

機関番号：24403

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580325

研究課題名 (和文) 遺伝子治療を併用した樹状細胞による新規癌免疫治療法の研究

研究課題名 (英文) Improvement of immune cancer therapy with dendritic cells by using gene therapy methods

研究代表者

杉浦 喜久弥 (SUGIURA KIKUYA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30171143

研究成果の概要 (和文)：遺伝子治療の併用によって樹状細胞 (DC) を用いた癌免疫治療の効果を高めることを目的として基礎実験を行い、以下の成果を得た。1) 癌免疫を増強するインターフェロン (IFN) γ などのサイトカインのイヌ遺伝子をクローニングした。2) IFN γ を DC とともに癌組織内に注入することによって、イヌ自然発症癌の退縮に成功した。3) IFN γ 遺伝子を腫瘍細胞株に導入することによって DC の抗腫瘍効果を増強させた。これらの結果により、サイトカイン遺伝子の癌細胞への導入によって免疫治療を増強できることが示された。

研究成果の概要 (英文)：To improve clinical outcomes of DC-based tumor immune therapy, we carried out basic study for combination with gene therapy. In this study 1) we cloned canine genes of cytokine which activate cancer immunity, such as IFN γ , and certified that cloned genes produce functional cytokines; 2) we succeeded to obtain significant clinical responses, including complete healing of malignant tumors by inoculation of DCs with injection of IFN γ into tumors exerted; 3) we found that DCs inhibited *in vitro* tumor growth more significantly when tumor cells were transfected with IFN γ gene. These results suggest that transfection of IFN γ gene into tumor cells *in vivo* may significantly enhance the effect of DC-based tumor immune therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：免疫学・血液学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：サイトカイン、樹状細胞、腫瘍、免疫治療、遺伝子導入、

1. 研究開始当初の背景

癌に対する DC 治療は、患者の末梢血単球から生体外で DC を分化誘導し、癌抗原を取り込ませて提示させたのちに、患者体内に戻すことによって、抗腫瘍免疫反応を高め、癌を治療する治療法である。この治療法は、癌細胞に対する特異性が極めて高く、副作用が

極めて少ないが、治療効果が低く、癌の退縮を導くことは困難であった。

2. 研究の目的

免疫治療による腫瘍の退縮をめざし、細胞性免疫を活性化するサイトカインの腫瘍組織内濃度を高めることによって、抗腫瘍免疫

を活性化し DC の治療効果を高めることを目的とした。腫瘍組織内にサイトカインを供給する手段として、サイトカインの遺伝子を腫瘍細胞内に導入し、発現させることを考案し、以下の基礎研究を行った。

(1)細胞性免疫および DC の分化成熟を亢進するサイトカインのイヌ遺伝子のクローニングを行った。

(2)①それらサイトカインのうち、とくに癌免疫を強く増強する IFN γ およびインターロイキン (IL) -12 について、DC の成熟および活性化への影響を調べるとともに、②イヌに自然発症した腫瘍組織内に DC とともに注入し、治療効果の増強を検討した。

(3)イヌ腫瘍細胞株にサイトカイン遺伝子を導入し、in vitro において抗腫瘍免疫の増強効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) サイトカインのイヌ遺伝子のクローニング：既報のイヌ遺伝子あるいは既報のヒトとマウス遺伝子の保存配列をもとにプライマーを設計し、PCR によって目的とする遺伝子の cDNA を増幅した。それら cDNA を平滑末端化プラスミド (pCR-Blunt) に挿入し、E coli (DH5 α) にてクローニングし、シークエンサーによって塩基配列を確認した後、哺乳類細胞用発現プラスミド (pcDNA3.1/Myc-His (-)) に組み込んだ。発現プラスミドを CHO 細胞に導入してタンパク質を発現させ、それらが目的とするサイトカインの機能を持つことを確認した。

(2) ① IFN γ および IL-12 による DC の成熟および活性化の検討：イヌ末梢血から分離した単球をイヌ顆粒球-単球-コロニー刺激因子 (GM-CSF) および IL-4 とともに 7 日間培養して未成熟 DC に分化させた後、イヌ IFN γ あるいは IL-12 と 5 日間培養し、DC への成熟および活性化を顕微鏡観察における形態的变化、フローサイトメトリーあるいは ELISA における免疫刺激分子の発現量の変化によって調べた。また、DC の示す腫瘍細胞への傷害活性に対するそれらサイトカインの影響と機序について調べた。

