

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591668

研究課題名（和文） 癌細胞とキラー T 細胞が発現する Toll 様受容体の癌免疫療法への応用

研究課題名（英文） Anti-cancer immunotherapy targeting toll-like receptors expressed on cancer cells and killer T cells

研究代表者

原田 守 (HARADA MAMORU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50260716

研究成果の概要（和文）：Toll 様受容体（TLRs）などのアジュバント受容体は、免疫応答において重要な役割を担っているが、この受容体を標的とした癌免疫療法の研究は少ない。そこで今回、TLR3 や MDA5 受容体のリガンドとなる合成二本鎖 RNA である poly(I:C) の抗癌効果の可能性を検討した。その結果、一部のヒト前立腺癌細胞では poly(I:C) 添加により、また、poly(I:C) を細胞質内に transfect した場合には、検討したすべてのヒト乳癌細胞に細胞死と増殖抑制が誘導されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed that apoptosis and growth arrest in a LNCaP human prostate cancer cell line can be induced by the addition of poly(I:C). In addition, transfection of poly(I:C) induced apoptosis and growth arrest in all three human breast cancer cell lines tested. Give that poly(I:C) can stimulate the immune response, these results indicate that poly(I:C) can induce anti-tumor effects and the stimulation of immune system simultaneously.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：癌、免疫療法、Toll 様受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、自然免疫系にも 10 種類をこえるメンバーが存在する Toll 様受容体（TLR）ファミリーが存在し、病原体に特有の構成成分を特異的に認識することが明らかにされた。癌特異的適応免疫の誘導にも自然免疫の活性化が必要不可欠であり、TLR は、癌に対する適応

免疫の誘導の様々な場面に関与している。第一に、生体内の免疫応答誘導の中心を担う樹状細胞は、TLR からの刺激により活性化し、癌抗原をプロセッシングし、癌反応性 T 細胞に癌抗原ペプチドを自己 MHC とともに抗原提示する。第二に、癌細胞自身が種々の TLR を発現していることが報告されている。前立腺癌

では、TLR9の発現が (Prostate 67: 774-81, 2007)、腎癌やメラノーマや肝癌では TLR3 (Clin. Cancer Res. 13: 5703-9, 2007; Clin. Cancer Res. 13: 4565-74, 2007; J. Cell. Biochem. 100: 1301-12, 2007) の発現が報告されている。これらの癌細胞では、TLR リガンドによる刺激により、癌細胞の増殖が促進されることもあれば、増殖が抑制され細胞死に陥ることもある。第三に、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞も TLR3 を発現していることが報告されている (J. Immunol. 177: 87-8-13, 2006)。以上のように、癌に対する T 細胞免疫応答の誘導と効果発現の様々な局面で TLR の関与が考えられるが、癌免疫領域における TLR の研究は樹状細胞にのみ焦点が当てられ、癌細胞や CD8 キラーT 細胞での TLR の役割の解明や治療応用に関する研究は国内外において少ない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 癌細胞での TLR ファミリーの発現と TLR を介するシグナルが癌細胞に及ぼす作用を明らかにする、(2) 癌細胞に細胞死を誘導する、または、癌細胞の CD8 キラーT 細胞に対する感受性を増強させる TLR シグナルを解明し、免疫療法の治療効果増強の方法を開発する、(3) 癌(抗原)特異的 CD8 キラーT 細胞での TLR ファミリーの発現とその機能を解明し、癌細胞に対する細胞傷害活性を増強する TLR 刺激法を開発する、ことである。

## 3. 研究の方法

発現の解析：癌細胞株(前立腺癌と乳癌)での TLR ファミリーの発現を mRNA レベルと蛋白レベルで検討し、その後、癌組織での発現を免疫組織染色で検討する。機能の解析：TLR ファミリーを発現している癌細胞に対して特異的 TLR リガンドが及ぼす効果(促進的、又は、抑制的)を癌細胞の増殖能、アポトー

