

【退任記念講義】

niche を求めて

——Na, K-ATPase から癌特異免疫療法へ——

戸 田 剛 太 郎

東京慈恵会医科大学内科学講座消化器・肝臓内科

I. は じ め に

慈恵医大に来て13年、本年3月をもって、定年退任を迎える。私の40年間の医師としての生活の約1/3を慈恵医大で過ごしたことになる。慈恵医大を定年退任した後も医師としての生活が続ける予定であるが、今までのような医学研究者としての生活は難しくなるように思う。そこで、私のこれまでの生活を研究面から振り返ってみた。タイトルの「niche を求めて: Na, K-ATPase から癌特異免疫療法へ」のNicheとは自分のやりたいことを快適に、幸せな気持ちで行うことができる場所という意味である。

II. Na, K-ATPase

私の研究生活はモルモット腎皮質のNa, K-ATPaseの研究から始まった。理由は大学院に進学した際、東京大学の栄養学教室に派遣されたが、栄養学教室の当時の水上茂樹助教授の指示によるものである。東京大学第1内科の吉利和教授から与えられたテーマは「腎尿細管における蛋白の再吸収」であるが、どうアプローチするか難しく、Na, K-ATPaseの研究は当面の研究テーマとして与えられたものである。しかし、この研究が面白く、結局7年間、没頭することになった。

動物の細胞膜にはATP分解で放出されるエネルギーを利用して、Naを細胞内から排出し、Kを取り込む働きを持っているが、これを行っているのが、Na, K-ATPaseである(図1)。Na, K-ATPaseはNa, K, Mgの存在下でATPを分解するが、私が研究を始めた当時、Na, K-ATPaseのATP分解に伴う、Na, K-ATPaseのコンフォメーションの変化がNa, Kのvectorial move-

mentと密接に関連し、反応中間体として高エネルギーリン酸化酵素の存在が想定されていた。

私はNa, K-ATPaseがKイオンおよびMgイオンの存在下でBeCl₂によって阻害され、一方、Naは阻害を除くことを見出し、この仕事で学位を取得致した。私が明らかにしたのは、Kを結合したconformationが存在することである(図2)。米国のVanderbilt大学に留学した後も同じ研究を進め、Kの存在下Na, K-ATPaseは無機燐でリン酸化されること、また、高濃度のNaの存在下では無機燐とADPからATPが生成されることを見出した。生理的な条件下ではNa, K-ATPaseによるATP分解に伴い、Naが排出され、Kが細胞内に取り込まれるが、私が明らかにしたのは、逆反応が起こり得るということであり、NaがNa, K-ATPaseを介して細胞内に入り、Kが排出された場合、ATPが生成される可能性があるということである。こうして、Na-K ATPaseの研究に埋没していたが、臨床面で今までやってきたことを生かす領域はどこかということも考え、自分の専門領域を腎臓から肝臓に変更した。肝疾患を専門とすることにして、最初にやった仕事は胆汁うっ滞の発症機序に関する研究である。

III. 胆汁うっ滞-肝細胞表面における機能単位の極性分布

胆汁うっ滞とは胆汁の生成、あるいは胆汁の流れが滞った状態である。胆汁は毛細胆管腔で生成され、肝内、肝外胆管を流れて十二指腸腔に達する(図3)。胆汁うっ滞機序の解明には胆汁生成機序の解明が必要であると考え、この毛細胆管腔に注目した。毛細胆管腔を形成しているのは肝細胞膜の一部であり、毛細胆管膜と呼ばれ、界面活性

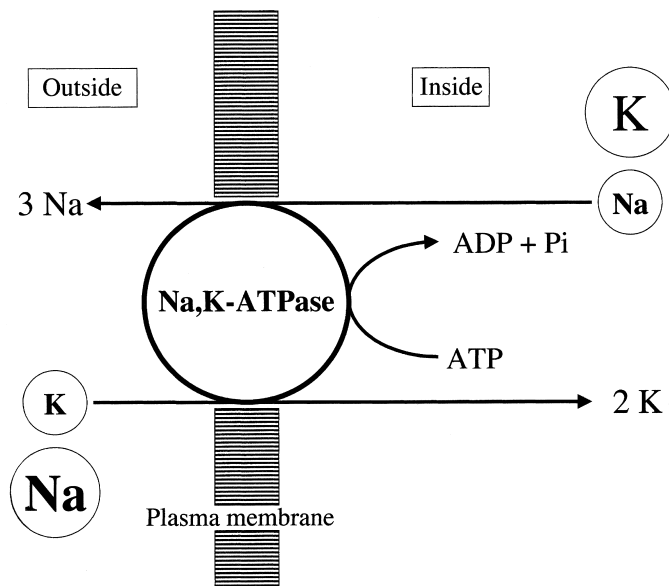


図 1.

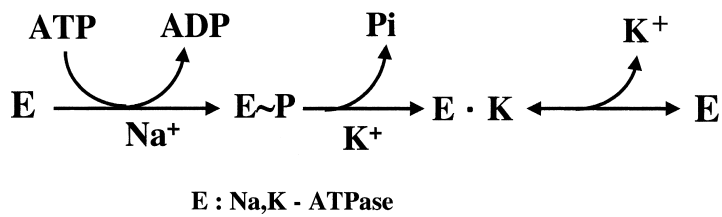


図 2.

