

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：24701  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010 年度 ～ 2011 年度  
 課題番号：22791296  
 研究課題名(和文) 消化器癌局所における新たな免疫パラグラム Treg/Th17 バランスの解明  
 研究課題名(英文) The elucidation of new immunity Paragram Treg/Th17 balance in the gastrointestinal carcinoma  
 研究代表者  
 飯田 武 (IIDA TAKESHI)  
 和歌山県立医科大学・医学部・学内助教  
 研究者番号：30453187

## 研究成果の概要(和文)：

IL-17 の腫瘍局所における検討として、マウス *in vivo* 皮下腫瘍モデルでの腫瘍増殖曲線の検討において、mIL-17A-shRNA 群は B16 皮下移植モデル・MC38 皮下移植モデルいずれにおいても有意にコントロールの PBS 群、SNC 群と比べて腫瘍増殖抑制効果を認めた。IL-17 は腫瘍微小環境においては腫瘍増殖因子として作用することが示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

In the examination of the tumor growth curve in the mouse *in vivo* subcutaneous tumor model, in the mIL-17A-shRNA group, it significantly showed tumor growth depression effect as compared with the PBS group of the control SNC group. It was suggested that IL -17 acted as a tumor growth factor in the tumor microenvironment.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1200000	360000	1560000
2011 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
年度			
総計	1700000	510000	2210000

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：Th17, Treg, 腫瘍, IL-17, Foxp3

## 1. 研究開始当初の背景

免疫療法の臨床研究が開始されて久しいが、癌治療効果に乏しいのが現状である。この原因の一つに、腫瘍が局所において増殖に有利な免疫バランス環境を形成し腫瘍特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) からのエスケープメカニズムを構築していることがあり、

強力な免疫療法の開発には腫瘍局所の免疫バランスを解明し、免疫抑制状態を克服することが重要な課題である。従来より免疫バランスを制御するパラダイムとして Th1 細胞および Th2 細胞が知られていた。その後、制御性 CD4 陽性 T 細胞(Treg 細胞)が腫瘍局所において抗腫瘍免疫応答を極めて強力に抑

制することが明らかとなり、現在、Treg を抑制する新しい免疫療法の研究開発が盛んに行われている。

近年、IL-17 を産生する新たな Th17 細胞の存在が明らかになり、この Th17 による慢性炎症は腫瘍増殖に関与することが証明された(Nature 442:461-465, 2006)。この報告では、マウス腫瘍において IL-17 が CTL の腫瘍浸潤抑制を介して腫瘍増殖に適した環境を提供することが示されている。我々はこれまでの研究において、ヒト胃癌腫瘍組織における IL-17mRNA、および Treg の転写因子である Foxp3mRNA の発現が正常組織と比して高発現であることを示してきた。つまり、ヒト胃癌腫瘍局所において、明らかに Th17 および Treg が優位となることで腫瘍増殖に有利な免疫環境が構築されていることを明らかにした。これらの近年の新たな知見により、Th17 と Treg はいずれも腫瘍局所において免疫抑制状態を構築する重要なコンテントであることが明らかとなった。従って、腫瘍局所において Th1/Th2 バランスに加え Th17 や Treg 細胞が腫瘍細胞と複雑な相互作用を引き起こして腫瘍増殖に有利な免疫バランスを構築していると考えられる。

しかし、腫瘍の周囲において実際どのような免疫細胞の相互作用が構築されているかの詳細は明らかになっておらず、このメカニズムを解明することは腫瘍周囲の免疫環境を理解する上で極めて重要であり、胃癌に対する新規免疫療法の開発につながるものである。マウスにおける報告では、Th17 細胞ならびに Treg 細胞はいずれもその分化誘導に TGF- $\beta$  が必須であり、特に Treg から誘導される TGF- $\beta$  は Th17 細胞の誘導に重要であると考えられている。実際、我々は、ヒト胃癌腫瘍組織における IL-17mRNA と Foxp3mRNA の発現に正の相関があることを明らかにし、Th17 と Treg が協調的に腫瘍の増殖を促進する環境を提供していることが示唆された。

一方、最近になって Th17/Treg バランスという新しい概念が提唱された。Treg 特異的な転写因子である Foxp3 は Th17 細胞の転写因子である ROR $\gamma$ t の発現に拮抗し、Th17 の分化に抑制的に働くという報告があり、Th17 と Treg 細胞はその分化誘導において互いに拮抗するとも考えられている。

しかし、これらはいずれもマウス in vitro における検討であり、マウス in vivo の腫瘍周囲にこのような免疫バランスが存在するかどうかは明らかでない。さらに、ヒト腫瘍組織においても Th17/Treg バランスが存在するかどうかは全く明らかになっていない。

今回、我々はマウスおよびヒトの in vivo における腫瘍局所の免疫バランスおよび相互作用を検討し、腫瘍微小環境において腫瘍

増殖および免疫抑制をもたらすメカニズムを解明することを目的とした研究を計画した。

## 2. 研究の目的

腫瘍微小環境における Th1/Th2/Th17/Treg の免疫バランスと相互作用を明らかにすることで、腫瘍が構築する抗腫瘍免疫からのエスケープメカニズムを解明するとともに、将来に向けての胃癌に対する新規免疫療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) mIL-17A-shRNA 発現プラスミドの作製

