

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19591856
 研究課題名 (和文) マウス腎癌ミニ移植モデルにおけるメカニズムの解析と抗腫瘍効果の増強に向けた検討
 研究課題名 (英文) Mechanistic analysis of nonmyeloablative allogeneic cell therapy for murine renal cancer and enhancement of antitumor effects
 研究代表者
 江藤 正俊 (MASATOSHI ETO)
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：90315078

研究成果の概要：我々は既報のマウス腎癌に対するミニ移植モデル(Cancer Res, 65:10032, 2005)に続いて、今回、マウス膀胱癌に対するミニ移植モデルを確立した。末梢血および腫瘍局所におけるドナー細胞の実際の動きをより詳細に検討した結果、ドナー由来の CD4 陽性 T 細胞が抗腫瘍効果の誘導に重要であることを証明した。また、ミニ移植において、腫瘍抗原ペプチドを用いたドナーの前感作を行い、腫瘍抗原特異的な免疫反応を加えることで、抗腫瘍効果の増強が誘導できることを示し、臨床応用の可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：renal cell carcinoma, bone marrow transplantation, mixed chimerism, tumor antigen peptide, GVT effect

1. 研究開始当初の背景

(1) 分子標的薬の出現で腎細胞癌に対する治療は一つの転換期を迎えつつある。しかし、分子標的薬はこれまでの免疫療法を否定するものではなく、分子標的薬とサイトカインの併用による相乗効果も報告されつつある。また分子標的薬無効例に対しては次なる治療が必要であり、我々の教室では今後も骨髄非破壊的同種移植(ミニ移植)を腎細胞癌に対

する最終治療と位置づけている。

(2) 白血病に対する骨髄移植で、GVHD が発生した患者の方が再発率が低いことなどから、Graft-versus-leukemia 効果(GVL 効果)が注目され、固形腫瘍に対しても同様の免疫反応が期待されることから、より広範に移植片対腫瘍効果(Graft-versus-tumor 効果: GVT 効果)と称されている。この GVT 効果を前面に出し、移植の安全性も高めた治療法が、

ミニ移植であり、NIHのChildらが転移性進行腎癌患者に行ったミニ移植で50%以上の奏効率を報告している。

(3) ミニ移植は臨床の現場で考案されてきた治療であるため、基礎的研究は少なく、特に腎癌については皆無であったが、我々はマウス腎癌に対するミニ移植モデルを確立に成功した(Cancer Res, 65:10032, 2005)。

(4) 今回、このモデルを用いて、ミニ移植におけるメカニズムの解析と抗腫瘍効果の増強に向けた検討を進めるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的はこのモデルを用いて

(1) 末梢血におけるキメラの程度と抗腫瘍効果における意義についての検討

(2) T細胞レセプター(TCR)を用いた本モデルのメカニズムの解析

(3) 腫瘍抗原ペプチドを用いたドナーの前感作による抗腫瘍効果の増強についての検討以上の3つを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 末梢血におけるキメラの程度と抗腫瘍効果における意義についての検討はBALB/cマウスに同系の腎癌であるRenca細胞を皮下投与して、腫瘍の生着を確認した上で処置を開始した。ヒトのミニ移植の時と同様にMHC(主要組織適合抗原)が一致するDBA/2マウスの脾細胞(SC)と骨髄細胞(BMC)を静脈内投与して、その2日後にcyclophosphamide(CP)を腹腔内投与した。CPの翌日にドナーのリンパ球(LNC)を追加投与した。末梢血におけるドナー由来細胞の割合をフローサイトメトリーにて経時的に解析した。同時に本モデルの場合と同様のマウスの組み合わせを用いて、放射線照射を用いた骨髄移植モデルも作成し、放射線のdoseを変えることでさまざまなレベルの骨髄キメラを作成した。それらにおいてもRencaに対する抗腫瘍効果を検討し、本モデルと比較することで、キメラ状態と抗腫瘍効果について検討した。

(2) T細胞レセプター(TCR)を用いた本モデルのメカニズムの解析については、C3H/Heマウスに同系の膀胱癌であるMBT2を皮下投与して、ドナーとしてAKR/Jの細胞を用いるこ

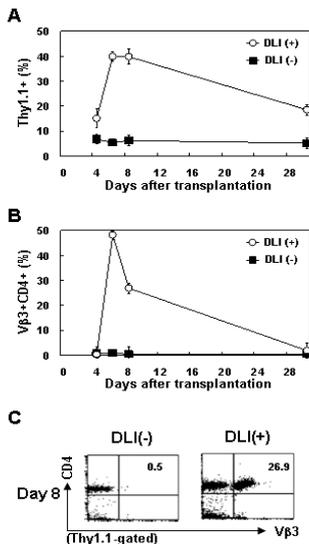
とで、マウス膀胱癌に対するミニ移植モデルを作成した。この場合、ドナー由来T細胞はThy1.1を用いてフォローでき、レシピエントに反応する細胞としてT細胞レセプターV₃をモニターすることで、末梢血および腫瘍局所におけるドナー細胞の実際の動きをより詳細に検討できるので、膀胱癌に対する抗腫瘍効果と合わせて検討した。この際、レシピエント末梢血におけるサイトカイン濃度も測定し、フローサイトメトリーにてサイトカイン発現細胞の解析も施行して、実際にサイトカインを産生している細胞を同定した。

