

脳腫瘍免疫における頸部リンパ節の重要性 ラット 移植脳腫瘍モデルにおける検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9120

脳腫瘍免疫における頸部リンパ節の重要性

—ラット移植脳腫瘍モデルにおける検討—

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

岡 本 禎 一

種々の実験動物において脳間質液や脳脊髄液が直接頸部リンパ節に流入していることが明らかにされ、頸部リンパ節は免疫学的に中枢神経系と密接な関係を持つことが示唆されている。本研究においては、ラット移植脳腫瘍モデルを用いて、脳腫瘍移植後の脳、頸部リンパ節および体部リンパ組織における細胞性免疫反応を免疫組織化学およびフローサイトメトリーにより経時的に観察し、脳腫瘍免疫における頸部リンパ節の役割について検討した。ラットC6神経膠腫細胞をウィスター系ラットの大脳基底核部に定位脳的に移植し、ラット脳腫瘍移植モデルを作製した。脳腫瘍、頸部リンパ節および脾臓において、主要組織適合遺伝子複合体クラスII (major histocompatibility complex class II, MHC class II) は、脳腫瘍移植2週間後に最も強く発現した。頸部リンパ節のCD4陽性Tリンパ球数は脳腫瘍移植2週間後に著しく増加し、3週以降減少した。脳腫瘍浸潤CD4陽性Tリンパ球数の経時的動態は、頸部リンパ節のもの一致した。脾臓および腸管膜リンパ節においてはCD4陽性Tリンパ球数は腫瘍移植後も変化を認めなかった。CD8陽性Tリンパ球数は、脳腫瘍内と頸部リンパ節では移植2週以降に著明に増加した。脾臓および腸管膜リンパ節では変化を認めなかった。一方、腫瘍細胞を頭皮下に移植した対照群においては頸部リンパ節のCD4陽性Tリンパ球数が最も増加したのは移植4週間後であり脳腫瘍ラットのものより遅延した。さらに頸部リンパ節摘出後に腫瘍を脳内に移植した群においては、脳腫瘍内浸潤CD4陽性Tリンパ球数が最も増加したのは脳腫瘍移植3週間後であり頸部リンパ節非摘出群のものより遅延した。この場合、脾臓および腸管膜リンパ節においてCD4陽性Tリンパ球数の増加を認めた。以上の結果より、ラットの頸部リンパ節において選択的に、脳腫瘍関連抗原の提示および認識、さらにはCD4およびCD8陽性Tリンパ球の増殖が行なわれ、これらの効果細胞が脳腫瘍内に浸潤すると考えられる。このことより、ラットにおいて頸部リンパ節は中枢神経系の局所リンパ節としての役割を果たし、脳腫瘍免疫に深く関与していることが示唆された。

Key words brain tumor, regional lymph node, cervical lymph node, T lymphocyte subsets, MHC class II

悪性脳腫瘍に対して、今日まで様々の免疫療法が試みられてきたが、今のところ満足すべき結果は得られていない。その理由として、脳腫瘍抗原の免疫原性が弱く、十分な免疫を誘導できないこと、さらに担痛状態において宿主の免疫応答能力を抑制する機構が働くためと考えられている¹⁻³⁾。しかし、不成功の原因を究明する上で、もっと基本的で重要な問題は、脳の免疫情報はどのようにして免疫系に伝えられ、局所の免疫反応が導かれるのかという問いに対して明確な解答がまだ得られていないことである。

従来、脳組織は、全身の免疫監視機構から隔絶された免疫学的隔離部位 (immunologically privileged site) と考えられてきた⁴⁾。その根拠としては、1) 脳血管には血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) が存在し、免疫細胞の浸潤が制限されること、2) 脳実質内にはリンパ組織が存在せず、全身のリンパ組織との交通が不十分であること、3) 神経細胞や神経膠細胞を主とする正常脳細胞は主要組織適合遺伝子複合体 (major

histocompatibility complex, MHC) を発現していないことなどである。しかし、ウィルス性脳炎、多発性硬化症、脳腫瘍などの中枢神経疾患において病変部にMHCクラスIIの発現やTリンパ球の浸潤が認められることが報告されて以来、免疫系と中枢神経系は他の体部組織とは異なった独自の連絡機構で結ばれていると考えられ始めた⁵⁾。

近年、神経-免疫-内分泌調節 (neuro-immuno-endocrine system) の概念^{7,8)}が提唱され、生体の恒常性保持や免疫疾患の病態をこの方面から理解していく動向がある。すなわち全身のリンパ組織やホルモン産生器官に自律神経を主とする神経支配が存在し、局所の細胞レベルでの情報伝達に関わるだけでなく、相互のフィードバック調節機構も働いている。一方、ラットにおいて脳間質液や脳脊髄液が直接頸部リンパ節へ流入する解剖学的経路が最近明らかにされた⁹⁾。また、ラットの脳内あるいは脳脊髄液への異種蛋白注入実験にて頸部リンパ節における抗原特異的抗体産生細胞の出現が報告されている¹⁰⁾。これら

平成6年12月16日受付, 平成7年2月3日受理

Abbreviations: CTL, cytotoxic T lymphocyte; FITC, fluorescein isothiocyanate; MHC, major histocompatibility complex; TAA, tumor associated antigen; TGF, transforming growth factor; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte

の事実は、頸部リンパ節が中枢神経系の免疫反応に深く関与している可能性を示唆する¹¹⁾。

脳腫瘍では、腫瘍内へ浸潤している免疫細胞はTリンパ球やマクロファージが優位であり、脳腫瘍免疫においては細胞性免疫が主座を占めていると考えられる¹²⁾。またいくつかの実験腫瘍で、生体における腫瘍排除に重要なTリンパ球表面マーカーは、CD4 および CD8 であり両T細胞分画それぞれが腫瘍中和能を惹起、調節できることが明らかとなっている¹³⁾。

本研究では、脳腫瘍免疫において頸部リンパ節が特異的に脳の局所リンパ節としての役割を果たすかどうかを検討する目的で、ラット移植脳腫瘍モデルを用い、脳腫瘍およびリンパ組織におけるCD4 および CD8 陽性Tリンパ球の反応動態を免疫組織化学的手法およびフローサイトメトリー法により経時的に解析した。

材料および方法

I. 実験動物

実験動物は、8週齢、体重約250gのウィスター系雄性ラットを用いた。動物は飽水クロラル 0.03mg/gの腹腔内投与にて麻酔した。

II. 細胞

ラットC6神経膠腫細胞(がん研究振興財団, 細胞・遺伝子銀行, 東京)を15%ウマ血清, 2.5%牛胎児血清を含むF-10培地(GIBCO, New York, 米国)にて培養した。

III. C6神経膠腫細胞の移植

1. 腫瘍脳内移植群

ウィスター系雄性ラット16匹を使用した。麻酔したラットをラット用定位脳装置(Narishige, 東京)に固定し、頭皮正中切開後、矢状縫合より右側外側へ4mm, 冠状縫合より後方1mmの位置に歯科用ドリルを用いて穿頭した。穿頭部より26ゲージの針を脳表より4mmの深さまで垂直に刺入し、微量注入器(Hamilton, Reno, 米国)を用い、C6神経膠腫細胞 1×10^6 個(1 μ l)を大脳基底核部に2分間かけて注入した。C6神経膠腫細胞注入後、針を10分間脳内に留置したのち抜去した。穿頭部を骨蠟にて塞いだ後、皮膚縫合した。

