

造血器腫瘍細胞における細胞間接着分子 ICAM-1 の発現とその血中における検出

仲野 龍己 今井 浩三

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Expression of ICAM-1 Molecule on the Surface of Hematopoietic Tumor Cells and Detection of ICAM-1 Antigen in Patient's Serum

Tatsumi NAKANO and Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. A. YACHI)

ABSTRACT The expression of cell surface ICAM-1 antigen and ICAM-1 mRNA in cell lines of hematopoietic diseases was investigated. In addition, the concentration of solubilized ICAM-1 antigen in spent medium of cell lines and in sera of patients suffering from hematopoietic diseases was detected using an ELISA system established by us. The results are summarized as follows:

1. The level of cell surface ICAM-1 expression in cell lines of hematopoietic diseases was high in B-cell lines and especially high in myeloma cell lines. On the other hand, the level was low in T-cell lines and myeloid cell lines, except for ATL cell lines, which showed high level expression.
2. In the investigation of ICAM-1 mRNA expression, the level was parallel to that of cell surface antigen.
3. The expression of cell surface ICAM-1 antigen increased in all lineages with IFN- γ treatment, and the rate of increase was highest in T-cell lines.
4. The concentration of solubilized ICAM-1 antigen in spent medium of cell lines was parallel to the expression level of cell surface antigen.
5. The concentration of ICAM-1 antigen in sera of patients suffering from hematopoietic diseases was high in B-cell leukemia. In cases of B-cell type malignant lymphoma, the concentration was high in cases of advanced stage and/or in cases with leukemic change. As to T-cell malignancies, the concentration of serum ICAM-1 was high in cases of T-CLL, ATL and nasal T-cell lymphoma. The concentration was low in cases of myelocytic leukemia and multiple myeloma.
6. The clinical features associated with high level serum ICAM-1 antigen were hepatosplenomegaly, invasion of tumor cells into organs, tumor formation and poor prognosis.

Abbreviations

ALL	: acute lymphocytic leukemia	kb	: kilobase
AML	: acute myelocytic leukemia	LFA-1	: lymphocyte function-associated molecule-1
ATL	: adult T-cell leukemia	ML	: malignant lymphoma
cDNA	: complementary DNA	MoAb	: monoclonal antibody
CLL	: chronic lymphocytic leukemia	mRNA	: messenger RNA
CML	: chronic myelocytic leukemia	PBS	: phosphate-buffered saline
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay	PCR	: polymerase chain reaction
FCS	: fetal calf serum	PGK	: phosphoglycerate kinase
ICAM-1	: intercellular adhesion molecule-1	PMA	: phorbol 12-myristate 13-acetate
IFN- γ	: interferon- γ	RT-PCR	: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

(Received December 3, 1990 and accepted December 19, 1990)

Key words: ICAM-1, Hematopoietic disease, Monoclonal antibody, ICAM-1 mRNA

1 緒 言

T細胞, B細胞, マクロファージ, 顆粒球等, 免疫系を構成する細胞群は, 相互に, あるいは血管内皮細胞や血管外組織の細胞と接着することにより, 免疫反応や炎症反応にかかわっている. この際, 細胞表面の接着に関与する分子群が重要な役割をはたしており, レセプター・リガンドの相互作用を介してこれらの反応を調節している.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1/CD54)¹⁾は lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1/CD11a)²⁾のリガンドのひとつ³⁻⁴⁾であり, LFA-1と結合することにより, CTLやNK細胞の細胞障害活性の発現, T細胞の活性化等の免疫反応の調節にかかわっている. ICAM-1はまた, 種々の癌細胞表面にも発現しており, 腫瘍免疫に重要な役割をはたしていると考えられている⁵⁾.

本研究では, 教室で新たに確立した, ICAM-1分子と反応するMoAb HA58⁶⁾およびRT-PCR法により作製したICAM-1のcDNAプローブを用いて, 造血器腫瘍におけるICAM-1の発現を細胞表面抗原およびmRNAについて検討した. また我々の確立した遊離ICAM-1抗原の測定系により, 細胞培養上清及び造血器腫瘍患者血清中の遊離ICAM-1抗原濃度を測定し, ICAM-1の発現と病態との関連を検討した.

2 方 法

2.1 モノクローナル抗体

2.1.1 ICAM-1に対するモノクローナル抗体

HA58およびCL207を用いた. HA58(IgG1)はIFN- γ 200 U/mlで24時間培養したヒト大腸癌細胞株BM314をBALB/cマウスに免疫し, 脾細胞とマウスミエローマ細胞X 63-Ag 8.653を細胞融合させ, 平田・今井⁶⁾により作製されたものである. 一方, CL207(IgG1)はIFN- γ 処理ヒトメラノーマ細胞Colo 38を免疫原としてMatsui *et al.*⁶⁾により作製されたものである.

2.1.2 その他のモノクローナル抗体

ヒトHLA-DR+DP抗原に対するMoAb CR11-462(IgG1)はFerrone教授(New York Medical College)より供与された. また抗LFA-1抗体IOT 16

(IgG1)はCOSMO BIO社より入手した.

2.1.3 Self-aggregation 阻止試験

ICAM-1なしのLFA-1に対するモノクローナル抗体が, B細胞株のself-aggregationを阻止するか否かを検討する目的で, B細胞株RPMI1788をminimal essential medium (MEM, 日本製薬)にて洗浄後, 10%FCS加RPMI1640培養液(GIBCO, U. S. A.)に浮遊し 5×10^3 個/mlとした. 組織培養用96穴平底マイクロプレート(coster, U. S. A.)にこれを各々50 μ l注ぎ, HA58, 抗LFA-1抗体IOT16, またcontrolとして, HA58と同じIgG1クラスの抗HLA-DR+DP抗体CR11-462を各々200 μ g/mlに調整したものを50 μ l (HA58+抗LFA-1抗体では各々25 μ l)加えた. 37°C, 5%CO₂の条件下で3時間培養後, 位相差顕微鏡を用いてself-aggregationの状態を観察した.

2.1.4 モノクローナル抗体のビオチン化

抗体のビオチン化はGuesdon *et al.*⁷⁾の方法に従った.

