

機関番号：14501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791077
 研究課題名（和文） 腫瘍免疫および腫瘍ワクチン免疫機構における IL-17 産生細胞の役割の検討
 研究課題名（英文） Investigation of the role of IL-17-producing-cells in tumor immunity and tumor vaccine immunity.
 研究代表者
 鬼木 俊太郎 (SHUNTARO ONIKI)
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号：50448180

研究成果の概要（和文）：

本実験モデルでは IL-17 は B16F10 メラノーマの腫瘍免疫機構および腫瘍ワクチン免疫機構には関与していないが、IL-12 を介した B16F10 メラノーマの腫瘍免疫機構では、OX40 と関連して何らかの役割を果たしていた。

研究成果の概要（英文）：

In our experimental model, IL-17 had no effect on tumor immunity or tumor vaccine immunity of B16F10 mouse melanoma. But, only in IL-12, not in IL-23 or IL-27, derived tumor immunity to B16F10 mouse melanoma, OX40, one of TNFR family members, had an important role associated with IL-17.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：IL-17、腫瘍免疫、腫瘍ワクチン

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍への免疫学的な治療の試みは、現在臨床応用の段階を迎えている。その免疫学的な治療の内容は、ワクチン療法、抗体療法、細胞免疫療法、サイトカイン療法などに大別される。近年、我が国においても、悪性腫瘍への免疫学的治療法に関して幾つかの臨床試験が試みられているが、特に免疫学的治療が適応となる進行した悪性腫瘍に対しては、有効な実績を得ているとはいえない。悪性黒色腫は、皮膚悪性腫瘍の中でも最も予後不良の腫瘍の 1 つであり、近年増加傾向にある。悪性黒色腫は、腫瘍に対する宿主の免疫反応が臨床病態に強く関連していることが知ら

れており、そのため、これまでに悪性黒色腫に対する免疫療法の基礎および臨床研究が数多く成されている。しかし、免疫療法に関しての研究が進んでいるのにも関わらず、進行期の悪性黒色腫に対しては、未だ有効な治療法は見つかっていない。よって、悪性黒色腫に対するより効果的で副作用の少ない免疫療法の開発が望まれている。そのためには、悪性黒色腫存在下において抗腫瘍免疫を効率よく誘導する必要がある。

近年、IL-17 産生細胞が自己免疫疾患や炎症性疾患発症に関与しているという報告があり (J. Exp. Med. 201:233-240, 2005)、IL-17 は免疫機構のなかで重要な役割を果た

していることが明らかになりつつある。腫瘍免疫においても IL-17 産生細胞が抗腫瘍効果に対して有益か有害かは明らかになっていない。IL-17 は CD4 陽性ヘルパー T 細胞の一部からだけでなく、様々な免疫担当細胞より分泌されることが分かっている。また、IL-17 産生性 CD8 陽性 T 細胞が腫瘍周囲の微少環境に存在し、抗腫瘍免疫を誘導するとの報告もある。

申請者は、低免疫原性マウス悪性黒色腫 B16F10 メラノーマ細胞株に対して、IL-23 遺伝子導入し IL-23 高発現株を作成したうえで、その高発現株を用いた腫瘍ワクチンが腫瘍特異的な B16F10 マウスメラノーマ親細胞に対して有意に予防効果が誘導されることを最近報告した。特に、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞を予め除去しておくとその効果はさらに増強し、完全な腫瘍拒絶が 80% も認められることが分かった。(Cancer Res. 66:6395-404, 2006) 加えて、IL-23 は IL-17 産生細胞を誘導できることも報告されている。また、ごく最近の報告では、腫瘍周囲の微少環境では IL-17 産生細胞と CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞がお互いに制御しあう状態であると報告されている。