2. 腫瘍頭皮皮下移植群

ウィスター系雄性ラット12匹を使用した。麻酔したラットの頭頂部皮下に、C6神経膠腫細胞 5×10^6 個(5 μ l)を26ゲージ注射針にて移植した。

3. 頸部リンパ節摘出後腫瘍脳内移植群

ウィスター系雄性ラット9匹を使用した。麻酔したラットに手術顕微鏡下に両側頸部リンパ節摘出手術を施行した。手術3

日後に、上記脳内移植群と同様の方法にてC6神経膠腫細胞 1×10^6 個(1 μ l)を移植した。

4. 培地注入対照群

ウィスター系雄性ラット12匹を使用した。F-10培地を上記脳内移植群と同様の方法にて1 μ l注入し、対照群とした。

IV. 免疫組織化学

C6神経膠腫細胞移植1, 2, 3および4週間後にラットを麻酔下に、0.1Mリン酸緩衝食塩水(pH 7.2)に4%パラフォルムアルデヒドを加えた固定液300mlを左心室より注入し、灌流固定を行った。ただちに脳、両側頸部リンパ節、脾臓、腸管膜リンパ節を摘出し、同固定液による48時間の浸漬固定を追加した。パラフィン包埋後、4 μ mの組織切片を作製し、HE染色と免疫組織化学染色を行なった。一次抗体は、ラットCD4陽性T細胞に対する抗体であるW3/25(Serotec, Oxford, 英国)、ラットCD8陽性T細胞に対する抗体であるOX-8(Serotec)、ラットMHCクラスIIに対する抗体であるOX-6(Serotec)およびラットのマクロファージ、マイクログリアに対する抗体であるED-1(Serotec)を使用した。W3/25およびOX-8は200倍希釈、OX-6およびED-1は1000倍希釈し、抗体と組織切片を30分間反応させた後、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(avidin-biotin-peroxidase complex, ABC)(Vector, Burlingame, 米国)と10分間反応させ、3,3'-ジアミノベンジジン(3,3'-diaminobenzidine, DAB)(Sigma, St. Louis, 米国)にて抗原の可視化を行い、光学顕微鏡にて観察した。脳では脳腫瘍内を、頸部リンパ節および腸管膜リンパ節では副皮質およびリンパ洞を、脾臓では白脾髄を観察し、400倍にて陽性細胞数を測定した。5視野を検鏡し、1視野あたりの陽性細胞数が1~10個を-, 11~30個を+, 31~50個を++, 51個以上を+++と評価した。

V. フローサイトメトリーによる解析

脳腫瘍内浸潤リンパ球の分布が不規則であったため、フローサイトメトリーによるリンパ球の解析を行なった。ウィスター系雄性ラット20匹を使用した。C6神経膠腫細胞移植後1, 2, 3および4週にラットを麻酔下に屠殺し、脳腫瘍を摘出した。腫瘍組織は、0.1%トリプシンおよび0.1%コラゲナーゼにて30分間処理した後、ステンレスメッシュを通過させパーコール液(Percoll)(Pharmacia, Uppsala, スウェーデン)を用いた比重分離法により脳腫瘍内浸潤リンパ球を分離、回収した。リンパ球をフルオレスセインイソチオシアネート(fluorescein isothiocyanate, FITC)で標識された抗ラットCD4抗体、W3/25-FITC(Serotec)にて染色した。フローサイトメーターはFACScan™(Becton Dickinson, Lincoln Park, 米国)を使用

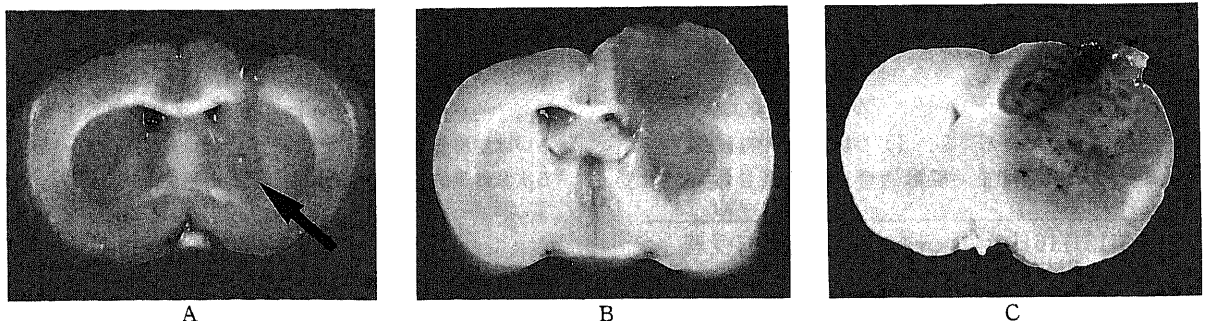


Fig. 1. Growth of C6 glioma in the brain 1 week (A, arrow), 2 weeks (B) and 4 weeks (C) after intracranial transplantation.

