の効果は、Figure 11aにおける実験群と対照群の差から、Figure 11bにおける実験群と対照群の差を引いたものとなる。Figure 11aに見られる差がFigure 11bに見られる差よりはるかに大きいことは、Figure 11aの差が主としてMUC1特異的免疫反応に依っていることを示している。これはMUC1特異的皮下免疫による脾腫抑制、治療の可能性を示している。MUC1特異的皮下免疫の有効性は免疫3週間後に腫瘍を脾内注入した群が5週間後の群より良好であった(Figure 11a vs Figure 12a)。これは皮下免疫により活性化される免疫細胞の時間経過による量的減少が原因と考えられる。しかし、結果には示していないが、別の実験において、皮下免疫後6ヵ月を過ぎたマウスにおいてもFig. 11に見られるようなMUC1特異的脾内腫瘍拒絶効果を認めており、免疫記憶細胞の存在が想定される。

一方、今回の実験では免疫後5週間を経過するとMUC1のみならず Panc02-neo 細胞に対しても免疫学的拒絶反応を示した。この現象は xenogenization - 異種タンパクに対する強力な免疫反応が本来ほとんどあるいは全く免疫原性を持たない抗原に対する免疫反応をひき起こす、という考え方 - にて説明できる[34]。すなわち、Panc02-MUC1 を皮下免疫することによりまずMUC1に対する免疫応答が起り、引き続いて Panc02-MUC1 細胞のMUC1以外の抗原、つまり Panc02-neo 細胞上の本来ほとんどあるいは全く免疫原性を持たない抗原に対する免疫反応が惹起されたと考えられる。

(b)のモデルはワクチン療法としての養子免疫療法の有効性を検証する目的で行なわれた。ドナー野生マウスを Panc02-MUC1 にて皮下免疫し、3週間後に脾・リンパ節細胞を受容者野生マウスに養子免疫した。養子免疫を受けたマウスは対照群に比べより強いMUC1特異的免疫反応による腫瘍拒絶を示した。このことは、ドナーの免疫細胞が別の個体である受容者においても免疫反応を起こし得ることを示している。第1のモデルで皮下免疫後5週間を経過すると皮下にて惹起された免疫反応が低下する結果が得られたが、このモデルにおいてはFigure 15aに示す様に皮下免疫と養子免疫の間隔が5週間になると養子免疫の効果が見られなくなった。そこで以下の実験では皮下免疫後3週間で養子免疫を行なうこととした。さて、MUC1.Tg マウスは自己タンパクであるMUC1に対して免疫学的に寛容である。ドナー野生マウスの免疫細胞をMUC1.Tg マウスに養子免疫することで果たして寛容を破ることができるであろうか。結果はFigure 17aに示す通り、受容者MUC1.Tg マウスにおいてドナー野生マウスの免疫細胞の養子免疫は Panc02-MUC1 排除に効果的であった。しかも、ドナー野生マウスから養子免疫された免疫細胞の、受容者MUC1.Tg マウスの内因性MUC1に対する自己免疫反応は見られなかった。この結果は、ドナー野生マウスの免疫細胞が腫瘍MUC1を特異的に攻撃し、一方正常細胞上のMUC1に対する反応は大きくないことを示唆している。臨床への応用を考えると、癌患者から得られたMUC1特異的細胞障害性T細胞を精製して増殖させ、別の癌患者に養子免疫することで自己免疫反応を起こすことなくMUC1発現癌細胞を攻撃できる可能性がある。今までに癌患者から得られたMUC1特異的細胞障害性T細胞はMHC非拘束性であることもこの可能性を支持する。すなわちMHCの異なる別の患者に対しても細胞障害性T細胞が有効と考えられる。

ここでもう一度MUC1.Tg マウスのMUC1に対する免疫寛容の問題に触れたい。先にMUC1.Tg マウスは皮下および脾内に提示されたMUC1に対して寛容であると述べた。これは、*in vivo*の実験系にてMUC1に対する免疫応答を検出できなかった、ということである。

MUC1.Tg マウスをドナーとして使用した養子免疫の実験においては、受容者野生マウスにおいて生存曲線の改善は見られず、むしろ養子免疫を行なった群では対照群よりも有意差はないが若干生存曲線が悪化した(Figure 19a)。この結果は、Panc02-MUC1 を皮下注入されたMUC1.Tg マウスはPanc02-MUC1 を拒絶できないだけでなく、MUC1特異的免疫応答を押さえる機構を働かせている可能性を示唆している。

ところで、別の系(MUC1遺伝子導入メラノーマ細胞の皮下注入モデル)を使用した実験で、MUC1.Tg マウスからMUC1特異的細胞障害性T細胞を*in vitro*で検出した[35]が、皮下腫瘍注入実験、すなわち*in vivo*の実験系においてMUC1.Tg マウスはMUC1遺伝子導入メラノーマ細胞を拒絶できなかった。*in vitro*で検出された細胞障害性T細胞が、*in vivo*での抗腫瘍効果を表すには量的、質的に不十分であったと推測される。

MUC1はヒトにとって自己抗原である。MUC1.Tg マウスはヒトと同様の臓器分布でMUC1を発現しており[21]、ヒトと同様にMUC1発現癌細胞を排除できず、一方ではやはりヒトと同様にMUC1特異的細胞障害性T細胞が*in vitro*で検出されている。従って、MUC1.Tg マウスで得られたMUC1に対する免疫状態の実験結果はヒトにおけるMUC1に対する免疫状態に類似していると考えられ、その状態を要約すれば、*in vitro*でMUC1に対する免疫応答が検出されるものの、*in vivo*ではMUC1に対して免疫寛容である。そして、MUC1.Tg マウスはヒトにおけるMUC1に対する*in vivo*の免疫寛容を破り、MUC1特異的免疫療法を樹立するための研究モデルとして有用である。*in vitro*で検出される免疫応答を増強することにより*in vivo*での免疫寛容を破り、有効な腫瘍免疫につながる可能性として、抗原提示細胞を刺激するGM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)やT細胞の活性化をもたらすIL-2(Interleukin-2)などのサイトカイン刺激が挙げられている[36-39]。

目的(4) MUC1に対して免疫応答する野生マウスにおいてどの免疫機構が腫瘍排除を司っているかの検討

まず液性免疫であるが、Figure 20 に示した通り、MUC1に対する血中抗体価が高いマウスは比較的早く死亡し、一方抗体価が低いマウスは長期生存した。この結果はMUC1に対する抗体、すなわち液性免疫がPanc02-MUC1に対する腫瘍免疫には役立たないことを示している。そこで細胞性免疫の関与を探るため、T細胞抗体除去モデルを利用した。T細胞特異的抗体を注射し、CD4+のみ、CD8+のみ、その両方、を除去したのちPanc02-MUC1を脾内に注入した。結果はCD4+、CD8+T細胞は共に腫瘍拒絶に必要であった(Figure 21a)。一般的に想定されている腫瘍免疫の機構は、腫瘍を抗原提示細胞が貪食し、腫瘍抗原決定基をCD4+に提示、CD4+が

CD8+を刺激する形で実際の腫瘍細胞の攻撃は細胞障害性CD8+が行なう、というものであるから、この結果は妥当なものと言える。ところが、Panc02-MUC1を皮下に注入した同様の実験では、CD8+細胞が腫瘍拒絶に必要で、CD4+細胞が必ずしも必要ないという結果を得た(Figure 21b)。この皮下モデルにおける結果は、別の細胞株を用いた研究[40]の結果、すなわちMUC1特異的免疫反応に対してCD8+細胞が必要でCD4+細胞が必要ないという結果と一致している。

以上の臍内注入モデルと皮下モデルにおける一見相反する結果に対しては幾つかの解釈が可能である。まず、同じ細胞株に対しても抗原提示または標的の存在する場所が異なる場合には担当する免疫細胞が異なることが考えられる。事実、別の系(MUC1遺伝子導入メラノーマ細胞の皮下注入モデル)を用いた同様の実験では、CD4+が腫瘍拒絶に必要で、CD8+は必ずしも必要ないとの結果を得ている[34]。次に、皮下免疫の場合には少数の免疫細胞があれば十分であり、特に実際に腫瘍細胞障害性を発揮するCD8+の「指令塔」の役割を果たすと想定されるCD4+はそれほど多数は必要がない。