2.2 ヒト培養細胞

B細胞株としてBALL-1, RPMI1788, Daudi, Raji, UC7296, BOH-1, また骨髄腫由来のものとしてRPMI8226, HS-Sultan, Karpas707, HO323-8, KR-4, KR-12, T細胞株としてMolt 4, TALL-1, Jurkat, PEER, CEM, またそのうちATL由来のものとしてMT-1, TL-Su, ILT-Mat, ILT-Mor, myeloid細胞株としてTHP-1, U937, K562, HL60, KG-1を用いた. これらの細胞は10%FCS加RPMI1640培養液中で37°C, 5%CO₂の条件下で, またILT-Mor, ILT-MatのみにはさらにIL-2(TGB-3, TAKEDA)50 U/mlを加えて培養維持した. なおATL細胞株のうちTL-Su, ILT-Mat, ILT-Morは東北大学菅村和夫教授より供与された.

2.3 γ -インターフェロン (IFN- γ)

ヒト型recombinant IFN- γ は東レ株式会社より供与を受けた. 500 U/mlの濃度で培養液に添加し, 72時間培養した細胞をフローサイトメトリーの試料とし, 細胞培養上清を遊離ICAM-1抗原濃度測定のための試料とした. なお, IFN- γ 非添加の培養液で72時間培養した細胞および細胞培養上清をコントロールとして用いた.

2.4 フローサイトメトリー

MoAb HA58の各種細胞表面での反応をEPICS

(Coulter Electronics, U. S. A.) を用いて検索した。IFN- γ 処理及び非処理細胞 (5×10^5) に HA58 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を一次抗体として 4°C , 30 分反応させ、PBS で 3 回洗浄後、約 1 ml の冷 PBS に懸濁させて、検索試料とした。抗体の各細胞表面抗原との反応は、横軸に蛍光強度、縦軸に細胞数として表現した。陽性率は、抗体未使用のコントロール試料の陽性率を 1% 未満に設定し、蛍光強度がこの条件を越える細胞の量を % として表した。

2.5 遊離 ICAM-1 抗原濃度の ELISA による測定

対象として 2.3 で述べた細胞培養上清、およびヒト血清として健常成人 25 例、B 細胞白血病 6 例、B 細胞悪性リンパ腫 19 例、T 細胞白血病 7 例 (ATL 5 例)、T 細胞悪性リンパ腫 6 例、骨髄性白血病 9 例、多発性骨髄腫 4 例の計 76 例から得た血清を用いた。

ELISA は、平田・今井の方法⁹⁾ によった。すなわち、固相化 CL-207-ビオチン化 HA58 の測定系が遊離 ICAM-1 抗原を特異的に検出することを確認した後、この測定系により、ヒト膵癌細胞株 Panc-1 の培養上清を段階希釈し、 492 nm の波長で吸光度 OD 値を測定して検量曲線を求めると、OD 値は 0.01 より 1.50 の間において直線性を示した。そこで、標準液 (OD 値 1.68) を 1000 ELISA units として、比較する試料の OD 値より ELISA units の値を決定した。試料として培養上清は原液のまま、患者血清は 200 倍希釈して用いた。なお、培養上清をヒト血清により段階希釈した試料の OD 値曲線は検量曲線と平行性を示した。

2.6 ノーザンプロット法

2.6.1 cDNA プローブ

ICAM-1 の cDNA プローブは、Staunton *et al.*⁸⁾ によって決定された cDNA の塩基配列より、RT-PCR 法⁹⁻¹⁰⁾ にて作製した。すなわち、まず上記 cDNA の 5' 末端より 348 番目より 367 番目までの塩基の oligomer を sense primer として、また 848 番目より 867 番目までの塩基に相補的な塩基の逆方向の oligomer を antisense primer として作成した。次に IFN- γ 処理した骨髄単球性白血病細胞株 MZ-1 より抽出した total RNA より、Sambrook *et al.*¹⁰⁾ に従い antisense primer と逆転写酵素を用いて template となる cDNA を合成した。次に sense primer および Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer-Cetus, U. S. A.) を加え、DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer-Cetus, U. S. A.) を使用して PCR を行った。PCR の条件は denaturation 94°C , 1 分間, annealing 52°C , 2 分間, polymerization 72°C , 1 分 30 秒間で 25 サイクル

行った。増幅された cDNA を回収した後、複数の制限酵素による切断パターンの解析により、この cDNA の塩基配列が Staunton *et al.*⁸⁾ により決定されたものと同一であることを確認し、ICAM-1 の cDNA プローブとした。

一方、ノーザンプロット法のコントロールのプローブとして PGK (phosphoglycerate kinase) プローブを用いた¹¹⁾。PGK はヒト X 染色体にコードされており、mRNA は 1.9 kb とされている。

2.6.2 プローブの標識

2.6.1 に述べたプローブをニックトランスレーション法¹²⁾ により標識し、ノーザンプロット法に用いた。なお、specific activity は $5 \sim 8 \times 10^8 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ であった。

2.6.3 total RNA の抽出及びノーザンプロット法

培養細胞の total RNA は Chirgwin *et al.*¹³⁾ の方法に従い、guanidium thiocyanate 法により抽出した。

ノーザンプロット法は Goldberg¹⁴⁾ の方法に準じて行った。

3 成績

3.1 モノクローナル抗体による細胞の self-aggregation 阻止効果

MoAb HA58 および抗 LFA-1 抗体による B 細胞株 RPMI1788 の self-aggregation 阻止効果を検討した。Fig. 1 に示すように、抗体を加えない control では self-aggregation を生じたが、HA 58, 抗 LFA-1 抗体、および両者によって aggregation は阻止された。その効果は HA58+抗 LFA-1 抗体と抗 LFA-1 抗体単独の場合が同程度で、HA58 単独ではやや弱かった。また、コントロールとして用いた HA58 及び抗 LFA-1 抗体と同じ IgG1 サブクラスの抗 HLA-DR+DP 抗体では self-aggregation は阻止されず、むしろやや増強された。

