

In vivo Augmentation of Human Natural Killer Cell Activity by MRN-100,
an iron based compound derived from bivalent and trivalent ferrates

Mamdooh Ghoneum*

Drew University of Medicine and Science

Los Angeles, CA 90059

Data were briefly presented at the 88th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. San Diego, CA. April 12-16, 1997 and at the Annual Conference on Clinical Immunology. New Orleans, LA. May 31 - June 3, 1996

KEY WORDS: MRN-100, Natural Killer Cell, Lymphocyte, Activity

*To whom correspondence should be addressed. Mamdooh Ghoneum, Ph.D.

Abstract

The effect of MRN-100 on human natural killer (NK) cell activity was determined. The MRN-100 is an iron base compound derived from bivalent and trivalent ferrates. Twelve (12) control healthy subjects were given MRN-100 at a concentration of 1ml/kg/day, and blood was drawn at 0 day, 2 wks and 1 month after treatment with MRN-100. Peripheral Blood Lymphocyte-NK activity was measured by a 4 hr ^{51}Cr -release assay using K562 tumor cells as targets. Treatment with MRN-100 was shown to have an augmentory effect on NK activity: a significant enhancement (an over-shoot) was detected as early as 2wks, that was maximized at 1 month post-treatment. The activity returned to the normal level by 3-4 wks after cessation of treatment. Changes in the activities of NK cells after treatment with MRN-100 were inversely related to the E:T ratios; namely 209%, 193%, 171% and 177.7% at 12:1, 125:1 50:1 and 100:1, respectively. In vitro studies indicated no significant change in NK activity post culture of PBL with MRN-100 for 16hrs and 3 days as compared with control untreated cells. The mechanism by which MRN-100 augments NK activity was examined. Flow cytometry analysis indicated remarkable increase in the NK cell sub-populations post-treatment with MRN-100 in the experimental subjects as compared with control untreated subjects. Similarly, MRN-100-treated NK cells showed higher binding capacity to their tumor cell targets. We conclude that MRN-100 is a potent immunomodulator and may be useful in cancer immunotherapy.

Our understanding of the immune system has increased greatly in the past decade. This greater understanding of the immune system through the use of naturally derived BRM's can modulate functional components of the immune system to fight and destroy cancer cells or viral infections.

The theory of immune surveillance suggests that spontaneously arising malignant cells are destroyed by immunological host defenses. Immunotherapy which activates NK cells is likely to show significant improvement in the survival of cancer patients.

In our lab, we have recently demonstrated the anti-carcinogenic and anti-tumor activity of MGN-3 in mice and humans. Data obtained from clinical trials indicate that MGN-3 has immunomodulatory activity which was highly significant in the levels of tumor associated antigens.

In this study, we examine the immunomodulatory function of a new BRM called MGN-3 on 10 terminally ill cancer patients.

INTRODUCTION

Immunology increased greatly in the past decade. This greater understanding of the immune system through the use of naturally derived BRM's can modulate functional components of the immune system to fight and destroy cancer cells or viral infections.

The theory of immune surveillance suggests that spontaneously arising malignant cells are destroyed by immunological host defenses. Immunotherapy which activates NK cells is likely to show significant improvement in the survival of cancer patients.

In our lab, we have recently demonstrated the anti-carcinogenic and anti-tumor activity of MGN-3 in mice and humans. Data obtained from clinical trials indicate that MGN-3 has immunomodulatory activity which was highly significant in the levels of tumor associated antigens.

In this study, we examine the immunomodulatory function of a new BRM called MGN-3 on 10 terminally ill cancer patients.

INTRODUCTION

Biological response modifiers (BRMs) have received considerable attention because of their ability to augment natural effector mechanisms and probable ability to restrict tumor growth (Djeu, 1983). Several bacterial and fungal immunopotentiators have been an object of great interest because of their potential value in tumor therapy. However the clinical use of these BRMs are restricted because of severe side effects.

The various immunological functions of NK cells make them prime candidates as therapeutic agents. Interleukin-2 (IL-2) has been shown to boost NK activity in peripheral blood, both *in vitro* and *in vivo*. These activated NK cells have broader antitumor cytolytic capabilities, including lysis of fresh, uncultured, human tumor cells as well as a wide variety of tumor cell lines (11, 12). Activated NK cells are defined as lymphokine activated killer (LAK) cells. Together, IL-2 and LAK cells have been used as adoptive immunotherapy against cancer (13); however, although IL-2 was reported to have promising results when administered to patients with advanced malignancies (14-16), the overall clinical success of IL-2 has been limited due to its severe side effects.

An increasing body of evidence implicates the Natural Killer phenomenon as a means of host defense against the growth and dissemination of tumor cells (4-6). NK cells have the ability to mediate natural resistance against tumors, and may play an important role in immune surveillance (7,8). Therefore, factors enhancing or influencing NK activity could be relevant for resistance to malignant disease. Based on this rationale, we test the ability of a new immunomodulator called MRN-100, with no notable side effects, to enhance human NK cell activity *in vivo*. The results show that MRN-100 augments NK activity as early as 2 wks after

oral administration and that this effect maximized at 1 month. On the other hand, discontinuation of treatment caused NK activity to return to normal levels.

