

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007 年度～2009 年度  
課題番号：19591493  
研究課題名（和文）  
腫瘍組織における炎症反応制御を目的とした新しい分子標的免疫療法の開発  
研究課題名（英文）  
Novel therapeutic target for regulation of inflammation in tumor microenvironment  
研究代表者  
岩橋 誠（IWAHASHI MAKOTO）  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70244738

## 研究成果の概要（和文）：

IL-17, IL-21, IL-23 mRNA の発現は腫瘍組織において正常組織より有意に高発現であった。IL-17 mRNA と IL-21 mRNA, IL-23 mRNA の発現に強い相関を認めた。IL-17 mRNA は腫瘍の深達度, stage の進行が増すにつれ高発現であった。腫瘍組織において IL-17 mRNA 高発現群では好中球浸潤を伴う慢性炎症、および新生血管の増生が高度であった。IL-17 は腫瘍の増殖、進展に関与していることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Expression of IL-17, IL-21 and IL-23 mRNA was found to be significantly up-regulated in tumor tissues compared with adjacent normal tissues. The expression level of IL-17 mRNA correlated with that of IL-21 and IL-23 mRNA in tumor tissue. The expression level of IL-17 mRNA in gastric tumors was associated with the depth of the tumors, suggesting that IL-17 obviously was related to tumor progression.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科総論

## 1. 研究開始当初の背景

消化器癌においては手術手技の確立、新規抗癌剤登場によりその予後は近年、飛躍的に改善された。とはいえ、高度のリンパ節転移、腹膜転移、遠隔転移を有する進行消化器癌においては治癒が望める症例は極めて少なく有効な治療法が未だ無いのが現状である。このような患者に対して、細胞免疫療法、ペプチドワクチン療法、樹状細胞療法などの免疫療法の臨床研究が開始されて久しいが、免疫反応は認めるものの、腫瘍縮小を認めた症例はほとんど無い。我々も、1988年より活性化腫瘍浸潤リンパ球による養子免疫療法や固層化 CD3 抗体刺激 CTL を用いた養子免疫療法、さらには 1998 年より CEA ペプチド添加樹状細胞を用いた癌ワクチン療法を行ってきたが満足のいく結果が得られなかった。その理由として、特にワクチン療法では進行癌患者では Th1/Th2 バランスが明らかに Th2 に shift しており免疫抑制の状態にあるため、腫瘍特異抗原ペプチドを用いたワクチン療法を行っても、抗腫瘍免疫応答が誘導されないと考えられる。これを克服するためより強力に効果的なワクチン療法の開発とともに、免疫抑制状態からの離脱・回復が重要な課題である。

従来から腫瘍局所における慢性炎症が腫瘍増殖に関連する可能性が示唆されていたが、本年に入り、それを直接証明する結果が報告された (Nature 442:461-465, 2006)。この報告ではヒトの多くの腫瘍組織において腫瘍局所に存在する (浸潤する) 樹状細胞 (dendritic cell; DC) が IL-23 を強く発現しており、これにより炎症が惹起され、好中球浸潤、腫瘍血管新生および matrix metalloprotease MMP 9 の高発現をもたらし、さらに驚くべき事に同時に CD8+ T 細胞の浸潤を著明に抑制するというものであった。またマウスモデルにて同様の現象を確認されており、IL-23 ノックアウトマウスでは CD8+ T 細胞の浸潤を著明に認め、CTL の活性化の指標とされる Perforin, Fas L, Granzyme A, B の発現が増強され、それとともに IL-23 receptor ノックアウトマウスでは腫瘍増殖が明らかに抑制されていた。この現象は抗 IL-23 抗体でも同様に認められた。つまり腫瘍局所において産生される IL-23 が腫瘍増殖における最適な環境を提供するばかりでなく CD8+CTL の局所への浸潤を抑制している

ため、たとえ優れた腫瘍抗原ペプチドを用いたワクチン療法にて腫瘍特異的 CTL が誘導できたとしても抗腫瘍効果を発揮するにいたっていない可能性が考えられる。一方、腫瘍局所において内在性制御性 CD4 陽性 T 細胞 (regulatory T cell: T<sub>reg</sub> 細胞) が抗腫瘍免疫応答においては抑制性に働くことが明らかとなっているが、IL-23 は T<sub>reg</sub> 細胞由来の TGF- $\beta$  1 とともに naïve CD4+ T 細胞から Th17 の分化誘導に関与することが明らかにされた (Nature 441:231-234, 2006)。Th17 は IL-23 receptor を有しており、IL-17 を介して炎症反応を惹起する重要なサイトカインであり、様々な免疫抑制機序が相互に関連しつつ癌細胞は生体の免疫反応を巧みにかわしているものと考えられる。したがって、この癌患者における IL-23 を中心とする炎症反応の惹起、抗腫瘍免疫の抑制の制御こそが癌ワクチン療法の成否において極めて重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