3.2 造血器腫瘍細胞表面抗原の発現のフローサイトメトリーによる検討

MoAb HA58 を用いたフローサイトメトリーにより、各種造血器腫瘍細胞表面 ICAM-1 抗原の発現および IFN- γ 処理によるその変化を検討した。Fig. 2 (a) に示すように、一般に B 細胞株では強い発現がみられ、特に骨髄腫細胞株の一部 (Karpas707, RPMI8226) にさらに強い発現がみられた。これに対して Fig. 2 (b) に示すように、T 細胞株では一般に発現は弱い、ATL 細胞株 (ILT-Mor, TL-Su) では強い発現がみられ、また、myeloid 細胞株では T 細胞株と同様、一般に発現は弱かった。

次に IFN- γ 処理による変化をみるために、処理前と

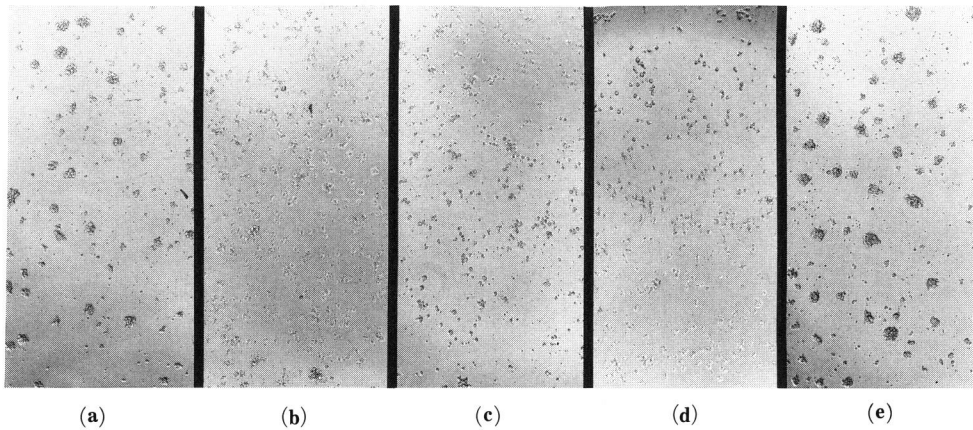


Fig. 1 Self-aggregation of RPMI1788 cells and effect of MoAb to ICAM-1 on the intercellular adhesion of the cells. (a) no monoclonal antibody, (b) anti-ICAM-1 MoAb HA58, (c) anti-LFA-1 MoAb IOT16, (d) anti-ICAM-1 MoAb HA58+anti-LFA-1 MoAb IOT16, (e) anti-HLA-DR+DP MoAb CR11-462.

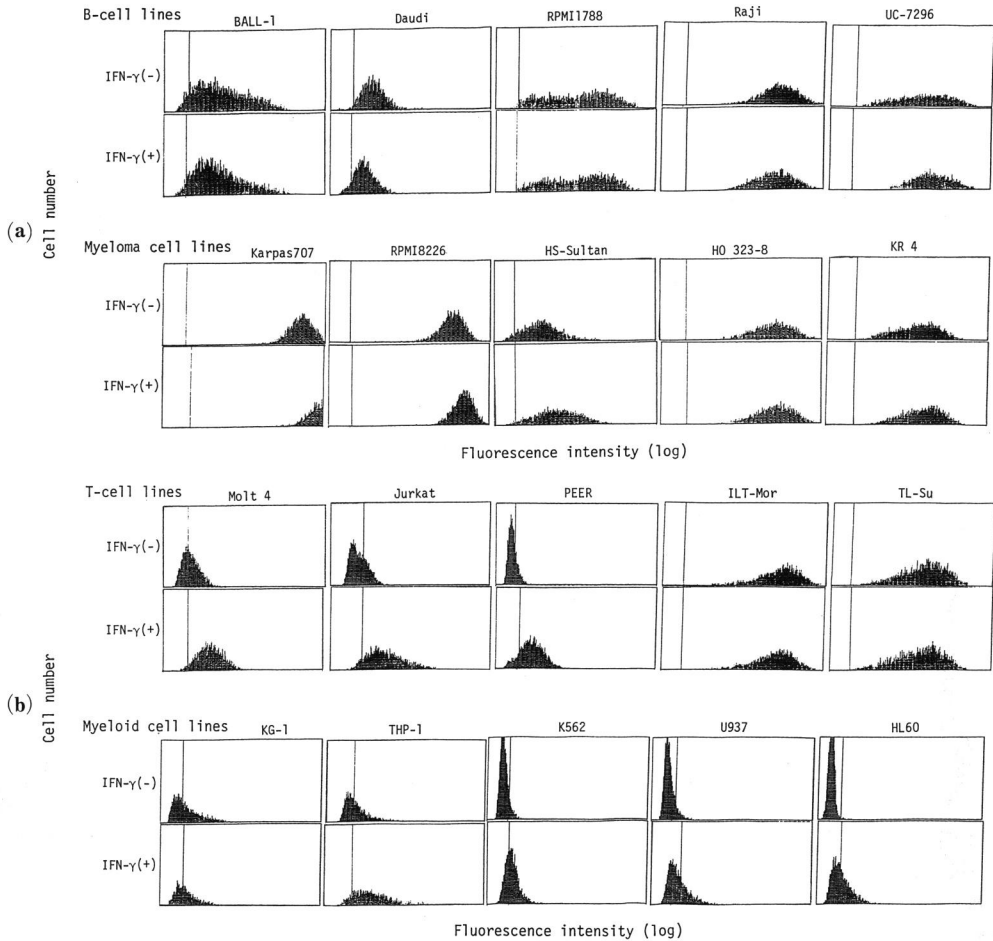


Fig. 2 Histogram of the expression of cell surface ICAM-1 antigen in different types of cell lines of hematopoietic diseases and the effect of IFN- γ on cell lines. (a) B-cell lines and myeloma cell lines, (b) T-cell lines and myeloid cell lines.