MATERIALS AND METHODS

Human Subjects

Twelve healthy control subjects (6 females and 6 males) participated in this study. Subjects ranged in age from 34 to 53 years, with a mean of 44 years. They had not ingested any medications or vitamins for at least 2 wks prior to their participation. Moreover, the subjects did not have a history of chronic diseases. During the course of the experiment that extended for 2 months, the women were not menstruating nor taking oral contraceptives—both of which can affect the level of NK cell activity.

MRN-100 and treatment protocol

MRN-100 is an iron base compound derived from bivalent and trivalent ferrates. It was provided by ACM Co., LTD., Tokyo, Japan. All the subjects were given MRN-100 orally in the form of liquid at a concentration of 1ml/kg/day and 10-15 ml blood were drawn from each individual at different intervals; 0 day, 2 wk, 1 month after treatment and 3-4 wks after cessation of treatment.

Complete Medium (CM)

Complete medium (CM) consists of RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 1% antibiotic (100 U penicillin and 100 µg/ml streptomycin).

Tumor Cell Line

K562, an human erythroleukemic cell line, was used as targets.

Preparation of Peripheral blood lymphocytes (PBLs)

PBLs were prepared from fresh heparinized peripheral venous blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Cells were washed three times with Hanks balanced salt solution (HBSS) and resuspended to 10×10^6 cells/ml in CM.

Culture of PBL with MRN-100

PBLs from healthy control subjects were adjusted to 1×10^6 cells/ml in CM and cultured with MRN-100 at concentrations of 10% (v/v) for 16 and 20% (v/v) for 3 days. PBLs were then washed twice and examined for NK activity at effector:target (E:T) ratios of 100:1.

^{51}Cr -release Assay for Measuring NK Activity

NK activity was measured by a standard 4 hr ^{51}Cr -release assay. Briefly, 1×10^4 ^{51}Cr -labelled tumor target cells in 0.1 mL CM were added to different wells of a 96 well microtiter plate. Effector cells were then pipetted into quadruplicate wells to give E:T ratios of 12:1, 25:1, 50:1 and 100:1. After a 4 hr incubation (37°C), the plates were centrifuged (1400 rpm for 5 min) and 0.1 mL of supernatant from each well was collected and counted in a gamma counter (Beckmann G50, Beckmann Instruments).

The percentages of isotope released were calculated by the following formula:

$$\% \text{Lysis} = \frac{\text{Exp. Rel} - \text{Sp. Rel}}{\text{Total Rel} - \text{Sp. Rel}} \times 100$$

Spontaneous release (SP) from target cells was no more than 8-10% of total release. Total release was measured by adding 0.1 mL Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) to designated wells.

Lytic Units (LU)

Lytic units (LU) were calculated from effector titration curves with one LU defined as the number of effector cells required to achieve 20% lysis for K562. This serial performance of NK cytotoxic assay was based on criteria for a reproducible NK test and was intended to help minimize associated errors (17).

NK Sub-populations

NK cell subset enumeration was carried out with PBLs from individuals for baseline and after treatment with MRN-100. A single laser flow cytometer (Epics Profile: Coulter Epics, Inc., Hialeah, FL), which discriminates forward and right-angle light scatter, as well as two colors, was used with a software package (Quad Stat: Coulter). Mononuclear cell populations were determined by two-color direct immunofluorescence, by using a whole-blood staining technique with the appropriate monoclonal antibody and flow cytometry (18). Fluorescein isothiocyanate (FITC, CD3-FITC), or phycoerythrin (PE, CD56-PE)-conjugated monoclonal antibodies (Coulter Immunology) were selected for the determination of NK cell subsets. To monitor lymphocyte markers, bit maps were set on the lymphocyte population of the forward-angle light scatter versus a 90° light scatter histogram. The percentage of positively stained cells for each marker, as well as the percentage of double stained lymphocyte positive for the respective surface markers were determined.

Conjugate formation

The percent of effector:target cell conjugates was determined as described previously (). 1×10^4 peripheral blood lymphocytes (PBLs) were incubated with 1×10^5 K562 target cells in 1 ml of CM in 12x75mm glass tubes, sedimented by centrifugation at 130g for 5 min and incubated for

1h at 4°C. Pellets were resuspended, cytocentrifuged smears were prepared, stained with Giemsa and the percent of conjugates were examined by counting 200 lymphocytes (bound and free) in triplicate samples.

Statistical Analysis

The SAS procedure of analysis of variance (ANOVA) was used to examine: 1) The effects before and after treatment with MRN-100 in different determinations, 2) The effect of changing the ratios between E:T cells and 3) The interaction of the two effects.