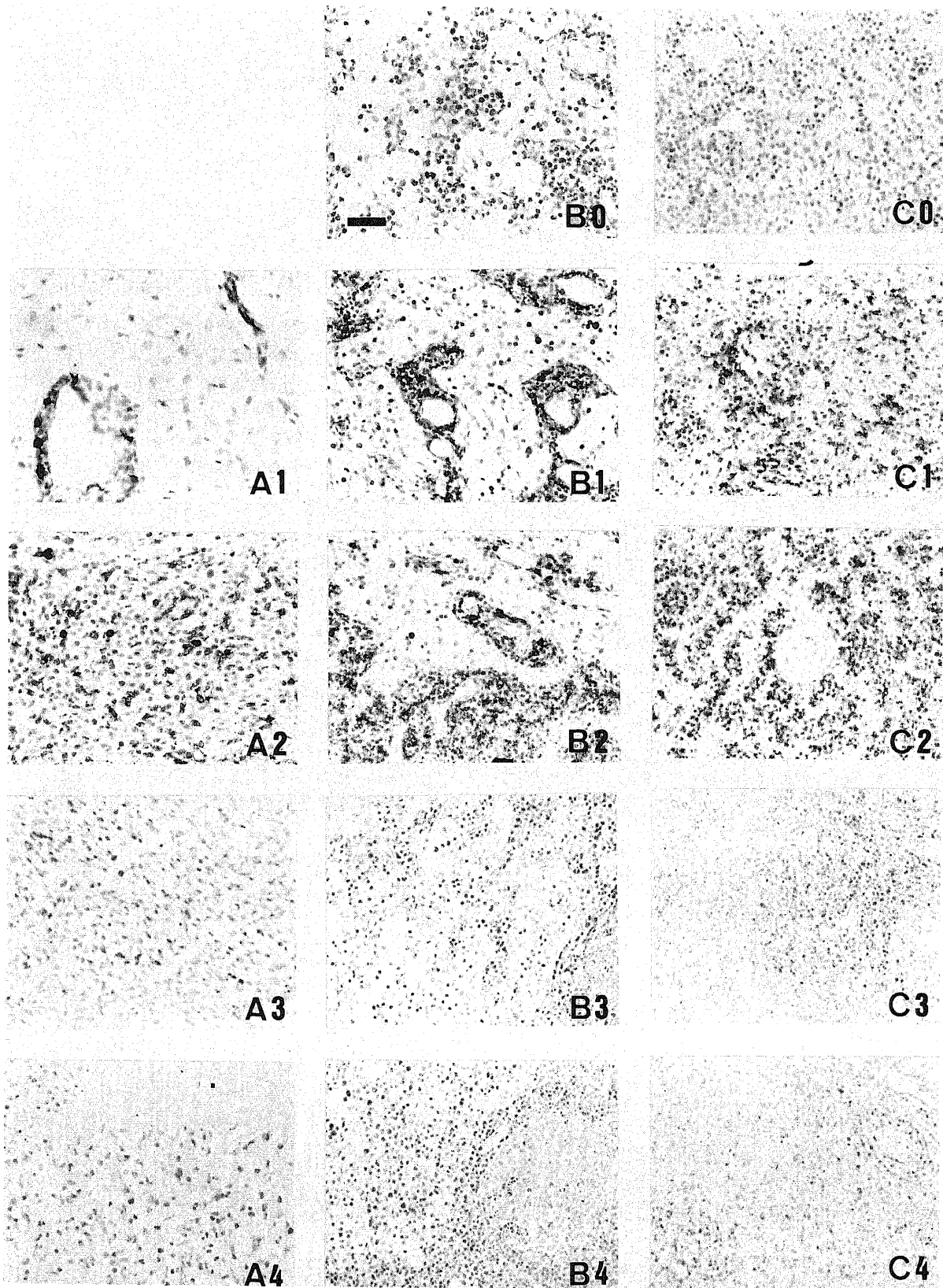


Fig. 2. Light micrographs of MHC class II (OX-6) immunostain in tumor (left column, A), cervical lymph node (center column, B) and spleen (right column, C). Upper line, normal control (B0, C0); 2nd line, 1 week (A1, B1, C1); 3rd line, 2 weeks (A2, B2, C2); 4th line, 3 weeks (A3, B3, C3); bottom line, 4 weeks (A4, B4, C4) after intracranial transplantation of C6 glioma. Scale bar indicates 20 μ m.

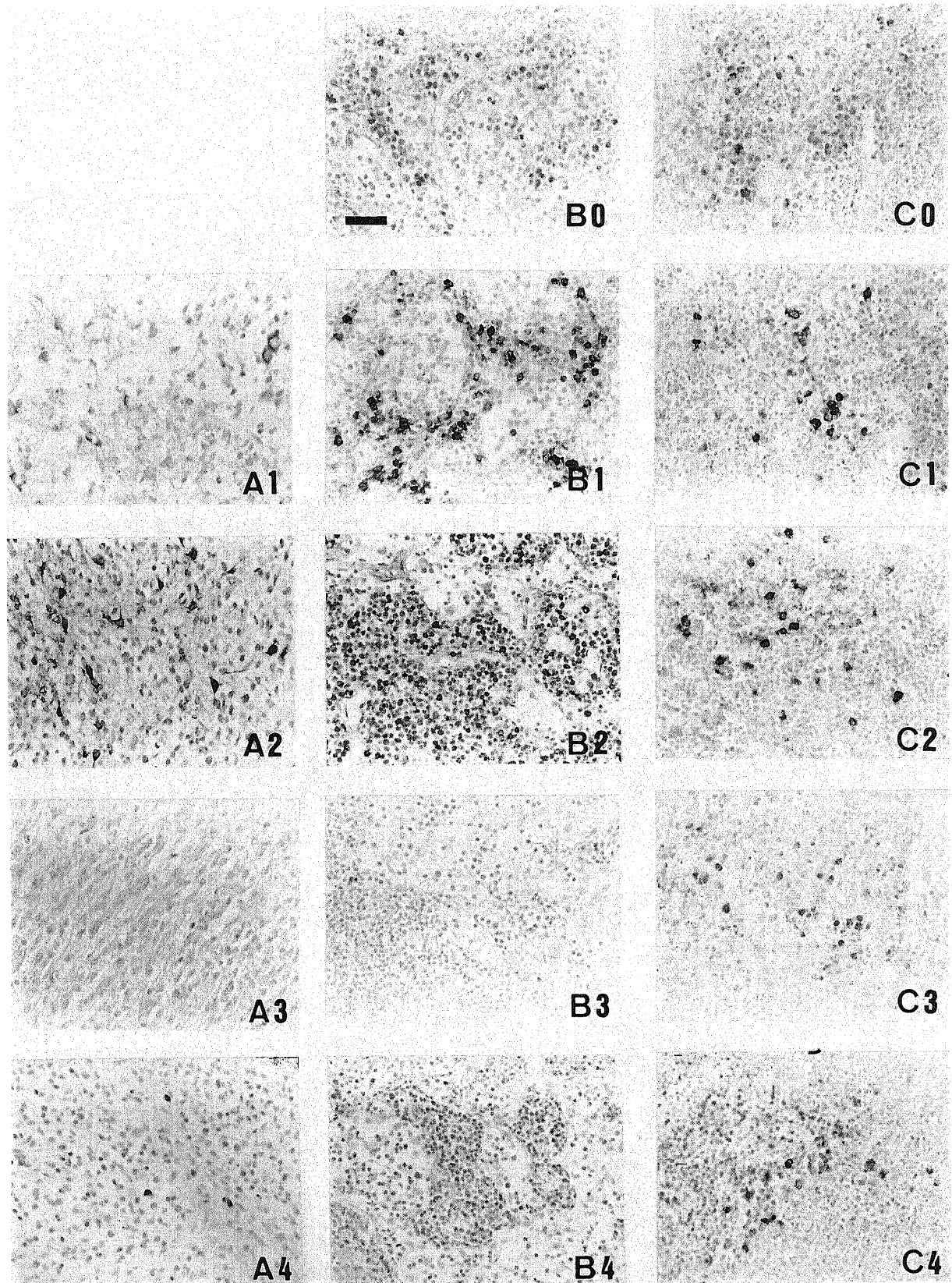


Fig. 3. Light micrographs of CD4 immunostain in tumor (left column, A), cervical lymph node (center column, B) and spleen (right column, C). Upper line, normal control (B0, C0); 2nd line, 1 week (A1, B1, C1); 3rd line, 2 weeks (A2, B2, C2); 4th line, 3 weeks (A3, B3, C3); bottom line, 4 weeks (A4, B4, C4) after intracranial transplantation of C6 glioma. Scale bar indicates 20 μ m.

し、細胞1万個中のCD4陽性細胞数を測定した。

成 績

1. C6神経膠腫の増大と組織学的所見

C6神経膠腫脳内移植ラットにおいては、脳腫瘍移植後、腫瘍は増大し(図1)、移植4週間後に約半数の動物が腫瘍死した。HE染色にてC6神経膠腫に、強い核異形性、多数の核分裂像、腫瘍中心部の壊死像、豊富な血管新生、浸潤性の増殖像が観察され、ヒト脳腫瘍における膠芽腫(glioblastoma)に極めて類似した組織学的所見を呈した。

II. MHCクラスII抗原の発現

光学顕微鏡的観察において、MHCクラスIIは、脳内では腫瘍内へ浸潤したマクロファージ、腫瘍周辺脳および脳梁部のマイクログリア、血管周囲腔の血管周囲細胞(perivascular cell)において発現していた。これらの細胞群は、すべてED-1免疫染色陽性であった。頸部リンパ節、脾臓および腸管膜リンパ節においては、マクロファージ、樹状細胞およびリンパ球の一部において発現していた。MHCクラスII陽性細胞数は脳腫瘍内、腫瘍周辺脳および検索した各リンパ組織において、移植2週間後まで増加し、3週以降に減少した(図2)。

III. CD4陽性Tリンパ球の光学顕微鏡的観察

1. 腫瘍脳内移植群

腫瘍内浸潤CD4陽性Tリンパ球数は、移植2週間後まで増加し、3週以降著明に減少した(図3, A)。頸部リンパ節においても、同様にCD4陽性Tリンパ球数は移植2週間後まで増加し、3週以降著明に減少した(図3, B)。脾臓および腸管膜リンパ節においては、CD4陽性Tリンパ球数は明らかな変化を