処理後の陽性率の変化を Fig. 3 に示した。骨髄腫細胞株を含む B 細胞株では処理前の比率が高いため大きな変化はないが、ATL 細胞株 (MT-1) を除く T 細胞株では、陽性率は著明に上昇した。Myeloid 細胞株では個々の細胞により差があり、一定の傾向は示さなかった。

3・3 造血器腫瘍細胞株における ICAM-1 mRNA の発現

cDNA プローブを用いたノーザンブロット法により各種造血器腫瘍細胞株における ICAM-1 mRNA の発現を検討した。Fig. 4 (A) に骨髄腫細胞株を含む B 細胞株、(B) に T 細胞株、(C) に myeloid 細胞株における mRNA の発現を示す。結果はフローサイトメトリーによる細胞表面抗原の発現の検討結果と並行する所見であった。すなわち、B 細胞系で発現が強く、T 細胞系では発現は弱い。ATL 細胞株 (ILT-Mor, TL-Su)

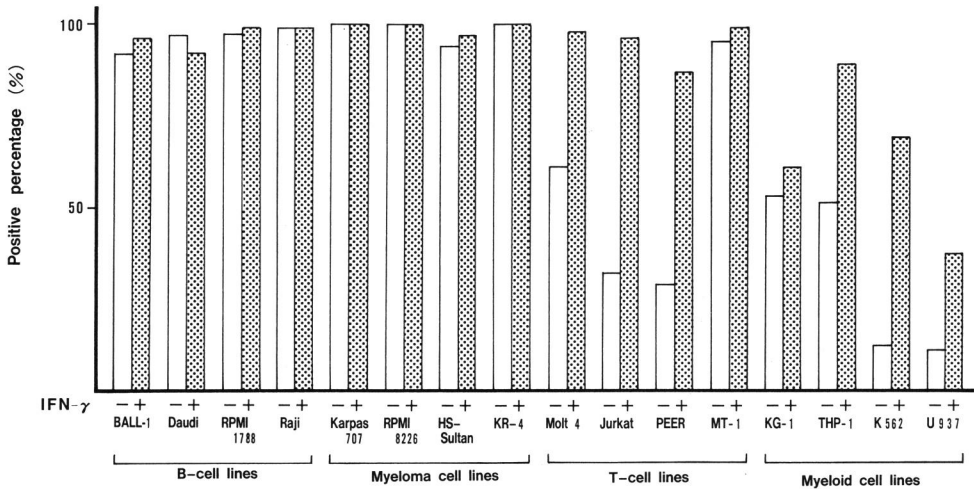


Fig. 3 Increase in the cell surface ICAM-1 antigen on cell lines of hematopoietic diseases induced by IFN- γ : detection of the antigen by MoAb HA58 using flow cytometry.

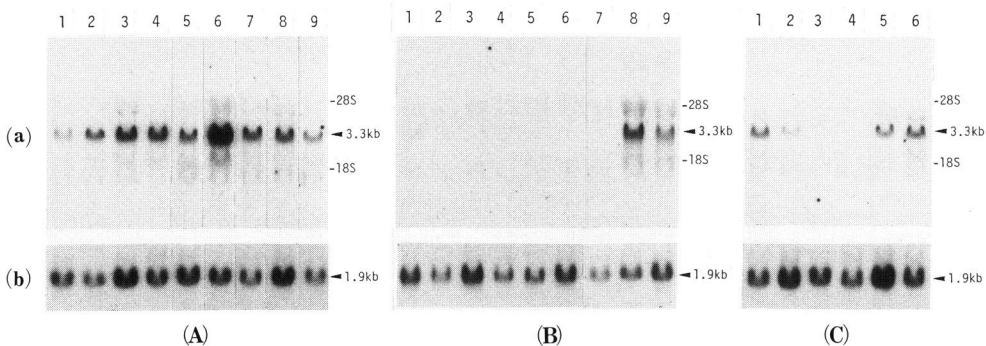


Fig. 4 Northern hybridization of total RNA from cell lines of hematopoietic diseases with ICAM-1 cDNA probe (a). PGK cDNA probe (b) was used as a control probe.

- (A) B-cell lines including myeloma cell lines. Lane 1, BALL-1; lane 2, Daudi; lane 3, RPMI1788; lane 4, Raji; lane 5, BOH-1 are B-cell lines, and lane 6, Karpas 707; lane 7, RPMI8226; lane 8, UC-7296; lane 9, KR-12 are myeloma cell lines.
- (B) T-cell lines including ATL cell lines. Lane 1, BALL-1 is a control, lane 2, Molt 4; lane 3, TALL-1; lane 4, Jurkat; lane 5, PEER; lane 6, CEM are T-cell lines, and lane 7, MT-1; lane 8, ILT-Mor; lane 9, TL-Su are ATL cell lines.
- (C) Myeloid cell lines. Lane 1, BALL-1 is a control, lane 2, KG-1; lane 3, THP-1; lane 4, HL60; lane 5, K562; lane 6, U937.

で強く、myeloid 細胞株では全体に弱い、一部にやや強い発現を示すものがあった。

3.4 造血器腫瘍細胞培養上清中の ICAM-1 抗原濃度

各種造血器腫瘍細胞培養上清中の ICAM-1 抗原濃度を、IFN- γ 処理前、処理後に分けて測定した。その結果、Fig. 5 に示すように、遊離 ICAM-1 抗原濃度は B 細胞株、特に骨髄腫細胞株で高値を示した。T 細胞系では非 ATL 細胞株 3 種ではすべて低値であるが、ATL 細胞株 2 種 (MT-1, TL-Su) のうち TL-Su では高値を示した。Myeloid 細胞株においても低値であった。IFN- γ 処理によりいずれの系統でもほとんどの細胞株で ICAM-1 抗原の遊離ないし分泌の増多がみられた。

3.5 造血器腫瘍患者血清中の ICAM-1 抗原濃度と病態との関連性

各種造血器腫瘍患者血清中の ICAM-1 抗原濃度を ELISA により測定した結果を Fig. 6 に示す。健康人 25 名の平均値+2 \times 標準偏差値より、75 ELISA units を正常上限とし、各疾患において高値を示した症例の比率を上段に示した。

B 細胞白血病患者血清では 6 例中 4 例 (67%) で高値であり、このうち最も高値を示した症例 (B-CLL) では、表在リンパ節腫脹、肝脾腫が著明で、腹部大動脈周囲リンパ節の腫大を認めた。また 2 番目に高値を示した症例 (B-ALL) では、肝脾腫が著明で、剖検時、