RESULTS

I. *In Vivo* Studies

1. NK Activity at Different E:T Ratios:

Treatment with MRN-100 resulted in a significant induction of NK activity at 2 wks. $P < 0.001$. The relationship between NK activity and the ratios of effector:target (E:T) cells showed that NK enhancement was inversely related to the E:T ratio, i.e. maximum enhancement of MRN-100-treated NK cell activity (209.8%) was achieved at a lower E:T ratio, 12:1, compared with higher E:T ratios of 50 and 100:1 (171.2% and 172.7%, respectively).

2. Effects of MRN-100 on NK Activity expressed as LUs

The time course of the changes in NK activity expressed as LUs in the subjects treated with MRN-100 is shown in Fig. 1. Because of the complexity of the study only five subjects were tested for NK activity before (0 time) and , during treatment (2 wks and 1 mon) and after cessation of treatment. A remarkable increase in NK activity took place at 2 wks post-treatment in all subjects which was maximized at 1 month after treatment, MRN-100-induced NK activity was statistically significant $P < 0.001$. Activity returned to an almost normal level at 3-4 wks after -discontinuation of treatment. NK activity in one subject (CJ) was maintained at a high level after cessation of treatment.

3. Differential Subject Response to MRN-100

The percent induction of NK activity in each subject is depicted in Table 2. Data shows that all subjects responded to MRN-100 with increased NK activity but there was a differential response towards the immunaugmentory effect of MRN-100. Subjects could be divided into two categories of activity increase: G1 (50%) 200-350%; and G2 (50%) $> 350\%$ (350-1500).

4. Inter sex difference in response to MRN-100

Data in Table 2 show that there is no significant difference between both sexes in response to the augmentory effect of MRN-100.

5. Quantities of NK Sub-Populations

Total NK cell populations post-treatment with MRN-100 were determined by Flow Cytometry using Anti-CD16+ and CD56+/CD3- monoclonal antibodies respectively. Results in Table 3 demonstrated that treatment with MRN-100 had significant effect on the percentages of total NK cell populations, 134% and 142% increase in CD16+ and CD56+/CD3⁻, respectively examined at 1 month post-treatment as compared to baseline value.

6. Percent of Conjugates

Results in Fig. 2 shows significant increase in the binding capacity of NK cell to K562 tumor cell targets (32%) as compared to baseline value (10%).

II In Vitro Effect of MRN-100 on NK Activity

Data of in vitro effect of MRN-100 on NK activity is depicted in Table 4. PBL were cultured in the presence of MRN-100 at a concentration of 10% (v/v) for 16hrs and 20% (v/v) for 3 days. Results showed only 15% increase in NK activity post culture of PBL with MRN-100 for 16 hrs as compared to control cells.

DISCUSSION

The present study was undertaken to investigate the augmentory effect of a new product called MRN-100) on human NK cell activity in vivo and examined possible underlying mechanisms. MRN-100 is an iron base compound derived from bivalent and tervalent ferrates.

NK cells are large granular lymphocytes distinct from T and B cells. Animal studies suggest that they originate, and in part differentiate, in the bone marrow (10) and constitute approximately 10-15% of the mononuclear cells in the peripheral blood. NK cells play a crucial role in tumor rejection, immune surveillance, resistance to infections, and immune regulation (11-13). In addition, abnormal NK cell activity has been identified in many neoplasms (14), including malignant melanoma (15), atopic dermatitis (16), epidermodysplasia verruciformis (17), systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and Sjogren's syndrome (18). Therefore many attempts have been made to augment NK cell activity with limited success because of toxicity associated with many biological response modifiers (BRMs). In the present study we showed that MRN-100 is a potent BRM as manifested by increased human NK activity post treatment with MRN-100 and return of NK function upon discontinuation of treatment. The effect was detected as early as 2 wks post treatment and maximized at 1 month. Further studies (data not shown) indicated that long term treatment for 5 month is associated with NK activity that maintained at high level upon continuation of treatment.

BRMs have received considerable attention because of their ability to augment natural effector mechanisms and probable ability to restrict tumor growth (Djeu, 1983). Several bacterial and fungal immunopotentiators have been an object of great interest because of their potential

value in tumor therapy. However the clinical use of these BRMs are restricted because of severe side effects.

The BRM used in the present study has been proven to be a safe product as measured by panel 20 which include liver enzymes. The test was conducted before and at 1 month after treatment with MRN-100 and showed no significant changes in all parameters tested. This property provides additional advantage over other BRMs.

Recognition and lysis of target cells involve a sequence of events (23). First, the NK cell must recognize and bind to target cells. It has been postulated that a receptor on human NK cells recognizes and binds to the target cells. After binding, the NK cell is activated and becomes programmed for target cell lysis. This is followed by release of the cytotoxic factors and, ultimately, lysis of the target cell. The effector cell then recycles and binds to new target cells. The augmented NK activity post-treatment with MRN-100 appears to be due to an increase in the binding of NK cells to target cells. This binding process is a key event in the activation of these cells. Other factors that can cause enhancement in NK function by MRN-100 was the increased numbers of NK cells.

