

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670558

研究課題名(和文) Tissue Engineering をもちいた抗腫瘍免疫応答の誘導

研究課題名(英文) Induction of anti-tumor immune response using a Tissue Engineering technique

研究代表者

後藤 満一 (Gotoh, Mitsukazu)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50162160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：フィブリンの働きに着目し、OK-432を用い、固形がんに対する免疫療法の開発に向けた基礎研究を行うことを目的とした。

フィブリン網の電子顕微鏡による観察を行い、至適希釈倍率を決定し、マクロファージのフィブリン内への侵入およびOK-432貪食像を確認した。次に、フィブリンにOK-432を加えることによりマクロファージ系細胞株J774.1がフィブリン内に数多く侵入すること(遊走能獲得)を評価した。ラット門脈塞栓モデルでは組織障害・炎症性細胞浸潤の経時的変化の観察し、フィブリンの存在により組織学的な障害が長期間残存し、組織障害部位にマクロファージの浸潤細胞数が多く炎症反応が遷延することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Focusing on scaffold function of fibrin, we carried out research for development of immunotherapy for solid tumors. The microstructure of fibrin was observed with electron microscope to determine the optimal dilution. In macrophage infiltration assay using fibrin containing OK-432, significantly large number of cells were observed in fibrin gel compared to fibrin without OK-432. In the rat portal vein embolization model, we evaluated the extent of liver tissue damage and cell infiltration due to the difference of embolic materials. When embolization was performed using embolic material containing fibrinogen, histological damage of the liver in association with significant number of infiltrating macrophages was observed until 7 days after the embolization. These data together suggested that coexistence of fibrin and OK-432 has affected the local immune environment.

研究分野：医学

キーワード：腫瘍免疫 徐放物質 フィブリン OK-432

### 1. 研究開始当初の背景

Fibrinは主に急性期の組織修復に関わり、細胞遊走や増殖に関わるサイトカインなどのリザーバーとしての機能をするとともに、異物拡散を防ぎ、細胞浸潤の足場としての働きがある。

OK-432はStreptococcus pyogenes S株のペニシリン処理凍結乾燥粉末であり、免疫細胞を活性化しサイトカインの産生を促す。我々は、肝細胞癌の術後残肝再発を抑制する目的で、術前にOK-432とfibrinogenで栄養動脈を塞栓(TIE)したところ、手術単独群と比較し、術後再発が有意に抑制され、腫瘍内へマクロファージ、CD8+細胞、樹状細胞が出現し、FOXP3陽性T細胞が有意に低下することを明らかにし、TIEではfibrinという生理的なscaffoldをもちいることで、自然免疫から獲得免疫へとsequenceがtempoを損なわず誘導されたと考えられた。また、TIE後の $INF\gamma$ 上昇は24時間後に誘導され発熱が3日間持続するため、免疫応答は日の単位で継続していることが読める。

### 2. 研究の目的

細胞遊走や増殖に関わるサイトカインなどのリザーバーとしての機能および細胞浸潤の足場としての働きがあるフィブリンに関して、免疫細胞を活性化するOK-432を用いて、固形がんに対する免疫療法の開発に向けた基礎研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

- ①フィブリン網およびフィブリンに結合したOK-432の状態を電子顕微鏡で観察
- ②マクロファージ系細胞株 J774.1・蛍光標識したOK-432を用いて貪食形式および細胞の活性化(遊走能獲得)の観察
- ③ラット門脈塞栓モデルによる免疫塞栓療

法による組織障害・炎症性細胞浸潤の経時的変化の観察を実施した。

### 4. 研究成果

#### ①フィブリン網とOK-432の電子顕微鏡での観察

フィブリノゲンとトロンビンを混和しフィブリン網を作成した。図1に示すようにフィブリノゲンの濃度を変えて作成し、電子顕微鏡でフィブリンの観察を行った。希釈によりフィブリン網の目の大きさが変化することが明らかとなり、電子顕微鏡でのフィブリン網の形状と扱いやすさを考慮し、8倍希釈で作成したフィブリンを用いて今後の実験を行うこととした。

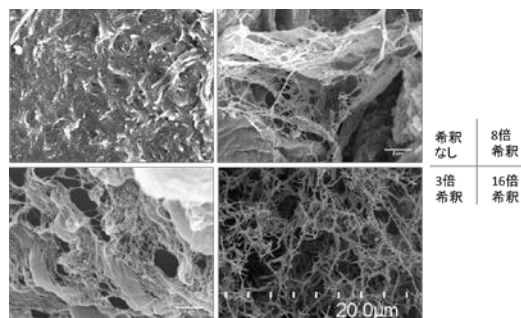


図1 希釈倍率別フィブリン網

次に、OK-432入りのフィブリノゲンにトロンビンを混和し、フィブリン網を作成した。電子顕微鏡で観察すると、粒状のOK-432がフィブリン網に入り込むよう存在していることが明らかとなった。培地(RPMI1640)にこのフィブリン網を入れ、マウスマクロファージ cell line J774.1と培養し、J774.1のフィブリン網への侵入する像とOK-432の菌体を貪食する像を観察した(図2)。