肝臓、脾臓をはじめ全身の臓器に腫瘍細胞の広範な浸潤を認めた。高値を示した 4 例のうち 3 例で肝脾腫を認めたのに対し、正常値を示した 2 例には肝脾腫を認めなかった。B 細胞リンパ腫では 19 例中 6 例 (32%) で高値を示したが、これらの症例はいずれも病期分類の Stage III ないし Stage IV であり、うち 3 例で肝脾腫を、また 4 例で白血化を認めた。また、19 例中 10 例は扁桃原発の症例であり、うち 9 例は正常範囲内の値を示した。これは後に述べる鼻腔原発の T 細胞性リンパ腫とは対照的であった。扁桃以外が原発巣である B 細胞リンパ腫で正常値を示したのは 2 例のみであった。

T 細胞系腫瘍では、T-CLL の 2 例はいずれも軽度高値を示した。ATL 患者血清中では 5 例中 2 例 (40%) で高値を示した。このうち最も高い値を示した症例では著明な肝脾腫がみられ、剖検時、肝臓、脾臓の他、腎臓、消化管、肺門リンパ節等に広範な腫瘍細胞浸潤を認めた。高値を示した他の 1 例にも肝脾腫、表在リンパ節腫脹がみられた。一方、ICAM-1 抗原量が正常域を示した ATL 症例には肝脾腫はみられなかった。また、高値を示した症例はいずれも病型は急性型であったが、正常値を示した 3 例の中では 1 例のみが急性型であった。鼻腔原発の T 細胞悪性リンパ腫である nasal T-cell lymphoma では 6 例中 4 例 (67%) で高値を示した。高値を示した症例はいずれも予後不良であった。

骨髄性白血病では 9 例中 1 例 (11%) のみが高値を

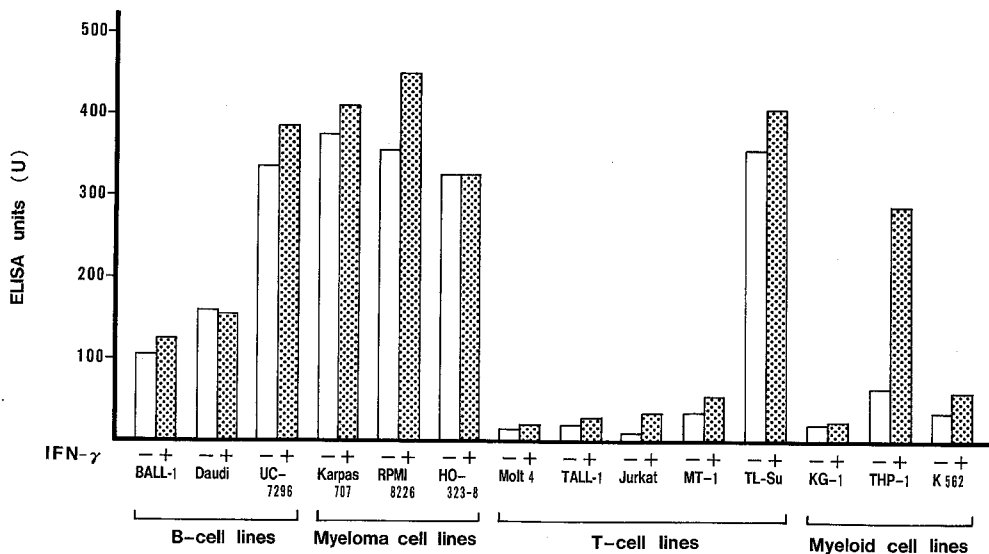


Fig. 5 Detection of ICAM-1 antigen in the spent medium of cell lines of hematopoietic diseases. Cells were incubated for 72 hours with and without IFN- γ (500U/ml), and ICAM-1 antigen in the spent medium was assessed by ELISA.

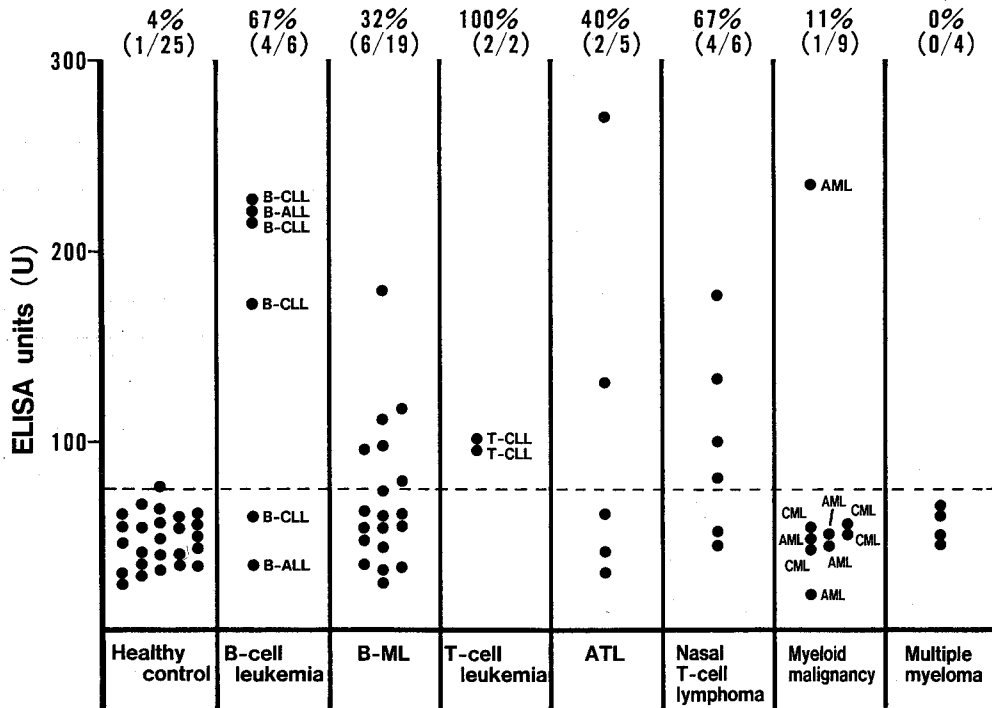


Fig. 6 Concentration of ICAM-1 antigen in sera of patients suffering from hematopoietic diseases detected by ELISA. The upper figures indicate the percentage of high ICAM-1 antigen cases. B-ML: malignant lymphoma, B-cell type, ATL: adult T-cell leukemia.