シス、浸潤能、サイトカイン産生に関して検討し、さらに、そのシグナル経路を明らかにする。応用の検討：癌細胞が CD8 キラーT 細胞の細胞傷害活性・免疫抑制性サイトカイン産生に及ぼす TLR リガンドの作用を検討し、シグナル経路を明らかにする。CD8 キラーT 細胞の発現の解析：癌反応性 CD8 キラーT 細胞での TLR ファミリーの発現を mRNA レベルと蛋白レベルで検討する。機能の解析：TLR リガンドの刺激が CD8 キラーT 細胞の機能に及ぼす影響を検討し、キラーT 細胞での TLR シグナル経路を解明する。応用の検討：癌反応性 CD8 キラーT 細胞の細胞傷害活性・サイトカイン産生を増強する TLR リガンド刺激の方法やシグナル経路を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 研究機期間の前半は、ヒト前立腺癌細胞を用いて研究を実施した。その結果、① 検討した3種類のヒト前立腺癌細胞株は、TLR2、TLR3、TLR4、TLR9のmRNAの発現が陽性であった。② TLR3のリガンドである合成2本鎖RNAであるpoly(I:C)のヒト前立腺癌細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。その結果、LNCaP細胞は、poly(I:C)の添加により濃度依存性に生細胞数が減少した。この効果は、エンゾソーム受容体である TLR3 をsiRNAでノックダウンさせると軽減することから、主な受容体はTLR3であることが判明した。また、poly(I:C)添加により誘導されるLNCaP細胞の細胞死は、caspase依存性であった。また、poly(I:C)は、LNCaP細胞に growth arrest を誘導し、c-myc と cyclinD1 の発現低下と、p21とp27の発現増強が伴っていた。③ 興味深いことに、poly(I:C)は、LNCaP細胞に autophagy を誘導した。また、autophagyを抑制すると細胞死が促進され、逆に、アポトーシスを抑制すると autophagy が亢進した。(2) 研究期間の後半は、poly(I:C)とヒト乳癌細胞を用いて研究を実施した。その結果、① 検討した3種類のヒト乳癌細胞株は、poly(I:C)のエンゾソーム受容体である

TLR3 だけでなく細胞質内受容体であるMDA5 も発現していた。② poly(I:C) を細胞質内に transfect した場合、すべての細胞株で、caspase 依存性の apoptosis と細胞増殖関連分子である c-Myc と cyclinD1 の発現低下による細胞増殖抑制 (growth arrest) を認めた。③ 癌治療抵抗性に関わる可能性が示唆されている autophagy の関与についても検討したところ、一部の乳癌細胞株では恒常的に、また、一部の乳癌細胞株では、poly(I:C) transfection 後に autophagy が誘導されていた。④ さらに、autophagy 関連分子である beclin-1 をノックダウンさせた癌細胞で検討したところ、autophagy は、poly(I:C) transfection 後に誘導される apoptosis に対して防衛的に作用していた。⑤ ヒト乳癌細胞を移植した異種移植マウスモデルで検討したところ、poly(I:C) transfection により癌細胞の増殖を in vivo でも抑制できた。

#### 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 12 件)

- 1) Harada M. et al., (11 人中 7 番目)  
Interleukin-17A is involved in enhancement of tumor progression in murine intestine. **Immunobiology**, 査読有 217: 54-60, 2012. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.08.002
- 2) Harada M. et al. (5 人中 5 番目). Oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract can restore the antitumor T cell response of mice inoculated with colon-26 cells into the subserosal space of the cecum. **Oncology Reports**, 査読有 27: 325-332, 2012. DOI: 10.3892/or.2011.1549
- 3) Harada M. et al. (6 人中 6 番目) Roles of the

- PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 査読有 61: 667- 676, 2012. DOI: 10.1007/s00262-011- 1132-1
- 4) Harada M. et al. (8 人中 8 番目)  
Antitumor effects of cytoplasmic delivery of an innate adjuvant receptor ligand, poly(I:C), on human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, 査読有 in press 2012. DOI: 10.1007/s10549-011-1930-3
  - 5) Harada M. et al. (7 人中 7 番目)  
Combining a peptide vaccine with oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract enhances anti-tumor activity in B16 melanoma-bearing mice. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 査読有 in press 2012. <http://www.springerlink.com/content/0340-7004>.
  - 6) Harada M. et al. (10 人中 6 番目)  
Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells by RIG-1-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus. **Journal of Immunology**, 査読有 186:1828-1839, 2011. DOI: 10.4049/jimmunol.0901641
  - 7) Harada M. et al. (6 人中 6 番目) Oral ingestion of *Lentinus edodes* mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression. **Cancer Science**, 査読有 102:516-521, 2011. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01841.x
  - 8) Harada M. et al. (5 人中 5 番目)  
Immunogenic chemotherapy with

cyclophosphamide and doxorubicin against established murine carcinoma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 査読有 59: 769-777, 2010. DOI: 10.1007/s00262-009-0797-1

9) Harada M, Harashima N. 'Sterile' inflammation and autophagy in cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, 査読無 2: 599-601, 2010. DOI: 10.2217/imt.10.55

10) Harada M, et al. (8人中8番目) 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 Science**, 査読有 100: 138-143, 2009. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.01014.x

11) Harada M, et al. (8人中8番目) Roles of proinflammatory cytokines and the Fas/FasL interaction in pathogenesis of inflammatory myopathies. **Immunology**, 査読有 128: e589-e599, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03039.x

12) Harada M, et al. (8人中8番目) Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to up-regulation of nitric oxide and IFN- $\gamma$  production by tumor-associated macrophages. **Cancer Science**, 査読有 100: 2160-2166, 2009. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01296.x

[学会発表] (計 21 件)

1) Harada Mamoru. Role of autophagy in apoptosis of human cancer cells after

stimulation through innate adjuvant receptor. 第 40 回日本免疫学会総会 2011 年 11 月 27 日- 29 日幕張メッセ (千葉)