ヒト癌組織における IL-23 を中心とする炎症反応と免疫応答との関連を検討し、その制御を行うことにより進行消化器癌の癌免疫療法の有効性を高めることを究極の目的として以下の検討をおこなう。胃癌腫瘍組織における IL-17mRNA、IL-23mRNA, IL-21mRNA, IL-6 mRNA, TGF- $\beta$  1mRNA の発現を real time RT-PCR 法にて検討する。腫瘍組織および正常組織における発現量を比較検討する。その発現量と臨床病理学的因子との関連を検討する。また免疫組織学的検討により IL-17 産生細胞の同定とその分布を検討するとともに腫瘍局所における血管新生、好中球浸潤を定量的に評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

2005 年より 2007 年に和歌山県立医科大学第 2 外科にて根治切除を施行し得た、術前治療歴のない病理組織学的に確定診断された胃癌 82 例を対象とした。

### (2) 組織からの RNA の抽出, cDNA の合成

胃癌摘出標本より 5mm 角で採取した正常組織、腫瘍組織を Homogenate した後 RNeasy Mini Kit (QIAGEN) にて total RNA を抽出し、Reverse Transcription system (Promega) にて cDNA を合成した。

(3) Real-time RT-PCR 法による mRNA の定量

IL-17 mRNA, IL-21 mRNA, IL-23 mRNA, TGF- $\beta$  mRNA, IL-6 mRNA, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の primer, hybridization probe および検量線用人工 RNA 作成し(日本遺伝子研究所), Light Cycler® (Roche Diagnostics) を用いて, real time RT-PCR を行い、人工 RNA を標準としてコピー数で定量した。IL-17 mRNA, IL-21 mRNA, IL-23 mRNA, TGF- $\beta$  mRNA および IL-6 mRNA の定量値は GAPDH mRNA との発現比にて解析した。

(4) IL-17 mRNA の発現量と IL-21 mRNA, IL-23 mRNA 発現量との相関についての検討

正常組織, 腫瘍組織での IL-17 mRNA, IL-21 mRNA, IL-23 mRNA, TGF- $\beta$  mRNA および IL-6 mRNA の発現量を比較した。また、腫瘍組織での IL-17 mRNA の発現量と IL-23 mRNA, IL-21 mRNA の発現量との相関について検討した。統計解析は Mann-Whitney U 検定, Spearman's test にて行い,  $p < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。

(5) 腫瘍局所における免疫組織化学染色法による IL-17 産生細胞の同定

胃癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋固定標本を作製し、蛍光色素抗体法にて免疫組織化学染色を行った。一次抗体として mouse Anti-Human CD4 (DAKO; dilution x50), rabbit Anti-Human IL-17 (DAKO; dilution x100) を用い、DAPI にて核染色を行った。

(6) 免疫組織化学染色法による IL-17 および IL-21 産生細胞の分布の検討

上記同様に作製した腫瘍組織標本および正常胃粘膜標本において酵素標識ポリマー法 (DAKO; ENVISION kit) にて免疫組織化学染色を行った。一次抗体として rabbit Anti-Human IL-21 (DAKO; dilution x100), rabbit Anti-Human IL-17 (DAKO; dilution x100) を用いた。

(7) 免疫組織化学染色による血管新生および好中球浸潤の検討

一次抗体として新生血管は mouse Anti-Human CD34 (DAKO; dilution x50) を用いて、また好中球は mouse Anti-Human CD66b (BD Pharmingen; dilution x100) を用いて酵素標識ポリマー法にて染色した。壊死、潰瘍形成のない視野において、弱拡大にて陽性細胞高発現部位にて、各 x200, x400 の倍率、5 視野の陽性細胞数を画像解析ソフト

(WinRoof) を用いて定量し、その平均値にて評価した。IL-17 mRNA 定量値を中央値にて高発現群、低発現群の 2 群に分け、統計解析は Mann-Whitney U 検定にて解析した。

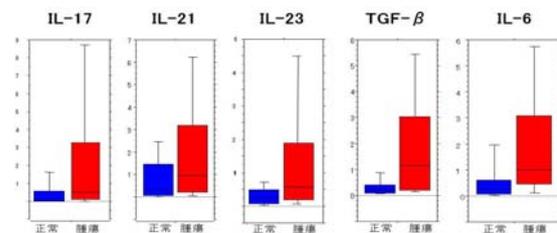
(8) IL-17 mRNA 発現量と臨床病理学的因子との関連についての検討

統計解析は Mann-Whitney U 検定, Kruskal-Wallis test にて行い,  $p < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。

