

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792172

研究課題名(和文)細胞周期制御因子とがん発生についての検討

研究課題名(英文)Analysis of cell cycle control factor and cancer generation

研究代表者

桑島 精一 (KUWAJIMA, SEIICHI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：40569448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでに腫瘍モデルマウス(B16F10)を確立し、CpG-ODN1555を投与することで一部の個体でがん免疫の効果を見出してきた。CpGは生体内と培養系で抗腫瘍効果は示さず、生体内の細胞を介して腫瘍の成長を遅延あるいは阻害していることが認められたことから、CpGはがん免疫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)：We established the tumor model mouse by B16F10, and has found out the partial effect of cancer immunity by administered CpG-ODN1555. Since it was admitted that CpG did not show anticancer efficacy according to in vivo and in vitro, but passed the cell in the living body, and it had delayed or checked growth of a tumor, it was suggested that CpG acts as a cancer immunological factor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：がん免疫 CpG

1. 研究開始当初の背景

CpG の最初の報告は、徳永らの BCG から抽出した DNA 分画が強力なインターフェロン誘導能を有していることを示したものに遡る ( *J.Nat.Cancer Inst.*72:955(1984) ) . CpG は、強い免疫活性化能による単独での腫瘍免疫治療への応用、あるいは腫瘍ワクチンアジュバントとしての利用が期待されている ( *Nat. Rev. Immunol.*4:249(2004) , 図 1 ) .

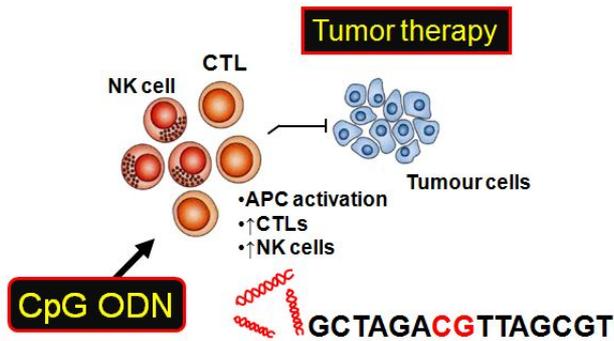


図 1. CpG と腫瘍免疫

その中でも、I 型インターフェロン ( IFN ) と T 細胞を介した CpG の抗腫瘍効果に関して多くの報告がある。これらは、多くの T 細胞クローンを活性化できるため、大きく成長した腫瘍を効果的に縮小できることと、抗腫瘍剤のような副作用がない点で非常に有効である。一方、これらの実験系ではがん細胞に OVA 抗原を付与しており、OVA を発現するがん細胞以外に傷害作用を持たないことが問題となる。現在のがん治療で難しい点は、抗腫瘍剤抵抗性と考えられている腫瘍幹細胞を根絶できずに、再発を完全に防いでいない点にある。これに対して、IFN は幹細胞の増殖を盛んにし、移植の効果を高めることを示す知見がある ( *Nat Med.* 15(6):696(2009) , 図 2 ) .

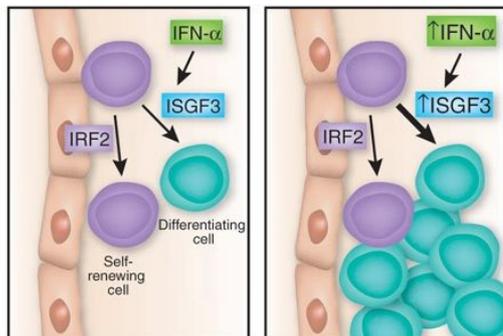


図 2. IFN と幹細胞の細胞周期

悪性腫瘍の幹細胞において、IFN をはじめとした何らかの細胞増殖因子が腫瘍幹細胞の周期を制御し、抗腫瘍剤の効果を高めることが予想できる。また、CpG により大量の I 型 IFN を生産する細胞種が質芽樹状細胞 ( plasmacytoid dendritic cells , pDC ) であることは広く知られている ( *Eur J Immunol.* 31:2154(2001) ) . これらを踏まえて、CpG で IFN を誘導し、腫瘍幹細胞を分化させ抗腫瘍剤の感受性を高める試みである。申請者はこれまでに、CpG 投与後にみられる IL-15 と IL-12 の生産を通じて、CpG による免疫系の活性化の機序について解析してきた ( *Nat. Immunol.* 7, 740-746, 2006 ) . これまでに行われている腫瘍の治療には、手術療法 ( 固形がん ) , 化学療法、放射線療法があり、機能低下や全身的な副作用 ( 主に骨髄抑制 ) が大きいことが挙げられる。さらに、再発に対する治療は非常に難しくなる。以上のことから、腫瘍幹細胞の根絶治療、あるいは副作用の極めて少ないより効果的な縮小治療法が求められる。

2. 研究の目的

CpG 投与によってもたらされる抗腫瘍効果についての機序を明らかにすることで、従来よりも効果的な治療法を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

腫瘍モデルマウスの確立

C57BL/6 由来の悪性黒色腫株 ( B16F10 ) あるいは同系統の腺癌細胞株 ( MCA38 ) をマウスに移植して腫瘍モデルマウスを作製した。これらに CpG を投与して、生存率と腫瘍のサイズで抗腫瘍効果があるかを検討した。さらに、CpG に対する生体内での反応をサイトカインの生産、アポトーシスの誘導、細胞周期、細胞分画の変化について検討した ( 図 3 ) .



図 3. 実験方法

4. 研究成果

( 1 ) CpG 投与後のサイトカインの生産

マウスに CpG を投与すると、投与後 3 時間と早いタイミングで p40, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  の生産がみられた。3 日目には、生産量は定常レベルまで低下していた ( 図 4 ) .

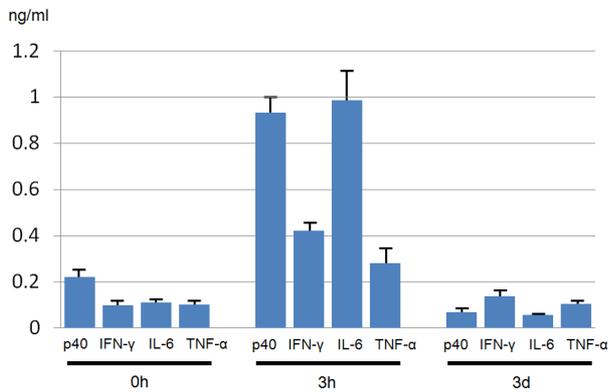


図4. CpGによるサイトカインの生産  
以上から生体に CpG を投与すると炎症性サイトカインが生産されることが確認できた。

(2) CpG の生体内での効果判定

B16F10 移植後に ODN を投与すると腫瘍の成長抑制がみられたが、一方で MCA38 移植後に ODN を投与しても腫瘍の成長抑制は若干みられたが、有意な差はなかった(図5)。以上から B16F10 をモデルとして、解析を進めた。

Tumor Volume (mm<sup>3</sup>)

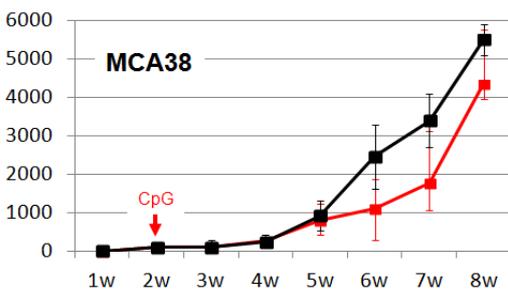
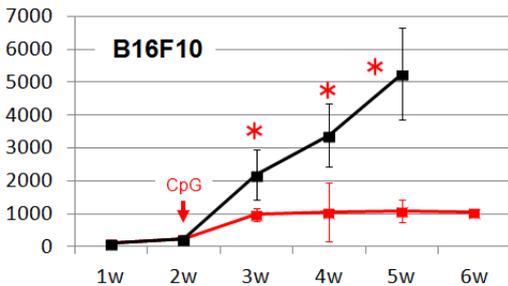


図5. CpGの腫瘍成長抑制効果

(3) CpG の腫瘍に対する作用

CpG の抗腫瘍効果を確認するために、腫瘍部でのアポトーシス誘導を TUNEL 法で、解析したが、CpG によって腫瘍部位への積極的なアポトーシスの誘導はみられなかった(図6)。

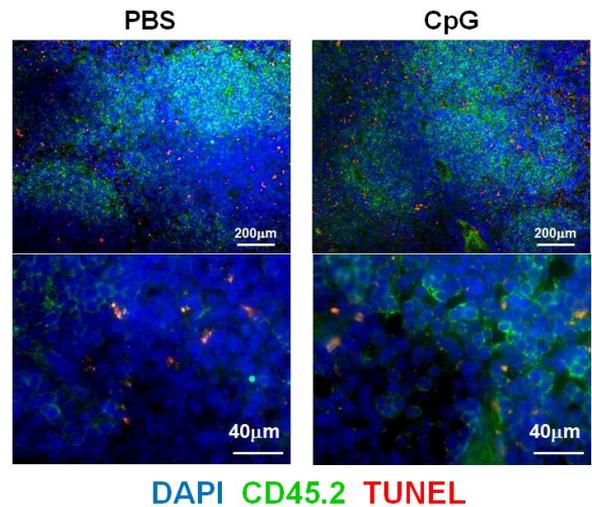


図6. 腫瘍部でのTUNEL染色

また、培養系において B16F10 に CpG を添加しても、B16F10 のアポトーシスはみられなかった(図7)。

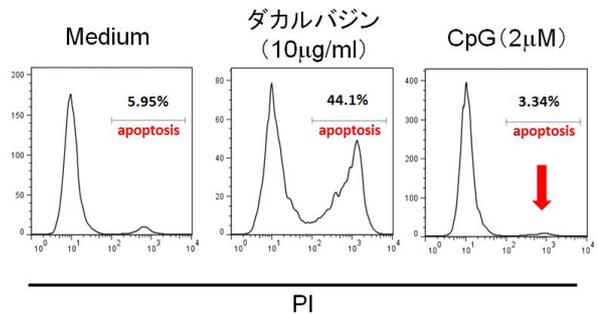


図7. CpGには直接的な抗腫瘍効果はない

次に CpG による細胞周期の変化がみられるかを BrdU 取り込みで確認した。BrdU においても、腫瘍部での CpG による細胞増殖の違いはみられなかった(図8)。

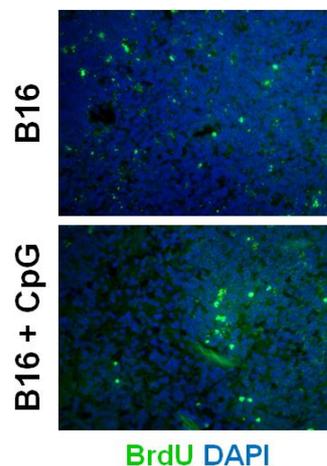


図8. 腫瘍部でのBrdUの取り込み

以上から、生体に投与した CpG は腫瘍に作用していないことが示唆された。

そこで、生体側の CpG に対する反応をみるために、骨髄細胞での BrdU の取り込みを検討した。腫瘍モデルマウスに CpG と BrdU を投与すると、骨髄細胞の S 期への著明な移行がみられた(図 9)。

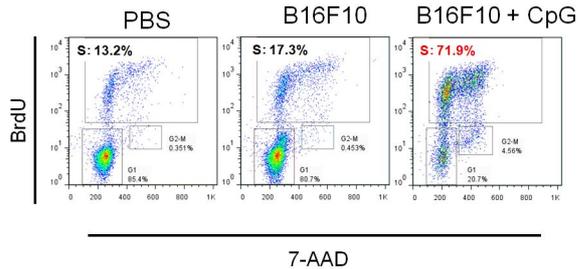


図9. 骨髄細胞のBrdUの取り込み

次に骨髄で活性化して末梢循環にのった細胞が腫瘍の分裂を阻害するかを、培養系で検討した(図 10)。

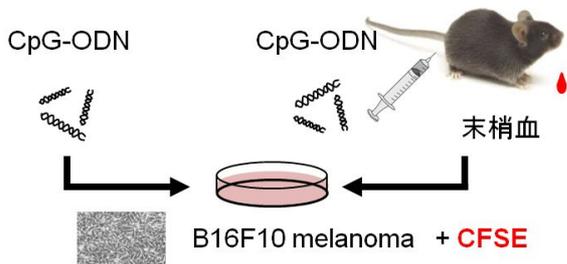


図10. CpGで活性化した末梢血液細胞の機能

培養系において、B16F10 に CpG を添加しても分裂の抑制はみられなかったが、CpG で活性化した末梢血液細胞と共培養すると B16F10 の分裂抑制がみられた(図 11)。このことは、CpG は免疫系の細胞種を介して B16F10 の成長を阻害することを示唆している。

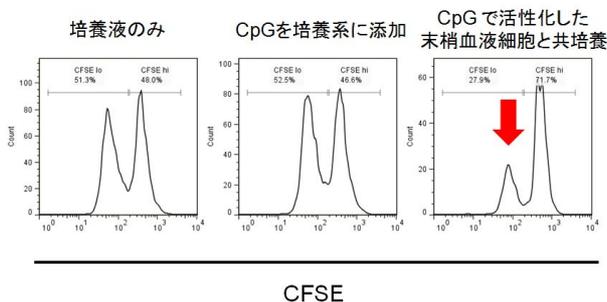


図11. CpG で感作された末梢血液細胞は B16F10 の成長を抑制する

腫瘍モデルに CpG を投与した際に、どのような細胞種が抗腫瘍効果に関与しているのかを検討した。腫瘍病巣の中心部や、転

移巣で観察されるといわれている、MDSC ( Myeloid Derived Suppressor Cells; Gr-1/Ly-6C 陽性分画)について、末梢血液中の分画を比較検討した。B16F10 移植後あるいはODN投与後にはMDSCの分画が同程度に相対的な増加を認めた。腫瘍モデルマウスに CpG を投与すると、MDSC の相対的な減少を認めた。中でも Gr-1 陽性分画の減少が顕著であった。(図 12)。

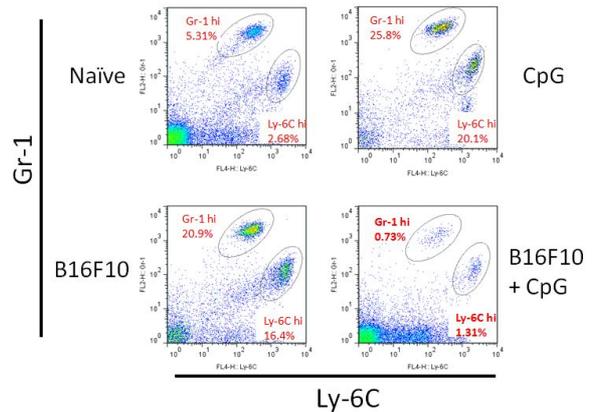


図12. 腫瘍モデルにCpGを投与すると、Gr-1<sup>hi</sup>が減少する。

以上をまとめると、

- (1) CpG の投与で生体内の免疫系の生産源となる骨髄細胞の周期を制御できる。
- (2) CpG を投与すると腫瘍の成長抑制がみられたが、腫瘍の成長を直接抑制する能力はなかった。
- (3) CpG を投与することで、生体内の MDSC が相対的に減少し、それら末梢血液細胞には腫瘍の分裂抑制効果がみられた。

結論として、CpG 投与によって MDSC を始めとした免疫系の細胞種の役割を理解することで、悪性黒色腫のコントロールにつながるものと考えられる。

### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 平成 24 年 11 月 3 日、郡山、第 32 回公益社団法人 日本口腔インプラント学会 東北・北海道支部総会・学術大会

(2) 平成 25 年 5 月 24 日、宇都宮、第 67 回 日本口腔科学会

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑島精一 (KUWAJIMA Seiichi)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号：40569448

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：