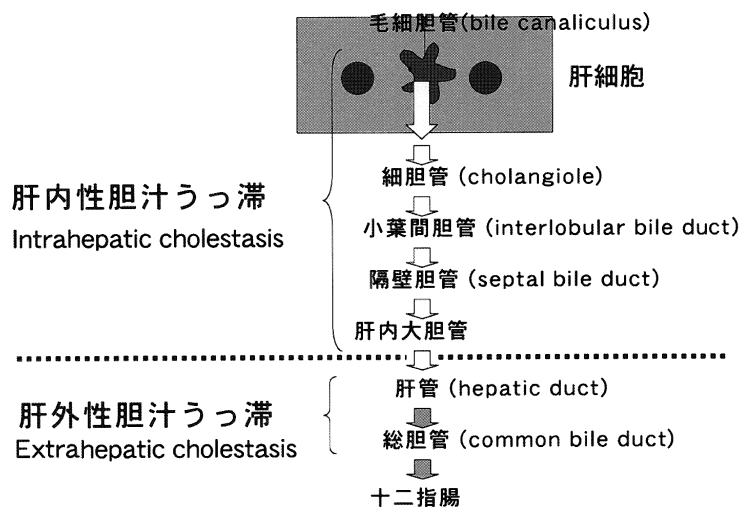


図 3.

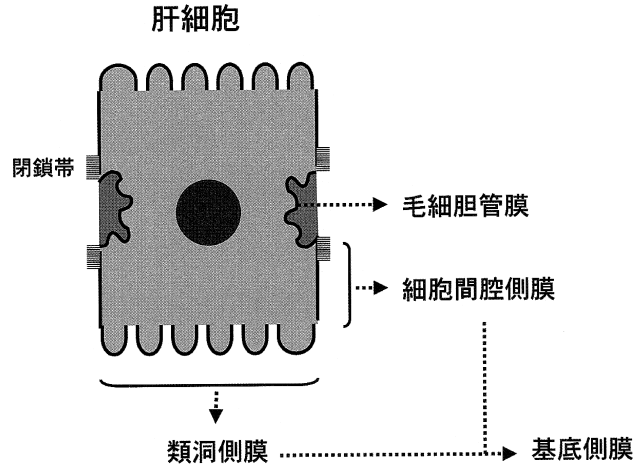


図 4.

作用の強い胆汁に接しているという意味では、他の膜領域とは構造上区別されるはずである (図 4)。そこで、毛細胆管膜とその他の領域とを分離分画することを試みた。毛細胆管腔の指標としてはアルカリホスファターゼ、その他の膜領域の指標としてはグルカゴン感受性アデニレートサイクラーゼを用いた。肝細胞膜から蔗糖密度勾配遠沈で得られた低比重分画ではアルカリホスファターゼ比活性は高く、グルカゴン感受性アデニレートサイクラーゼ比活性は高比重分画と比較して低いことから、毛細胆管膜は低比重分画に回収されたと考えられる。この仕事は肝細胞膜の低比重分画に毛細胆管膜が回収されることを示した最初の報告である。問題は Na-K ATPase の specific activity がこの分画に高いことであり、これが後で議論を呼ぶことになる。総胆管結紮による肝外性胆汁うっ滞では低比重膜分画の Mg-ATPase 活性が選択的に低下し (図 5)、このことも低比重膜分画が毛細胆管膜由来であることを示している。

IV. Gianotti 病

松山市およびその近郊に原因不明の小児の皮膚疾患が多発した。これが、infantile papular acrodermatitis すなわち Gianotti 病であり、わが国ではきわめてまれな HBV サブタイプ ayw 株によるものであることを小児科医石丸啓郎とともに明らかにした。松山市周辺の HBV キャリアー

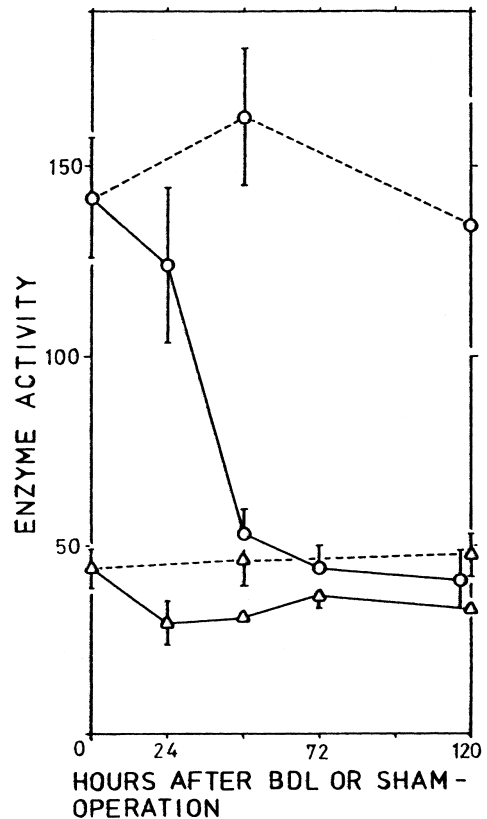


図 5. 胆管結紮 (bile duct ligation, BDL) の肝細胞膜 Mg-ATPase に及ぼす影響⁷⁾.