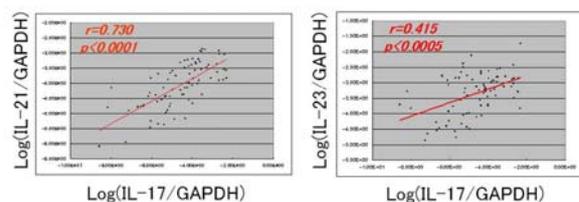
#### 4. 研究成果

(1) 胃癌腫瘍組織における IL-17 mRNA, IL-21 mRNA, IL-23 mRNA, TGF- $\beta$  mRNA, IL-6 mRNA の発現

胃癌腫瘍組織において IL-17 mRNA, IL-21 mRNA, IL-23 mRNA, TGF- $\beta$  mRNA, IL-6 mRNA の発現はいずれも正常組織に比較して有意に高発現であった ( $p < 0.0005$ )。

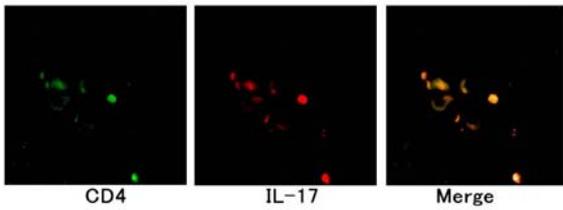


また、IL-17 mRNA の発現は IL-21 mRNA の発現と強い相関関係を認めた ( $r = 0.730$ ,  $p < 0.0001$ )。一方、IL-17 mRNA の発現と IL-23 mRNA 発現との間には弱い相関 ( $r = 0.415$ ,  $p < 0.0005$ ) を認めるのみであった。



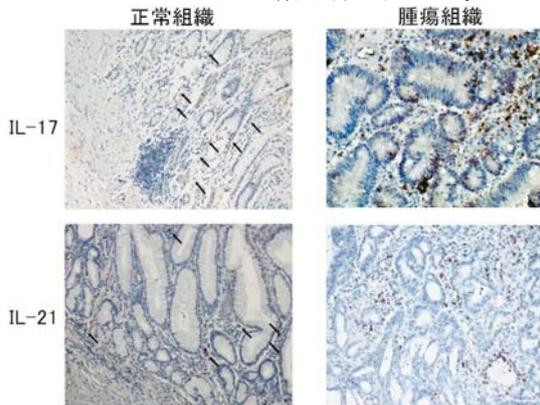
(2) IL-17 産生細胞の同定

胃癌腫瘍局所において、蛍光免疫組織化学染色法にて腫瘍に浸潤する CD4 陽性リンパ球に一致して IL-17 の陽性像を認めた。



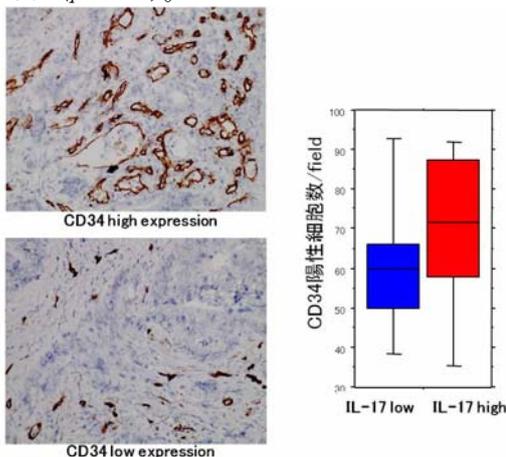
(3) IL-17 および IL-21 産生細胞の分布

正常胃粘膜において IL-17 および IL-21 陽性細胞は主に粘膜固有層に存在するリンパ球にわずかに認めるのに対し、腫瘍組織においては癌細胞周囲の間質に浸潤する多数のリンパ球にそれらの陽性像を認めた。