Table 1 Incidence of hepatosplenomegaly in the hematopoietic diseases

Disease	ICAM-1 level	
	normal (≤ 75 U)	high (> 75 U)
B-cell leukemia	0/ 2 (0%)	3/ 4 (75%)
B-ML	1/ 4 (25%)	3/ 5 (60%)
T-cell leukemia	—	0/ 2 (0%)
ATL	0/ 3 (0%)	2/ 2 (100%)
Myeloid malignancy	0/ 8 (0%)	1/ 1 (100%)
Multiple myeloma	0/ 4 (0%)	—
total	1/21 (5%)	9/14 (64%)

B-ML: malignant lymphoma, B-cell type, ATL: adult T-cell leukemia. Hepatosplenomegaly was judged by use of computed tomography and/or echography.

示したが、この症例では鎖骨上リンパ節腫脹の他、鼠径部、耳後部に腫瘤形成を認め、また経過中に肝、脾の著明な腫大を認めた。多発性骨髄腫患者4例の血清中では、ICAM-1の増加は認められなかった。

以上、臨床病態との関連をみると、ICAM-1高値を示した症例に特徴的な所見は、肝脾腫の存在であった。

Table 1 に血清 ICAM-1 値の正常値群および高値群における肝脾腫の頻度を、検索し得た範囲で疾患別に示した。この場合、肝腫は右季肋下、脾腫は左季肋下に触知できるものとし、いずれも画像診断で確認したものである。両方が認められる場合のみ肝脾腫とした。

一方、症例の臨床経過に伴う血清 ICAM-1 値の変動について観察したのは少数例に過ぎないが、B細胞リンパ腫の1例で、化学療法により腫瘤の縮小を認めた際に血清 ICAM-1 値の減少を認めた。また、ATLの1例では全身状態の悪化に伴い、AMLの1例では肝脾腫の増大に伴って、血清 ICAM-1 値が増加した。

4 考 察

ICAM-1分子は、1986年、Rothlein *et al.*¹⁾により同定された。この分子はLFA-1のリガンドのひとつとして種々の免疫応答にかかわるほか、rhinovirusのレセプターとしての役割¹⁵⁾や、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のレセプターとしての役割¹⁶⁾が確認されており、ヒトメラノーマの転移に関する可能性も示唆されている¹⁷⁾。

教室の平田・今井⁵⁾は、大腸癌細胞株においてIFN-

γ により細胞表面に誘導される新たな分子へのMoAbの作製を試み、HA58を確立した。その後HA58が、抗ICAM-1抗体であるCL207と同じ分子の異なるエピトープを認識することが明らかになった。

本研究では抗ICAM-1抗体としてのHA58の作用をみるため、まずMoAb HA58によるB細胞株のself-aggregation阻止の有無を検討した。この結果、self-aggregationはHA58、抗LFA-1抗体、及び両者によって阻止され、この際、抗LFA-1抗体は抗ICAM-1抗体に比べより強力に阻止した。この成績は、self-aggregationにおける細胞間の接着において、ICAM-1/LFA-1の結合が極めて重要な役割を演じていることを示唆する。一方、最近ICAM-1以外のリガンドとしてICAM-2の存在が報告¹⁸⁾されており、今後接着のメカニズムがさらに詳細に明らかにされるものと期待される。さらに興味深いのは、コントロールとして用いた抗HLA-DR+DP抗体により、self-aggregationがやや増強している点である。Patarroyo *et al.*¹⁹⁾は、MHC class IIに対する抗体がEBV処理正常B細胞の凝集を増強することを報告しており、これらの事実は、MHC class II分子もまた細胞間接着に関連することを示唆している。

次に本研究では、各種造血器腫瘍細胞において、その系統により、また各々の疾患について、特徴的なICAM-1発現の傾向が認められるか否かについて検索し、さらにサイトカインの影響につき検討した。これまでICAM-1 mRNAの発現を造血器腫瘍細胞において系統別に検討した報告はみられない。

細胞表面ICAM-1抗原およびICAM-1 mRNAの検討では、B細胞系統は他の系統に比べ共に発現が強く、特に骨髓腫細胞株では強い発現がみられた。Dustin *et al.*²⁰⁾は抗ICAM-1抗体RR1/1を用いたフローサイトメトリーにおいて、例数は少ないが同様の結果、すなわち発現量はB細胞系で多く、myeloid細胞系あるいはT細胞系では相対的に少なくなることを報告している。さらに彼らは、単芽球細胞株U937及びHL60をPMAで分化誘導することにより、ICAM-1の発現が増強することを見出し、ICAM-1の発現がこれらの細胞の分化(maturation)と関係することを示唆している。本研究で、骨髓腫細胞株において発現が他のB細胞株より増強していることを明らかにしたが、この成績は、ICAM-1の発現がB細胞腫瘍においても細胞の分化と関連する可能性を示している。この点、最近のMaio *et al.*²¹⁾の研究でも、B-CLL患者の末梢血腫瘍細胞のICAM-1陽性率が、表面免疫グロブリンの発現と関連

性があり、分化と共に増強することが示唆されており、本研究の成績を支持するものといえよう。

これに対しT細胞株では、ICAM-1の発現は弱い傾向を示したが、興味あることにATL細胞株では発現が増強していた。Myeloid細胞株では個々の株により差が大きいが、その発現はT細胞系よりやや強い傾向を示した。この点、Maio *et al.*²¹⁾も腫瘍細胞の免疫染色によりほぼ同様の成績を示しているが、彼らはATLについては検討を行っていない。

ICAM-1の腫瘍細胞における発現の調節は、IL-1、TNF、IFN- γ 等のサイトカインが関与していることが明らかになっている^{20,22-23)}。本研究で各系統の造血器腫瘍細胞についてIFN- γ の影響を検討した結果、いずれの系統においてもIFN- γ 処理によりICAM-1の発現は増強したが、その割合はT細胞株およびmyeloid細胞株でより大であった。

ICAM-1分子は平田・今井⁵⁾により初めて細胞表面より遊離ないし分泌されていることが確認され、その測定系が確立された。この系により測定した細胞培養上清中のICAM-1抗原濃度は、細胞表面抗原の表出度とほぼ並行していた。