Enzyme activity: Pi/hr per mg protein

○: 低比重膜分画

△: 高比重膜分画

破線: 偽手術ラット

実線: 胆管結紮ラット

における HBV サブタイプは, adr, adw がほとんどで, ayw は見られない。一方, 患者では ayw が 94% を占めており, ayw 株の感染と Gianotti 病とは密接な関連があると考えられる。これは HBV サブタイプと臨床形態との関連を示す最初の実例である。Gianotti 病患者の家族で母親または父親 13 例に急性 B 型肝炎の発症が見られたが, いずれも HBV subtype は ayw であった。小児と異なり全例に黄疸がみられたが, 発疹がみられたのは 13 例中 7 例であり, 年齢も HBV 感染の clinical manifestation と密接に関連していると考えられる。

V. 自己免疫性肝炎

当時の東大第一内科教授であった織田敏次教授の勧めもあり, 自己免疫性肝炎の研究をすることになり, これが結局, 癌免疫療法とともに私のライフワークとなった。当時の自己免疫性肝炎における研究の焦点は肝細胞膜抗体であった。そこで, 肝細胞膜抗体に焦点をあてた研究を開始した。当時, 肝細胞膜抗体測定法には組織切片を用いた免疫蛍光法, 分離家兎肝細胞, Meyer zum Büschenfelde のいわゆる LSP を抗原として用いる方法などがあった。

私は分離精製家兎肝細胞膜を用いる方法を開発し, 肝細胞膜抗体が自己免疫性肝炎に特異的に出現し, 抗体活性は肝炎の活動性と密接に関連して

いることを明らかにした (図 6)。肝細胞膜抗体の標的抗原の 1 つは asialoglycoprotein receptor と考えられ, Lohse らの報告を追試したが, 自己免疫性肝炎の特異性は高く, また, 肝炎の活動性と密接に関連している (図 7)。

しかし, 自己免疫性肝炎における肝細胞障害に関わっているのは抗体産生で代表される Th2 免疫応答ではなく, Th1 免疫反応であった。末梢血単核球によるサイトカイン産生パターンをみると肝障害の改善すなわち ALT の低下は, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ をはじめとする Th1 サイトカインの産生の減少, Th2 サイトカインである IL-10 産生増加と連動していた (未発表データ)。すなわち, Th1 dominance から Th2 dominance への免疫反応の推移が病態の改善と couple しており, 肝細胞障害には Th1 応答すなわち細胞性免疫が関わっていると考えられる。

以上のデータを統合的に解釈するのに最適の仮説は自己免疫性肝炎における肝細胞死には antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity すなわち ADCC が関わっていると考えられる。しかし, 実際に肝組織に浸潤している単核球は T 細胞であり, 肝細胞障害部位には CD8^+ 細胞の浸潤がみられ, 細胞障害性 T 細胞が肝細胞障害に関わっている可能性が高い。自己免疫性肝炎に関連して肝細胞膜抗体以外にカルモデュリン抗体, インターフェロン抗体, Super oxide dismu-

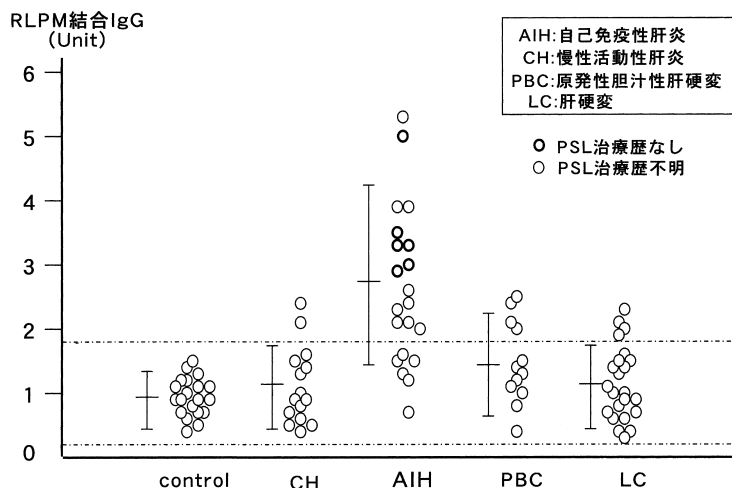


図 6. 各種肝疾患における抗家兎肝細胞膜 (rabbit liver plasma membrane, RLPM) 抗体⁹⁾。

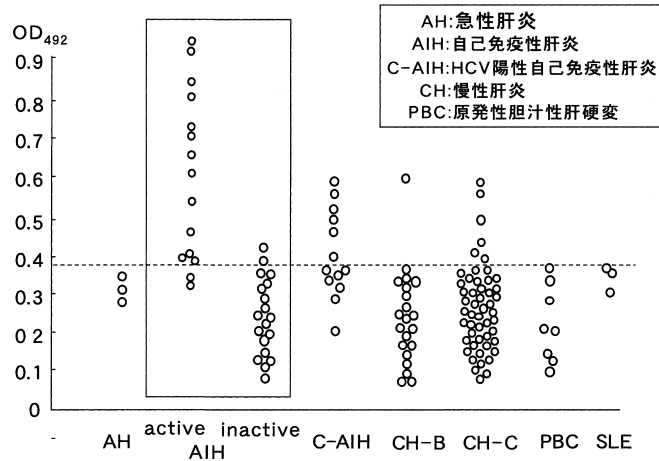


図7. 各種肝疾患における抗アシアロ糖蛋白レセプター (HepG2細胞由来) 抗体 (ELISA法) (相澤良夫ら).

