

平成22年 6月 7日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20015016

研究課題名（和文） 樹状細胞機能の理解に基づく腫瘍特異的免疫誘導法の開発

研究課題名（英文） Development of tumor-specific immunotherapy based on the analysis of functions of dendritic cells

研究代表者

田原秀晃（TAHARA HIDEAKI）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70322071

研究成果の概要（和文）：生体の免疫反応の種類と程度を司る樹状細胞の機能を十分に解析し、その結果を利用すれば、がん免疫療法を飛躍的に発展させるための糸口が見出せると考えられる。そこで本研究においては、樹状細胞の分泌するサイトカインである IL-23 および apoptosis 細胞の貪食に関わる因子である Milk Fat Globule EGF-8(MFG-E8)に関して検討した。その結果、IL-23 の全身投与、ならびに、抗 MFG-E8 阻害抗体と既存の抗がん剤や放射線治療その併用が、強い抗腫瘍効果を持つことを見出し、臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Dendritic cells (DCs) are the immune cells which direct the immune responses of the host. It has been conceived that the examination on the DCs could lead to the development of effective immunological therapy against cancer. In this project, we have found using mouse tumor systems that systemic administration of IL-23, a cytokine secreted by DCs, and blocking antibody against Milk Fat Globule EGF-8(MFG-E8) could be effective cancer immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	0	7,800,000
2009年度	7,800,000	0	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,600,000	0	15,600,000

研究分野：がん治療

科研費の分科・細目：がん特定研究

キーワード：免疫学、がん治療、樹状細胞、サイトカイン、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、樹状細胞が特異的免疫を誘導する種々の機構を *in vitro* ならびに *in vivo* のモデル・システムを用いて解析し、その知見を応用した種々の治療モデル実験を行ってきた。特に、樹状細胞の分泌するサイ

トカインの中でも IL-12 と同様に重要であると最近認知されてきた IL-23 の抗腫瘍免疫誘導作用については、*In vitro* electroporation (IVE)法を用いた全身的投与方法を用いて明らかにしてきた。

2. 研究の目的

樹状細胞は、自然免疫と獲得免疫の橋渡し役を担い、生体の免疫反応の種類と程度を司る専門的抗原呈示細胞である。この細胞群の機能をさらに深く検討し、その結果を利用すれば、現在進められている様々な癌関連抗原を用いた癌免疫療法を発展させるための糸口が見出せると考えられる。そこで本研究においては、樹状細胞の分泌するサイトカインであり、我々がその抗腫瘍効果と機序について最近報告した IL-23 を中心に検討を進め、効果的な癌免疫療法の開発へとつなげることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

1) 樹状細胞の分泌するサイトカインである IL-23 の投与による抗腫瘍免疫反応誘導の機序ならびに治療への応用に関して、マウス皮下腫瘍モデルならびに肺転移モデルなどにおける治療として IL-23 cDNA を In vivo electroporation (IVE) 法により筋肉内に遺伝子導入して IL-23 蛋白を全身投与し、治療されたマウスのリンパ節ならびに脾臓における抗腫瘍免疫反応の性質と程度を検討した。

2) IL-23 投与などにより誘導される Th17 反応の抗腫瘍効果への関与に関して、IL-17 遺伝子ノックアウト・マウスを用いて in vitro ならびに In vivo にて検討した。

3) MFG-E8 の機能を人為的に制御する方法として、抗 MFG-E8 阻害抗体を選択し、通常の場合免疫反応から逃避している生体内のアポトーシスがん細胞に対して有意な免疫反応を惹起することが可能となる可能性を検討した。具体的な方法としては、細胞障害性を持つ治療法と抗 MFG-E8 抗体の全身投与を組み合わせ、前者のみによる抗腫瘍効果と比較検討した。この抗 MFG-E8 抗体併用療法による抗腫瘍効果の免疫関与を検討するためには、免疫不全である SCID マウスでの腫瘍治療実験、ならびに、免疫正常マウスに各種リンパ球サブセットに対する阻害抗体を投与することにより検討した。また、この治療法の腫瘍周囲の微小環境に与える影響を検討するために、治療を受けたマウスより腫瘍組織を採取し、それに含まれる腫瘍浸潤リンパ球を分離して解析した。