### ① mIL-17A 発現プラスミドの作製

目的遺伝子である Mouse interleukin 17A(mIL-17A)発現プラスミドを作製するため mIL-17A、mRNA(NM-010552)の配列の全長 1171bp を pBApo-CMV-Neo ベクターの [BamHI-HindIII] に挿入、pBApo-CMV-mIL17 を作製。

### ② mIL-17A-shRNA 発現プラスミドの作製

iGENE 社開発のデザインプログラムを用いて mIL-17A に対する siRNA 設計を行い pcPURmU6cassette に 2 種類構築する。293 細胞に pBApo-CMV-mIL17 と pcPURmU6-mIL-17A-shRNA を同時に、遺伝子導入試薬 TransIT-293(TaKaRa)にて導入し mRNA を抽出し、LightCycler を用いて定量的 RT-PCR 法にて mIL-17AmRNA の発現量レベルを比較し、発現抑制効果の強い mIL-17A-shRNA 発現プラスミドを選択し実験に用いる。また、ヒト・マウス・ラットいずれの UniGene 代表配列に対して、BLAST にて 19 塩基 16 塩基以上の相同性が認められない配列をスクランブルネガティブコントロール配列として、pBasi mU6 Neo に構築し、scramble negative control 発現プラスミド(SNC)を作製。

(2) マウス in vivo 皮下腫瘍モデルでの腫瘍増殖曲線の検討

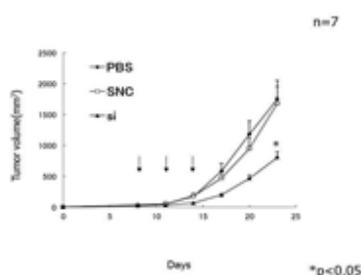
マウスは 6 週-8 週齢、メスの C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを使用する。Cell line として MC38(C57BL/6 mice colon cancer)、CT26(BALB/C mice colon cancer)を使用し 5 × 10<sup>5</sup> 個/PBS100  $\mu$ L を右側腹部の皮下に接種する。mIL-17A-shRNA をアテロコラーゲン(AteloGene:KOKEN)と混合し、Day5、Day8 に腫瘍内に局所投与する。①PBS 群、② mIL-17A-shRNA 群、③SNC 群の 3 群で腫瘍増殖曲線を検討する。

## 4. 研究成果

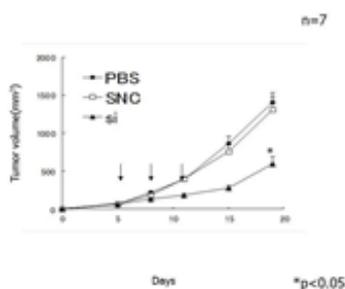
mIL-17A-shRNA 群は有意にコントロールの PBS 群、SNC 群と比べて腫瘍増殖抑制効果を認めた。

(次頁図)

腫瘍増殖曲線(B16皮下移植モデル)



腫瘍増殖曲線(MC38皮下移植モデル)



## 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 Comparison of different classes of CpG-ODN in augmenting the generation of human epitope peptide-specific CTLs. Katsuda M, Iwahashi M, Matsuda K, Miyazawa M, Nakamori M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Hayata K, Yamaue H. Int J Oncol. 2011 Nov;39(5):1295-302.
- ② Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Ueda K, Hayata K, Nakamura Y, Yamaue H. Oncol Rep. 2011 May;25(5):1271-7.
- ③ Vaccination with peptides derived from cancer-testis antigens in combination with CpG-7909 elicits strong specific CD8+ T cell response in patients with metastatic esophageal squamous cell carcinoma. Iwahashi M, Katsuda M, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Iida T, Yamaue H. Cancer Sci. 2010 Dec;101(12):2510-7.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 飯田 武, 胃癌腹腔洗浄液中における IL-17mRNA の発現解析. 第 19 回日本消化器関連学会週間, 2011.10 福岡
- ② 飯田 武, Prognostic significance of IL-17 mRNA expression in peritoneal lavage detected by real-time RT-PCR in gastric cancer. 第 70 回日本癌学会総会, 2011.10 名古屋
- ③ Takeshi Iida, Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. 第 9 回国際胃癌学会, 2011.4 ソウル
- ④ 飯田 武, 胃癌腫瘍局所における IL-17 の発現解析と腫瘍増殖との関連. 第 48 回日本癌治療学会学術総会, 2010.10 京都
- ⑤ 飯田 武, 胃癌腫瘍微小環境における Th17 および Treg の動態からみた癌免疫逃避機構の解析. 第 31 回癌免疫外科研究会, 2010.5 大阪
- ⑥ 飯田 武, 胃癌腫瘍微小環境における Treg および Th17 の動態解析. 第 110 回日本外科学会定期学術総会, 2010.4 名古屋

[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

<http://www.wakayama-med.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 武 (IIDA TAKESHI)

和歌山県立医科大学・第 2 外科・  
学内助教

研究者番号：3045318

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：