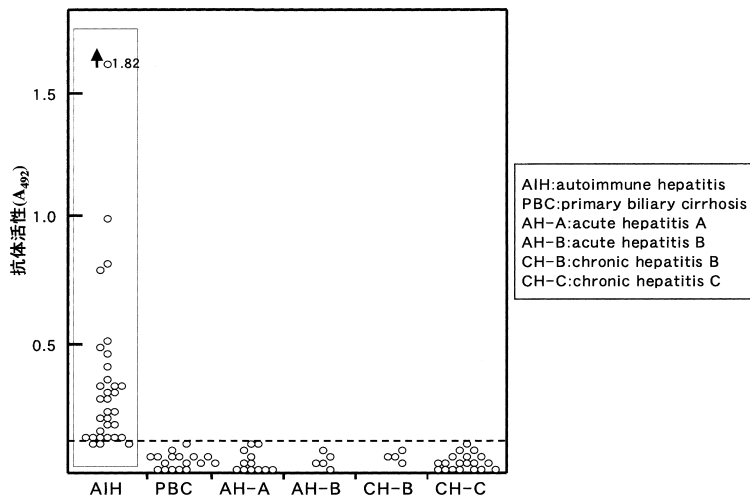


図8. 肝疾患における抗スルファチド抗体¹³⁾.

tase抗体などを見出し、一時、autoantibody hunter といわれた。

肝細胞膜抗体の標的抗原を同定しようと研究を進めている間、sulfatideと反応する抗体が自己免疫性肝炎で高率に出現することを見出した(図8)。スルファチド抗体は自己免疫性肝炎で特徴づける抗体であり、International autoimmune Hepatitis groupのDiagnostic criteriaのadditional markerの一つとなっている。興味深いことに、このスルファチド抗体はヘパリンと反応した(図9)。ヘパリンは、内皮細胞表面に存在することが知られており、内皮細胞抗体の出現を予測

させるものである。そこで、自己免疫性肝炎患者について、抗類洞壁内皮細胞抗体を検索した。自己免疫性肝炎患者では97%が類洞壁内皮細胞と反応する抗体が陽性であるが、B型、C型慢性肝炎では陽性率は10%を超えていない(図10)。この類洞内皮細胞抗体は類洞内皮細胞に対して障害を与えた。自己免疫性肝炎における肝細胞障害の発現には内皮細胞抗体による内皮細胞障害、それに続発する微小循環障害も関わっている可能性もある。とくに急性発症型の自己免疫性肝炎では小葉中心性壊死が主病変のことがあり、このような病変成立には内皮細胞抗体が関わっていると考えら

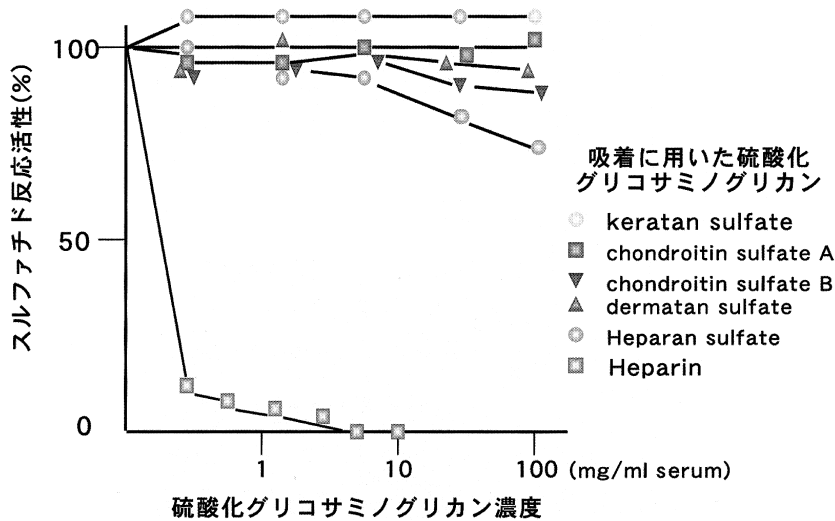


図9. スルファチアドと硫酸化グリコサミノグリカンとの交叉反応性⁹⁾.

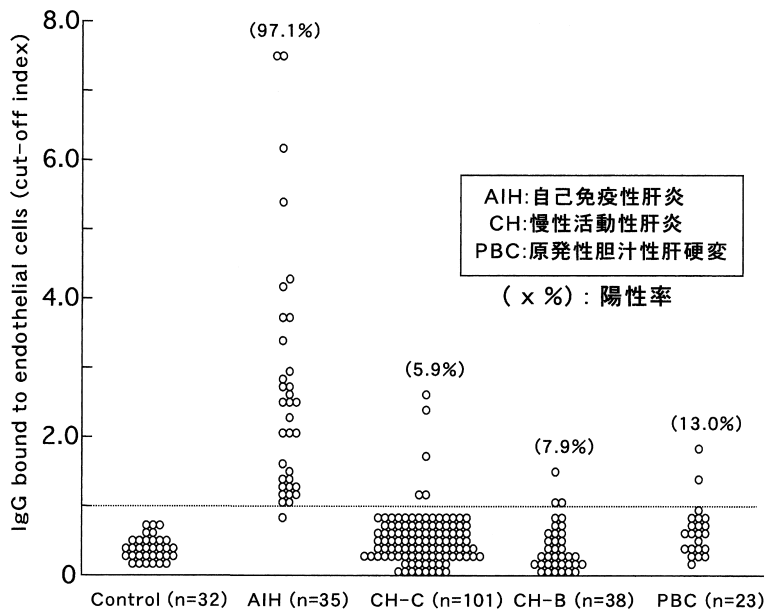


図10. 各種肝疾患におけるラット類洞壁内皮細胞抗体¹⁵⁾.