示さなかった(図3, C)。以上の各組織におけるCD4陽性Tリンパ球数の経時的变化を図4に示す。

2. 腫瘍頭皮下移植群

頸部リンパ節において、CD4陽性Tリンパ球数は移植2週間後までは増加せず、以後漸増し、4週間後に最大となった(図5, A, B)。脾臓および腸管膜リンパ節においては、CD4陽性Tリンパ球数は明らかな変化を示さなかった(図5, C, D)。以上の各組織におけるCD4陽性Tリンパ球数の経時的变化を図6に示す。

3. 頸部リンパ節摘出後腫瘍脳内移植群

腫瘍内浸潤CD4陽性Tリンパ球数は、移植3週間後に最も増加した(図7, A, B)。同様に脾臓および腸管膜リンパ節に

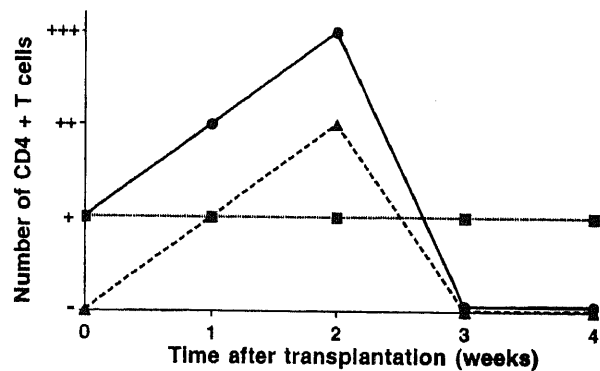


Fig. 4. Appearances of CD4+T lymphocytes after intracranial transplantation of C6 glioma. ▲, tumor; ●, cervical lymph node; ■, spleen or mesenteric lymph node.

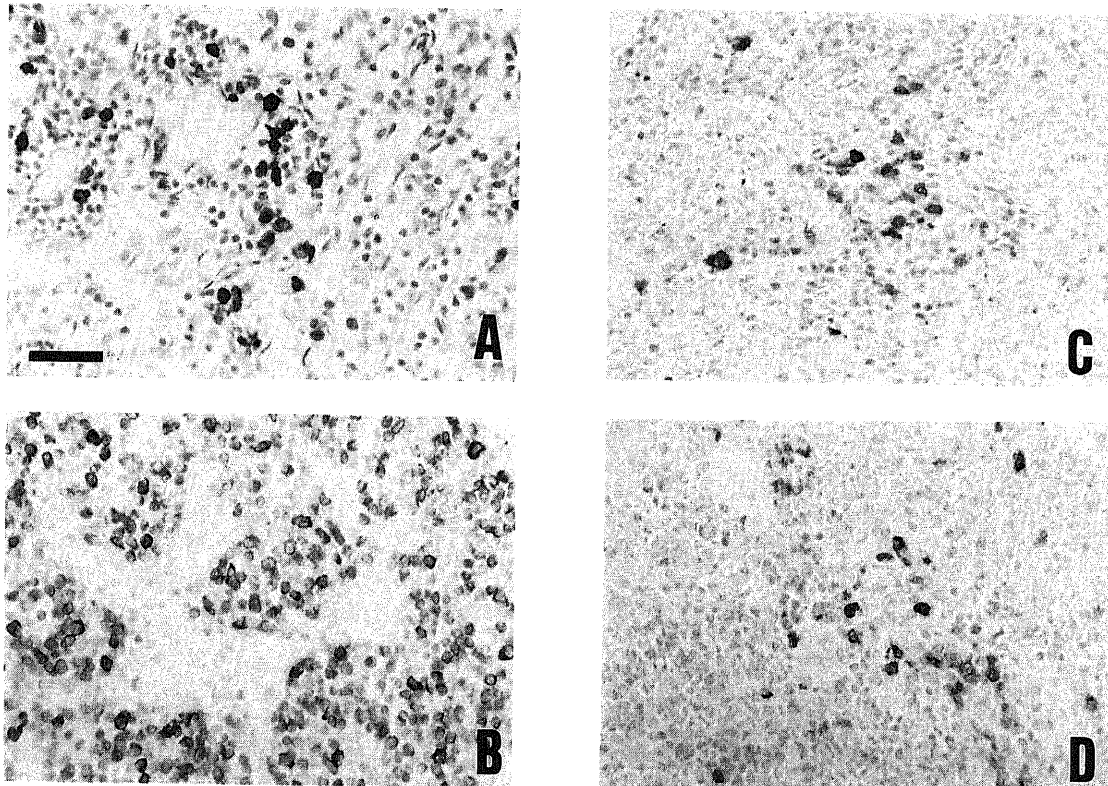


Fig. 5. Light micrographs of CD4 immunostain in cervical lymph node (A, B) and spleen (C, D) after extracranial transplantation of C6 glioma. Upper line, 2 weeks (A, C); bottom line, 4 weeks (B, D) after the transplantation. Scale bar indicates 20 μm.

においても CD4 陽性 T リンパ球数は、移植後 2 週間は変化を示さなかったが、3 週間後に増加した (図 7, C, D). 以上の各組織における CD4 陽性 T リンパ球数の経時的変化を図 8 に示す.

4. F-10 培地脳内注入対照群

F-10 培地のみを脳内に注入した対照群では、脳内注入部位には MHC クラス II の発現や CD4 陽性 T リンパ球の浸潤は認めなかった. また、検索した全てのリンパ組織においても CD4 陽性 T リンパ球の変化はみられなかった.

IV. CD8 陽性 T リンパ球の光学顕微鏡的観察

腫瘍を脳内に移植した場合、CD8 陽性 T リンパ球は、腫瘍移植 2 週間後より脳腫瘍内の特に壊死部周辺に認め、その数は腫瘍の増大にともない増加した. 頸部リンパ節では CD8 陽性 T リンパ球数は、移植 2 週間まで増加しそれ以降は変化しなかった. 脾臓および腸間膜リンパ節では CD8 陽性 T リンパ球数の変化を認めなかった.

V. CD4 陽性リンパ球のフローサイトメトリ的観察

腫瘍内浸潤 CD4 陽性リンパ球数は脳腫瘍移植 1, 2, 3, および 4 週間後において、細胞数 1 万個あたり、各々 281 ± 76.1 , 574 ± 154.4 , 336 ± 235.7 , 51 ± 33 (平均 \pm 標準偏差) 個であり腫瘍移植 2 週間後に最大となり以後減少した. Student の t 検定による有意差検定では、1 週と 2 週および 2 週と 4 週の間の腫瘍浸潤 CD4 陽性 T リンパ球数に有意差 ($p < 0.05$) を認めた (図 9).

考 察

本研究において、脳腫瘍ラットでは、脳と全身のリンパ組織で MHC クラス II の発現が誘導されたが、T 細胞分画の増加は、脳腫瘍内と頸部リンパ節にのみ認められ、その経時的動態は相関した. 腫瘍を頭部頭蓋外に移植した場合は、頸部リンパ節への免疫刺激は減少した. また頸部リンパ節摘出群では、脳腫瘍内への T リンパ球の浸潤は遅延した. これらの結果は、脳腫瘍免疫において頸部リンパ節が特異的に重要な役割を果たしていることを示唆する.

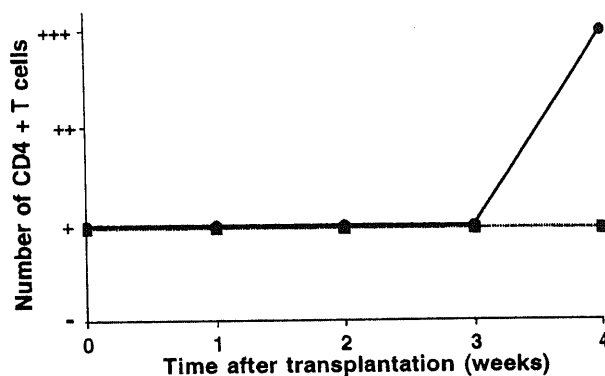


Fig. 6. Appearances of CD4+T lymphocytes after extracranial transplantation of C6 glioma. ●, cervical lymph node; ■, spleen or mesenteric lymph node.

