

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791482
 研究課題名（和文）IL-23/Th17 による慢性炎症の制御機構の解明とがん治療への実用化
 研究課題名（英文）The elucidation of chronic inflammation by IL-23/Th17 and the application to cancer immunotherapy
 研究代表者
 松下まりも（佐藤まりも）（Sato-Matsushita, Marimo）
 東京大学・医科学研究所・助教
 研究者番号：50401253

研究成果の概要（和文）：

IL-23 の全身投与により、Th1 細胞ならびに Th17 細胞が有意に増強されることを明らかにし、このうち Th1 細胞については、内因性 IL-12 を介して、抗腫瘍効果に深く関わっていることを示してきた。しかしながら、Th17 細胞の抗腫瘍効果への関与については未だ不明である。そこで、wild type および IL-17 遺伝子欠損マウスを用いて、IL-23 の全身投与により増強される Th17 細胞の抗腫瘍免疫における役割について検討した。

研究成果の概要（英文）：

Th1 cells and Th17 cells were significantly enhanced by systemic administration of IL-23. However, it is still unknown about the effects of Th17 cells in antitumor immunity. Th17 cells promote an IL-17 production through IL-23 which a macrophage and dendritic cells produce by antigen stimulation in chronic inflammation. In this project, I have found the mechanisms of the antitumor effects of Th17 cells by systemic administration of IL-23 using wild-type and IL-17 knockout mouse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：実験外科学

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、マウスモデルにおける IL-23 全身投与の抗腫瘍効果の検討を行い、IL-23 がメモリー型 Th1 細胞を効果的に誘導することによって Th1 細胞からの IFN- γ 産生を増強し、癌特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化とナチュラルキラー (NK) 細胞および NKT 細胞を活性化することで、担癌マウスの腫瘍が消失することを確認し、副作用なく高い抗腫瘍効果が得られることをマウス腫瘍モデルを用いて世界に先駆けて発見した (T. Kaiga, M. Sato et al. J.

Immunol, 2007, 178 : 7571-7580、ほか)。また、IL-23 の全身投与は、メモリー型 Th1 細胞の誘導および維持を増強することを可能にし、それに伴い全身的な癌特異的 CTL の活性化が可能であることも報告してきた。

IL-23 のメモリー T 細胞、エフェクター T 細胞の活性化および増殖・促進する作用は、生体内で“免疫学的メモリーの確立”に有用である。一方、IL-23 は、炎症誘導作用が強い IL-17 を産生する Th17 細胞と呼ばれる細胞集団を特異的に活性化できる唯一のサイトカインであるこ

とも明らかにされてきている。
そこで、本研究課題においては、IL-23により誘導されるTh17細胞が引き起こす慢性炎症が、IL-23の抗腫瘍効果にどのような影響を及ぼすのかについて検討をおこない、Th細胞の分化に与えるIL-23の影響をより詳しく調べることによって、T細胞の分化の新しいパラダイムを確立したいと考えた。また、IL-23による腫瘍抗原を用いたワクチンの抗腫瘍効果増強法の開発につなげ、これまで申請者が種々の形で進めてきたワクチン療法(DNAワクチン)の基礎研究(マウス腫瘍モデル実験を用いた機序解析等)を更に進めることを計画した。腫瘍細胞を特異的に認識し攻撃し得る免疫を成立させることができれば、それは副作用が少ない有効ながん免疫療法となる。しかしながら、腫瘍関連抗原に対する特異的免疫反応の誘導と腫瘍への集積、そしてその結果としての抗腫瘍効果の発現が長期間にわたって可能となる理想的な免疫治療法はまだ開発されておらず、その実現に向けて一層の研究が必要であると考えた。

これまで申請者はマウス腫瘍モデル実験において、サイトカイン蛋白の全身投与や遺伝子導入による局所的発現、樹状細胞の利用など、様々な手法により腫瘍特異的免疫反応を成立させることが可能であることを示してきた。これらをさらに深く検討することにより、より優れたがん免疫療法開発のための糸口が見出せると考えられる。本研究課題を進めてゆくことにより、種々のがん免疫研究を有機的に連携させることが可能となり、新たな研究の創造が期待できる。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの検討にて、IL-23の全身投与によりTh1細胞ならびにTh17細胞が有意に誘導されることが明らかとなっている。また、このうちTh1細胞については、内因性のIL-12を介して抗腫瘍効果に深く関わっていることを示してきた。しかしながら、Th17細胞の抗腫瘍効果への関与については未だ不明である。そこで、東京大学医科学研究所ヒトモデル疾患センターの岩倉教授(現、東京理科大)より供与いただいた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、Th17細胞の関与を検討した。

手法としては、*wild-type*のマウスに対するものと同様で、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蛋白を全身投与して、その抗

腫瘍効果ならびに免疫反応について検討した。さらに、IL-23によりTh17細胞が引き起こす慢性炎症が、抗腫瘍効果にどのような影響を及ぼすのかを検討した。また、これまでのこの種の研究では、OVAなどの外来異種抗原をモデル抗原として用いるものが多くみられていた。しかし、それらのモデル抗原は、実際の腫瘍抗原とは免疫原性の強さも性質も大きく異なるものであるため、ヒトでの反応を適切に推測できるか否かについて議論が多かった。そこで本研究においては、マウスのメラノーマ抗原として同定された *tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)* を標的抗原として用いて、マウス B16メラノーマを治療するがんワクチン・モデルを構築した。具体的には、TRP-2の塩基配列を基にしたPCR用プライマーを設計し、B16マウス・メラノーマ細胞株より採取したmRNAをテンプレートとしてTRP-2の全長cDNAを得た。これを、発現プラスミドに組み込みワクチン用プラスミドとした。そして、このワクチン用プラスミドを投与することによるDNAワクチン法が有効な抗原特異的免疫反応を惹起できるか否かをまず検討した。その際には、*in vivo electroporation*法を併用するか否かについても検討した。そして、ワクチン効果の増強を狙って同時に投与するIL-23の発現手法を確立した。