Previous studies have indicated that NK cells are not a homogeneous population with respect to surface markers and tumoricidal activity (26-29). Allavena and Ortaldo (29) demonstrated that clones derived from purified preparations of large granular lymphocytes have different functional and antigenic characteristics, supporting the concept of the heterogeneity of NK cell populations. Hence there is substantial evidence showing 2 subsets of NK cells, these are CD16+ and CD56+/CD3-. Data of table 3 showed that treatment with MRN-100 had significant effect on the percentages of NK cell population; 134% and 142% increase in CD16+ and

CD56+/CD3 respectively examined at 1 month after treatment. Data of the present study showed no significant intersex difference in response to the augmentory effect of MRN-100. Data of the present study, while showing a significant induction in NK activity post treatment with MRN-100 in vivo, there was only 15% increase in activity of NK cells cultured with MRN-100 for 16hrs or 3 days. The reason for the difference in in vivo and in vitro studies is not known but could be attributed to

10. Trinchieri G, Perussia B. Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects. *Lab Invest* 1984;50:489-513.
 11. Roder JC, Pross HF. The biology of the human natural killer cell. *J Clin Immunol* 1982;2:249-63.
 12. Goldfarb RH, Herberman RB. Characteristics of natural killer cells as possible mechanisms for their cytotoxic activity. In: Weissman G, ed. *Advances in Inflammation research*; vol 4. New York: Raven Press, 1982:45-72.
 13. Arai S, Yamamoto H, Itoh K, Kumagai K. Suppressive effect of human natural killer cells on pokeweed mitogen-induced B cell differentiation. *J Immunol* 1983;131:651-7.
 14. Herberman RB. NK cells and other natural effector cells. New York: Academic Press, 1982:1167-253.
 15. Golub SH. NK cytotoxicity in interferon treated melanoma patients. In: Herberman RB, ed. *NK cells and other natural effector cells*. New York: Academic Press, 1982:1265-7.
 16. Kusairi NT, Trentin JJ. Natural cell-mediated cytotoxic activity in the peripheral blood of patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 1982;118:568-71.
 17. Kaminski M, Pawinski M, Jablonska S. Increased natural killer cell activity in patients with epidermodysplasia verruciformis. *Arch Dermatol* 1985;121:84-5.
 18. Sibblitt WL, Bankhurst AD. Natural killer cells in connective tissue disorders. *Clin Rheum Dis* 1985;11:507-21.
 23. Roder JC, Kiessling R, Biberfeld P, Anderson B. Target-effector interaction in the natural (NK) cell system. II. The isolation of NK cells and studies on the mechanism of killing. *J Immunol* 1978;121:2509-16.
 26. Ortaldo JR, Sharrow SO, Timonen T, Herberman RB. Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1981;127:2401-9.
 27. Minato N, Reid L, Bloom RB. On the heterogeneity of murine natural killer cells. *J Exp Med* 1981;154:750-2.
 28. Callawaert DM, Lightbody JJ, Kaplan J, Karoszewski J, Peterson PD, Rosenberg JC. Spontaneous cytotoxicity of cultured human cell lines mediated by normal PBL. II. Specificity for target antigens. *Cell Immunol* 1979;42:103-12.
 29. Allavena P, Ortaldo JR. Characteristics of human NK clones: target specificity and phenotype. *J Immunol* 1984;132:2363-9.
20. Kumagai J, Itoh K, Suzuki R, Hinuma S, Saitoh F. Studies of murine large granular lymphocytes. I. Identification of effector cells in NK and K cytotoxicities. *J Immunol* 1982;129:388-94.

Figure Legends

Figure 1. NK activity of four different individuals expressed as number of lytic units at 0 day, 2 wk, and 1 mon during treatment, and 1 mon after cessation of treatment.

二価および三価の鉄酸塩から得られた鉄化合物 MRN-100 による
in vivo ヒトナチュラルキラー (NK) 細胞活性の増強

Mamdooh Ghoneum*

Drew 医科理科大学耳鼻咽喉科、1621E, 120th St., Los Angeles, CA90059

本研究の要旨は、1997年4月12～16日カリフォルニア州サンディエゴで開かれたアメリカ癌研究会の第88回年例会および1996年5月31～6月3日ルイジアナ州ニューオーリンズで開かれた臨床免疫学年例会で報告した。