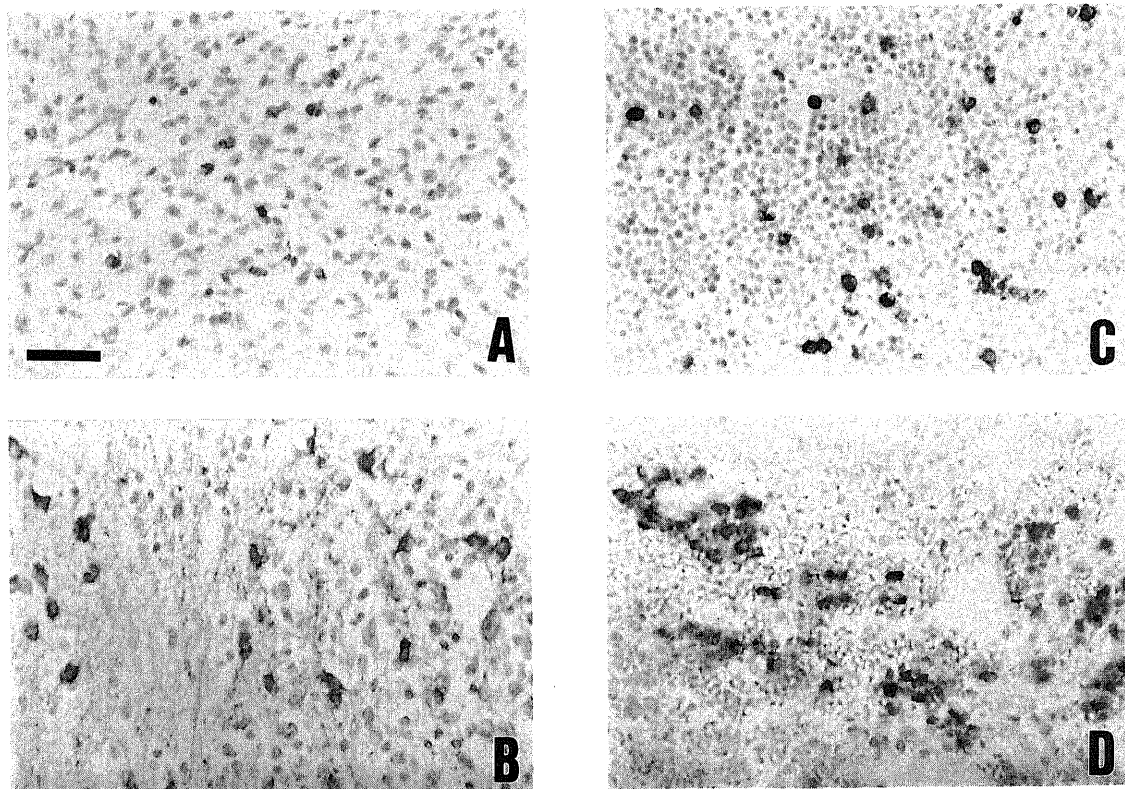


Fig. 7. Light micrographs of CD4 immunostain in tumor (A, B) and spleen (C, D) after intracranial transplantation of C6 glioma with cervical lymphadenectomy. Upper line, 2 weeks (A, C); bottom line, 3 weeks (B, D) after the transplantation. Scale bar indicates 20 μ m.

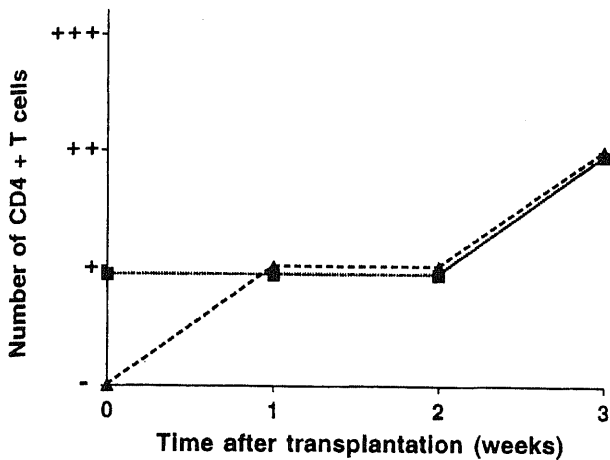


Fig. 8. Appearances of CD4+T lymphocytes after intracranial transplantation of C6 glioma with cervical lymphadenectomy. ▲, tumor; ■, spleen or mesenteric lymph node.

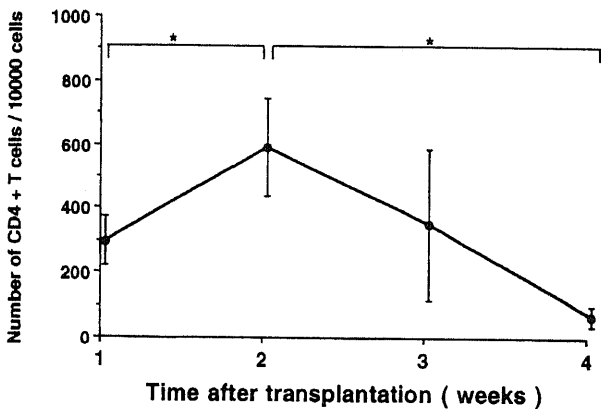


Fig. 9. Flow cytometric analysis of tumor infiltrating CD4+T lymphocytes. Each point represents the $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$, Student's t test.

所属リンパ節 (regional lymph node) はある器官またはある体の領域からのリンパを直接受け入れる最初のリンパ節であり¹⁴⁾, ある器官へ侵入した抗原に対してその抗原を最初に認識し, リンパ球やマクロファージが増殖する場である。すなわち, 所属リンパ節と定義するには以下の二点の条件が重要と考えられる。1) 抗原提示が行われる場である。2) 抗原提示に引きつづき効果細胞 (effector cell) の増殖が認められる。

抗原がマクロファージなどの抗原提示細胞に貪食され, 細胞内プロセッシングを経て MHC 分子と複合体を形成し, 抗原提示細胞の細胞膜表面に発現することを抗原提示という。本研究ではリンパ組織のみならず, 脳内のマイクログリア, 血管周囲細胞および腫瘍内浸潤マクロファージにおいて MHC クラス II の新たな発現を認めたが, これは膠芽腫, 多発性硬化症およびその動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (experimental allergic encephalomyelitis, EAE) において星状神経膠細胞, マイクログリア, 血管周囲細胞¹⁵⁾ および浸潤マクロファージ等が MHC クラス II を発現したという報告と一致する³⁾。マイクログリアおよび血管周囲細胞は胎生期に脳に移住した骨髄

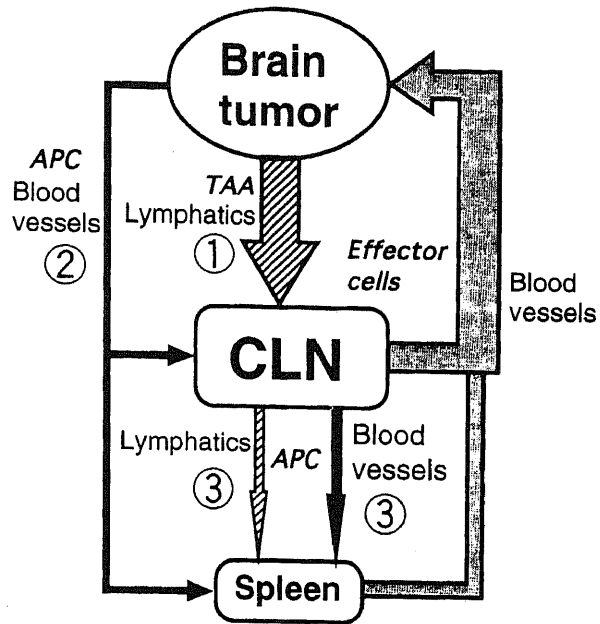


Fig. 10. Response of CLN as a TAA-draining regional lymph node in brain tumor immunity. ①, major pathway of TAA and possibly APC to CLN via cerebrospinal fluid drainage; ②, pathway of APC to CLN and the spleen via blood flow; ③, pathway of APC in CLN to the spleen via blood or lymphatic flow. APC, antigen presenting cell; CLN, cervical lymph node; TAA, tumor associated antigen.