2) Harada Mamoru: Apoptosis and ROS production in ploy(I:C)-transfected human renal cell carcinoma. 第 40 回日本免疫学会総会 2011 年 11 月 27 日- 29 日幕張メッセ (千葉)

3) Harada Mamoru. Neoadjuvant immunotherapy using IL12/DC for control of recurrent hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. 第 70 回日本癌学会総会 2011 年 11 月 27 日-29 日幕張メッセ (千葉)、第 40 回日本免疫学会総会

4) 原田守: 移植後肝細胞癌再発抑制における IL-12 と樹状細胞を用いた術前補助免疫療法の抗腫瘍効果の検討。第 70 回日本癌学会総会 2011 年 10 月 3 - 5 日 名古屋コンgresセンター (名古屋)

5) 原田守: Lentinula edodes mycelia 抽出物の予防的経口摂取は Treg 抑制を介してワクチンによる抗癌効果を増強する。第 70 回日本癌学会総会 2011 年 10 月 3 - 5 日名古屋コンgresセンター (名古屋)

6) 原田守: Lentinula edodes mycelia 抽出物の経口摂取は Treg 抑制により抗癌ペプチドワクチン効果を増強・持続させる。第 70 回日本癌学会総会 2011 年 10 月 3-5 日名古屋コンgresセンター (名古屋)

7) 原田守: Treg と MDSC をターゲットとしたシクロホスファミドとゲムシタビンの間欠投与による化学療法。第 70 回日本癌学会総会 2011 年 10 月 3 - 5 日名古屋コンgresセンター (名古屋)

8) 原田守: Poly(I:C)トランスフェクションによるヒト乳癌細胞に対する抗がん効果とオートファジー。第 70 回日本癌学会総会 2011 年 10 月 3 - 5 日名古屋コンgresセンター (名古屋)

9) 原田守: Neoadjuvant immunotherapy using IL12/DC for control of recurrent hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. 第 15 回日がん免疫

学会総会 2011年6月30日 - 7月1日千里  
ライフサイエンスセンター (大阪)

10) 原田守: 乳癌細胞に発現するアジュバント受容体を利用した immunogenic cancer cell death の誘導。第15回日がん免疫学会総会 2011年6月30日 - 7月1日千里ライフサイエンスセンター (大阪)

11) Harada Mamoru. Induction of apoptosis and growth arrest of human breast cancer cells by targeting a cytoplasmic RIG-I-like receptor. The 20<sup>th</sup> HCS-The three Universities' Consortium International Symposium. October 31, 2010. (Hiroshima) . 広島国際会議場

12) 原田守: シイタケ菌糸体抽出物による Treg 免疫抑制の解除を介した腫瘍特異的 CTL の誘導。第69回日本癌学会総会 2010年9月22 - 24日 大阪国際会議場 (大阪)

13) 原田守: リコンビナントセンダイウイルスによる RIG-1 刺激性細胞内 RNA 合成はヒト樹状細胞の新規刺激剤である。第69回日本癌学会総会 2010年9月22 - 24日 大阪国際会議場 (大阪)

14) 原田守: Poly(I:C) のトランスフェクションによるヒト乳癌細胞でのアポトーシスとオートファジーの誘導。第69回日本癌学会総会 2010年9月22 - 24日 大阪国際会議場 (大阪)

15) Harada Mamoru. Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells (DC) by RIG-1-stimulating cytosolic RNA synthesis of recombinant Sendai virus (rSeV). 国際免疫学会 2010年8月22 - 27日 神戸国際会議場 (神戸)

16) Harada Mamoru. TLR3 ligand-induced apoptotic cell death with autophagy and growth arrest in human prostate cancer cells. 国際免疫学会 2010年8月22 - 27日 神戸国際会議場 (神戸)

17) 原田守: TLR3 シグナルは PI3K/Akt 経路の不活化を介してヒト前立腺癌細胞に細胞死と増殖抑制を誘導する 第14回日本がん免疫学会総会 2010年7月22 - 23日ホテル

熊本 (熊本)

18) 原田守: RIG-1-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus (rSeV) is a novel stimulant for human dendritic cells. 第14回日本がん免疫学会総会 2010年7月22 - 23日 ホテル熊本 (熊本)

19) Mamoru Harada: TLR3 ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月2日- 4日 大阪国際会議場 (大阪)

20) Harada Mamoru: TLR3 ligand-induced prostate cancer cell death through endogenous production of type I IFN. 第68回日本癌学会総会 2009年10月1日- 3日 パシフィコ横浜 (横浜)

21) 原田守. Immunogenic chemotherapy with cyclophosphamide and adriamycin against established murine colon carcinoma. 第13回日本がん免疫学会総会 2009年6月24日 - 25日 北九州国際会議場 (北九州)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/immunology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 守 (HARADA MAMORU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 50260716