キーワード：MRN-100、ナチュラルキラー細胞、リンパ球、活性

(脚注) *連絡先

要約

ヒトナチュラルキラー (NK) 細胞活性に対する MRN-100 の効果を測定した。MRN-100 は二価および三価の鉄酸塩から得られた鉄化合物である。対照群の健康なヒト 12 人には MRN-100 を 1 日 1ml/kg の濃度で投与し、投与後 0 日、2 週および 1 ヶ月に採血した。末梢血リンパ球 NK 活性は、腫瘍細胞系 K562 を標的細胞として 4 時間 ⁵¹Cr 放出アッセイにより測定した。MRN-100 投与は NK 活性を増強することが示された：有意増加（オーバーシュート）は早くも 2 週目から見られ、1 ヶ月後に最大となった。NK 活性は投与中止後 3～4 週で正常レベルに戻った。MRN-100 投与開始後の NK 細胞活性の変化は、エフェクター／標的細胞 (E/T) 比と逆相関していた；すなわち E/T 比が 12:1、12.5:1、50:1、100:1 のとき NK 細胞活性はそれぞれ 209%、193%、171%、177.7%となった。*in vitro* 試験では、末梢血リンパ球を MRN-100 と共に 16 時間および 3 日間培養したときその NK 活性は対照の未処置細胞とくらべて有意に変化していなかった。MRN-100 が NK 活性を増強する機序を検討した。フローサイトメリー分析を行なうと、投与群では未投与対照群にくらべて NK 細胞サブセット細胞数が顕著に増加していた。同様に、MRN-100 処理した NK 細胞では標的腫瘍細胞への結合能が増加していた。私たちは MRN-100 が強力な生体応答調節剤であり癌化学療法に有用かもしれないと結論した。

序

過去 10 年間に私たちの癌免疫病理に関する知識は大きく増加した。免疫学的解明が進むにつれて、免疫調節剤または生物学的応答調節剤 (BRM) を用いて免疫系の機能成分を調節しようとする試みがなされるようになった。いくつかの自然 BRM は、特定の免疫応答成分の活性を調節することにより癌細胞またはウイルス感染と戦い破壊する。

免疫監視の理論は、その前提として免疫エフェクターは自然に発生する悪性腫瘍細胞を認識し破壊する能力をもつと仮定する。腫瘍は癌化した細胞が宿主の免疫防禦機構を逃れたときに発生するのかもしれない。NK 細胞を活性化する免疫療法は癌治療に重要な改善をもたらす可能性がある。

最近、私たちはマウスおよびヒト実験により (*原稿ブランク) が発癌抑制および抗腫瘍作用をもつことを示した。マウス実験で得られた結果は MGN-3 が強力な免疫調節活性をもつことを示している。さらにヒト実験でも、NK 細胞活性の上昇およびそれと密接に相関する腫瘍関連抗原量の有意な減少が見られた。

本研究では、私たちは末期癌患者 10 人に MGN-3 と呼ばれる新しい BRM を投与しその NK 免疫調節機能を検索する。

はじめに

生物学的応答調節剤 (BRM) はナチュラルエフェクター機構を増強しおそらく腫瘍増殖を制限する能力をもっているため、かなり注目を集めてきた(Djeu,1983)。いくつかの細菌または真菌由来免疫強化剤は腫瘍治療剤としての可能性のため大きな興味の対象となった。しかしこれら BRM には強い副作用があり、臨床的に使うことは難しい。

NK 細胞はさまざまな免疫機能をもっており、絶好の治療薬となる可能性を秘めている。インターロイキン 2 (IL-2) は、*in vitro* でも *in vivo* でも末梢血中の NK 活性を促進することが示された。このようにして活性化された NK 細胞は、新鮮で未培養のヒト腫瘍および色々な腫瘍細胞系を含むより広範囲の腫瘍に対し細胞溶解能を示す(11,12)。活性化 NK 細胞はリンホカイン活性化キラー (LAK) 細胞と定義されている。IL-2 と LAK 細胞は共に癌の養子免疫療法剤として用いられてきた(13);しかし進行癌患者に対する IL-2 の使用結果は期待のもてるものだったと報告されているものの(14-16)、全体として IL-2 の臨床効果はその強い副作用のため不十分なものとなっている。

ナチュラルキラー現象は腫瘍細胞の増殖および播種に対する宿主の防禦手段であることを示唆するデータはますます増加している(4-6)。NK細胞は腫瘍に対する自然抵抗を仲介する能力をもち、免疫監視に重要な役割をはたしている可能性がある(7,8)。それゆえNK活性を増強またはこれに影響する因子は悪性腫瘍に対する抵抗に関連してくる。私たちはこの論理に基づいて、著明な副作用のない新しい免疫調節剤MRN-100の*in vivo*ヒトNK細胞活性増強能をテストした。その結果、MRN-100は経口投与開始の2週間後には早くもNK活性を増強し、この作用は1月後には最大となった。一方、MRN-100投与を中止するとNK活性は正常に戻った。

(P 6/23)

材料および方法

ヒト被験者

健康なヒト12人(女6、男6)を対象とした。年齢は34才から53才、平均44才である。被験者は本試験前の少なくとも2週間、薬剤またはビタミンなどを一切摂取しなかった。いずれも慢性疾患の既往歴はない。2ヶ月にわたる試験期間中、女性は無月経とし、経口避妊薬を服用しなかった。これらはNK細胞活性レベルに影響することがあるからである。