由来の細胞で, 脳組織定住マクロファージと考えられており¹⁶⁾, 脳実質内において抗原提示細胞として働いている可能性が示唆される。頸部リンパ節, 脾臓および腸間膜リンパ節においては, マクロファージ, 樹状細胞, リンパ球の一部において MHC クラス II の発現を認めたが, リンパ組織ではこれらの細胞が抗原提示細胞として働くことはよく知られた事実である¹⁷⁾。

腫瘍化に伴って腫瘍に発現し, 同系宿主に対して何らかの免疫反応を引き起こし得る抗原を腫瘍関連抗原 (tumor associated antigen, TAA) と言い, ウィルスや化学的発癌物質を用いて誘導された腫瘍においてその存在が確認されている³⁾。F-10 培地のみを注入した対照群では, 脳および頸部リンパ節を含むどのリンパ組織においても MHC クラス II の発現や CD4 陽性 T リンパ球の増殖を認めなかったこと, また, 腫瘍を脳内に移植後 2 週までは MHC クラス II の発現は腫瘍の増大に依存したことは, 本研究モデルにおける MHC クラス II の発現は腫瘍関連抗原によるものであることを強く示唆する。自然発生腫瘍, とくにヒトの腫瘍細胞は, 腫瘍発生段階から自己の免疫系にさらされ, その監視機構をかいくぐって成長してきたものである。ラットの実験結果が必ずしもヒトの腫瘍にあてはまるとは限らない。しかし, ヒトの場合でも, 癌患者のリンパ球から自己腫瘍細胞に選択的な細胞障害活性を誘導できることが, 多くの研究で報告されている¹⁸⁾ という事実は, 研究手段として, 本実験系のような移植腫瘍を用いることの価値や重要性を裏付けるものと思われる。

本研究結果より, 脳内の抗原情報が全身の免疫監視機構へ伝達する経路については, つぎの三経路が考えられる (図10)。まず第一は脳脊髄液および脳間質液とともに抗原が頭蓋内から頸

部リンパ節へ直接流入する経路である。第二は抗原を捕捉したマクロファージ等の抗原提示細胞が血管周囲腔より血液脳関門の破綻部を通過し血中に入るか、または脳脊髄液がくも膜絨毛を介して静脈洞へ流入する吸収経路に沿って血行性にリンパ組織へ到達する経路である。頸部リンパ節摘出後に腫瘍を脳内に移植した群において、脾臓および腸管膜リンパ節での MHC クラス II の発現と CD4 陽性 T リンパ球の増殖がみられたことは、この血行性経路の存在を実証している。第三の経路は最初頸部リンパ節へ到達した抗原および抗原提示細胞がリンパ行性あるいは血行性に他のリンパ組織へ到達する経路である。本研究のラット移植脳腫瘍モデルで、頸部リンパ節、脾臓および腸管膜リンパ節において MHC クラス II の発現を認めたにもかかわらず、CD4 および CD8 陽性 T リンパ球数は、頸部リンパ節でのみ増加し、他の体部リンパ組織では変化しなかった。この理由として、頸部リンパ節が脳と直接の交通をもつ唯一のリンパ節である⁹⁾ためと考えられる。ラットにおいても膜下腔は、くも膜-硬膜境界部より始まって前頭蓋底の篩板を貫通する直接経路 (direct channel) によって鼻粘膜下組織リンパ管さらに頸部リンパ節へと解剖学的連絡を持つ。また、放射性同位元素で標識されたアルブミンを頭蓋内へ注入した動物実験において、脳脊髄液の14%から47%までもが直接頸部リンパ節に流入すると報告されている¹⁹⁾。以上の事実より頸部リンパ節へ直接流入する腫瘍抗原刺激は、各リンパ組織へ到達するものに比べ圧倒的に多いと考えられる。

最近、T リンパ球の抗原認識における補助分子の関与が注目されており、T リンパ球の抗原認識には抗原-MHC 複合体と T 細胞受容体の相互作用だけでは不十分な場合があることが明らかになっている。特に、生体内のそれまでに活性化されたことのない T 細胞を初めて活性化する場合 CD28/B7 分子の相互作用が重要であると考えられている²⁰⁾。本研究において、頸部リンパ節以外の全身のリンパ組織で、MHC クラス II の発現と CD4 陽性 T リンパ球の増殖が一致しなかったことは、他のリンパ組織ではこの種の補助分子の発現がなく、T 細胞の抗原認識が不十分であった可能性も考えられる。これら補助分子も含めた抗原提示細胞の抗原提示能について、脳腫瘍に特異的な抗原認識組織である頸部リンパ節における検討が今後必要であると思われる。

本研究では、CD4 および CD8 両 T 細胞分画を対象に解析を行なった。従来、CD4 陽性 T リンパ球はヘルパー T 細胞で MHC クラス II 拘束性であり、CD8 陽性 T リンパ球は細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) で MHC クラス I 拘束性と考えられてきた²⁰⁾。しかし最近の研究結果から、機能と表現型 (phenotype) と MHC 拘束性の関係は、当初考えられていたものよりはるかに複雑多彩であることが明らかとなっている²¹⁾。すなわち抗腫瘍免疫における細胞障害作用の中心的役割を担うのは MHC クラス I 拘束性 CD8 陽性 CTL であると考えられてきたが、CD4 陽性で MHC クラス I 拘束性 CTL が存在するとの報告²²⁾や、抗 CD8 抗体により CD8 陽性細胞を除去したマウスにおいて抗腫瘍活性を認めたとという報告がある¹⁹⁾。このことは、分化抗原である CD4 および CD8 で分類される T リンパ球分画は、腫瘍抗原の質や量あるいは免疫反応が誘導される諸条件により異なることを示唆する²²⁾。このため CD4 および CD8 両分画ともに腫瘍排除に関与しているものにとらえるのが妥当と思われる。