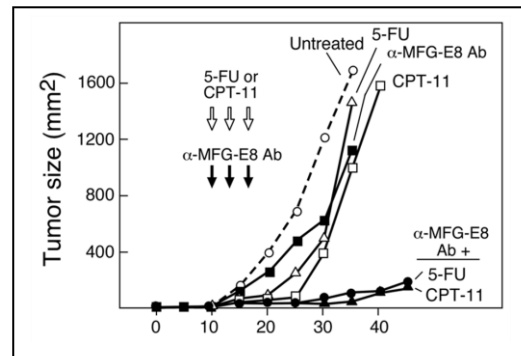
4. 研究成果

1) マウス線維肉腫細胞株である MCA205 細胞を皮下に投与し、その 7~10 日後に治療を開始する腫瘍治療モデルを用いて検討を進めた。IL-23 cDNA を IVE により筋肉内に遺伝子導入して IL-23 蛋白を全身投与したところ、腫瘍径は、対照群に比べて統計学的に有意に増殖抑制が確認され、その多くのも (60~80%) は腫瘍が完全退縮した。このことより、

IL-23 の全身投与は、強い抗腫瘍効果が得られることが確認された。この抗腫瘍免疫反応誘導の機序を解析するために、治療されたマウスのリンパ節ならびに脾臓における抗腫瘍免疫反応の性質と程度を検討したところ NK および NK-T 細胞がこの抗腫瘍効果に関与することが示唆された。

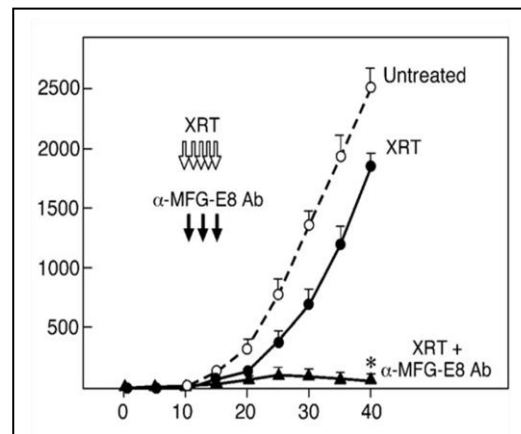
2) IL-23 投与により誘導される Th17 反応の抗腫瘍効果への関与に関して、IL-17 遺伝子ノックアウト・マウスを用いて検討を始めたが、IL-17 欠損による明らかな抗腫瘍効果の減弱は認めなかった。しかし、NK 細胞反応については減弱を示唆する結果が得られたので今後さらに詳細な検討を予定している。

3) 抗 MFG-E8 阻害抗体の全身投与を細胞障害性抗がん剤 (5-FU および CPT-11) と組み合わせることによる抗腫瘍効果を、マウス大腸癌細胞株である MC38 の皮下投与モデルにて検討した (下図)。



すると、後者のみでは到底得られない非常に強い抗腫瘍効果が長期間にわたって腫瘍特異的に発揮されることを見出した。この抗 MFG-E8 抗体と抗がん剤との併用療法による相乗的な強い抗腫瘍効果は、B-16 (マウス悪性黒色腫) や MCA205 (マウス線維肉腫) においても見られた。また gemcitabine などの他の抗がん剤との併用においても同様の効果が見られた。