[結語]

(1) C57Bl/6マウスおよび同系腫瘍細胞株 Panc02 を用いた臍内腫瘍細胞同所注入モデルを確立した。

(2) C57Bl/6野生マウスは臍においてMUC1を認識し免疫学的拒絶反応を惹起することができ、C57Bl/6 MUC1トランスジェニックマウスは臍に提示されたMUC1に対して免疫学的寛容であった。

(3) C57Bl/6野生マウスの皮下にて惹起されたMUC1に対する免疫反応が、臍におけるMUC1発現 Panc02 の増生を抑制した。

(4) 腫瘍細胞の発現するMUC1に対する臍における免疫応答はCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞を主とする細胞性免疫が司っていると考えられた。

謝辞

本研究に対してはUniversity of Nebraska Medical CenterのMichael A. Hollingsworth 博士の多大なる援助および助言によった。ここに同博士に対する謝意を表する。また同博士の研究室員であるRichard M. Tempero 博士からも多くの助言を頂戴した。ここに同博士に対して謝意を表する。

Fig. 1

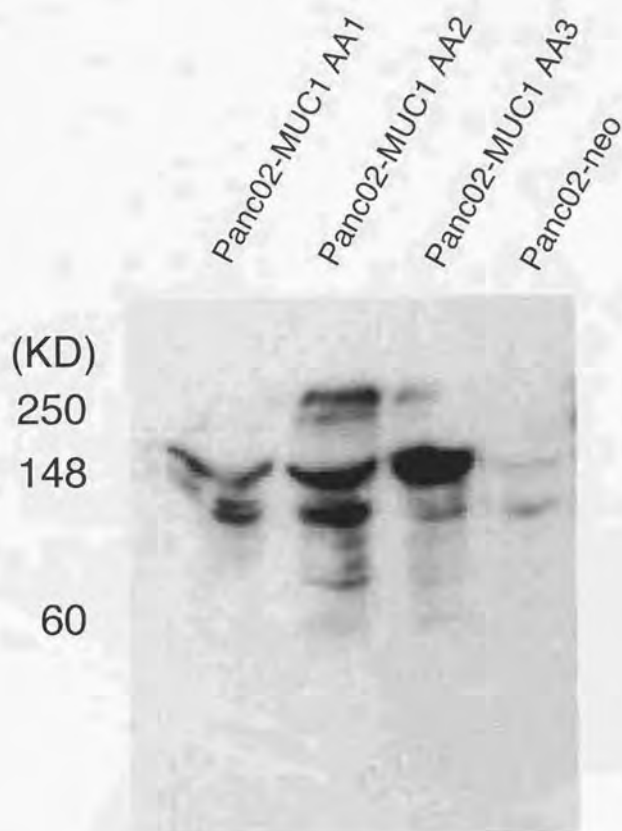


Fig. 1

MUC1を遺伝子導入したPanc02におけるMUC1の発現のウエスタンブロット法による解析

AA1, AA2, AA3はそれぞれ異なるクローンであり、MUC1の発現が確認された。Panc02-neoはベクターのみを遺伝子導入した株で、MUC1の発現はなかった。

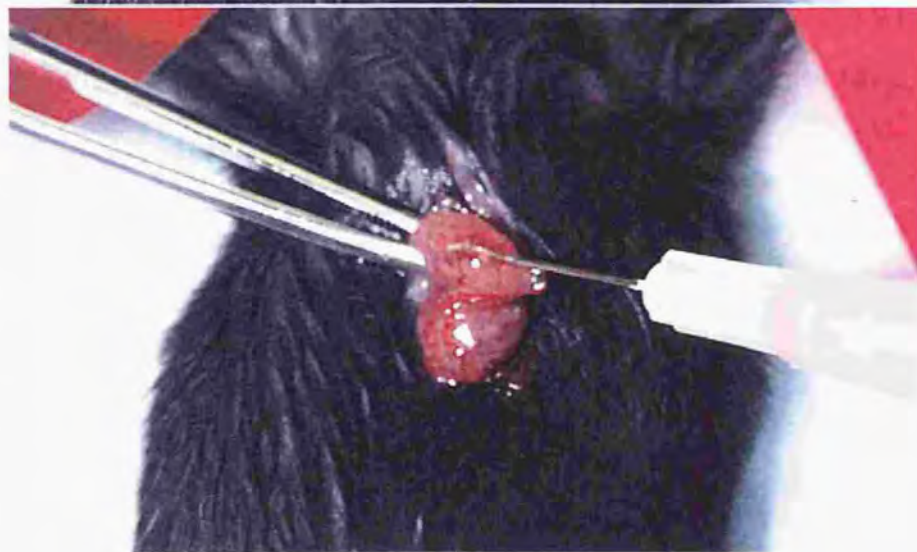
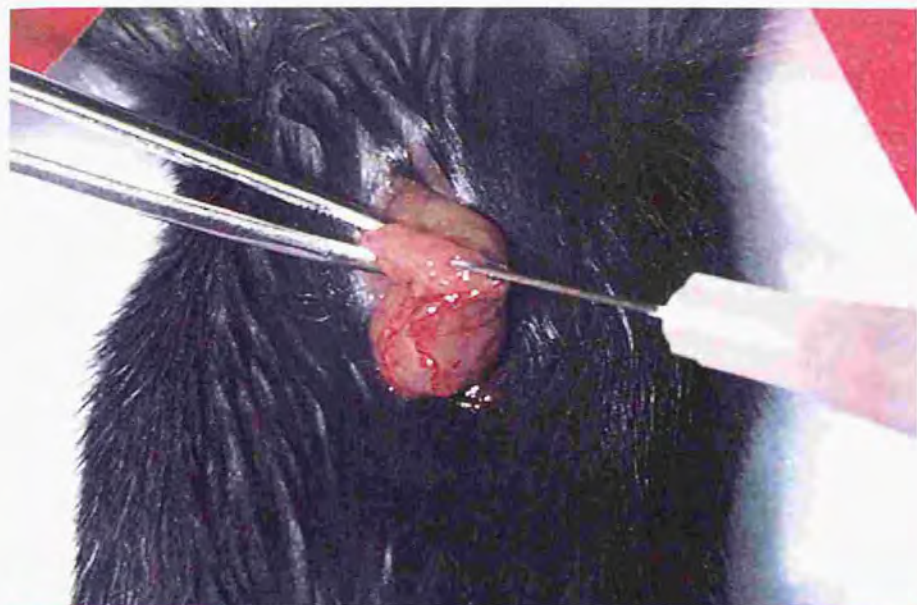


Fig. 2

脾内同所注入

上：腫瘍懸濁液を注入する直前。針の先端が脾内にある。

下：腫瘍懸濁液を注入した直後。脾は腫大している。



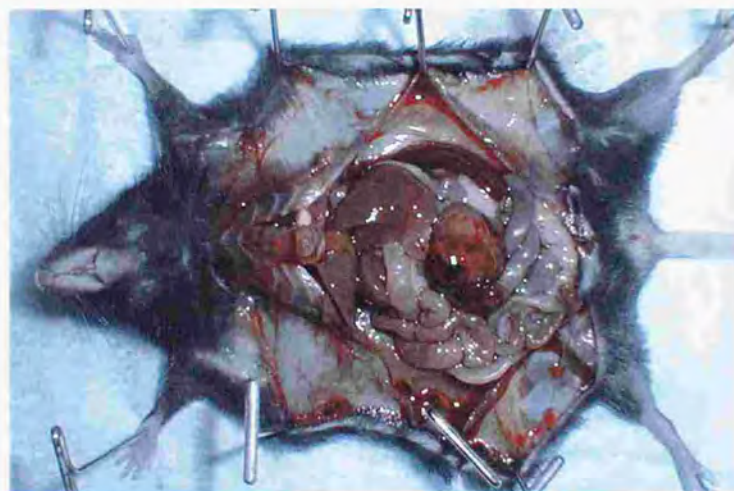


Fig. 3

上段 (Fig. 3a) 左: 腹水による腹部膨満をきたしたマウス。右: 正常のマウス。

下段 (Fig. 3b) 著しい腹部膨満を示し、犠死させたマウスの腹腔内所見。脾に直径12mmの腫瘍を認めた。

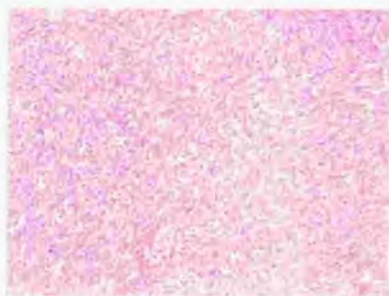
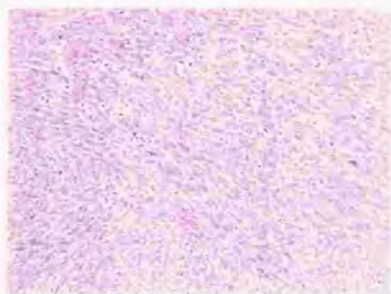