脳腫瘍内浸潤および頸部リンパ節内の CD4 陽性 T リンパ球数は移植 3 週以降に著明な減少を示した。本実験における脳腫瘍移植モデルでは、脳腫瘍移植 4 週間で約半数の動物が腫瘍死し、この CD4 陽性 T リンパ球の著明な減少は、脳腫瘍末期において免疫抑制状態にあることを示すと思われる。この機序として、CD4 陽性 T リンパ球数が腫瘍の増大に伴い減少していること、および脳腫瘍環境と直接の交通のない脾臓や腸管膜リンパ節では CD4 陽性リンパ球数に変化がなかったことより、脳腫瘍由来の局所性免疫抑制因子による CD4 陽性 T リンパ球の腫瘍組織への浸潤の抑制や、供給源である頸部リンパ節内 CD4 陽性 T リンパ球の枯渇による影響が考えられる。ベータ型トランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor-beta, TGF- β) は増殖因子の一つに分類されているが、多彩な生理活性を有し、多くの細胞に対して強力な抑制因子として作用する。ヒト胚芽腫において腫瘍細胞より TGF- β が分泌されていることが報告されている^{24,25)}。またラット実験脳腫瘍モデルにおいても、腫瘍の成長にともない TGF- β mRNA 量の増加が報告されている²⁶⁾。本研究に用いたモデルにおいても、腫瘍の増大に比例して TGF- β 陽性の腫瘍細胞数は増加している (preliminary data)。さらに TGF- β により CD4 陽性 T リンパ球活性が抑制されるという報告があり²⁷⁾、担癌末期に CD4 陽性 T リンパ球のインターロイキン 2 (IL2)⁹⁾ やガンマインターフェロン (IFN- γ) 産生量が減少すること (preliminary data) は、拮抗作用を持つ TGF- β による影響を示唆する。さらに、強力な抗腫瘍活性をもつ一酸化窒素 (nitric oxide, NO) のマクロファージによる産生分泌が、本研究に用いたモデルで担癌末期に減少すること (preliminary data) も、同様に TGF- β による抑制の結果と考えられる。一方、リンパ球が血液脳関門を透過し、脳内に浸潤するには脳血管内皮細胞上に細胞間接着分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 等の細胞接着分子の発現が必要であるが、TGF- β はこれに対しても抑制的に作用することが知られている。

腫瘍頭皮下移植群において頸部リンパ節の CD4 陽性細胞の増加が遅延してみられたが、これは腫瘍抗原が、ラット頭頸部軟部組織の主要局所リンパ組織である鼻咽頭リンパ組織²⁸⁾ 等を經由して二次的に頸部リンパ節に到達したためと思われる。ラットへの異種蛋白注入実験で、脳内注入の方が頭皮下注入に比べ頸部リンパ節での抗体産生量が高かったこと¹⁰⁾ は、この結果と同様に解釈できる。これらの事実は、頸部リンパ節が脳に対して高い特異性を持つことを示すものである。

脾臓は末梢リンパ組織として免疫応答の要となっており、特に生体外から進入した抗原が局所リンパ節を突破して血行に入り、全身に広がったとき、最後の砦として反応するといわれている²⁹⁾。頸部リンパ節摘出後に腫瘍を脳内に移植した群において、遅延しながらも脾臓での CD4 陽性リンパ球が増殖し、脳腫瘍内にも浸潤していたことは、脳腫瘍においても局所リンパ節における防御機構が破綻した場合、脾臓が代償的に脳腫瘍免疫に関与しうることを示している。ラット実験的脳脊髄炎において、頸部リンパ節摘出により、脳内浸潤 T リンパ球の減少による病変の縮小がみられたという報告³⁰⁾ も、脾臓などの他のリンパ組織は、頸部リンパ節の代りとして中枢神経病変に関与し得るが、その程度は頸部リンパ節には及ばないためと解釈でき、本研究の結果を支持するものと思われる。

さて、ヒトにおいても頸部リンパ節は脳の局所リンパ節とし

て機能しているであろうか。ヒトにおいて脳脊髄液および脳間質液はその大部分がくも膜顆粒より吸収されており、頭蓋内から頸部リンパ節へ至る脳脊髄液および脳間質液の流入経路は明らかになっていない。しかし、ヒトにおける脳間質液の吸収経路すなわち血管周囲腔の構造は解剖学的にラットのものと同様に類似しており²¹⁾²²⁾、またラット脳の血管周囲腔に沿って抗原提示細胞として分布する血管周囲細胞がヒト正常脳でも存在し²³⁾、膠芽腫において、MHCクラスⅡが血管周囲細胞に強く発現することが確認されている¹²⁾²⁴⁾。さらに水頭症の小児において、頸部リンパ節の腫脹を認めたことや、膠芽腫が頸部リンパ節に最初に転移したという、頭蓋内と頸部リンパ節との連絡を示唆する報告²⁵⁾もなされている。このことはヒトにおいて、頸部リンパ節は脳脊髄液および脳間質液の吸収機能の面では退化したものの、頭蓋内との免疫学的連絡は存在している可能性を示しており、今後ヒト脳腫瘍における頸部リンパ節の免疫学的重要性を考える上で興味深い。

最近、脳腫瘍以外の他臓器の癌で局所リンパ節内活性T細胞を利用した養子免疫療法の有効性が報告されている³⁰⁾。従来、生体の腫瘍抵抗機構において最も強力な効果細胞は腫瘍内浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte, TIL) であると考えられていた。しかし、近年 TIL は同じ担癌宿主の血中、脾臓およびリンパ節のリンパ球と比べると自己腫瘍障害活性が低下または消失していることが明らかになった³¹⁾。これは腫瘍細胞由来の抑制物質の影響を TIL が最も強く受けるためと考えられている。この事実は TIL による養子免疫療法の臨床成績が期待されたほどの効果をあげていないこととみられている。したがって悪性脳腫瘍においても本研究で明らかになった脳の局所リンパ節である頸部リンパ節の活性T細胞を利用すれば、より有効な養子免疫療法の確立が期待されるものと思われる。さらに、頸部リンパ節は抗腫瘍効果細胞の供給源であることより、効果細胞の解析を進め、その抗腫瘍活性を増強する治療手段を開発していくことは、臨床的に意義あることと考えられる。

結 論

ラット脳腫瘍移植後の脳、頸部リンパ節および他のリンパ組織における細胞性免疫反応を経時的に観察し、以下の知見を得た。

1. 脳内ではマイクログリア、血管周囲細胞、マクロファージが MHC クラスⅡを発現し、抗原提示細胞として働いている可能性が示唆された。
2. 脳腫瘍移植後に頸部リンパ節、脾臓および腸間膜リンパ節において MHC クラスⅡが発現し、脳内の免疫情報が全身のリンパ組織に伝達されることが示された。
3. 脳腫瘍移植後の T リンパ球の増加は、脳腫瘍内と頸部リンパ節でのみ認められ、その経時的動態は相関した。
4. 腫瘍を頭蓋外に移植した群では、頸部リンパ節での CD4 陽性 T リンパ球の増加は遅延した。
5. 頸部リンパ節摘出群では、脳腫瘍内への CD4 陽性 T リンパ球の浸潤は遅延し、代償性に脾臓および腸間膜リンパ節において CD4 陽性 T リンパ球の増加を認めた。

以上の結果から、ラット脳腫瘍において頸部リンパ節は中枢神経系の局所リンパ節としての役割を果たしていると結論された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導とご校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導をいただきました金沢大学医学部脳神経外科学講座、木多真也助手に心から感謝致します。また、本研究の遂行に際し、御協力とご助言を頂きました、金沢大学医学部附属病院中央検査部、橋本琢磨教授、高村利治技官、東京都神経科学総合研究所神経病理部門、松本陽博士に深謝致します。さらに、御支援と御協力を頂きました、金沢大学医学部脳神経外科学講座の皆様へ感謝致します。