れる。

VI. 癌特異免疫療法

この自己免疫性肝炎の研究と並行して、癌に対する免疫療法の基礎的検討を行った。癌細胞は様々な手段を使って、生体の免疫学的監視機構から逃れており、いかにして強力な癌免疫を誘導するかが大きな課題である。1997年、当時Dana-

Farber Cancer Institute にいた Gong は樹状細胞と癌細胞を polyethyleneglycol 処理により作成した融合細胞を接種することにより強力な癌免疫を誘導できることを報告した。癌抗原の存在は確認されているが、多くの癌では同定されていないのが実情であり、この融合細胞で免疫する方法は癌抗原の同定、分離も必要ないという意味で広い臨床応用の可能性がある。樹状細胞は、MHC

class 1, class 2 分子, costimulatory molecules (共刺激分子)を持ち,ある特定の抗原で T リンパ球を priming する能力を持っているが,癌抗原産生がなく, T リンパ球に癌抗原を提示することはできない.一方,癌細胞は癌抗原を産生することはできるが, T リンパ球に抗原を提示し, priming するための MHC class 2 分子 (MHC class 1 分子を持っている場合もあるが,持っていないこともある), costimulatory molecules を欠いている.しかし,両者が融合すると,癌抗原提示能を持ち, T リンパ球を priming する能力を持った,新しい professional antigen presenting cell が生成する. Gong らはこの融合細胞を接種することにより,癌免疫を誘導することを示した.従来,融合細胞接種による癌免疫誘導の研究は移植癌をもちいて行われてきた.しかし,われわれが日常診療において遭遇する癌はすべて自然発症癌であり,融合細胞接種による癌免疫誘導の効果は自然発症癌について検討されるべきであると私達は考えた.

家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis, FAP) は APC 遺伝子の異常のために大腸癌が 15 歳前後より発生し, 60 歳ではほぼ全

例が大腸癌に罹患する遺伝性大腸癌であるが, この FAP のモデルマウス APC1309 マウスを用いて融合細胞接種の発癌予防効果について検討した. APC1309 マウスの骨髄由来の樹状細胞と APC1309 マウス由来の大腸癌細胞株 tumor T cell とを PEG 処理により融合細胞を作製し, 2 回接種し, 初回接種後 4 週目に屠殺し, 大腸腫瘍数を算定した (図 11). また, 融合細胞接種後, IL-12 を腹腔内注射するグループも作成した. 樹状細胞は FITC 標識 anti CD80, tumor T cell は赤色蛍光色素で標識し, 融合細胞が産生されたかどうか蛍光顕微鏡下で検討すると, polyethylene glycol 処理により tumor T cell を取り込んだ樹状細胞が産生されていることが明らかとなった.

融合細胞接種マウスでは非接種マウスと比較して明らかに腫瘍数は少なく, IL-12 投与は更なる減少をもたらし, 注目すべきは融合細胞接種マウスでは腫瘍数は接種前と比較して増加せず, 融合細胞接種は腫瘍発生を抑制することが明らかとなった (図 12).

腫瘍発生に対し抑制的に働く effector は何であるかを明らかにするために, ^{51}Cr release assay 法を用いて, 接種マウス脾細胞が tumor T cell に

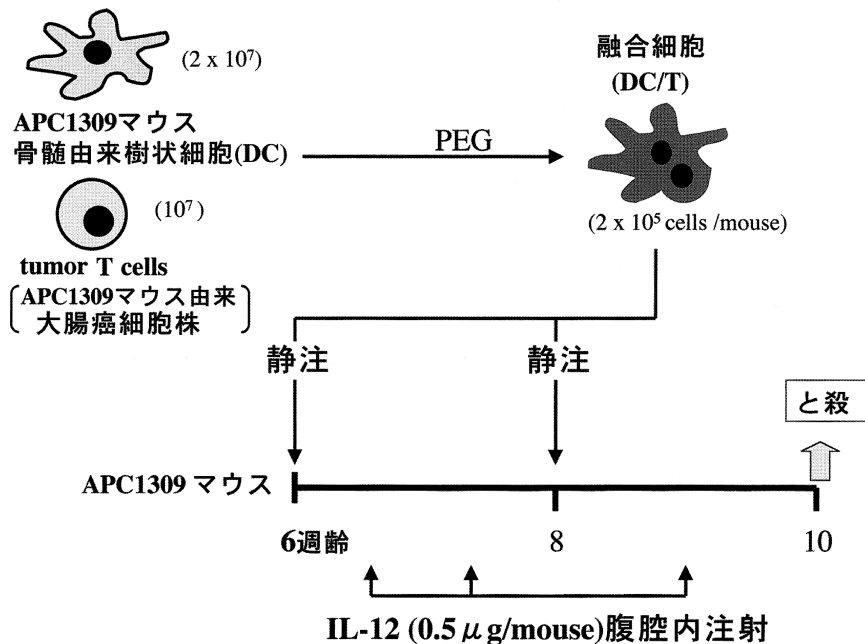


図 11. 樹状細胞と大腸癌細胞の融合細胞による APC1309 マウスにおける腫瘍発生の抑制.

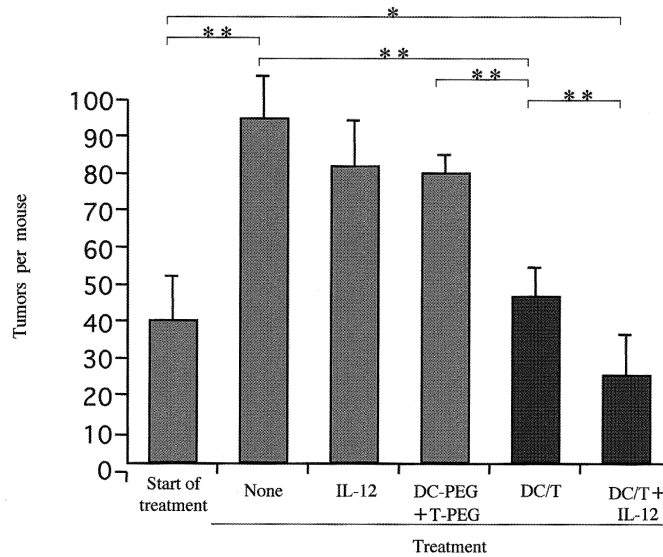


図 12. DC/T 接種による消化管腫瘍発生の抑制¹⁹⁾.