Fig. 4

腫瘍の組織学的所見

左：臍内注入モデルより得られた腫瘍の組織写真(H-E, x100)。腫瘍は明らかな腺管構造を持たない未分化癌であった。

右：皮下注入モデルより得られた腫瘍の組織写真(H-E, x100)。腫瘍は同じく明らかな腺管構造を持たない未分化癌であった。

Fig. 5a - Panc02-neo

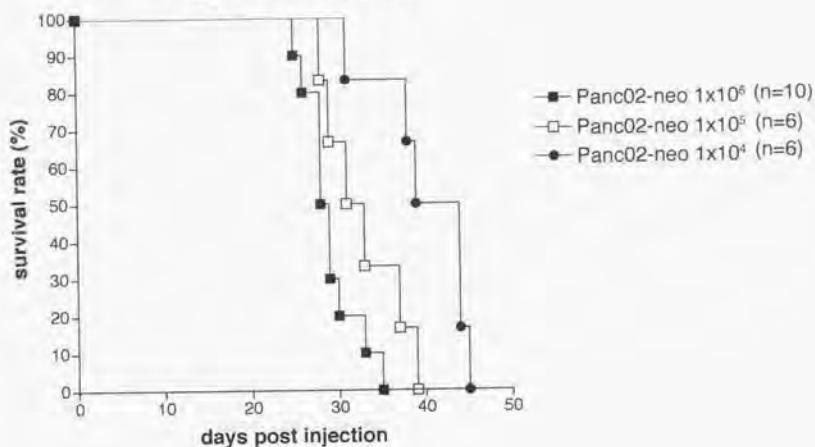


Fig. 5b - Panc02-MUC1

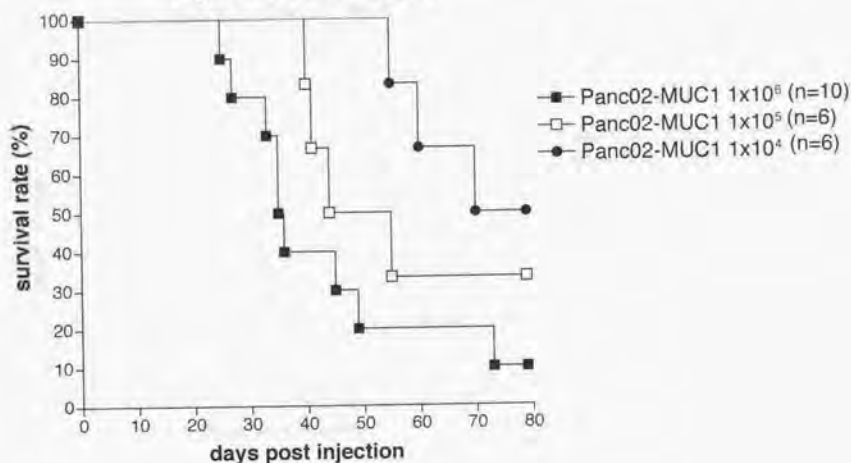


Fig. 5

Panc02-neo (Fig. 5a) または Panc02-MUC1 (Fig. 5b) の脾内注入モデルにおける、注入腫瘍細胞の量と生存曲線の関係
Panc02-neo および Panc02-MUC1 のいずれの場合も脾内注入する細胞数を増加させると生存曲線が悪化する傾向が見られた。

Fig. 6a - Panc02-neo

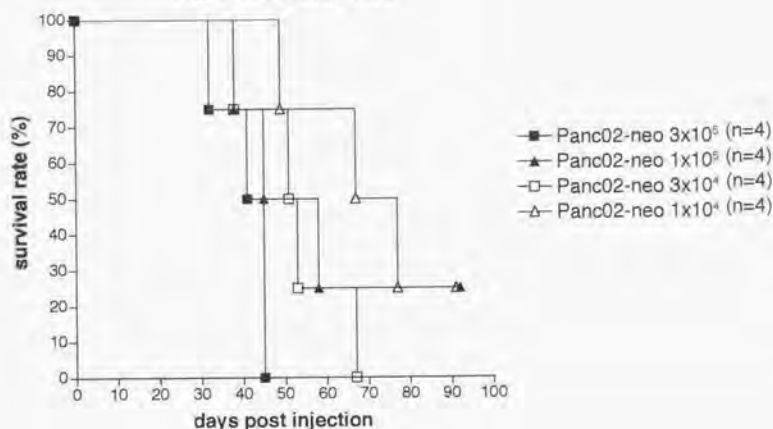


Fig. 6b - Panc02-MUC1

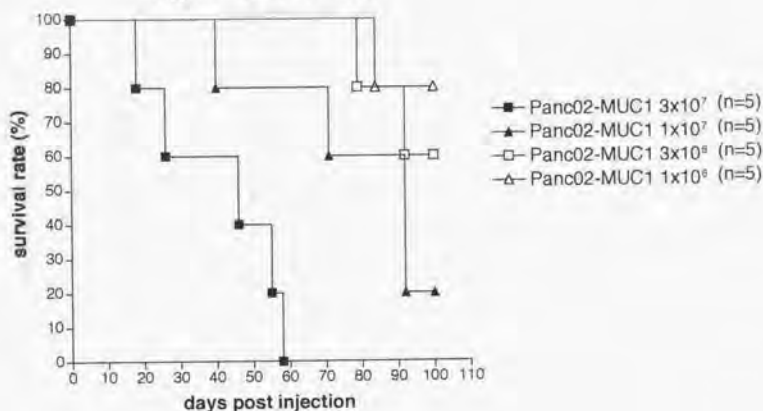


Fig. 6

Panc02-neo (Fig. 6a) または Panc02-MUC1 (Fig. 6b) の皮下注入モデルにおける、注入腫瘍細胞の量と生存曲線の関係
Panc02-neo および Panc02-MUC1 のいずれの場合も皮下注入する細胞数を増加させると生存曲線が悪化する傾向が見られた。

Fig. 7a - orthotopic site

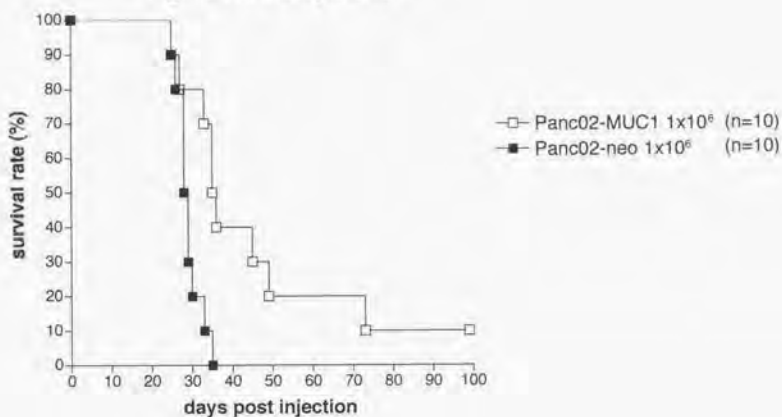


Fig. 7b - subcutaneous site

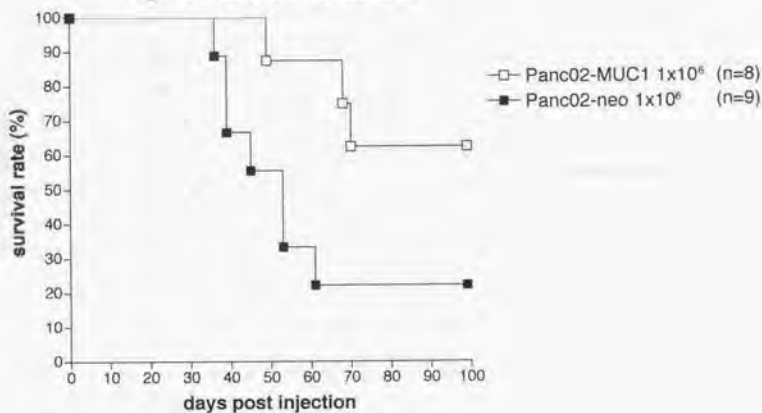


Fig. 7

膵内注入モデル (Fig. 7a) または皮下注入モデル (Fig. 7b) における細胞株と生存曲線の関係
 いずれのモデルにおいても、Panc02-neo細胞の腫瘍増生がPanc02-MUC1に比べて急速であった。