② IFN γ を併用したイヌ腫瘍に対する DC 治療の効果の検討：悪性あるいは良性腫瘍を発症したイヌの末梢血細胞から単球を分離し、イヌ GM-CSF および IL-4 により DC へ分化誘導して、IFN γ (1 万単位/Kg) とともに腫瘍内に注入した。その 2 日および 5 日後に同容量の IFN γ のみを同部位に注入した。この操作を 7 日毎 8 回以上繰り返し、治療効果を観察した。また、治療処置前および治療 8 回終了後に罹患犬から末梢血細胞を採取し、腫瘍抗原に対する末梢血 T 細胞の反応性を³H-チミジンの取り込みによって検討した。

(3) イヌ腫瘍細胞への IFN γ 遺伝子の導入

による DC の腫瘍抑制効果の検討：イヌ腫瘍細胞株である CTAC (甲状腺癌) および D-17 (骨肉腫) にイヌ IFN γ 遺伝子を導入し、それらをイヌ末梢血単球由来 DC と培養し、DC の成熟活性化への影響および DC による腫瘍細胞株の増殖抑制効果を検討した。

4. 研究成果

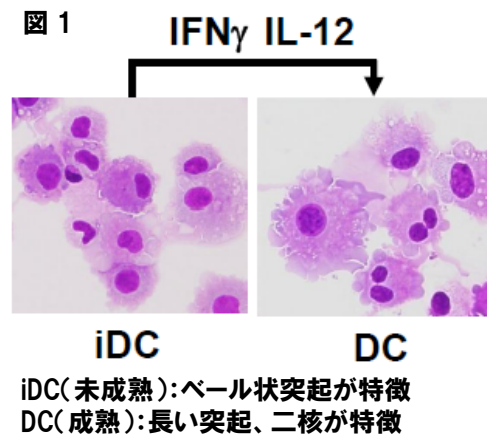
(1) サイトカインのイヌ遺伝子のクローニング：本研究においてクローニングしたサイトカインのイヌ遺伝子およびサイトカインの機能を下表に示す。

遺伝子	発現蛋白の機能
GM-CSF*	樹状細胞の分化誘導
IL-4*	
CD40L	樹状細胞の成熟・活性化の促進、免疫反応の増強
IL12(p40, p35)*	
IFN γ	
IL-18**	免疫反応の増強
IL-2	

*下記発表論文 1 ；**下記発表論文 5

とくに、小胞体からの分泌に必要なシグナルペプチドを持たない IL-18 や膜結合型タンパクの CD40 リガンドを単独遺伝子の導入によって、細胞からの分泌を可能にするために、クローニングした cDNA の上流に IL-12p40 遺伝子から分離したシグナルシーケンスを連結した。このようにして作製した遺伝子を哺乳類に発現可能な pcDNA 3.1/*myc*-His に挿入してサイトカイン遺伝子の発現ベクターを作製し、CHO 細胞に導入したところ、目的とするサイトカインの CHO 細胞からの分泌を確認することができた。

(2) ① IFN γ および IL-12 による DC の成熟および活性化：未成熟 DC を IFN γ あるいは IL-12 と培養することによって、図 1 に示すように、成熟樹状細胞に特徴的な形態を示す細胞に変化した。



また、図 2 および図 3 に示すように T 細胞

を活性化する分子である CD80 および CD86 の DC 表面での発現量や癌免疫を特異的に活性化する IL-12 の DC からの産生量が IFN γ の濃度依存性に増加した。