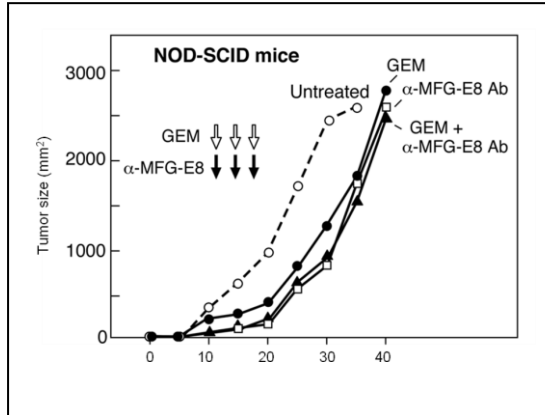
またこの相乗効果は、下図のごとく放射線療法との併用にも認められた。



これらの結果から、この抗体併用療法は、併

用する治療法が腫瘍細胞のアポトーシスがある程度引き起こすことのできるものでありさえすれば、同様の抗腫瘍効果を有することが示唆された。

この併用効果に関する宿主免疫反応の関与を検討するために、免疫不全である SCID マウスを用いて同様の実験を行った（下図）。



すると、この系では、相乗的抗腫瘍効果が有意に減少した。また、免疫正常マウスにおいても、CD8 陽性 T 細胞を除去すると抗腫瘍効果は著明に減弱した。これらの結果より、抗 MFG-E8 抗体併用による抗腫瘍効果には免疫反応が有意に関わっていることが示唆された。

この併用療法による抗腫瘍効果について、その機序をさらに検討したところ、抗 MFG-E8 抗体投与により、腫瘍抗原の認識に好適な微小環境となり抑制性 T 細胞の出現を阻止でき、液性および細胞性免疫を介した強力な免疫反応が誘導できることが判明した。この強い免疫反応は、MFG-E8 を抗体により阻害することにより、免疫寛容を誘導する経路である Integrin $\alpha v \beta 3$ を介した腫瘍細胞の獲得が妨げられ、免疫反応を促進する経路である Fc γ レセプターを介した獲得が促進されることにより起こることも判明した。

現在、この抗体の臨床応用に向けさらなる検討を進めている。

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 Jinushi M, Sato M, Kanamoto A, Itoh A, Nagai S, Koyasu S, Dranoff G, and Tahara H. Milk Fat Globule EGF-8 blockade triggers tumor destruction through coordinated cell-autonomous and immune-mediated mechanisms. *J Exp. Med.* 206:1317-1326, 2009
- ② Jinushi M, Tahara H. Cytokine gene-mediated immunotherapy:

Current status and future perspectives. *Cancer Science* 100:1389-1396, 2009.

- ③ Tahara H. et al. (56 authors in total) Emerging concepts in biomarker discovery; The US-Japan workshop on immunological molecular markers in oncology, *J Translational Med* 7:45-69, 2009,
- ④ Suzuki T, Ogawa S, Tanabe K, Tahara H, Abe R, Kishimoto H. Induction of anti-tumor immune response by homeostatic proliferation and CD28 signaling. *J Immunol* 180: 4596-4605, 2008
- ⑤ Takahashi H, Ishizaki H, Tahara H, Tamaki Y and Yanagi Y. Vaccination with Epitope Peptide Derived from Human VEGF Receptor 2 Prevent Choroidal Neovascularization in an Animal Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49: 2143-2147, 2008
- ⑥ Saito T, Takayama T, Osaki T, Nagai S, Suzuki T, Sato M, Kuwano H, Tahara H. Combined mobilization and stimulation of tumor-infiltrating dendritic cells and natural killer cells with Flt3 ligand and IL-18 in vivo induces systemic anti-tumor immunity. *Cancer Sci.* 99:2028-36, 2008

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 田原秀晃 Cancer vaccination using tumor cells in situ as the source of tumor antigens（シンポジウム）日本癌学会総会、2009年10月3日、横浜市
- ② 佐藤まりも、田原秀晃 他 5 名、Cancer vaccine against malignant melanoma using monocyte-derived dendritic cells stimulated with OK-432 and PGE2 日本癌学会総会 2009年10月2日 横浜市
- ③ 米山公康、田原秀晃 他 3 名 Antigen-specific antitumor effects of DNA vaccine are significantly enhanced with systemic administration of interleukin (IL)-23 日本免疫学会総会、2009年12月4日、大阪市
- ④ Hideaki Tahara, Potent Anti-tumor Immunity and both Th1 and Th17 promotion associated with IL-23 administration (Symposium) Annual Meeting, International Society of Biological Therapy for Cancer, 2008年10月31日米国 San Diego

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原秀晃（TAHARA HIDEAKI）
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：70322071

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：