Fig. 8a - Panc02-neo

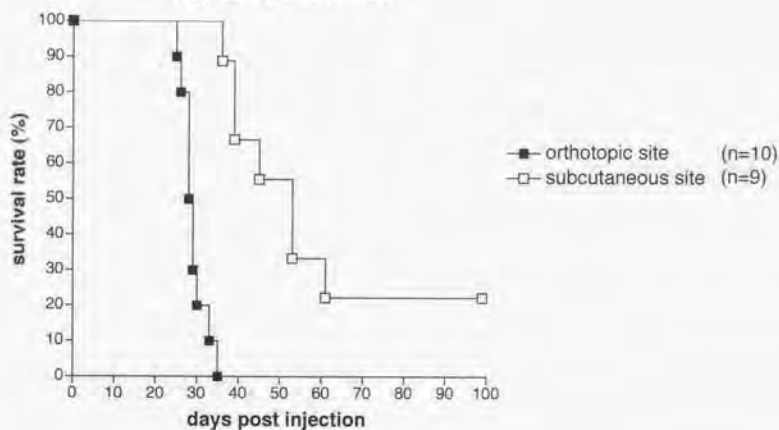


Fig. 8b - Panc02-MUC1

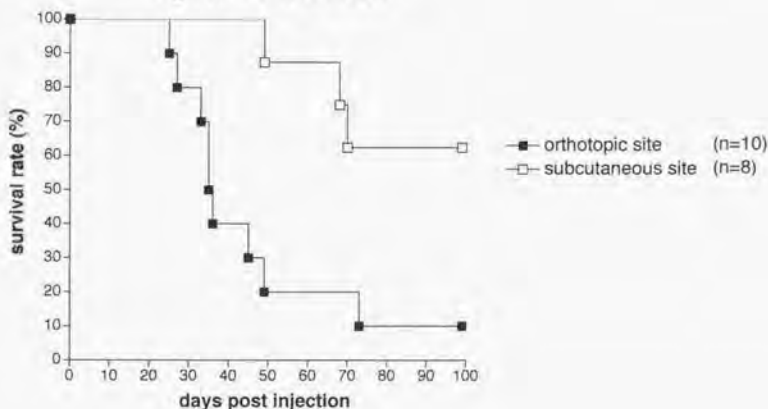


Fig. 8

同一細胞株を臍内または皮下に注入した際の腫瘍増殖速度の相違
 Panc02-neo(Fig. 8a)およびPanc02-MUC1(Fig. 8b)いずれを注入した場合も、
 臍内注入モデルにおける腫瘍増殖が皮下注入モデルに比べて急速であった。

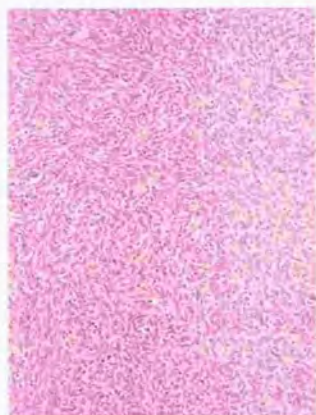
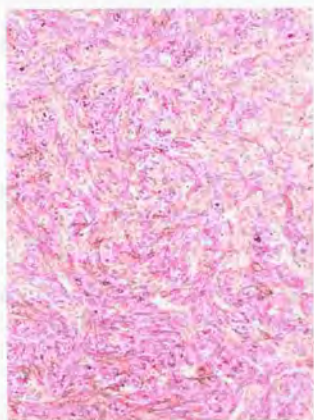


Fig. 9

腫瘍の免疫組織化学染色所見

左：免疫組織化学的染色にてMUC1陽性であった、臍内注入モデルより得られた腫瘍の組織写真。

右：同じくMUC1陰性の組織写真。

Fig. 10

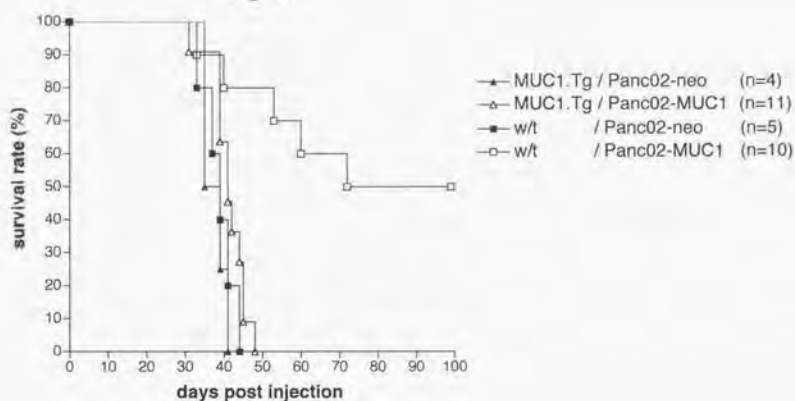


Fig. 10

野生マウス(w/t)およびMUC1.Tgマウスの、Panc02-MUC1またはPanc02-neoの脾内注入後の生存曲線の相違

MUC1.Tgマウスにおいては野生マウスと異なり、Panc02-neo注入群とPanc02-MUC1注入群がほぼ同様の生存曲線を示した。

Fig. 11a - Panc02-MUC1

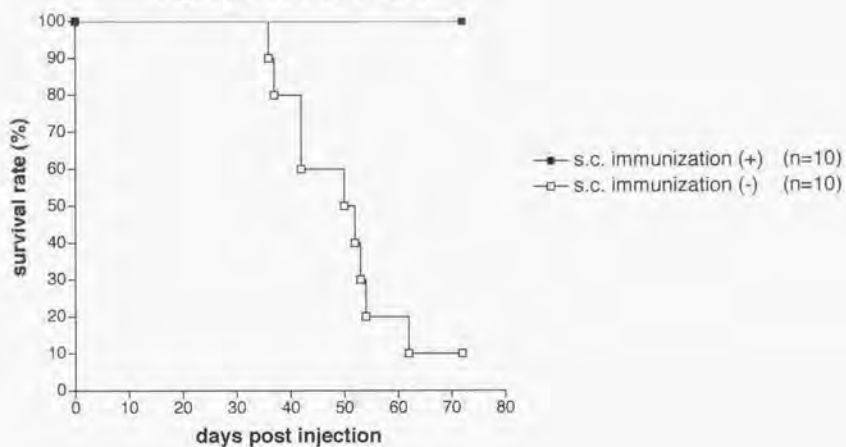


Fig. 11b - Panc02-neo

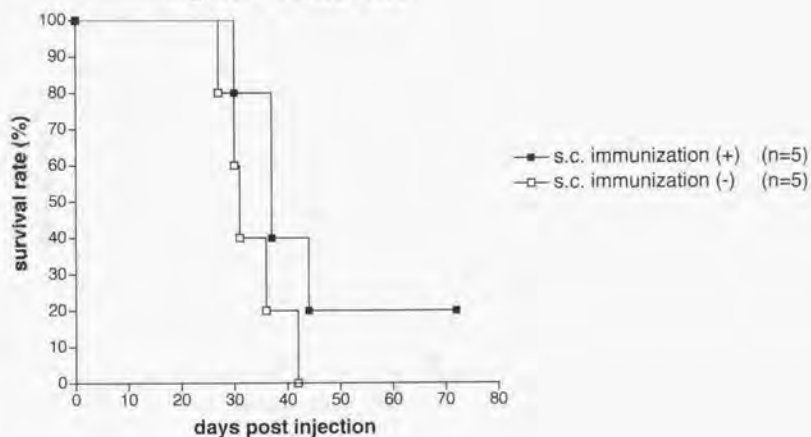


Fig. 11

皮下免疫の脾内腫瘍に対する免疫学的腫瘍拒絶への効果(3週間の間隔)
免疫群においてPanc02-MUC1に対する拒絶効果が見られた。皮下免疫の
Panc02-neoに対する拒絶効果は低いものであった。