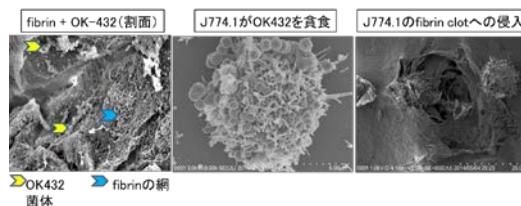


図2 フィブリンとOK-432

②J774.1 を用いたマクロファージ活性化に関する評価

フィブリン網と J774.1 の共培養で、J774.1 の活性化の評価を行った。当初、培養上清中のサイトカイン測定をもって評価することを検討したが、FCS の存在が強く影響すること、フィブリン網内への侵入の程度が均一でなく、評価が困難であることから、サイトカイン測定による評価は適さないと判断した。

次に、J774.1 と OK-432 を蛍光標識し、OK-432 含むフィブリンと含まないフィブリンを用いて、フィブリン内へ侵入する J774.1 細胞数をもって活性化の評価を行った。図 3 に示すようにフィブリン+OK-432 へ侵入する細胞数が有意に多かった。以上より、フィブリン内に OK-432 が存在することでマクロファージの遊走能が高まるものと考えられた。

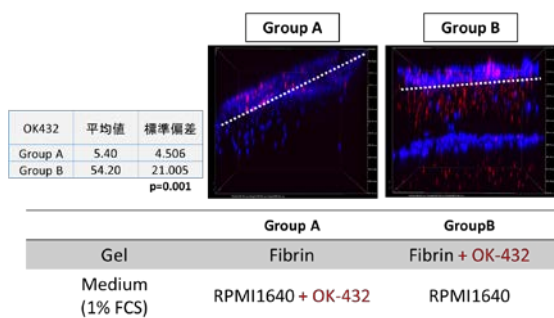


図 3 J774.1 侵入細胞数評価

③ラット門脈塞栓モデルを用いたフィブリン+OK-432 の効果に関する評価

Wister ラットを用いて、経門脈的に塞栓物質を注入し、肝右葉を塞栓するモデルを作成し、塞栓物質の違いによる肝組織障害の程度、マクロファージ浸潤細胞数について評価を行った。

塞栓物質は、①リピオドール、②リピオドール+OK-432、③リピオドール+フィブリノゲン、④リピオドール+フィブリノゲン+OK-432 の 4 種類を作成し、塞栓後、1 日、3 日、7 日に肝臓を摘出し、障害部位の組織変化を観察した。

塞栓後 1 日では塞栓物質の種類に関係なく組織障害を認めたが、フィブリノゲンを含む塞栓物質を使用した場合に組織障害が 7 日後まで遷延していた(図 3)。

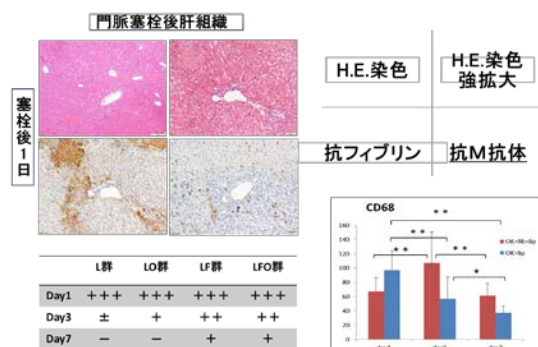


図 3 ラット門脈塞栓モデル

さらに、組織障害を認める部位に一致しマクロファージの集積を認め、リピオドール+フィブリノゲン+OK-432 で門脈を塞栓した群において、浸潤細胞数も長期間増加した状態であった。

以上の実験結果より、フィブリンと OK-432 の組み合わせにより、マクロファージを代表とする自然免疫細胞の遊走能が高まることを観察するとともに、フィブリンの存在により炎症反応を遷延することが明らかとなった。マクロファージより産生されるサイトカインによる局所での免疫環境の変化が、腫瘍に対する免疫応答に影響を与えるものと考えられる。

当施設では、肝細胞癌症例を対象として、フィブリノゲン+リピオドール+OK-432 を用いた術前免疫塞栓療法の実験を実施している。今回の研究で明らかとなった現象が、腫瘍局所での免疫学的環境を変化させ、抗腫瘍反応に関与しているかどうかの検証を予定している。

## 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1件)

- ① 佐藤 哲、見城 明、土屋貴男、斎藤拓朗、佐藤直哉、芳賀淳一郎、穴澤貴行、木村 隆、後藤満一. 術前Transarterial Immunoembolization(TIE: 経動脈免疫塞栓療法)による肝細胞癌切除後再発抑制効果に対する基礎研究. 第114回日本外科学会定期学術集会 2014. 4. 3-5 京都

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

後藤 満一 (GOTOH, Mitsukazu)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号： 5 0 1 6 2 1 6 0

### (2)研究分担者

見城 明 (KENJO, Akira)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号： 4 0 3 0 5 3 5 5

木村 隆 (KIMURA, Takashi)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号： 0 0 3 8 1 3 6 9

穴澤 貴行 (ANAZAWA, Takayuki)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号： 9 0 5 6 6 8 1 1

土屋 貴男 (TSUCHIYA, Takao)  
福島県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号： 7 0 3 4 3 3 9 0