MRN-100 および投与方法

MRN-100は二価および三価の鉄酸塩から得られた鉄化合物であって、日本、東京のACM社から提供された。被験者全員にMRN-100液を1日1ml/kgの割合で経口投与し、被験者から1人あたり10~15mlの血液を次の時点で採取した；投与後0日、2週、1ヶ月、投与中止後3~4週目。

完全培地 (CM)

完全培地 (CM) はRPMI-1640に10%胎仔ウシ血清および1%抗生物質(ペニシリン100Uおよびストレプトマイシン100 μ g/ml)を添加して調製した。

腫瘍細胞系

標的としてヒト赤白血病細胞系K562を用いた。

(P 7/23)

末梢血リンパ球 (PBL) の調製

PBLは新鮮なヘパリン化末梢血から、フィコール-ハイバック密度勾配遠心法により調製した。リンパ球はハンクス液(HBSS)で3回洗浄し、CM中に 10×10^6 /mlの濃度となるよう再懸濁した。

MRN-100 存在下での PBL の培養

健康対照ヒト被験者からの PBL は CM 中で 1×10^6 /ml の濃度となるよう調整し 10% (v/v) MRN-100 存在下で 16 日、20% (v/v) MRN-100 存在下で 3 日間培養した。ついで PBL を 2 回洗浄し、エフェクター／標的 (E/T) 比 100:1 として NK 活性の測定を行った。

^{51}Cr 放出アッセイによる NK 細胞活性の測定

NK 活性は標準的な 4 時間 ^{51}Cr 放出アッセイによって測定した。簡単に述べると、CM 0.1 ml に懸濁した 1×10^4 の ^{51}Cr 標識標的腫瘍細胞を 96 ウェルのマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに注ぐ。次にエフェクター細胞を 4 枚組のプレートに分注して、E/T 比が 12:1、25:1、50:1、100:1 となるように調節する。プレートは 4 時間培養 (37°C) 後遠心分離し (1400 rpm、5 分)、各ウェルから上清液 0.1 mL を採取して、これをガンマカウンター (Beckmann G50、Beckmann Instruments) で計測する。

放出アイソトープの比率は次の式によって算出する：

$$\text{溶解率\%} = \frac{\text{放出期待値} - \text{自然放出値}}{\text{総放出値} - \text{自然放出値}} \times 100$$

各標的細胞からの自然放出 (SP) は総放出の 8~10% を超えない程度であった。総放出は、指定ウェルにトリトン X-100 (Sigma Chemical Co.) 0.1 mL を添加することにより測定した。

(P 8/23)

溶解単位 (LU)

溶解単位 (LU) はエフェクター滴定曲線から計算したが、1LU は K562 を 20% 溶解させるに必要なエフェクター細胞の数と定義した。この連続 NK 細胞傷害活性アッセイは、再現性ある NK テストのための基準に基づいており、関連するエラーを最小限とすることを目的としている(17)。

NK サブセット

NK 細胞サブセットの計測は、各被験者からの PBL を用いて基線値を得た後、MRN-100 投与後に行った。ソフトウェア式 (Quad Stat: Coulter) と共に、前方および右角散乱光および 2 色の識別ができる単一レーザーフローサイトメーター (Epics Profile: Coulter Epics, Inc., Hialeah, FL) を用いた。単核細胞数は 2 色直接免疫蛍光法によって計測したが、適当なモノクローナル抗体およびフローサイトメトリーを利用した全血染色法を用いた(18)。NK 細胞サブセットの測定には、フルオレセインイソチオシアネート (FITC, DS3FITC) またはフィコエリトリン (PE, CD56-PE) 抱合モノクローナル抗

体 (Coulter Immunology) を選んだ。リンパ球マーカーを監視するために、前方一角散乱光と 90° 散乱光を対比させたヒストグラムのリンパ球集団にビットマップを被せた。各マーカーに対する陽性染色細胞の比率およびそれぞれの表面マーカーに陽性の二重染色リンパ球の比率を測定した。

複合体形成

エフェクター／標的細胞複合体の比率は前報のようにして測定した()。すなわち 12 × 75 mm のガラス管に入れた CM 1 ml 中で 1×10^4 の末梢血リンパ球 (PBL) を 1×10^5 の標的細胞 K562 と共に培養し、130 g で 5 分間遠心して沈降させ、4℃ で 1 時間培養した。沈降物は再懸濁して、細胞遠心塗抹標本を調製し、ギムザ染色して、3 枚 1 組の標本でリンパ球 200 個 (結合および遊離) を数えることにより複合体の比率を計測した。

(P 9/23)

統計学的解析

分散分析 (ANOVA) の SAS 法を用いて次の解析を行った: 1) それぞれの測定における MRN-100 投与前後の効果、2) E/T 比の変化の効果、3) 二つの効果の相互作用。