Fig. 12a - Panc02-MUC1

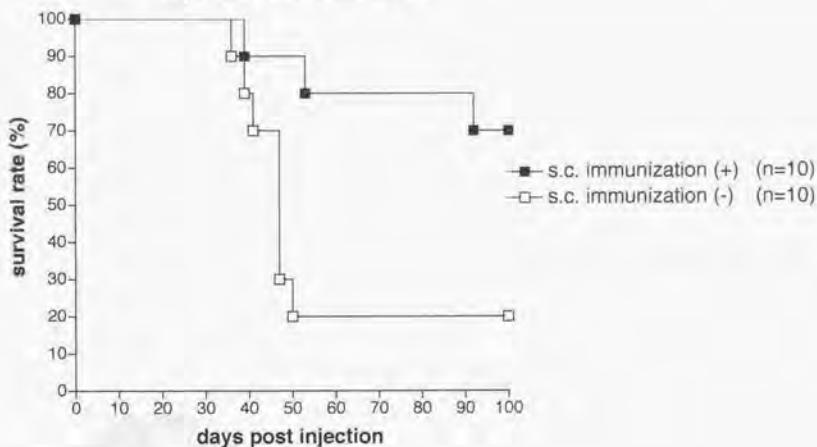


Fig. 12b - Panc02-neo

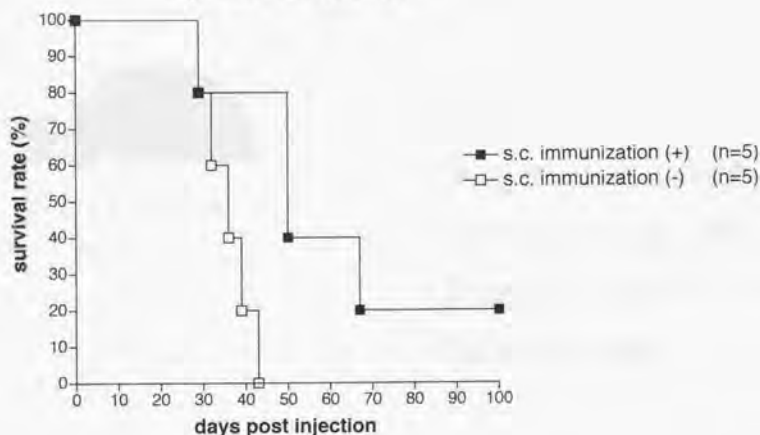


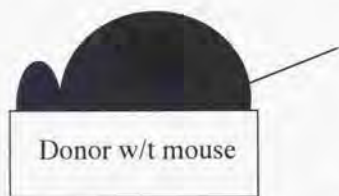
Fig. 12

皮下免疫の群内腫瘍に対する免疫学的腫瘍拒絶への効果(5週間の間隔)

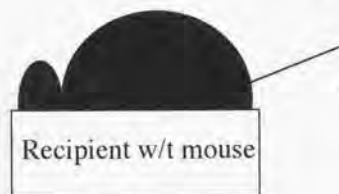
免疫群においてPanc02-MUC1に対する拒絶効果が見られたがFig.11に見られた効果よりやや減少した。皮下免疫のPanc02-neoに対する拒絶効果が逆に増加して、免疫群と対照群との生存曲線の差が有意となった。

Fig. 13 Cellular adoptive transfer (1)

challenged s.c.
with Panc02-
MUC1



3 (or 5) weeks later,
harvest spleen and
→ LN cells
→ single cell
suspension
i.p. injection



One day later,
tumor challenge
into the pancreas
(Panc02-MUC1 or
Panc02-neo)

Fig. 13

免疫細胞の養子免疫の概略図(1)

ドナー野生マウスを免疫し犠死後脾・リンパ節細胞を受容者野生マウスに移植、
その翌日に受容者マウスに脾内注入を行なった。

Fig. 14a - Panc02-MUC1

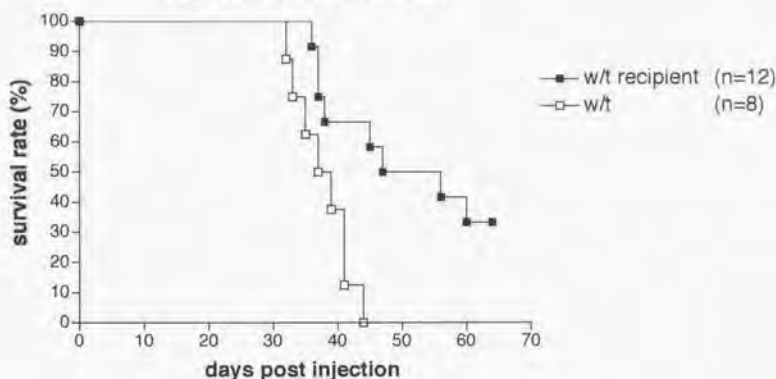


Fig. 14b - Panc02-neo

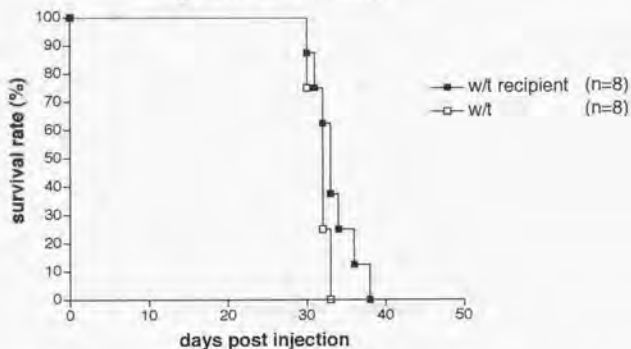


Fig. 14

ドナー野生マウスから得られた免疫細胞の養子免疫が受容者野生マウスの脾内注入腫瘍細胞増生に及ぼす効果(3週間の間隔)
免疫細胞の養子免疫を受けた群は、Panc02-MUC1の脾内注入に対して対照群より有意に生存期間が長かった($p=0.0044$)。Panc02-neoの脾内注入に対する養子免疫の効果はなかった。

Fig. 15a - Panc02-MUC1

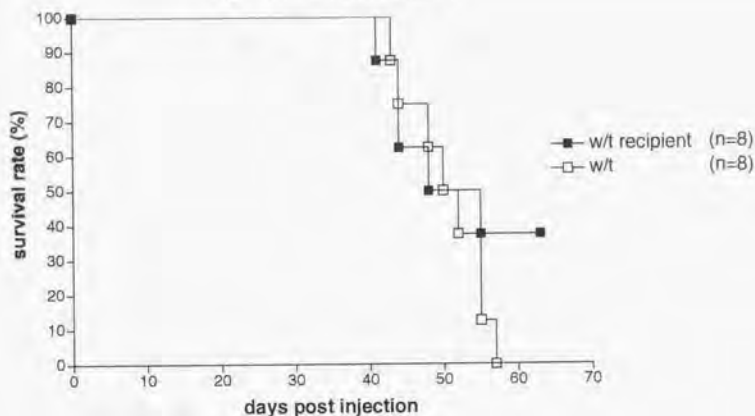


Fig. 15b - Panc02-neo

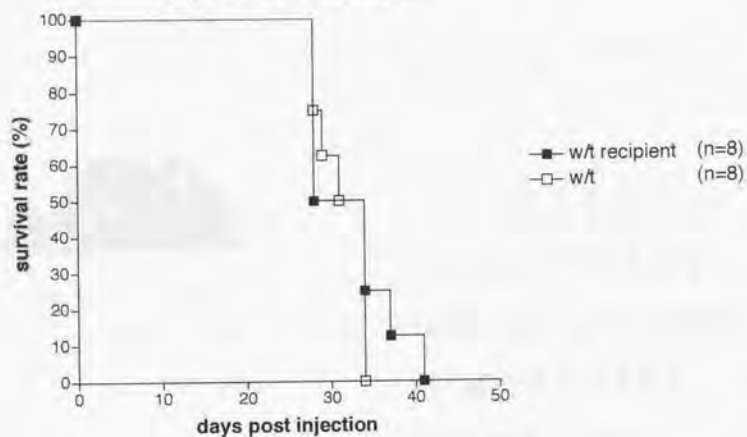
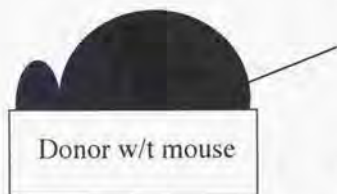