患者血清中の遊離ICAM-1濃度の測定では、B細胞白血病・リンパ腫、T細胞白血病、ATLおよびnasal T-cell lymphomaで高値を示した。

臨床病態との関連性をみると、血清ICAM-1高値の14例中9例(64%)に肝脾腫がみられ、これらのうち剖検可能であった3例については、いずれも腫瘍細胞の浸潤が確かめられており、その際、その他の臓器への広範な浸潤も認められた。これに対し、正常値を示した21例中、肝脾腫は1例(5%)のみで、有意な差(Fisherの直接確率計算法による)が認められた($p < 0.01$)。この結果から、血中ICAM-1値が腫瘍細胞の臓器浸潤と何らかの関連性を有する事がうかがわれた。

また、ATLについては、高値を示した3例は急性型であった。急性型ATLに特徴的な臨床像としては、一般的に皮膚病変、リンパ節腫大、肝脾腫があげられ、また消化管や中枢神経系への浸潤を認める場合も多く、予後不良である。これらの原因としてHTLV-1感染による免疫不全、特に細胞性免疫不全状態が存在することが指摘されている²⁴⁾。ATLにおける、ICAM-1の細胞表面抗原およびmRNAの発現の増強、遊離抗原濃度の増加については、第一にT細胞DNAに組み込まれたHTLV-1 provirus自体が、何らかの機序で宿主細胞を活性化し、ICAM-1の発現異常をもたらしていることが考えられる。第二に、HTLV-1感染細胞におけ

る各種サイトカインおよびその受容体の発現との関係が重要であろう。すなわち、感染細胞には IL-1 α , IL-1 β , TNF α , TNF β 等の mRNA の発現が報告²⁵⁻²⁷⁾されており、これらのサイトカインの産生が autocrine 機構による ATL 細胞の増殖のみならず、単独に、あるいは互いに協調して ICAM-1 の up-regulation に働き、細胞表面 ICAM-1 及び遊離 ICAM-1 が増加することが十分に考えられる。

Nasal T-cell lymphoma については、従来“進行性鼻壞疽”ないし“lethal midline granuloma”と診断されていた疾患であるが、Ishii *et al.*²⁸⁾ および Yamanaka *et al.*²⁹⁾ の免疫組織学的検討により鼻腔原発の T 細胞性悪性リンパ腫であることが明らかにされた。特徴的な臨床像は顔面正中部の壊死性肉芽性病変による進行性の組織欠損であり、組織の欠損は鼻腔に始まり漸次拡大する。進行した状態では全身諸臓器へ腫瘍細胞のびまん性浸潤がみられる予後不良の疾患である。さらに Yamanaka *et al.*³⁰⁾ は、耳鼻咽喉科領域の悪性リンパ腫では扁桃原発の B 細胞リンパ腫に比較して、鼻腔原発の T 細胞リンパ腫の悪性度が高いことを指摘しているが、今回の検索により、血清 ICAM-1 値はこれらの病態の悪性度に対応していることが明らかになった。

以上、血清中の遊離 ICAM-1 が高値を示す造血器腫瘍に共通してみられる特徴は、腫瘍細胞の臓器への浸潤や腫瘍形成性であり、いずれも予後は不良である。先述の Maio *et al.*²¹⁾ の末梢血腫瘍細胞の ICAM-1 発現の検討結果でも、高値を示すのは B-NHL の high grade malignancy のもの、B-CLL で急激な臨床経過を示すもの等、予後の悪い症例であり、我々の血清における検討結果と共通している。また症例数を増して検討を要するが、病変の進展と血清 ICAM-1 量が並行する傾向がみられた。造血器腫瘍における血清 ICAM-1 値増加の意義としては、腫瘍細胞から遊離された ICAM-1 分子が免疫細胞表面の LFA-1 分子と結合することにより、正常な細胞接着機序を阻害し、免疫反応に影響を及ぼすことが考えられよう。その際遊離 ICAM-1 分子が接着することにより活性化した T 細胞が、自らも ICAM-1 を遊離すると同時にサイトカインを放出し、組織の ICAM-1 陽性細胞を活性化させ、ますます遊離 ICAM-1 を増加させるというカスケード機構も推測される。

これらのことより造血器腫瘍においては、血清 ICAM-1 抗原の増減は疾患の悪性度や病変の進展のひとつの指標として利用し得る可能性が示唆される。また、この

ような接着分子に特異性を有する抗体は、これらの病態に対して治療効果を有する可能性も考えられ、その応用が期待される。

5 要 約

造血器腫瘍細胞株における ICAM-1 の発現を、我々の作製した MoAb HA58 および RT-PCR 法により作製した cDNA プローブを用いて、細胞表面抗原および mRNA について検討した。また我々の確立した遊離型 ICAM-1 の測定系により、細胞培養上清中および患者血清中の ICAM-1 抗原濃度の測定を行った。これらの検討より以下の結論を得た。

- 1) 造血器腫瘍細胞表面の ICAM-1 の発現は B 細胞系、特に骨髄腫系の細胞株で強かった。また、T 細胞系の細胞株あるいは myeloid 系細胞株では弱いが、ATL 細胞株では強かった。
- 2) mRNA の発現の検討でも、細胞表面抗原と同様の傾向がみられた。
- 3) IFN- γ により各系統で、細胞表面 ICAM-1 の発現は増強するが、この傾向は T 細胞系で最も強かった。
- 4) 遊離型 ICAM-1 抗原濃度は、培養細胞上清中では細胞表面の表出度と対応していた。
- 5) 血清 ICAM-1 濃度は、B 細胞白血病では増加しており、B 細胞リンパ腫では stage の進行した症例、白血化した症例で高値を示した。T 細胞系腫瘍では T-CLL, ATL, nasal T-cell lymphoma で増加していた。また、myeloid 系腫瘍では一般に増加はみられず、骨髄腫患者末梢血中でも増加はみられなかった。
- 6) 血清中の ICAM-1 の高値と関連する病態は肝脾腫、腫瘍細胞の臓器浸潤、腫瘍形成であり、予後不良の症例が多かった。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた本学内科学第 1 講座 谷内昭教授ならびに御協力いただいた諸先生、とくに貴重な御意見をいただいた日野田裕治博士、辻崎正幸博士、平田博巳博士に深謝いたします。また細胞株を御供与下さった東北大学 菅村和夫教授、JCRB 細胞バンク、また血清検体について御協力をいただきました本学耳鼻咽喉科学教室 形浦昭克教授、原潤保明博士、国立札幌病院 三国主税副院長に深謝致します。