(P 10/23)

結果

I *in vivo* 試験

1. 様々な E/T 比における NK 活性

MRN-100 を投与すると、2 週目に有意な NK 活性誘導が起こった ($P < 0.001$)。NK 活性とエフェクター／標的細胞 (E/T) 比の関係を見ると、NK 活性増強は E/T 比と逆相関していた。すなわち MRN-100 投与による NK 細胞活性の増加は、E/T 比がより高い 50 および 100:1 のとき (それぞれ 171.2% および 172.7% の増加) にくらべ 12:1 と低いときに最大 (209.8%) となった。

2. LU で表現された NK 活性に対する MRN-100 の効果

図 1 に MRN-100 を投与した被験者における LU で表現された NK 活性の経時変化を示す。試験が複雑なため、5 人の被験者のみで投与前 (0 時)、投与中 (2 週および 1 ヶ月) および投与中止後に NK 活性を測定した。全被験者で投与 2 週目に NK 活性の著明増加が見られ、この増加は 1 ヶ月目に最大となった。MRN-100 誘導 NK 活性は統計的に有意であった ($P < 0.001$)。NK 活性は投与中止から 3~4 週後にほぼ正常レベルとなった。被験者の一人 (C) では NK 活性は投与中止後も高レベルに保たれた。

3. MRN-100 に対する応答の個人差

表 2 に各被験者の NK 活性誘導率を示す。全被験者が MRN-100 に応答して NK 活性の増加を示したが、MRN-100 の免疫増強作用に対する応答には個人差が見られた。被験者は活性増加の程度により 2 群に分けられた：すなわち G1 (50%) 200~350% および G2 (50%) >350% (350~1500) である。

(P 11/23)

4. MRN-100 に対する応答の性差

表 2 のデータは、MRN-100 の免疫増強作用に対する応答に有意な男女差がないことを示す。

5. NK 細胞サブセットの定量

MRN-100 投与開始後の総 NK 細胞数はフローサイトメトリーにより、それぞれ抗 CD16+ および CD56+/CD3-モノクローナル抗体を用いて計測した。表 3 の結果が示すように、MRN-100 投与が総 NK 細胞比率に有意な影響をおよぼし、投与 1 ヶ月目には CD16+ および CD56+/CD3-細胞がそれぞれ基線値にくらべて 134% および 142% 増加していた。

6. 複合体の比率

図 2 は、標的 K562 腫瘍細胞への NK 細胞結合率が基線値 (10%) にくらべて有意に増加 (32%) したことを示す。

II NK 活性に対する MRN-100 の *in vitro* 効果

表 4 に NK 活性に対する MRN-100 の *in vitro* 効果を示す。PBL は濃度 10% (v/v) の MRN-100 の存在下 16 時間、濃度 20% (v/v) の MRN-100 の存在下で 3 日間培養した。

(P 12/23)

考察

本試験は、新製品 MRN-100 のヒト NK 細胞活性に対する *in vivo* 増強作用を調べ、その基礎をなすと思われる機構を検討するため行った。MRN-100 は二価および三価の鉄酸塩から得られた鉄化合物である。

NK 細胞は T および B 細胞と区別される大きな顆粒状リンパ球である。動物実験から、NK 細胞は骨髄で造られ、ある程度まで分化すると思われるものであり(10)、末梢血中単核細胞の約 10~15% を占める。NK 細胞は腫瘍拒絶、免疫監視、感染に対する抵抗および免疫調節に決定的な役割をはたす(11~13)。さらに NK 細胞活性の異常が、悪性黒色腫(15)、アトピー性皮膚炎(16)、疣贅状表皮異形成(17)、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群(18)を含む多くの新生物で認められた(14)。そこで NK

細胞活性を増強する試みが多数行われたが、多くの生体応答調節剤 (BRM) のもつ細胞傷害活性のためそれほど成功していない。今回、私たちは MRN-100 が強力な BRM であってヒト NK 活性を増強すること、および投与を中止すると NK 機能が正常に戻ることを示した。NK 活性増強効果は早くも投与 2 週目に認められ 1 ヶ月目には最大となった。より長期の試験 (結果未提示) では 5 ヶ月という長期間の投与を行ったが、NK 活性が投与の継続によって高レベルに維持されたことが示された。

BRM はナチュラルエフェクター機構を増強しおそらく腫瘍増殖を制限する能力をもっているため、かなり注目を集めてきた (Djeu, 1983)。いくつかの細菌または真菌由来免疫強化剤は腫瘍治療剤としての可能性のため大きな興味の対象となった。しかしこれら BRM には強い副作用があり、臨床的に使うことは難しい。

(P 13,14/23)

本試験で用いた BRM は、肝酵素を含むパネル 20 を用いた測定によって安全な製品であることが証明されている。測定は MRN-100 投与開始前および 1 ヶ月後に行われたが、テスト項目パラメータのいずれにも有意な変化は見られなかった。この性質は、他の BRM にくらべて MRN-100 を優位に立たせるものである。