よって、IL-17 産生細胞が抗腫瘍効果および腫瘍ワクチン免疫に対して正に働くか負に働くかを検討し、どのような環境が腫瘍免疫や腫瘍ワクチン免疫の確立を誘導するのに必要で、逆に何が不必要かを、IL-17 とその周囲の免疫機構に関して明らかにすることは、今後の癌に対する免疫治療の有効率を上げるうえで非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、多種の IL-17 産生 T 細胞が、腫瘍増殖に対する直接的な抗腫瘍免疫と、腫瘍ワクチン法における抗腫瘍免疫に対して、それぞれ正に働くのか負に働くのかを検討する。実際には、IL-17 ノックアウトマウスおよびワイルドタイプマウスを用いて、T 細胞を採取し CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞に選別する。これらの細胞を用いて、低免疫原性腫瘍である B16F10 マウスメラノーマ細胞株を使用し、それぞれの IL-17 産生 T 細胞の抗腫瘍効果への関連性と、それぞれの IL-17 産生 T 細胞と制御性 T 細胞の抗腫瘍効果への相互作用を明らかにする。腫瘍ワクチン効果についての研究においても、IL-17 産生 T 細胞において、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の役割の違いを比較検討して明らかにし、さらには制御性 T 細胞との関連性と相互作用を検討し、より有効な抗腫瘍免疫療法の開発につながる基礎データを得ること、さらには、今後ヒトの悪性黒色腫や転移性癌もしくは進行癌などの

低免疫原性腫瘍に対する免疫学的治療においても、IL-17 産生細胞を制御できることにつながる有用な研究であることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) B16F10 マウスメラノーマ組織内、所属リンパ節浸潤細胞の解析

B16F10 マウスメラノーマ細胞を同系の IL-17 ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスに皮下接種し、接種後の腫瘍組織と所属リンパ節を摘出して、一部は組織染色用にホルマリン固定、OCTコンパウンドに凍結包埋し、一部は RT-PCR 用の RNA 抽出を行う。免疫組織化学染色は、使用する抗体に応じてパラフィン切片あるいは凍結切片を用いて行う。免疫組織染色にて、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、NK 細胞、マクロファージの染色、および IL-17 もしくは IL-17 受容体の染色を行う。

また CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞のマーカーとして最も有用な foxp3 の染色も行い、それぞれの陽性細胞の数を経時的にどのように変化するかを確認する。さらに、同じ組織から抽出した RNA を用いて、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、NK 細胞、IL-17、IL-17 受容体、foxp3 に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い、同様にその発現が経時的にどのように変化しているのかを確認する。さらには、フローサイトメトリーにて IL-17 産生細胞がどの種類の細胞かを確認する。

(2) B16F10 マウスメラノーマの腫瘍増殖における IL-17 産生細胞の関連の解析

CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、NK 細胞をそれぞれ欠かせた同系の IL-17 ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスに B16F10 マウスメラノーマ細胞を皮下接種し、その後の腫瘍増殖曲線を描き、どの IL-17 産生細胞が関連しているかを検討する。

(3) 抗腫瘍免疫における CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞と IL-17 の関連性の検討

- a. 抗マウス CD25 抗体を投与して、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞を除去した IL-17 ノックアウトマウスおよびワイルドタイプマウスに、B16F10 マウスメラノーマ細胞皮下接種し、その後の腫瘍増殖曲線を描き、IL-17 の抗腫瘍効果の CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞との関連性を検討する。
- b. 同様に抗マウス CD25 抗体を投与して、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞を除去した IL-17 ノックアウトマウスおよびワイルドタイプマウスに、B16F10 マウスメラノーマ細胞を皮下接種し、その 7-10 日後に同マウスの脾細胞を採取し、フローサイトメ

トリー等にて脾臓における比較検討をする。

(4) In vitro における腫瘍存在下での種々の IL-17 産生細胞の腫瘍特異的細胞障害活性の検討

上記 3) と同様に抗マウス CD25 抗体を投与して、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞を除去した IL-17 ノックアウトマウスおよびワイルドタイプマウスに、B16F10 マウスメラノーマ細胞を皮下接種し、その 7-10 日後に同マウスの脾細胞を採取し、選択的に CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞を選別し、おのおのの細胞に関して腫瘍特異的細胞障害活性を測定し検討する。

(5) B16F10 マウスメラノーマに対する抗腫瘍免疫反応に対して、腫瘍組織内における IL-17 発現解析

抗 CD4 抗体で CD4 陽性 T 細胞を除去したワイルドタイプマウスにおいて、皮下接種した B16F10 メラノーマを採取し、RT-PCR 用の RNA 抽出を行う。そこで IL-17 発現に関して PCR を用いて検討する。