図 2

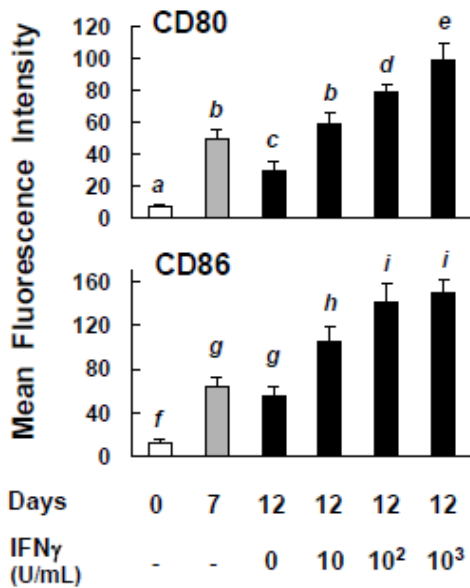
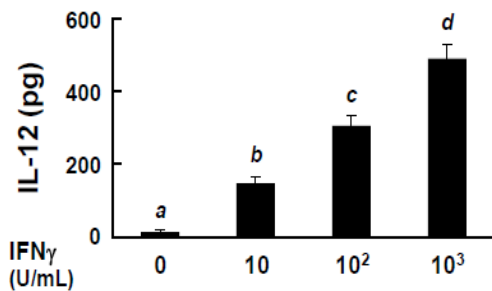


図 3



さらに、図 4 に示すように、IFN γ は、イヌ癌細胞株 (CTAC および D-17) に対する DC の直接的な増殖抑制能を高めることが認められ、その機序として DC によるアポトーシスの誘導が関与していることが判明した (図 5)。

図 4

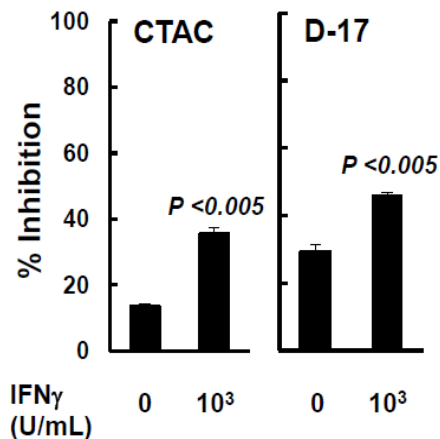
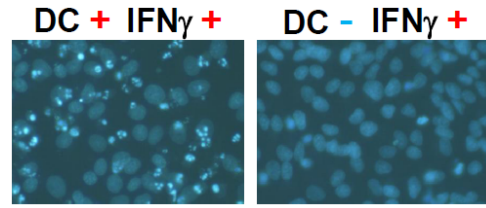
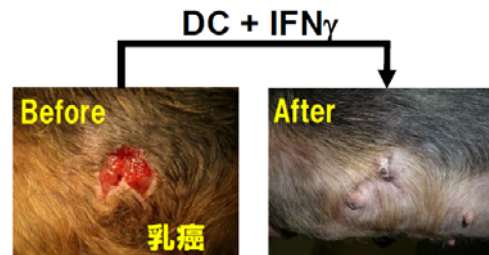


図 5



(2) IFN γ の併用によるイヌ腫瘍に対する DC 治療効果の増強：図 6 および下表に示すように IFN γ を併用することによって、これまでの DC 治療では不可能であった腫瘍の完全消失 (完全奏効) あるいは著しい退縮 (部分奏効) が可能となった。

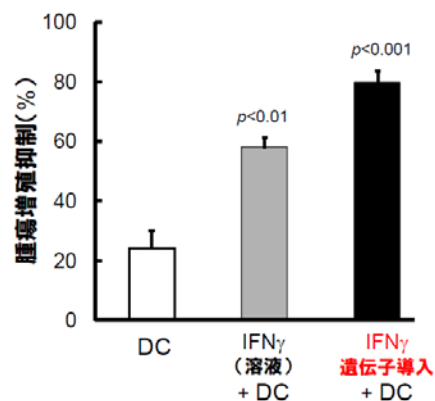
図 6



腫瘍の種類	治療結果
皮脂線上皮腫	部分(90%<)奏効
線維肉腫	部分(90%<)奏効
乳腺管癌(III B)	完全奏効 (図 6)
乳腺管癌(III A)	部分(70%<)奏効
乳腺管癌(II B)	完全奏効
乳腺管癌(II A)	完全奏効
直腸腺癌	完全奏効

(3) イヌ腫瘍細胞への IFN γ 遺伝子の導入による DC の腫瘍抑制効果の増強：図 7 に示すように in vitro における DC の腫瘍増殖抑制効果は、IFN γ 溶液の添加によるのみでなく、IFN γ 遺伝子の腫瘍細胞への導入によっても有意に増強された。