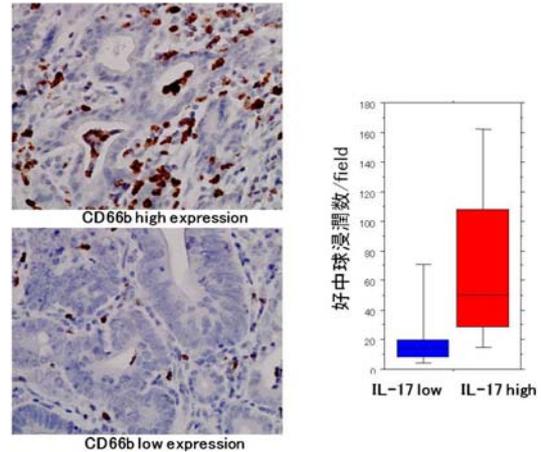


(4) IL-17 mRNA の発現量と腫瘍内微小環境における血管新生、好中球浸潤の評価

腫瘍局所において IL-17mRNA 高発現群では低発現群に比較して有意に新生血管の増加を認めた ( $p < 0.01$ )。

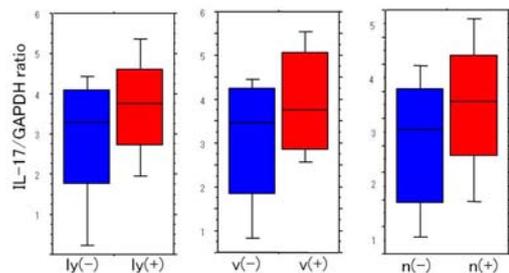


また、腫瘍局所において IL-17mRNA 高発現群では低発現群に比較して有意に好中球浸潤数の増加を認めた ( $p < 0.0001$ )。

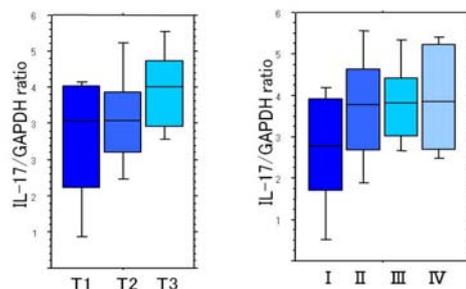


(5) 胃癌腫瘍組織における IL-17mRNA の発現量と臨床病理学的因子との関連

IL-17 mRNA の発現は静脈浸潤陽性群、リンパ管浸潤陽性群、リンパ節転移陽性群において陰性群に比べ有意に高発現であった ( $p < 0.005$ ,  $p < 0.05$ )。



さらには、深達度、stage の進行に伴い有意に高発現であった ( $p < 0.005$ ,  $p < 0.05$ )。



胃癌腫瘍局所に浸潤する CD4 陽性 T 細胞である Th17 の IL-17 産生の増加により好中球浸潤を伴う慢性炎症、および新生血管の増生を惹起することにより腫瘍局所での増殖、進展を促進することが示唆された。胃癌腫瘍局所における IL-21 の発現を抑制することで IL-17 による腫瘍の増殖、進展を制御できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Ishida K, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Yokoyama S, Iida T, Naka T, Nakamura Y, Yamaue H. High CCR7 mRNA expression of cancer cells is associated with lymph node involvement in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol, 査読有り, 34; 2009, 915-922
- ② Kikkawa K, Fujii R, Kuramoto T, Inagaki T, Kohjimoto Y, Iwahashi M, Yamaue H, Hara I. Dendritic cells with transduced surviving gene induce specific cytotoxic T lymphocytes in human urologic cancer cell lines. Urology, 査読有り, 74; 2009, 222-228
- ③ Ojima T, Iwahashi M, Nakamura M, Matsuda K, Nakamori M, Ueda K, Naka T, Katsuda M, Miyazawa M, Iida T, Yamaue H. Streptococcal preparation OK-432 promotes the capacity of dendritic cells (DCs) to prime carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocyte responses induced with genetically modified DCs that express CEA. Int J Oncol, 査読有り, 32; 2008, 459-466
- ④ Naka T, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Nakamori M, Ueda K, Katsuda M, Miyazawa M, Ishida K, Yamaue H. Cancer Sci, 査読有り, 99; 2008, 407-413

[学会発表] (計8件)

- ① 飯田武, Tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup>T cells secreting IL-17 Th17 promotes tumor growth in human gastric cancer. 第68回日本癌学会定期学術総会, 2009.10.3, 横浜
- ② 飯田武, Expression of interleukin-17 were associated with tumor progression in gastric cancer. 第67回日本癌学会定期学術総会, 2008.10.28, 名古屋
- ③ 飯田武, Distribution of regulatory T cells in tumor draining lympho node in patients with gastric cancer. 第66回日本癌学会定期学術総会, 2007.10.5, 横浜

[図書] (計1件)

岩橋誠, メディカルレビュー社, Cancer Treatment Navigator, 2008, 38-39

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩橋 誠 (IWAHASHI MAKOTO)  
和歌山県立医科大学  
医学部・講師  
研究者番号: 70244738

### (2) 研究分担者

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)  
和歌山県立医科大学  
医学部・教授  
研究者番号: 20191190

中森 幹人 (NAKAMORI MIKIHITO)  
和歌山県立医科大学  
医学部・講師  
研究者番号: 10322372

中村 公紀 (NAKAMURA MASAKI)  
和歌山県立医科大学  
医学部・助教  
研究者番号: 80364090

松田 健司 (MATSUDA KENJI)  
和歌山県立医科大学  
医学部・助教  
研究者番号: 30398458

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: