

## 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 4 月 30 日現在

機関番号：32409  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791850  
 研究課題名（和文） 癌細胞傷害活性と免疫賦活効果を示す NKT 細胞を応用した新規・卵巣癌免疫療法の開発  
 研究課題名（英文） Development of a new immunotherapy for ovarian cancer by utilizing the cytotoxic effects and adjuvant properties of natural killer T cells  
 研究代表者 鈴木 元晴（SUZUKI MOTOHARU）  
 埼玉医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：50406443

## 研究成果の概要（和文）：

ヒトインバリアント NKT (iNKT) 細胞は、 $\alpha$ -GalCer を負荷した樹状細胞 (DC) における IL-12p70 産生を促進し、その一方でオステオポンチン (OPN) 産生を著しく抑制した。また、iNKT 細胞由来の IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$  が OPN 産生に抑制的に作用していることを明らかにした。iNKT 細胞は DC 機能を修飾して OPN 産生を抑制することで、がんの増殖や転移に抑制的に作用することが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The present study investigated the role of human iNKT cells in the regulation of Osteopontin (OPN) production by dendritic cells (DCs). The activation of iNKT cells by their specific ligand  $\alpha$ -galactosylceramide inhibits the OPN production by DCs. The downregulation of OPN is associated with a production of IL-4, IL-13, and IFN- $\gamma$  from iNKT cells. These findings indicate that iNKT cells modify the DC function to suppress the OPN-dependent inflammatory condition that promotes the tumor development.

## 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・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学 卵巣がん 樹状細胞 NKT 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

マウス体内で NKT 細胞を活性化すると「がん」の転移が抑制されることが知られている。この効果は、主に NKT 細胞と樹状細胞 (DC) の相互作用によって誘導されるアジュバント効果（免疫賦活効果）が重要であり、これの下流で細胞傷害性 T 細胞 (CTL) やナチュラルキラー (NK) 細胞が活性化することによるものと考えられてきた。しかしながら、NKT 細胞の活性化によって得られる抗腫瘍効果は極めて強力であり、他にも作用点が存

在する可能性が示唆されてきた。卵巣癌組織は、炎症状態にあり、細胞性免疫応答が著しく抑制されている。NKT 細胞機能を応用して、免疫抑制状態を解除できれば、予後不良の卵巣癌患者の生命予後を改善することが可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、NKT 細胞のアジュバント効果を詳細に解析し、「卵巣癌」に認められる免

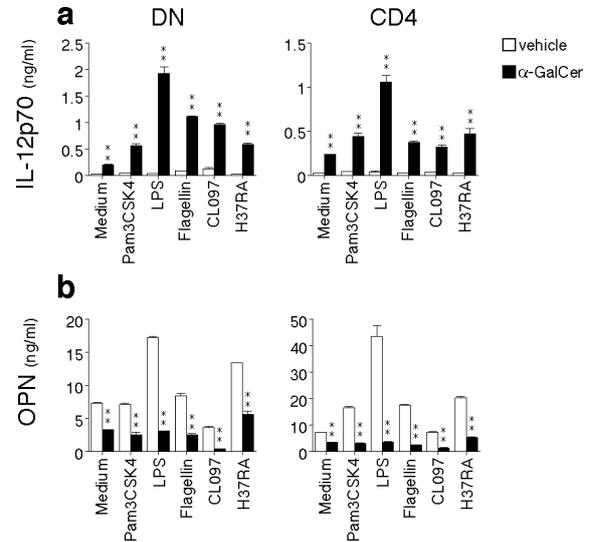
疫抑制状態を解除しうる新たな作用点を探索する。これを用いて免疫抑制機構を解除するとともに細胞性免疫応答を惹起する新たな免疫療法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

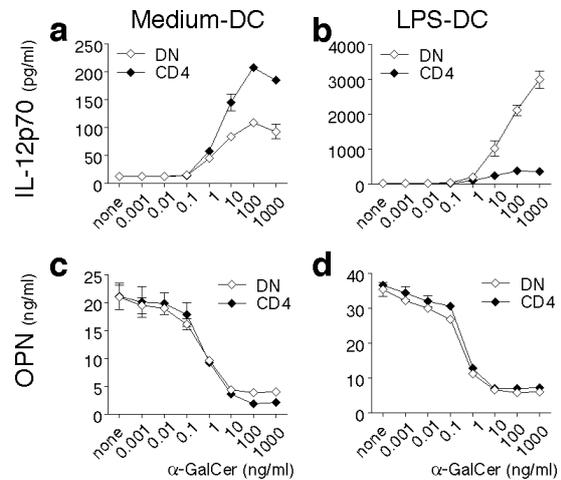
- (1) 健康人末梢血単核球を  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) にて刺激して  $\alpha$ -GalCer 特異的ヒトインバリアント NKT (iNKT) 細胞の増殖を誘導した。高速自動セルソーターを使用して、V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+6B11+ヒト iNKT 細胞を精製分離し、7-9 日おきに複数回刺激することで株化した。さらにヒト iNKT 細胞の 2 つの代表的なサブセット、CD4<sup>-</sup>CD8 $\beta$ <sup>-</sup> (DN: double negative) と CD4<sup>+</sup>CD8 $\beta$ <sup>-</sup> (CD4) をセルソーターにて分離した。
- (2) 免疫抑制性ミエロイド細胞と iNKT 細胞の相互作用を解析することを目的に、末梢血 CD15+CD11b+ミエロイド細胞を磁気分離して、血清アミロイド A (SAA) を負荷した際の IL-10 産生を評価した。その結果、SAA によって誘導される IL-10 は極めて微量であり、また、磁気分離によって得られるミエロイド細胞数が極めて少ないことから、iNKT 細胞との共培養による評価が困難であることが明らかとなった。
- (3) 一方、DC と iNKT 細胞の相互作用を解析することを目的に、末梢血単核球より CD14 陽性細胞を磁気分離して、ヒトリコンビナント IL-4 および GM-CSF を添加することで、モノサイト由来 DC を誘導した。これと iNKT 細胞との共培養を行い、DC における炎症性サイトカイン産生性を ELISA 法、リアルタイム PCR 法にて評価した。
- (4) iNKT 細胞由来の液性因子が OPN 産生制御に関与する可能性の検証は、LPS 刺激 DC あるいは CD40L 遺伝子を導入した線維芽細胞と DC との共培養系により評価した。
- (5) iNKT 細胞が産生する候補液性因子は、フローサイトメトリーベースのマルチプレックスアッセイにより決定した。これらに対する中和抗体、リコンビナントサイトカインを用いた評価系によって OPN 産生制御における責任液性因子を同定した。

### 4. 研究成果

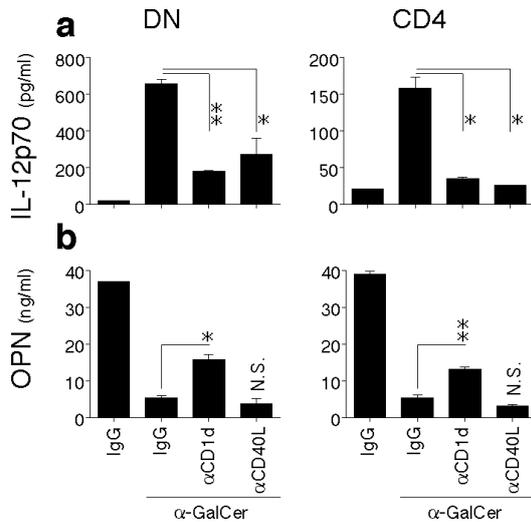
- (1) 活性化 iNKT 細胞は、未成熟 DC および Toll 様受容体刺激した成熟 DC の IL-12 産生を促進し、OPN 産生を抑制した。



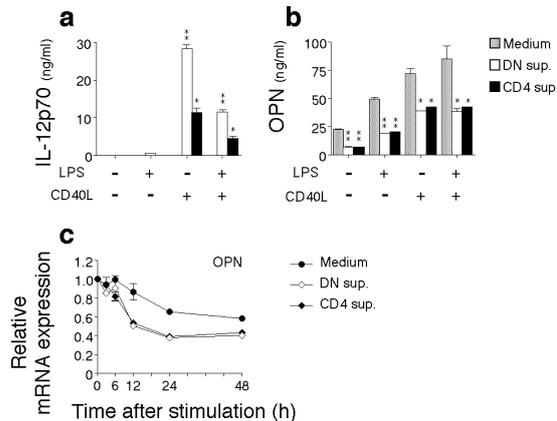
- (2) IL-12p70 産生の上昇と OPN 産生の低下は  $\alpha$ -GalCer 濃度依存性に認められた。



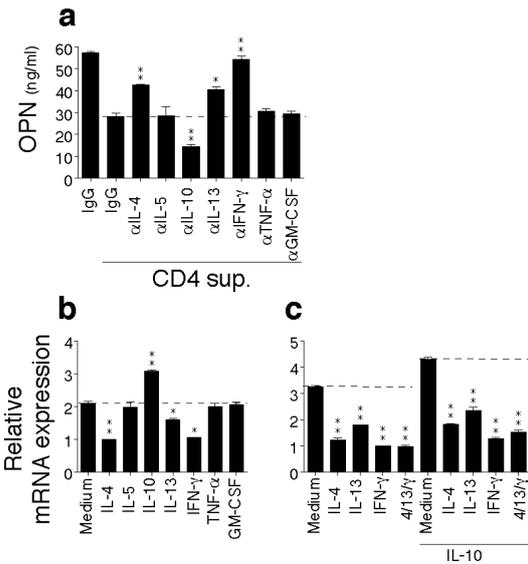
(3) 抗 CD1d 抗体、抗 CD40L 抗体を用いた阻害試験により、CD40L 以外の他の因子が OPN 抑制に関与することが示唆された。



(4) DC に抗 CD3 抗体刺激した iNKT 細胞の培養上清を添加したところ OPN 産生が低下したため、培養上清中に責任分子が存在することが示唆された。



(5) iNKT 細胞由来の候補サイトカインに対する中和抗体、およびリコンビナントサイトカインを用いた解析により、IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$  が OPN 産生に抑制的に作用すること、また、この観察は遺伝子発現レベルで制御されていることが明らかになった。



(6) iNKT 細胞は、免疫制御の中心的役割を果たす DC と相互作用し、IL-12 産生を促進して細胞性免疫応答を誘導するとともに、OPN レベルを低下させ、「がん」の増殖に適した環境を改善することが示唆された。

## 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 4 件)

### 1. 鈴木元晴, 板倉敦夫

子宮収縮薬の使い方

診断と治療社「産科と婦人科」(特集)

産科と婦人科 査読無 5(33): 561-566, 2012

### 2. 石原理, 鈴木元晴, 菊地真理子, 梶原健, 岡垣竜吾

リコンビナント FSH の基礎

産科と婦人科 査読無 79(7): 854-858, 2012

### 3. 大塚純一, 岡垣竜吾, 中山真人, 鈴木裕之, 鈴木元晴, 石原理, 荒木隆一郎, 板倉敦夫

器械的熟化併用による分娩誘発の成績—分娩誘発 177 症例の後方視的検討

日本産科婦人科学会関東連合地方部会誌 査読無, 49(4): 495-502, 2012

### 4. Kajihara, T., Uchino, S., Suzuki, M., Itakura, A., Brosens, J.J., Ishihara, O.

Human chorionic gonadotropin confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis in decidualizing human endometrial stromal cells.

**Fertil. Steril. 査読有 95: 1302-1307, 2011**

[学会発表] (計 2 件)

1. Rong Zhang, Tianyi Liu, Motoharu Suzuki, Narumi Hirose, Shin Kaneko, Ayako Okamura, Yasushi Sakamoto, Kiyotaka Kuzushima, and Yasushi Uemura  
Regulation of IL-27/Osteopontin balance in dendritic cells by ligand activation of invariant NKT cells.  
**第 41 回日本免疫学会学術集会 (神戸市)  
2012 年 12 月 5 日～7 日**
  
2. Motoharu Suzuki, Tianyi Liu, Narumi Hirose, Yayoi Nobori, Ayako Okamura, Yasushi Sakamoto, Kiyotaka Kuzushima, and Yasushi Uemura.  
Modification of IL-12p70/Osteopontin balance in dendritic cells by ligand activation of invariant NKT cells.  
**第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌市)  
2012 年 9 月 19 日～21 日**

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 元晴 (SUZUKI MOTOHARU)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50406443