Fig. 15

ドナー野生マウスから得られた免疫細胞の養子免疫が受容者野生マウスの脾内注入腫瘍細胞増生に及ぼす効果(5週間の間隔)
養子免疫はPanc02-MUC1 (Fig.15a),Panc02-neo (Fig.15b)のいずれの細胞株の脾内注入に対しても有効に作用しなかった。

Fig. 16 Cellular adoptive transfer (2)

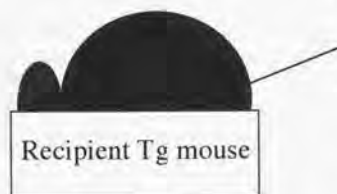
challenged s.c.
with Panc02-
MUC1



3 weeks later,
harvest spleen and
LN cells

→ single cell
suspension

i.p. injection



→ One day later,
tumor challenge
into the pancreas
(Panc02-MUC1 or
Panc02-neo)

Fig. 16

免疫細胞の養子免疫の概略図(2)

ドナー野生マウスを免疫し犠死後脾・リンパ節細胞を受容者MUC1.Tgマウスに移植、その翌日に受容者マウスに脾内注入を行なった。

Fig. 17a - Panc02-MUC1

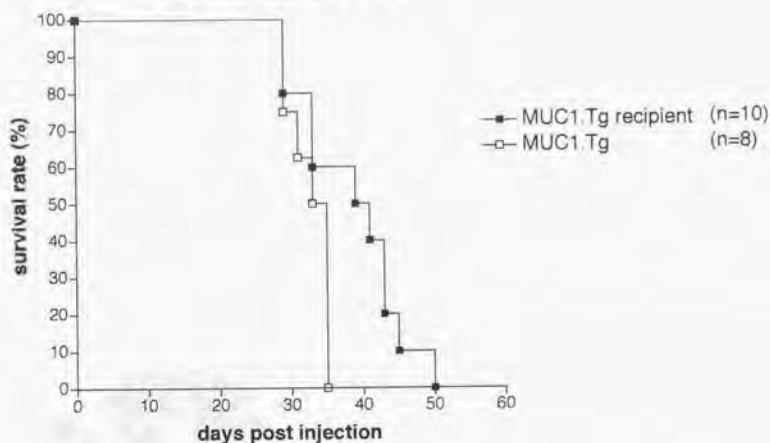


Fig. 17b - Panc02-neo

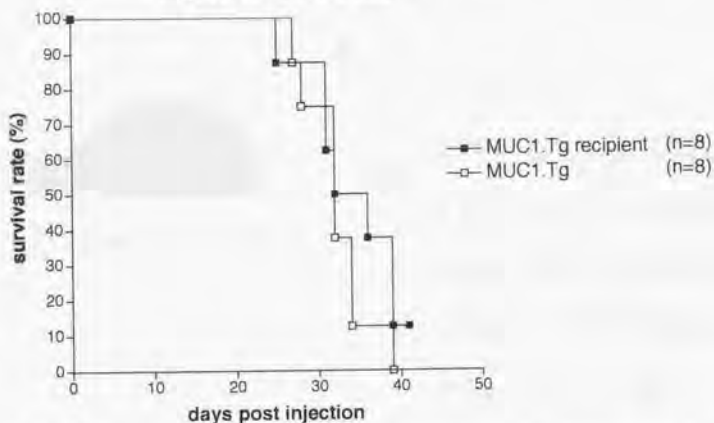


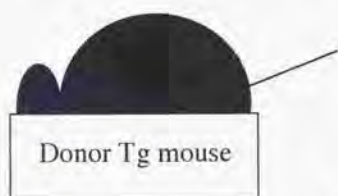
Fig. 17

ドナー野生マウスから得られた免疫細胞の養子免疫が受容者MUC1.Tgマウスの脾内注入腫瘍細胞増生に及ぼす効果

ドナー野生マウスの免疫細胞の養子免疫を受けたMUC1.Tgマウス群はPanc02-MUC1の脾内注入に対して対照群より有意に生存期間が長く($p=0.0446$)、養子免疫が脾内注入されたPanc02-MUC1に対して有効に働いていることが示された。Panc02-neoの脾内注入に対しては養子免疫は有効に作用しなかった。

Fig. 18 Cellular adoptive transfer (3)

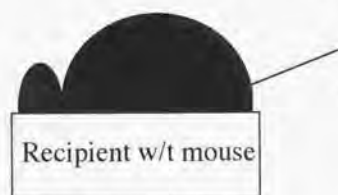
challenged s.c.
with Panc02-
MUC1



3 weeks later,
harvest spleen and
→ LN cells

→ single cell
suspension

i.p. injection



→ One day later,
tumor challenge
into the pancreas
(Panc02-MUC1 or
Panc02-neo)

Fig. 18

免疫細胞の養子免疫の概略図(3)

ドナーMUC1.Tg マウスを免疫し犠死後脾・リンパ節細胞を受容者野生マウスに移植、その翌日に受容者マウスに脾内注入を行なった。

Fig. 19a - Panc02-MUC1

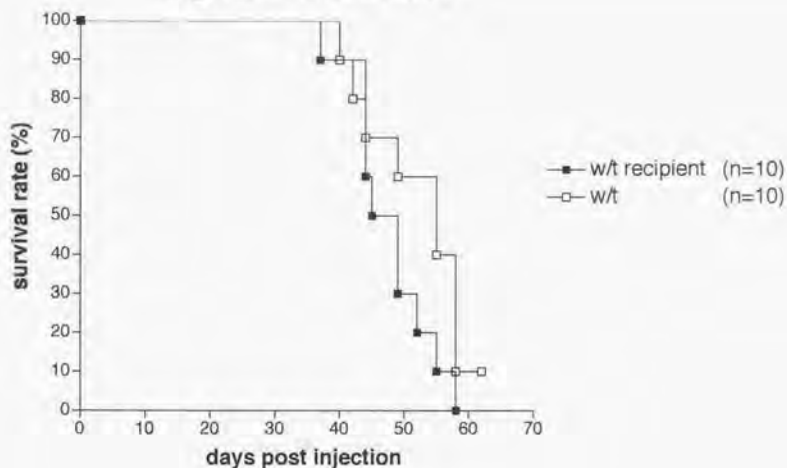


Fig. 19b - Panc02-neo

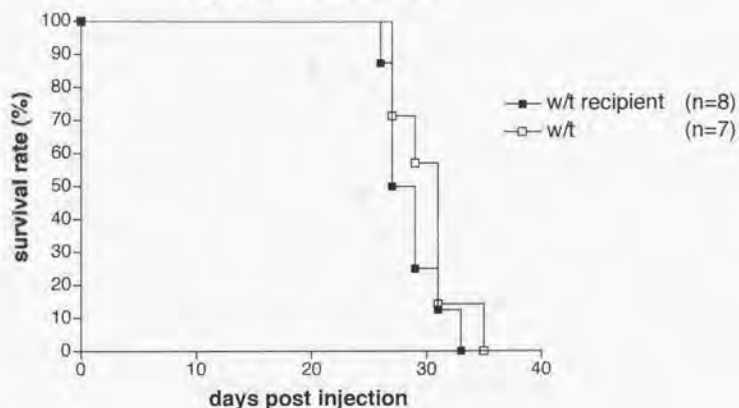


Fig. 19

MUC1.Tgマウスから得られた免疫細胞の養子免疫が受容者野生マウスの脾内
 注入腫瘍細胞増生に及ぼす効果
 養子免疫はPanc02-MUC1 (Fig.19a),Panc02-neo (Fig.19b)のいずれの脾内注
 入腫瘍細胞に対しても有効に作用しなかった。