(3) 腫瘍抗原ペプチドを用いたドナーの前感作による抗腫瘍効果の増強については、マウスの組み合わせは腎癌の場合と全く同じだが、癌細胞についてはマウス腎癌細胞(Renca)の腫瘍抗原ペプチドが同定されていないため、腫瘍抗原ペプチド(AH1:SPSYVYHOF)が同定されているマウス大腸癌coln26(CT26)を使用した。まずCT26に対するミニ移植の抗腫瘍効果を検討し、次に不活化(MMC処理)CT26あるいはAH1ペプチドでドナーを前感作し、この前感作ドナーのリンパ球輸注を行い、抗腫瘍効果の増強を検討した。さらにはAH1ペプチドにて前感作されたドナーのリンパ球輸注を行って、腫瘍を拒絶したマウスの脾細胞をAH1ペプチドで再刺激して、CT26に対する細胞障害活性も検討した。

4. 研究成果

(1) 末梢血におけるキメラの程度と抗腫瘍効果における意義についての検討においては、まず、6Gy以上の放射線照射でドナー由来の完全キメラを誘導できたが、わずかな抗腫瘍効果が誘導できるのみであった。一方、CPを用いた群では、ドナー由来のキメラの割合は低いものの、著明な抗腫瘍効果が誘導できた。移植後15日目の末梢リンパ節細胞数の回復を調べたところ、放射線照射群ではまだほとんど回復していなかったのに対して、CP群では無処置群と同等レベルまで回復していた。以上の結果より、ミニ移植における抗腫瘍効果の誘導に完全キメラの誘導は必須ではなく、ホストの免疫抑制状態の回復が重要であることが示された。

(2) T細胞レセプター(TCR)を用いた本モデルのメカニズムの解析においては、ドナーリンパ球輸注直後にレシピエント反応性CD4陽性V₃陽性T細胞が著明に増殖し(次頁図)、



レシピエント末梢血における IFN- γ の濃度も上昇し、フローサイトメトリーによる IFN- γ 発現細胞の解析ではドナー由来の CD4 陽性 T 細胞が重要であることが判明した。さらに腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析では徐々にレシピエント由来の CD8 陽性 T 細胞の割合が上昇し、レシピエント由来の MBT2 特異的な細胞障害性 T 細胞の存在が確認できた。このように CD4 陽性 T 細胞から CD8 陽性 T 細胞への経時的な流れが抗腫瘍効果の誘導維持に重要であることが示された。

(3) 腫瘍抗原ペプチドを用いたドナーの前感作による抗腫瘍効果の増強については、まず CT26 に対するミニ移植の抗腫瘍効果を検討したところ、腎癌の場合と同様に確認できた。次に不活化 (MMC 処理) CT26 あるいは AH1 ペプチドでドナーを前感作し、この前感作ドナーのリンパ球輸注を行い、抗腫瘍効果の増強を検討したところ、いずれの前感作の場合も抗腫瘍効果の増強が確認できた。さらには AH1 ペプチドにて前感作されたドナーのリンパ球輸注を行って、腫瘍を拒絶したマウスの脾細胞を AH1 ペプチドで再刺激して、CT26 に対する細胞障害活性も検討したところ、CT26 特異的な細胞障害活性が認められた。以上の結果は、ミニ移植において、アロの免疫反応に腫瘍抗原特異的な免疫反応を加えることで、抗腫瘍効果の増強が誘導できることを示しており、臨床応用の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3件)

(1) Kamiryo Y, Eto M, Yamada H, Yajima T, Harano M, Takeuchi A, Tatsugami K, Hamaguchi M, Naito S, Yoshikai Y. Donor CD4 T cells are critical in allogeneic stem cell transplantation against murine solid tumor. *Cancer Res* 2009, in press 査読有

(2) Hamaguchi M, Eto M, Kamiryo Y, Takeuchi A, Harano M, Tatsugami K, Teshima T, Harada M, Yoshikai Y, Naito S. Allogeneic cell therapy from immunized donors with tumor antigen peptide enhances the antitumor effect after cyclophosphamide-using nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in mice. *Cancer Sci* 100:138-144, 2009. 査読有

(3) Eto M, Kamiryo Y, Takeuchi A, Harano M, Tatsugami K, Harada M, Kiyoshima K, Hamaguchi M, Teshima T, Tsuneyoshi M, Yoshikai Y, and Naito S. Posttransplant administration of cyclophosphamide and donor lymphocyte infusion induces potent antitumor immunity to solid tumor. *Clin Cancer Res* 14:2833-2840, 2008. 査読有

[学会発表](計2件)

(1) Eto M, Vaccination of donors with tumor antigen peptide enhances the antitumor effects on renal tumors in recipient mice with nonmyeloablative allogeneic hemopoietic cell transplantation. *American Urological Association Annual Meeting 2008*, 2008年5月18日, Orlando, USA

(2) Eto M, Vaccination of donors with tumor antigen peptides enhances the antitumor effect on solid tumors in recipient mice with nonmyeloablative allogeneic hemopoietic cell transplantation. *American Urological Association Annual Meeting 2007*, 2007年5月20日, Anaheim, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

江藤 正俊 (ETO MASATOSHI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：90315078

(2)研究分担者

立神 勝則 (TATSUGAMI KATSUNORI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：90380617

原野 正彦 (HARANO MASAHIKO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：90380451

吉開 泰信 (YOSHIKAI YASUNOBU)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：90158402

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：