以上により、腫瘍細胞を特異的に認識し攻撃し得る免疫を成立させることが出来ればそれは副作用が少ない有効ながん免疫療法となる。しかしながら、腫瘍関連抗原に対する特異的免疫反応の誘導と、腫瘍への集積、そしてその結果としての抗腫瘍効果の発現が長期間にわたって可能となる理想的な免疫治療法はまだ開発されておらず、その実現に向けて一層の研究が必要である。

これまでに、申請者らマウス腫瘍モデルを用いて、IL-23、IL-12やIL-18などのサイトカイン蛋白の全身投与や遺伝子導入による局所的発現、樹状細胞の利用など様々な手法により腫瘍特異的免疫反応を成立させることが可能であることを示してきた。これらの手法に用いられた分子は、すべて樹状細胞の機能に関連しており、腫瘍免疫反応の制御における樹状細胞の役割の重要性を鑑みれば当然のこととも言え、その樹状細胞によって産生されるIL-23に注目した。

本研究課題においては、上述した(1)IL-23投与により誘導されるTh17細胞の抗腫瘍免疫応答機序およびIL-23の抗腫瘍効果にTh17細胞が引き起こす慢性

炎症が及ぼす影響の解明に関する検討、

(2) IL-23 による腫瘍抗原を用いたワクチンの抗腫瘍効果増強法の開発の2点に焦点を当てて検討を進め、有効ながん免疫療法の開発を進めていった。

腫瘍細胞に対する有効な免疫反応を惹起するためには、複数の局面が整合性の取れた形で作動する必要があり、その要となるのが樹状細胞である。その樹状細胞によって産生される IL-23 に関する研究を進めてゆくことにより、種々のがん免疫研究を有機的に連携させることが可能となると考えられ、それは各局面を総合的に解釈することへつながり、新たな研究の創造が期待できる。

3. 研究の方法

IL-23 投与により誘導される Th17 細胞の抗腫瘍免疫応答の機序および IL-23 の抗腫瘍効果に Th17 細胞が引き起こす慢性炎症が及ぼす影響の解明するために、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 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腫瘍浸潤リンパ球、所属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。

さらに、IL-23 による腫瘍抗原を用いたワクチンの抗腫瘍効果増強法の開発として、マウスのメラノーマ抗原である TRP-2 などを用いた DNA ワクチン・システムを構築し検討した。具体的には、マウス B16 メラノーマを TRP-2 遺伝子発現プラスミドの投与により治療する癌ワクチン・モデルを構築した。そして、このモデルを用いて発現した蛋白(遺伝子産物)を用いた DNA ワクチンの抗腫瘍効果を検討し、MHC class I 拘束性エピトープ・ペプチドを用いたものなど他の方法との比較も行った。

また、ワクチン効果の増強を狙って同時に、ワクチン効果の増強を狙って IL-23 の併用効果を検討した。野生型および IL-17 遺伝子欠損マウスを用いたマウス皮下腫瘍モデル(腫瘍:MCA205, MC38, B16F10)に、IL-23-cDNA を *in vivo* electroporation 法による遺伝子導入により IL-23 を全身発現させた。3週間後に、血液、腫瘍浸潤リンパ球、所属リンパ節、脾臓における抗腫瘍免疫反応について、各種免疫学的解析を行った。同時に、慢性炎症性腸疾患の発症に関して、免疫組織学的解析をおこなった。

4. 研究成果

本研究において、IL-23 の全身投与による抗腫瘍効果に内因性 IL-17 の関与は認められなかった。IL-23 の全身発現による慢性炎症性腸疾患の発症機構に関しては、引き続きの検討が必要である。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① Yoshitaka Kimura, Marimo Sato-Matsushita, Hideaki Tahara, Tatsuro Irimura, Yoshihiro Hayakawa, IL-17-producing NK1.1⁺ CD27⁻ γ δ T cells promote tumor malignant progression by inducing inflammatory microenvironment, 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012, June 15-16, 2012, Sanjo Conference Hall, The University of Tokyo, Tokyo
- ② Yoshihiro Hayakawa, Yoshitaka Kimura, Naoki Tsunekawa, Marimo Sato-Matsushita, Hideaki Tahara, Ikuo Saiki, Tatsuro Irimura, IL-17-producing NK1.1-CD27⁻ γ δ T cells promote tumor malignant progression by inducing inflammatory microenvironment, 第16回日本がん免疫学会総会, 2012年7月26日~28日, 北海道大学学術交流会館, 札幌
- ③ 早川 芳弘, 佐藤(松下) まりも, 田原 秀晃, 済木 育夫, 入村 達郎, IL-17-producing NK1.1⁺ CD27⁻ γ δ T cells promote tumor malignant progression by inducing inflammatory microenvironment, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日~21日, ロイトン札幌, 札幌
- ④ Yoshitaka Kimura, Marimo Sato-Matsushita, Hideaki Tahara, Tatsuro Irimura, Yoshihiro Hayakawa, IL-17-producing NK1.1⁺ CD27⁻ γ δ T cells promote tumor malignant progression by inducing inflammatory microenvironment, 第41回日本免疫学会総会・学術集会, 2012年12月5日~7日, 神戸国際会議場, 神戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 まりも (佐藤 まりも)

(Sato-Matsushita, Marimo)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50401253