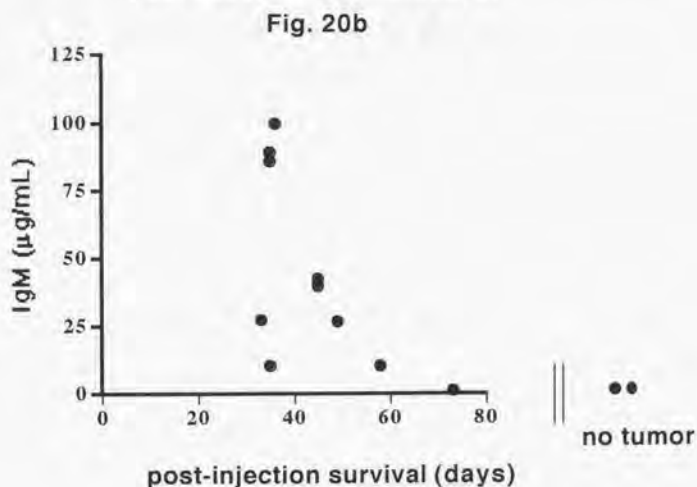
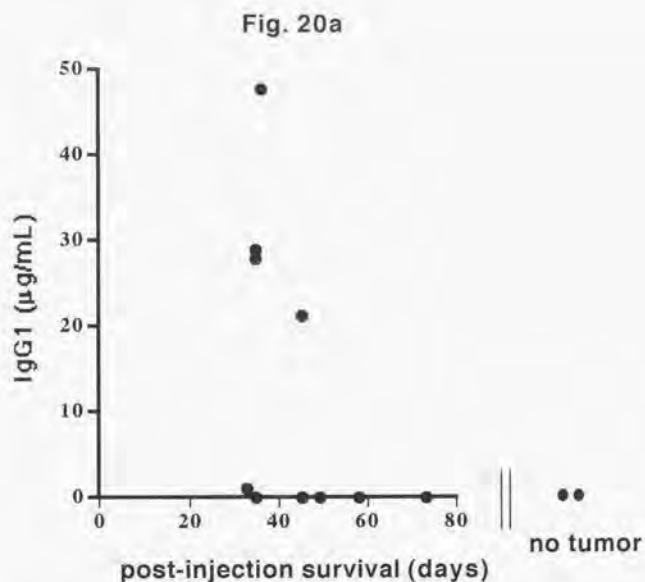


Fig. 20

MUC1に対する液性免疫

IgG1 (Fig. 20a), IgM (Fig. 20b) のいずれのクラスにおいても、比較的高い抗体価を示したマウスは比較的早く死亡した一方、比較的低い抗体価を示したマウスは比較的長期間生存した傾向が見られた。

Fig. 21a

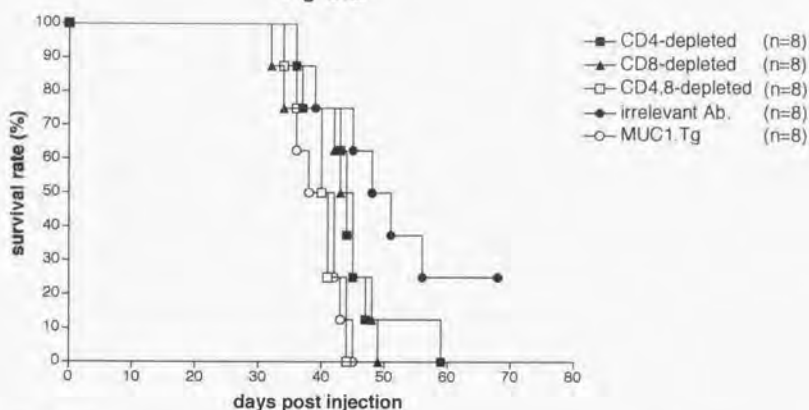


Fig. 21a

脾内に提示されたMUC1に対する細胞性免疫

対照群(irrelevant Ab) に比しCD4+ 除去群、CD8+ 除去群ともに生存曲線の悪化を示した (CD4+除去群 vs 対照群: $p=0.113$, CD8+ 除去群 vs 対照群: $p=0.0439$)。CD4+ T細胞、CD8+ T細胞は共に、Panc02-MUC1 の脾における拒絶に必要と考えられた。

Fig. 21b

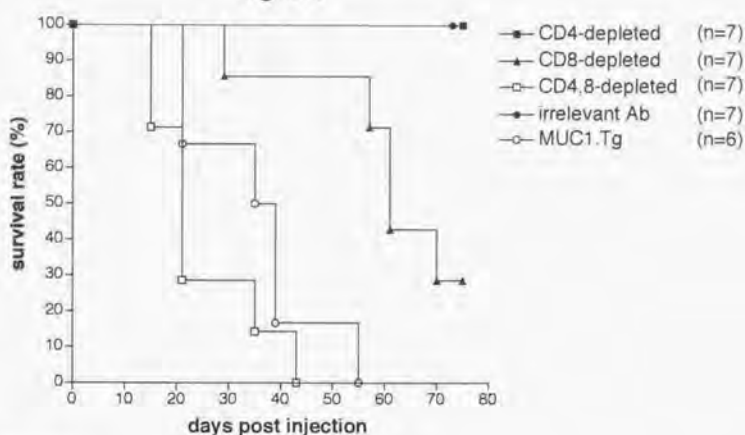


Fig. 21b

皮下に提示されたMUC1に対する細胞性免疫

CD4+ 除去群は対象群 (irrelevant Ab) と同じ様に腫瘍を拒絶したが、CD8+ 除去群は生存曲線が対象群に比べ悪化しており ($p=0.0068$)、CD8+ T細胞は Panc02-MUC1 の皮下における拒絶に必要と考えられた。CD4+除去群は対象群と同じ様に腫瘍を拒絶しており、CD4+ T細胞は Panc02-MUC1 の皮下における拒絶に必ずしも必要でないと考えられた。しかし、CD4+、CD8+ 両方を除去した群は CD8+のみを除去した群より生存曲線に有意な悪化を認めており ($p=0.0009$)、CD4+細胞も何らかの働きをしていると考えられた。

Table 1

マウスからの腫瘍組織に対する免疫組織染色

Panc02-MUC1にて脾内(n=12)または皮下(n=7)注入されたマウスから得られた腫瘍組織におけるMUC1の発現を免疫組織化学的に検討した。

a. 脾内注入モデルからの腫瘍

(Fig. 5bに示されている実験に使用されたマウスより)

注入細胞数	(-) ^a	heterogeneously (+) ^b	(+) ^c
1x10 ⁶			1
1x10 ⁵			4
1x10 ⁴		2	5
	0/12 (0%)	2/12 (17%)	10/12 (83%)

b. 皮下注入モデルからの腫瘍

(Fig. 6bに示されている実験に使用されたマウスより)

注入細胞数	(-) ^a	heterogeneously (+) ^b	(+) ^c
3x10 ⁶	1		
1x10 ⁷	2		
3x10 ⁷	4		
	7/7(100%)	0/7(0%)	0/7(0%)