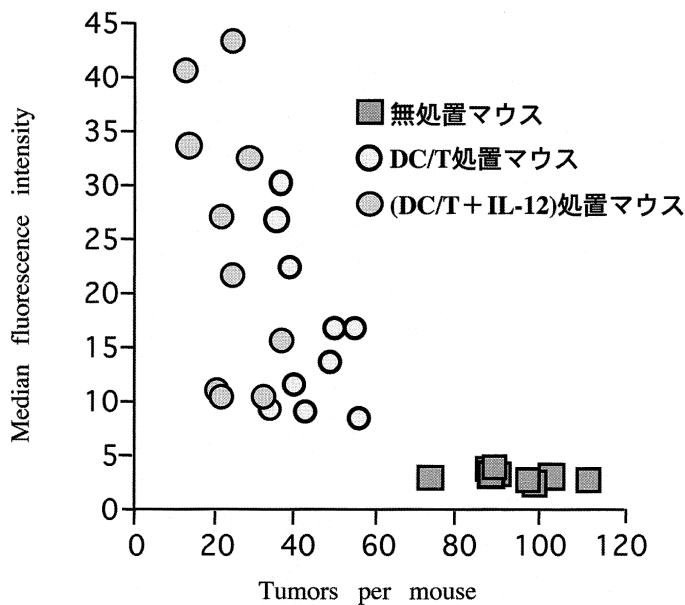


図 13. 抗 tumor T cell 抗体活性と大腸腫瘍数¹⁹⁾.

対し障害性かどうかを検討したが、障害性ではなかった。したがって、細胞性免疫の関与は否定的である。しかし、tumor T cell に対する抗体が産生されることが明らかとなった。抗体価と腫瘍数の間に有意の逆相関がみられ、抗体が腫瘍発生に抑制的に働いていると考えられる(図 13)。抗 CD4 抗体の腹腔内投与により、CD4 陽性細胞を枯渇さ

せると、腫瘍発生予防効果は消失した(図 14)。したがって、CD4 陽性細胞が腫瘍発生予防に重要な働きをしていると想定される。一方、抗 CD8 抗体の腹腔内投与により、CD8 陽性細胞を枯渇させても腫瘍発生予防効果は影響を受けない。したがって、CD8 陽性細胞の関与はないと考えられる。融合細胞接種により誘導された抗体は細胞障害性で

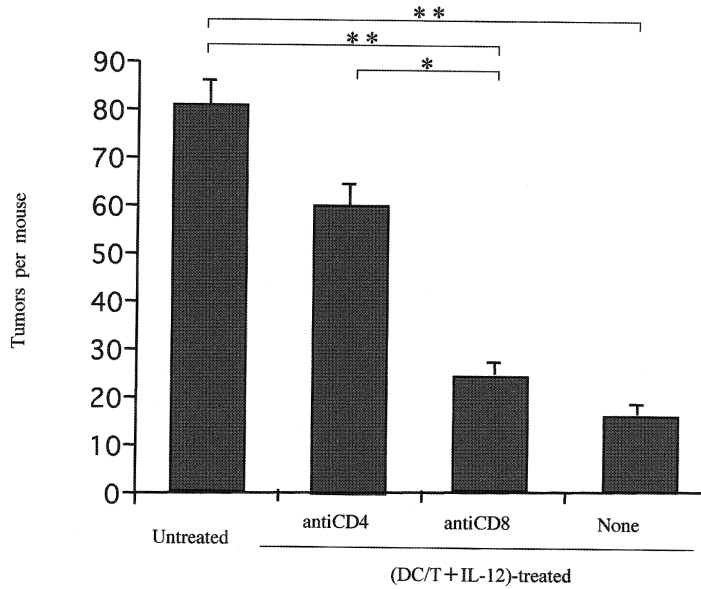


図 14. 腫瘍発生予防効果に対する $CD4^+$ T 細胞, $CD8^+$ T 細胞枯渇の影響¹⁹⁾.

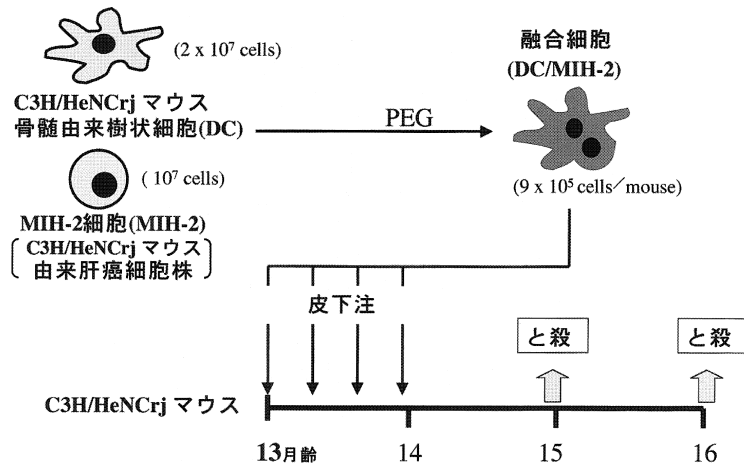


図 15. 樹状細胞と肝癌細胞の融合細胞による C3H/HeNcrj マウスにおける肝発癌抑制.