図 7



以上の結果により、腫瘍に対する免疫反応を担うタイプ1Tヘルパー (Th1) 細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルヘルパー細胞などのTh1免疫系を活性化し、DCを成熟・活性化させるサイトカインを腫瘍組織内に存在させ、腫瘍微小環境の免疫状態を改変することによって、DCを用いた免疫治療の効果を著しく高めることが示され、これまでのDC治療において問題とされてきた治療効果の低さを解決することができた。イヌは、ヒトの癌に類似した悪性腫瘍を多く自然発症する唯一の動物であり、イヌの癌治療にける本研究の成果は、ヒトの癌治療へも有用な情報を提供できるものと思われる。

さらに、DC治療効果の増強は、サイトカイン製剤の注入によってのみでなく、サイトカイン遺伝子を腫瘍細胞へ導入し、腫瘍細胞から分泌させることによって達成できることが明らかとなった。今後は、生体 (in vivo) においてサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞へ導入できるベクターシステムを樹立し、より安全で、効果的なDC治療を開発していく予定である。

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5件)

1. Sugiura K., Wijewardana V., Fujimoto M., Akazawa T., Yahata M., Mito K., Hatoya S., Inoue N., Inaba T.: Effect of IL-12 on canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137: 322-326, 2010. 査読有
2. Mito K., Sugiura K., Ueda K., Hori T., Akazawa T., Yamate J., Nakagawa H., Hatoya S., Inaba M., Inoue N., Ikehara S., Inaba T.: IFN γ markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. *Cancer Res.* 70:7093-7101, 2010. 査読有
3. Yamamoto E., Izawa T., Juniantito V., Kuwamura M., Sugiura K., Takeuchi T., Yamate J.: Involvement of endogenous prostaglandin E2 in tubular epithelial regeneration through inhibition of apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-induced rat renal lesions. *Histol. Histopathol.* 25: 995-1007, 2010. 査読有
4. Hatoya S., Sugiyama Y., Nishida H., Okuno T., Torii R., Sugiura K., Kida K.,

Kawate N., Tamada H., Inaba T.: Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology* 71:560-567, 2009. 査読有

5. Sugiura K., Akazawa T., Fujimoto M., Wijewardana V., Mito K., Hatoya S., Taketani S., Komori M., Inoue N., Inaba T.: Construction of an expression vector for improved secretion of canine IL-18. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126: 388-391, 2008. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 小西千紘 他、イヌの血小板減少症および貧血の治療に向けたトロンボポエチンおよびエリスロポエチン遺伝子の作製、第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月16日、帯広
- ② 杉浦喜久弥 他、Effect of Interferon-gamma on immune and clinical response in dendritic cell-based immunotherapy against cancer、第14回国際免疫学会議、2010年8月26日、神戸
- ③ 上田 佳奈 他、イヌ腫瘍治療に向けたインターフェロン γ およびインターロイキン2遺伝子の作製、第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月26日、鳥取
- ④ 八幡麻奈 他、分泌型イヌCD40リガンドの作製、第146回日本獣医学会学術集会、2008年9月24日、宮崎
- ⑤ 水戸凱 他、樹状細胞とインターフェロン γ を併用したイヌ腫瘍治療第146回日本獣医学会学術集会、2008年9月24日、宮崎

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 腫瘍治療用組成物およびその応用
発明者: 杉浦喜久弥、水戸凱、稲葉俊夫
権利者: 公立大学法人大阪府立大学
種類: 特許
番号: 特願 2008-143465 号
出願年月日: 平成 20 年 5 月 30 日
国内外の別: 国内

[その他]

Cancer Research at Osaka Prefecture University, in Osaka in Focus: Heritage in Future, pp 23-24, Feb. 18, 2011, Products of Science, AAAS/Science Business Office

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/profile/sugiura.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 喜久弥 (SUFIURA KIKUYA)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：30171143

(2) 研究分担者

赤澤 隆 (AKAZAWA TAKASHI)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府
立成人病センター・分子遺伝学部門・研究
員
研究者番号：80359299

鳩谷 晋吾 (HATOYA SHINGO)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：40453138

稲葉 俊夫 (INABA TOSHIO)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：00137241

(3) 連携研究者

稲葉 宗夫 (INABA MUNEO)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70115947