^a(-): 全細胞数の10%以下が陽性

^bHeterogeneously (+): 全細胞数の10%から90%が陽性

^c(+): 全細胞数の90%以上が陽性

文献

- 1 Lan, M.S., Batra, S.K., Qi, W.-N., Metzgar, R.S., and Hollingsworth, M.A. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J. Biol. Chem.*, 265: 15294-15299, 1990.
- 2 Zotter, S., Hageman, P.C., Lossnitzer, A., Mooi, W.J., and Hilgers, J. Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Rev.*, 12: 55-101, 1988.
- 3 Devine, P.L., Layton, G.T., Clark, B.A., Birrell, G.W., Ward, B.G., Xing, P.X., and McKenzie, F.C. Production of MUC1 and MUC1 mucins by human tumor cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 178: 593-599, 1991.
- 4 Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J. and Boshell, M. A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int. J. Cancer*, 44: 691-696, 1989.
- 5 Gendler, S.J., Spicer, A.P., Lalani, E.N., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Boshell, M., and Taylor-Papadimitriou, J. Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144: S42-47, 1991.
- 6 Burchell, J., and Taylor-Papadimitriou, J. Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product. *Epith. Cell Biol.*, 2: 155-162, 1993.
- 7 Hollingsworth, M.A., Strawhecker, J.K., Caffrey, T.C., and Mack, D.R. Expression of MUC1, MUC2, MUC3, and MUC4 mucin mRNA in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, 57: 198-203, 1994.
- 8 Graham, R.A., Burchell, J.M., and Taylor-Papadimitriou, J. The polymorphic epithelial mucin: potential as an immunogen for a cancer vaccine. *Cancer Immunol. Immunother.*, 42: 71-80, 1996.
- 9 Barnd, D.L., Lan, M.S., Metzgar, R.S., and Finn, O.J. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7159-7164, 1989.
- 10 Jerome, K.R., Barnd, D.L., Bendt, K.M., Boyer, C.M., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I.F.C., Bast, R.C., Jr., and Finn, O.J. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.*, 51: 2908-2916, 1991.
- 11 Ioannides, C.G., Fisk, B., Jerome, K.R., Irimura, T., Wharton, J.T., and Finn, O.J. Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J. Immunol.*, 151: 3693-3703, 1993.
- 12 Imai, K., Hinoda, Y., and Takahashi, T. Mucin gene and clinical immunology. *Jpn. J. Clin. Immun.*, 17: 139-146, 1994.
- 13 Finn, O.J., Jerome, K.R., Henderson, R.A., Pecher, G., Domenech, N., Magarian-Blander, J., and Barratt-Boyes, S.M. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.*, 145: 61-89, 1995.
- 14 Rughetti, A., Turchi, V., Ghetti, C.A., Scambia, G., Panici, P.B., Roncucci, G., Mancuso, S., Frati, L., and Nuti, M. Human B-cell immune response to the polymorphic epithelial mucin. *Cancer Res.*, 53: 2457-2459, 1993.

- 15 Koreta, Y., Fontenot, J.D., Pecher, G., Metzgar, R.S., and Finn, O.J. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients. *Cancer Res.*, 54: 2856-2860, 1994.
- 16 Gourevitch, M.M., Mensdorff-Pouilly, S., Litvinov, S.V., Kenemans, P., Kamp, G.J., Verstraeten, A.A., and Hilgers, J. Polymorphic epithelial mucin(MUC1)-containing circulating immune complexes in carcinoma patients. *Br. J. Cancer*, 72: 934-938, 1995.
- 17 von Mensdorff-Pouilly, S., Gourevitch, M.M., Kenemans, P., Verstraeten, A.A., Litvinov, S.V., van Kamp, G.J., Meijer, S., Vermorken, J., and Hilgers, J. Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC1) in patients with benign and malignant breast tumors. *Euro. J. Cancer*, 32A: 1325-1331, 1996.
- 18 Houghton, A.N. Cancer antigens : Immune recognition of self and altered self. *J. Exp. Med.*, 180: 1-4, 1994.
- 19 Apostolopoulos, V., Pietersz, G.A., Xing, P.-X., Lees, C.J., Michael, M., Bishop, J., and McKenzie, I.F.C. The immunogenicity of MUC1 peptides and fusion protein. *Cancer Lett.*, 90: 21-26, 1995.
- 20 Taylor-Papadimitriou, J., Stewart, L., Burchell, J., and Beverley, P. The polymorphic epithelial mucin as a target for immunotherapy. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 690: 69-79, 1993.
- 21 Peat, N., Gendler, S.J., Lalani, E.N., Duhig, T., and Taylor-Papadimitriou, J. Tissue-specific expression of a human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mice. *Cancer Res.*, 52: 1954-60, 1992.
- 22 Corbett, T.H., Roberts, B.J., Leopold, W.R., Peckham, J.C., Wilkoff, L.J., Griswold, D.P., Jr., and Schabel, F.M., Jr. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res.*, 44: 717-726, 1984.
- 23 Burdick, M.D., Harris, A., Reid, C.J., Iwamura, T., and Hollingsworth, M.A. Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *J. Biol. Chem.*, 272: 24198-24202, 1997.
- 24 Malincola F.M., Drucker, B.J., Siao, D.Y., Hough, K.L., and Holder, W.D. The nude mouse as a model for the study of human pancreatic cancer. *J. Surg. Res.*, 47: 520-529, 1989.
- 25 Alisauskus, R., Wong, G.Y.C., and Gold, D.V. Initial studies of monoclonal antibody PAM4 targeting to xenografted orthotopic pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 55: 5743s-5748s, 1995.
- 26 Fidler, I.J. Critical factors in the biology of human cancer metastasis. *Cancer Res.*, 50: 6130-6138, 1990.
- 27 Stephenson, R.A., Dinney, C.P.N., Gohji, K., Ordenez, N.G., Killon, J.J., and Fidler, I.J. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J. Natl. Cancer I.*, 84: 951-957, 1992.
- 28 Vezzeridis, M.P., Doremus, C.M., Tibbetts, L.M., Tzanakakis, G., and Jackson, B.T. Invasion and metastasis following orthotopic transplantation of human pancreatic cancer in the nude mouse. *J. Surg. Oncol.*, 40: 261-265, 1989.
- 29 Fu, X., Guadagni, F., and Hoffman, R.M. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens.

P. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5645-5649, 1992.

30 Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Kitajima, M., and Hoffman, R.M. A novel "Patient-like" treatment model of human pancreatic cancer constructed using orthotopic transplantation of histologically intact human tumor tissue in nude mice. *Cancer Res.*, 53: 3070-3072, 1993.

31 An, Z., Wang, X., Kubota, T., Moossa, A.R., and Hoffman, R.M. A clinical nude mouse metastatic model for highly malignant human pancreatic cancer. *Anticancer Res.*, 16: 627-632, 1996.

32 Reyes, G., Villanueva, A., Garcia, C., Sancho, F.J., Puig, J., Lluís, F., and Capella, G. Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquired genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res.*, 56: 5713-5719, 1996.

33 Rowse, G.J., Tempero, R.M., VanLith, M.L., Hollingsworth, M.A., and Gendler, S.J. Tolerance and Immunity to MUC1 in a human MUC1 transgenic murine model. *Cancer Res.*, 58: 315-321, 1998.

34 Pardoll, D.M. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Ann. Rev. Immunol.*, 13: 399-415, 1995.

35 Tempero, R.M., VanLith, M.L., Morikane, K., Rowse, G.J., Gendler, S.J., and Hollingsworth, M.A. CD4⁺ lymphocytes provide MUC1-specific tumor immunity *in vivo* that is undetectable *in vitro* and is absent in MUC1 transgenic mice. *J. Immunol.*, in revision, 1998.

36 Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R.C. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3539-3543, 1993.

37 Jaffee, E.M., Lazenby, A., Meurer, J., Marshall, F., Hauda, K.M., Counts, C., Hurwitz, H., Simons, J.W., Levitsky, H.I., and Pardoll, D.M. Use of murine models of cytokine-secreting tumor vaccines to study feasibility and toxicity issues critical to designing clinical trials. *J. Immunother.*, 18: 1-9, 1995.

38 Simons, J.W., Jaffee, E.M., Weber, C.E., Levitsky, H.I., Nelson, W.G., Carducci, M.A., Lazenby, A.J., Cohen, L.K., Finn, C.C., Clift, S.M., Hauda, K.M., Beek, L.A., Leiferman, K.M., Owens, A.H., Jr., Piantadosi, S., Dranoff, G., Mulligan, R.C., Pardoll, D.M., and Marshall, F.F. Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by *ex vivo* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Res.*, 57: 1537-1546, 1997.

39 Clary, B.M., Coveney, E.C., Philip, R., Blazer, D.G., III, Morse, M., Gilboa, E., and Lyerly, H.K. Inhibition of established pancreatic cancers following specific active immunotherapy with interleukin-2 gene transduced tumor cells. *Cancer Gene Therapy*, 4: 97-104, 1997.

40 Apostolopoulos, V., Xing, P.-X., and McKenzie, I.F.C. Murine immune response to cells transfected with human MUC1: immunization with cellular and synthetic antigens. *Cancer Res.*, 54: 5186-5193, 1994.