あり, 融合細胞と IL-12 投与マウスの大腸腫瘍組織の腫瘍細胞表面には IgG の結合がみられた。

以上, 融合細胞投与により, 大腸癌の自然発生を抑制することが可能であり, FAP のみならず, curative therapy 後の大腸癌再発抑制が将来の臨床応用として考えられる。

次に肝発癌予防に対する融合細胞接種の効果を検討した。肝癌自然発症マウス C3H/HeNcrj を用い, 骨髄由来樹状細胞と同系マウス由来の肝癌細胞 (MIH-2) の融合細胞を作製し, 皮下に接種

し, 肝腫瘍数を算定した (図 15)。Flow cytometer により得られた融合効率率は 54.7% であった。13 月齢で融合細胞を接種し, 16 月齢で肝発癌の有無を検討すると, 無処置マウスでは 9 匹中 7 匹に腫瘍がみられたが, 融合細胞接種マウスでは 9 匹中 1 匹に肝腫瘍がみられたに過ぎない (表 1)。樹状細胞, 肝癌細胞, 樹状細胞と肝癌細胞の単なる混合物の接種では肝発癌予防効果はなかった。肝発癌予防の effector は何であるかを明らかにするために, 融合細胞接種マウスの脾細胞を融合細胞と

ともに培養した後、 ^{51}Cr release assay 法を用いて脾細胞の癌細胞に対する障害性を検討した。その結果、脾細胞は肝癌細胞に対し障害性を示した。脾細胞サブセットのいずれが肝癌細胞に対して障害性を検討したが、 CD4^+ T 細胞、 CD8^+ T 細胞、NK 細胞いずれでもなかった。しかし、プレートに粘着した細胞、すなわちマクロファージが細胞障害作用を示すことが明らかとなった(図 16)。マクロファージが癌細胞に対し障害性を示すには、活性化されることが必要であるが、融合細胞との共培養の際、マクロファージは活性化され癌細胞に対し障害性を獲得すると考えられる。脾細胞と融合細胞との共培養の際に γ インターフェロン抗体を添加すると脾細胞の細胞障害活性は抑制されることから、細胞障害マクロファージ活性化に関

わっているのは γ インターフェロンであり、また、抗 CD4 抗体添加により CD4 陽性細胞を除去すると γ インターフェロン産生はみられず、 γ インターフェロンの産生に関わっているのは CD4 陽性 T 細胞であると考えられる。以上を総合して自然発症肝癌モデルマウスにおける融合細胞による肝発癌抑制は次のような機序で行われると考えられる。癌化した細胞が肝局在マクロファージ Kupffer 細胞により貪食され、癌抗原は MHC class 2 分子を介してすでにプライミングされている CD4 陽性 T 細胞に提示され、これを活性化し、活性化された CD4 陽性 T 細胞からは γ インターフェロンが産生分泌され、Kupffer 細胞を活性化し癌化した細胞を排除するように働くと考えられる。

自然発症大腸癌、肝癌モデルマウスにおいて、樹状細胞と癌細胞の融合細胞接種によって大腸癌発生、肝癌発生を抑制すること、また発癌抑制において CD4^+ T 細胞が critical な役割を演じていることを示した。しかし、誘導されたる癌免疫では既存の癌を regression させることはできなかった。既存の癌を regression させるような癌免疫の誘導が今後の課題である。

以上 40 年間の研究生活を振り返る機会を与えていただいた皆様に心からお礼申し上げる。この

表 1. 各種処置マウスにおける 16 月齢時の担癌率²⁰⁾

処 置	担癌率
None	7/ 9
DC/MIH-2 (9×10^5 cells/mouse)	1/ 9*
DCs (9×10^5 cells/mouse)	7/10
Irradiated MIH-2 (4.5×10^5 cells/mouse)	10/11
DCs (9×10^5 cells/mouse) + Irradiated MIH-2 (4.5×10^5 cells/mouse)	9/ 9

*: $p < 0.01$ vs the incidence in the other groups of mice.

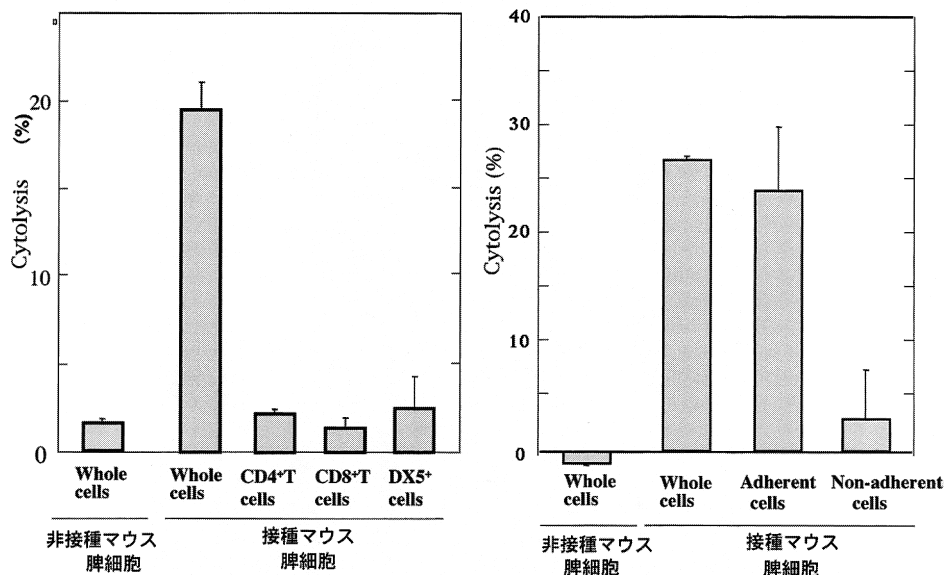


図 16. DC/MIH-2 接種マウス脾細胞サブセットの MIH-2 細胞に対する細胞障害性²⁰⁾。

40 年間を振り返ってみると Na, K-ATPase から はじまりさまざまなテーマに取り組んできた。慈 恵医大での 13 年間は臨床医学の研究者として相 応しいテーマを研究対象として選び、臨床家とし て、また医学研究者として楽しく過ごすことがで き、これもひとえに同僚教授、教室員のみなさま のお陰と心から御礼申し上げる。