本研究は厚生省対がん 10 年総合戦略プロジェクト研究 (分野 6, 谷内および今井) による補助を受けた。

文 献

1. Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D. and Springer, T. A.: A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. **J. Immunol.** **137**, 1270-1274 (1986).
2. Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kürzinger, K. and Springer, T. A.: Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): A surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**, 4535-4539 (1981).
3. Makgoba, M. W., Sanders, M. E., Ginther Luce, G. E., Dustin, M. L., Springer, T. A., Clark, E. A., Mannoni, P. and Shaw, S.: ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. **Nature** **331**, 86-88 (1988).
4. Marlin, S. D. and Springer, T. A.: Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1(LFA-1). **Cell** **51**, 813-819 (1987).
5. 平田博己, 今井浩三: インターフェロン- γ により発現の増強する分子 ICAM-1 に対する新しいモノクローナル抗体の作成と遊離型 ICAM-1 の検出. **札幌医学雑誌** **59**, 275-286 (1990).
6. Matsui, M., Temponi, M. and Ferrone, S.: Characterizaion of a monoclonal antibody-defined human melanoma-associated antigen susceptible to induction by immune interferon. **J. Immunol.** **139**, 2088-2095 (1987).
7. Guesdon, J. L., Ternynck, T. and Avrameas, S.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. **J. Histochem. Cytochem.** **27**, 1131-1139 (1979).
8. Staunton, D. E., Marlin, S. D., Stratowa, C., Dustin, M. L. and Springer, T. A.: Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. **Cell** **52**, 925-933 (1988).
9. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** **230**, 1350-1354 (1985).
10. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: Molecular cloning: a laboratory manual-second edition. 14. 1-14. 35, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
11. Michelson, A. M., Markham, A. F. and Orkin, S. H.: Isolation and DNA sequence of a full-length cDNA clone for human X chromosome-encoded phosphoglycerate kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **80**, 472-476 (1983).
12. Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. **J. Mol. Biol.** **113**, 237-251 (1977).
13. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** **18**, 5294-5299 (1979).
14. Goldberg, D. A.: Isolation and partial characterization of Drosophila alcohol dehydrogenase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **77**, 5794-5798 (1980).
15. Staunton, D. E., Merluzzi, V. J., Rothlein, R., Barton, R., Marlin, S. D. and Springer, T. A.: A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. **Cell** **56**, 849-853 (1989).
16. Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I. and Marsh, K.: Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. **Nature** **341**, 57-59 (1989).
17. Johnson, J. P., Stade, B. G., Holzmann, B., Schwäble, W. and Riethmüller, G.: *De novo* expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**, 641-644 (1989).
18. Staunton, D. E., Dustin, M. L. and Springer, T. A.: Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. **Nature** **339**, 61-64 (1989).
19. Patarroyo, M., Beatty, P. G., Nilsson, K. and Gahmberg, C. G.: Identification of a cell-surface glycoprotein mediating cell adhesion in EBV-immortalized normal B cells. **Int. J. Cancer** **38**, 539-547 (1986).
20. Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A. and Springer, T. A.: Induction by IL1 and interferon- γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J. Immunol.** **137**, 245-254 (1986).
21. Maio, M., Pinto, A., Carbone, A., Zagonel, V., Gloghini, A., Marotta, G., Cirillo, D., Colombatti, A., Ferrara, F., Vecchio, L. D. and Ferrone, S.:

- Differential expression of CD54/intercellular adhesion molecule-1 in myeloid leukemias and in lymphoproliferative disorders. **Blood** **76**, 783-790 (1990).
22. Pober, J. S., Gimbrone, M. A., Jr., Lapierre, L. A., Mendrick, D. L., Fiers, W., Rothlein, R. and Springer, T. A.: Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. **J. Immunol.** **137**, 1893-1896 (1986).
 23. Rothlein, R., Czajkowski, M., O'Neill, M. M., Marlin, S. D., Mainolfi, E. and Merluzzi, V. J.: Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines: Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. **J. Immunol.** **141**, 1665-1669 (1988).
 24. 甲木孝人, 山口一成, 高月清: HTLV-1感染による免疫不全—EBV感染免疫を指標として—. **Immunohaematology** **10**, 419-423 (1988).
 25. Wano, Y., Hattori, T., Matsuoka, M., Takatsuki, K., Chua, A. O., Gubler, U. and Greene, W. C.: Interleukin 1 gene expression in adult T cell leukemia. **J. Clin. Invest.** **80**, 911-916 (1987).
 26. Kodaka, T., Uchiyama, T., Umadome, H. and Uchino, H.: Expression of cytokine mRNA in leukemic cells from adult T cell leukemia patients. **Jpn. J. Cancer Res.** **80**, 531-536 (1989).
 27. Tschachler, E., Robert-Guroff, M., Gallo, R. C. and Reitz, M. S., Jr.: Human T-lymphotropic virus I-infected T cells constitutively express lymphotoxin in vitro. **Blood** **73**, 194-201 (1989).
 28. Ishii, Y., Yamanaka, N., Ogawa, K., Yoshida, Y., Takami, T., Matsuura, A., Isago, H., Kataura, A. and Kikuchi, K.: Nasal T-cell lymphoma as a type of so-called "Lethal midline granuloma". **Cancer** **50**, 2336-2344 (1982).
 29. Yamanaka, N., Kataura, A., Sambe, S., Minase, T. and Ishii, Y.: Midfacial T cell lymphoma: characterization by monoclonal antibodies. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.** **94**, 207-211 (1985).
 30. Yamanaka, N., Harabuchi, Y., Sambe, S., Shido, F., Matsuda, F., Kataura, A., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: Non-Hodgkin's lymphoma of Waldeyer's ring and nasal cavity. Clinical and immunologic aspects. **Cancer** **56**, 768-776 (1985).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 仲野龍己