文 献

- 1) 山下純宏, 川村哲朗: 脳腫瘍の免疫療法. 神経科学レビュー 5 (伊藤正雄, 植林博太郎編), 第1版, 218-241 頁, 医学書院, 東京, 1991.
- 2) Sawamura, Y. & de Tribolet, N.: Immunology of brain tumours. *In* L. Symon, L. Calliauv & F. Cohadon (eds.), *Advances in Technical Standards in Neurosurgery*, 17, 1st ed., p3-64, Springer-Verlag, Wien, 1990.
- 3) 藤原大美: 腫瘍免疫. T細胞系の免疫学 (藤原大美編), 第2版, 276-307 頁, 中外医学社, 東京, 1993.
- 4) Barker, C. F. & Billingham, R. E.: Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.*, 25, 1-54 (1977).
- 5) Fabry, Z., Raine, C. S. & Hart, M. N.: Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol. Today*, 15, 218-224 (1994).
- 6) 松本 陽: 脳細胞の抗原提示能と局所免疫調節機構. *臨床免疫*, 25, 1375-1383 (1993).
- 7) Smith, T. & Cuzner, M. L.: Neuroendocrine-immune interactions in homeostasis and autoimmunity. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 20, 413-422 (1994).
- 8) Watkins, A. D.: Hierarchical cortical control of neuroimmunomodulatory pathways. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 20, 423-431 (1994).
- 9) Kida, S., Pantazis, A. & Weller, R. O.: CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. *Anatomy, histology and immunological significance. Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 19, 480-488 (1993).
- 10) Harling-Berg, C. J., Knopf, P. M., Merian, J. & Cserr, H. F.: Role of cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin-microinfused into rat CSF. *J. Neuroimmunol.*, 25, 185-193 (1989).
- 11) Cserr, H. F., Harling-Berg, C. J. & Knopf, P. M.: Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol.*, 2, 269-276 (1992).
- 12) Kida, S., Ellison, D. W. & Weller R. O.: Characterization of perivascular cells in astrocytic tumours and peritumoural oedematous brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 21, (1995) in press.
- 13) 藤原大美: 癌に対する宿主免疫応答機構. *臨床病理*, 82, 35-41 (1989).
- 14) Kahle, V. W., Leonhardt, H. & Platzer, W.: *Taschenatlas der Anatomie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart,

1979. 越智淳三 (訳): リンパ管. 解剖学カラーアトラス, 第3版, 234頁, 文光堂, 東京, 1990.
- 15) Kida, S., Steart P. V., Zhang, E. T. & Weller R. O.: Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular space and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol.*, **85**, 646-662 (1993).
- 16) Hickey, W. F. & Kimura, H.: Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*, **239**, 290-292 (1988).
- 17) 花岡正男, 玉置憲一: 免疫細胞の活性化と機能分化. 免疫細胞 (花岡正男, 玉置憲一編), 第1版, 150-294頁, 文光堂, 東京, 1993.
- 18) 栗林景容: キラーT細胞. 腫瘍免疫 研究の新展開 (内田温士編), 第1版, 35-43頁, 中外医学社, 東京, 1992.
- 19) Yamada, S., DePasquale, M., Patlak, C. S. & Cserr, H. F.: Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *Am. J. Physiol.*, **261**, 1197-1204 (1991).
- 20) Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. & Allison, J. P.: CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, **356**, 607-609 (1992).
- 21) 山崎俊樹, 山下純宏, 菊池晴彦: 脳における免疫の特殊性—腫瘍免疫の観点から—. *神経研究の進歩*, **33**, 1024-1035 (1989).
- 22) 藤原大美: T細胞の免疫応答. T細胞の免疫学 (藤原大美編), 第2版, 155-174頁, 中外医学社, 東京, 1993.
- 23) Matsubayashi, Y., Zenita, K. & Morioka, A.: Characterization of CD4 (L3T4)-positive cytotoxic T cell clone that is restricted by class I major histocompatibility complex antigen on FBL-3 tumor cell. *Immunol.*, **180**, 33-46 (1986).
- 24) Bodmer, S., Strommeier, K., Frei, K., Siepl, C., de Tribolet, N., Heid, I. & Fontana, A.: Immunosuppression and transforming growth factor- β in glioblastoma. *J. Immunol.*, **143**, 3222-3229 (1989).
- 25) Clark, W. C. & Bressleer, J.: Transforming growth factor- β -like activity in tumor of the central nervous system. *J. Neurosurg.*, **68**, 920-924 (1988).
- 26) Kiefer, R., Supler M. L., Toyka, K. V. & Streit, W. J.: In situ detection of transforming growth factor- β -mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells. *Neurosci. Lett.*, **166**, 161-164 (1994).
- 27) Toda, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., Muramatsu, M., Li, X. F., Shimizu, J., Fujiwara, H. & Hamaoka, T.: Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J. Immunol.*, **146**, 1077-1082 (1991).
- 28) Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers D. M., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., van-Breda-Vriesman, P. J. & Sminia, T.: The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today*, **13**, 219-224 (1992).
- 29) 花岡正男, 玉置憲一: 免疫細胞の基底—リンパ組織—. 免疫細胞 (花岡正男, 玉置憲一編), 第1版, 108-148頁, 文光堂, 東京, 1993.
- 30) Phillips, M. J. & Weller R. O.: Inhibition of cerebral experimental allergic encephalitis by cervical lymphadenectomy. In Proceedings of the Eighty-Eighth meeting of the British neuropathological society. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **20**, 505 (1994).
- 31) Kida, S. & Weller, R. O.: Morphological basis for fluid transport in and around ependymal, arachnoid and glial cells. In A. J. Raimondi (ed.), Principles of Pediatric Neurosurgery: Intracranial Cyst Lesion, 4th ed., p37-52, Springer-Verlag, New York, 1993.
- 32) Weller, R. O., Kida, S. & Zang, E. T.: Pathways of fluid drainage from brain. Morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain Pathol.*, **2**, 277-284 (1992).
- 33) Graeber, M. B., Streit, W. J., Buringer, D., Sparks, D. L. & Kreutzberg, G. W.: Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **51**, 303-311 (1992).
- 34) Matumura, T., Sussman, J. J., Krinock, R. A., Chang, A. E. & Shu, S.: Characteristics and in vivo homing of long-term T-cell lines and clones derived from tumor-draining lymph nodes. *Cancer Res.*, **54**, 2744-2750 (1994).
- 35) 土田哲雄, 平櫛順仁, 東野一弥: キラーT細胞. 腫瘍免疫研究の新展開 (内田温士編), 第1版, 134-147頁, 中外医学社, 東京, 1992.

Significance of Cervical Lymph Nodes in Brain Tumor Immunity: Immunohistochemical and Flow Cytometric Study in Rats Yoshikazu Okamoto, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **104**, 143—153 (1995)

Key words brain tumor, regional lymph node, cervical lymph node, T lymphocyte subsets, MHC class II

Abstract

Recent physiological and anatomical studies have demonstrated that a major fraction of brain interstitial and cerebrospinal fluid drains into cervical lymph nodes in a number of experimental animals. To investigate the role of cervical lymph nodes in brain tumor immunity, temporal profiles of T lymphocyte subsets in brain tumors, cervical lymph nodes and other lymphoid tissues were analyzed by immunohistochemistry and flow cytometry. Two weeks after the transplantation of C6 glioma cells into a rat brain, expression of MHC Class II was induced in the brain and all lymphoid tissues examined. However, the following appearance of CD4 positive or CD8 positive cells was strictly confined to cervical lymph nodes, and coincided with the infiltration of such cells in the brain tumor 2 weeks after the transplantation. Extracranial transplantation of C6 glioma cells under the scalp showed a weak reaction in cervical lymph nodes, in which a delayed increase of the number of CD4 positive cells was observed 4 weeks after the transplantation. In the animal group of cervical lymphadenectomy followed by intracerebral transplantation of C6 glioma cells, there was a delayed infiltration of CD4 positive cells in the brain tumor 3 weeks after the transplantation, and the production of such cells was substituted by the spleen. These results suggest that cervical lymph nodes act as draining lymph nodes in brain tumor immunity.