文 献

- 1) Toda G, Hashimoto T, Asakura T, Minakami S. The inhibition of (Na^+-K^+) -activated ATPase by beryllium. *Biochim Biophys Acta* 1967; 135: 570-2.
- 2) Toda G. The effects of cations on the incibi-tion of sodium and potassium activated adenosinetriphosphatase by beryllium. *J Bio-chem* 1968; 64: 457.
- 3) Post RL, Taniguchi K, Toda G. Synthesis of adenosine triphosphate by Na^+ , K^+ -ATPase. *Ann NY Acad Sci* 1974; 242: 80-91.
- 4) Post RL, Toda G, Rogers FN. Phosphoryla-tion by inorganic phosphate of sodium plus potassium ion transport adenosine triphos-phatase: four reactive states. *J Biol Chem* 1975; 250: 691-701.
- 5) Toda G, Oka H, Oda T, Ikeda Y. Sub-fractionation of rat liver plasma membrane: uneven distribution of plasma membrane-bound enzymes on the liver cell surface. *Biochim Biophys Acta* 1975; 413: 52-64.
- 6) Ishimaru Y, Ishimaru H, Toda G, Bada K, Mayumi M. An epidemic of infantile papular acrodermatitis (Gianotti's disease) in Japan associated with hepatitis-B surface antigen subtype ayw. *Lancet* 1976; 1(7962): 707-12.
- 7) Toda G, Kako M, Oka H, Oda T, Ikeda Y. Uneven distribution of enzymatic alterations on the liver cell surface in the experimental extrahepatic cholestasis of rat. *Exp Mol Pathol* 1978; 28: 10-24.
- 8) Toda G, Ishimaru Y, Mayumi M, Oda T. Infantile papular acrodermatitis (Gianotti's disease) and intrafamilial occurrence of acute hepatitis B with jaundice: age dependency of clinical manifestations of hepatitis B virus infection. *J Infect Dis* 1978; 138: 211-6.
- 9) Toda G, Ikeda Y, Hashimoto N, Yamazaki M, Torii M, Oka H. Liver cell membrane anti-body detected by protein A and isolated rabbit liver plasma membrane in sera of patients with chronic liver diseases. *Clin Exp Immunol* 1983; 54: 661-70.
- 10) Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N, Aotsuka S, Yokohari R, Maruyama T, et al. Antical-modulin autoantibody in liver disease: a new antibody against a cytoskeleton-related pro-tein. *Hepatology* 1987; 7: 285-93.
- 11) Ikeda Y, Miyake K, Toda G, Yamada R, Yamanaka M, Oka H. Detection of anti-interferon- α_{2a} antibodies in chronic liver dis-ease. *J Gastroenterol Hepatol* 1989; 4: 411-8.
- 12) Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N, Kurokawa K. Antibody to superoxide dismutase, autoim-mune hepatitis, and antibody tests for hepatitis C virus. *Lancet* 1990; 335(8701): 1345-6.
- 13) Toda G, Ikeda Y, Kashiwagi M, Iwamori M, Oka H. Hepatocyte plasma membrane glycosphingolipid reactive with sera from patients with autoimmune chronic active hepa-titis: its identification an sulfatide. *Hepatology* 1990; 12(4 Pt1): 664-70.
- 14) Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N, Umeda N, Miyake K, Yamanaka M, et al. Naturally occurring anti-interferon- α_{2a} antibodies in patients with acute viral hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 80-4.
- 15) Han K-K, Hashimoto N, Ikeda Y, Shiratori Y, Kato H, Toda G, et al. Occurrence of anti-body against rat hepatic sinusoidal endothelial cells in sera of patients with autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1213-20.
- 16) Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, et al. Present sta-tus of autoimmune hepatitis in Japan: cor-relating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. *J Hepatol* 1997; 26: 1207-12.
- 17) Homma S, Toda G, Gong J, Kufe D, Ohno T. Preventive antitumor activity against hepatocellular carcinoma (HCC) induced by immunization with fusions of dendritic cells and HCC cells in mice. *J Gastroenterol* 2001; 36: 764-71.
- 18) Homma S, Matai K, Irie M, Ohno T, Kufe D, Toda G. Immunotherapy using fusions of autologous dendritic cells and tumor cells showed effective clinical response in a patient

- with advanced gastric carcinoma. *J Gastroenterol* 2003 ; 38 : 989-94.
- 19) Iinuma T, Homma S, Noda T, Kufe D, Ohno T, Toda G. Prevention of gastrointestinal tumors based on adenomatous polyposis coli gene mutation by dendritic cell vaccine. *J Clin Invest* 2004 ; 113 : 1307-17.
- 20) Irie M, Homma S, Komita H, Zeniya M, Ohno T, Toda G. Inhibition of spontaneous development of liver tumors by inoculation with dendritic cells loaded with hepatocellular carcinoma cells in C3H/HeNCrj mice. *Int J Cancer* 2004 ; 111 : 238-45.