標的細胞の認識と溶解は一連のイベントからなる (23)。最初に NK 細胞は標的細胞を認識しこれに結合しなければならない。ヒト NK 細胞の表面にある受容体が標的細胞を認識し結合すると考えられている。結合後、NK 細胞は活性化され標的細胞を溶解するためのプログラムが起動する。これに続いて細胞傷害因子が放出され、終局的に標的細胞の溶解がおこる。この後エフェクター細胞はリサイクルされ、新しい標的細胞に結合する。MRN-100 投与による NK 活性の増強は、標的細胞への NK 細胞の結合が増加するためと考えられる。この結合過程が NK 細胞活性化の決定的イベントである。MRN-100 による NK 機能の増強を起こす他の因子としては、NK 細胞数の増加がある。

従来の研究から、NK 細胞集団は表面マーカーおよび腫瘍破壊活性の点で均一でないと考えられる (26-29)。Allavena および Ortaldo (29) は大きな顆粒状リンパ球の精製品から得られたクローンは機能および抗原性がそれぞれ異なっていることを示し、NK 細胞の不均一性という概念を支えた。以来、NK 細胞には 2 つのサブセットがあることを示す証拠が得られている。これらは CD16+ および CD56+/CD3- である。表 3 のデータは、MRN-100 投与が NK 細胞の比率に有意な影響をおよぼすことを示している；投与 1 ヶ月目には、CD16+ および CD56+/CD3- サブセットはそれぞれ 134% および 142% 増加した。また本試験結果は MRN-100 の増強効果に対する応答に有意な性差がないことを示している。本試験結果から、MRN-100 の *in vivo* 投与は有意な NK 活性誘導を起こすが、MRN-100 の存在下で 16 時間または 3 日間培養した NK 細胞は僅か 15% の活性増加を示すのみであることが明らかになった。*in vivo* と *in vitro* 試験の差の理由は不明であるが---に帰せられる (*原文中断)。

参考文献

10. Trinchieri G, Perussia B. ヒトナチュラルキラー細胞：生物学的および病理学的見地から *Lab invest* 1984;50:489-513.
11. Roder JC, Pross HF. ヒトナチュラルキラー細胞の生物学 *J Clin Immunol* 1982;2:249-63.
12. Goldfarbs RH, Herberman RB. ナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性機構としての特徴 「Weissman G 編: 炎症研究の進歩：巻4、New York: Raven Press、1982:45-72」より
13. Arai S, Yamamoto H. PWM 誘導 B 細胞分化に対するヒトナチュラルキラー細胞の抑制効果 *J Immunol* 1983;131:651-7.
14. Herberman RB. NK 細胞および他の自然エフェクター細胞 New York: Academic Press、1982:1167-253.
15. Golub SH. インターフェロン投与黒色腫患者のNK細胞傷害活性. 「Herberman RB 編: NK 細胞および他の自然エフェクター細胞 New York: Academic Press、1982:1265-7」より
16. Kusaimi NT, Trentin JJ. アトピー性皮膚炎患者の末梢血のナチュラルキラー細胞仲介細胞傷害活性 *Arch Dermatol* 1982;118:568-71.
17. Kaminski M, Pawinski M, Jablonska S. 疣贅状表皮異形成患者におけるナチュラルキラー細胞活性上昇 *Arch Dermatol* 1985;121:84-5.
18. Sibbitt WL, Bankhurst AD. 結合組織障害におけるナチュラルキラー細胞活性 *Clin Rheum Dis* 1985;11:507-21.
23. Roder JC, Kiessling R, Biberfeld P, Anderson B. ナチュラルキラー(NK)細胞系における標的-エフェクター相互作用、II. NK細胞の分離および細胞傷害の機序 *J Immunol* 1978;121:2509-16.
26. Ortaldo JR, Sharrow SO, Timonen T, Herberman RB. モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる高度精製ヒトNK細胞の表面抗原の測定 *J Immunol* 1981;127:2401-9.
27. Minato N, Roid L, Bloom RB. マウスナチュラルキラー細胞の不均一性. *J Exp Med* 1981; 154:750-2.
28. Callawaert DM, Lightbody JJ, Kaplan J, Karoszewski J, Peterson PD, Rosenberg JC. 正常PBLに仲介された培養ヒト細胞系の自然細胞傷害活性 II. 標的抗原に対する特異性 *Cell Immunol* 1979;42:103-12.
29. Allavena P, Ortaldo JR. ヒトNKクローンの特性：標的特異性および表現型 *J Immunol* 1984;132:2363-9.
20. Kumagai J, Itoh K, Suzuki R, Hinuma S, Saitoh F. マウス顆粒状大リンパ球の研究 I. NK および K 細胞傷害におけるエフェクターとしての確定 *J Immunol* 1982;129:388-94.