(6) B16F10 マウスメラノーマに対する腫瘍免疫における、TNFR ファミリーメンバーの 1 つである OX40 (CD134) 発現の検討

OX40 リガンドである OX86 をマウスに全身投与し、B16F10 メラノーマもしくは、IL-12、23、27 遺伝子をそれぞれ導入した B16F10 メラノーマ (B16/IL-12) を皮下接種する。それぞれの腫瘍増殖曲線を測定して、抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1) B16F10 マウスメラノーマ腫瘍増殖における IL-17 産生細胞の役割について

B16F10 マウスメラノーマ細胞を同系の IL-17 ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスに皮下接種を行い、腫瘍径を経時的に計測したが、両マウス間には有意な差を認めなかった。

(2) IL-12 ファミリーメンバーによる抗腫瘍免疫における IL-17 産生細胞の役割について

IL-12、IL-23、IL-27 遺伝子をそれぞれ導入した B16F10 マウスメラノーマ細胞 (以下、それぞれを B16/IL-12、B16/IL-23、B16/IL-27 と記載) を①と同様に接種し、腫瘍径を計測した。B16/IL-12、B16/IL-23、B16/IL-27 の増殖について両マウス間に有意な差を認めなかった。

(3) 腫瘍ワクチンによる抗腫瘍免疫反応誘導における IL-17 産生細胞の役割について

腫瘍ワクチン実験については、研究代表者が既に報告済みの B16/IL-23 を用いた方法で行った。すなわち、制御性 T 細胞を除去する

抗 CD25 抗体 (PC61) を全身投与した翌日にマイトマイシン C 処理した B16/IL-23 細胞を皮下に接種し、ワクチンを施行。ワクチン 2 週間後に対側の皮下に B16F10 親細胞を接種して、その腫瘍増殖を経時的に計測した。IL-17 ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスに腫瘍ワクチン実験を行ったが、両マウス間には有意な差を認めなかった。

上記 1) から 3) 4) のごとく、IL-17 ノックアウトマウスを用いた研究では、B16F10 マウスメラノーマの腫瘍増殖および抗腫瘍免疫反応に対して、内在性 IL-17 が関与していることを示唆する有意な所見は得られなかった。

そのため、ワイルドタイプマウスを用いた実験系で IL-17 関与の可能性について調べた。(4) IL-17 は T 細胞から産生されるサイトカインであり Th17 細胞はその主な産生細胞として知られている。以前の当研究室の結果より、抗 CD4 抗体で CD4 陽性 T 細胞を除去すると B16F10 メラノーマに対する抗腫瘍免疫反応が増強することを確認している。その増強機序において、IL-17 発現低下が関与している可能性を疑い、抗 CD4 抗体処理の有無による B16F10 メラノーマ組織の IL-17 発現の変化を、リアルタイム PCR を用いて調べたが、有意な差を確認できなかった。

(5) 次に、TNFR ファミリーメンバーの 1 つである OX40 (CD134) に着目した。最近、OX40 リガンドによる刺激により、IL-17 発現が強く抑制されることが報告されている (Cell. Immunol. 253:31-37, 2008)。OX40 リガンドである OX86 をマウスに全身投与すると、B16F10 マウスメラノーマの腫瘍増殖には影響を及ぼさなかったが、IL-12 遺伝子を導入した B16F10 メラノーマ (B16/IL-12) の腫瘍増殖は有意に抑制した。同じ IL-12 ファミリーの IL-23 や IL-27 の遺伝子を導入した B16F10 メラノーマでも検討したが腫瘍増殖には影響を及ぼさなかった。

すべての結果を合わせると、本実験モデルでは IL-17 は B16F10 メラノーマの腫瘍免疫には関与していないが、IL-12 を介した腫瘍免疫機構では、OX40 に関連して何らかの役割を果たすという結果が得られた。

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 2 件)

① Nagai H, Oniki S, Fujiwara S, Xu M, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Nishigori C, Antitumor Activities of Interleukin-27 on

Melanoma、Endocr Metab Immune Disord Drug Targets、査読有、2009、41-46

② Nagai H, Oniki S, Fujiwara S, Xu M, Yoshimoto T, Nishigori C、

Antimelanoma immunotherapy: clinical and preclinical applications of IL-12 family members、Immunotherapy、査読有、2010、697-709

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔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

鬼木 俊太郎 (ONIKI SHUNTARO)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：50448180