

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861200

研究課題名(和文) マウス骨肉腫における腫瘍感作、Foxp3発現樹状細胞による抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Foxp3 expressed dendritic cells combined with cryoimmunology produce antitumor effects in osteosarcoma

研究代表者

河野 正典 (kawano, masanori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30571773

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)：樹状細胞(DCs)にFOXP3mRNAを導入および発現を確認しこれまで行ってきたRegulatory T cellsの機能を抑制しDCを併用する研究を継続した。私たちはImmunological cell death(ICD)に注目した。肉腫に対する化学療法で用いられるadriamycinをLM8に反応させるとin vitro, in vivoともにcalreticulin, heat shock protein 70の細胞表面への高発現, high mobility group box 1の細胞外放出を確認し、さらにマウスDCの活性化を確認しこのモデルでのICDを証明した。

研究成果の概要(英文)：We introduced FOXP3 mRNA into dendritic cells (DCs) and confirmed its expression. We have continued our study for a combined use of DCs by inhibiting the functions of regulatory T cells. We focused on immunological cell death. This is a phenomenon where, through the use of anticancer agents, cancer cells become more readily perceived by DCs and such because proteins expressed on the cell surface become antigens. While this has already been demonstrated in other carcinomas, we investigated whether a similar immunoreactivity increase occurs in murine osteosarcoma cells (LM8). When adriamycin used in chemotherapy for sarcoma was reacted to LM8, a high expression of calreticulin and the heat shock protein 70 on the cell surface, and extracellular release of high mobility group box 1 were observed both in vitro and in vivo, as well as the activation of mouse DCs, proving the ICD in this model.

研究分野：悪性腫瘍

キーワード：骨肉腫 腫瘍免疫

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は細胞性免疫を阻害している因子に注目することにした。制御性 T 細胞 (Regulatory T cell, 以下 Treg) が腫瘍局所およびリンパ節などで樹状細胞、effector T cell など腫瘍を攻撃する免疫因子を阻害している可能性を考えた。Treg は腫瘍内において種々の因子を放出または発現し免疫寛容の状態へ移行させ、腫瘍免疫の攻撃を回避している。これまでの研究によって、

1) DCs を凍結組織と反応させる事でその効果が上昇すること、

2) Treg を抑制することで細胞性免疫がさらに活性化すること、が明らかとなった。しかしながら、正常細胞に普遍的に発現している TGF- $\beta$  や CTLA-4 をターゲットとする抗体投与は重篤な副作用を引き起こす可能性がある。そこで Treg に特有な転写因子である Foxp3 に注目した。我々は DCs に foxp3 の mRNA

(MIGR-mFoxP3 ;Plasmid 24067, addgene) をトランスフェクションさせ Treg をターゲットとする foxp3 ワクチン療法を計画した。

#### 2. 研究の目的

1) 免疫活性に関わる検出可能なすべてのサイトカインを網羅的に定量化してそれぞれの群間で比較する。そこで上昇もしくは低下しているサイトカインを同定する。

2) 腫瘍ライセート、foxp3、その両者を抗原提示させた DCs の培養上清中とマウス血清のサイトカインを経時的に定量化する。即ち腫瘍ライセートが感作された樹状細胞が抗腫瘍効果が発揮される可能性と、Treg を特異的にターゲットとする DCs の感作により重篤な副作用が減少できるサイトカイン・ケモカインが明らかになる。

3) 私たちは Immunological cell death (ICD) に注目した。これは抗癌剤を使用することにより癌細胞が細胞表面に発現するタンパクが抗原となり DC などに認識されやすくなる、という現象である。樹状細胞療法と抗がん剤で誘導される ICD の併用についても検討した。

#### 3. 研究の方法

治療後 3 週間後 (35 日目) に LM8 細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞) を背部に皮下再移植する。皮下再移植 2 週間後に腫瘍形成の有無を確認する。切除した病巣を液体窒素で処理した。これまでの実験で

a) マウス骨肉腫細胞を用いその凍結腫瘍組織を体内へ戻すという方法が抗腫瘍効果を増強させることは明らかになっている。

b) 本研究ではより特異的な免疫効果を惹起させるために抗原提示細胞である樹状細胞に腫瘍ライセートを感作させると同時に Treg の特異的抗原となる Foxp3 を mRNA の導入により樹状細胞に抗原提示させる。これにより Treg を標的とするエフェクター T 細胞が惹起されると考えた。

これまでの実験データからは樹状細胞の抗

原感作による成熟とそれに伴う T 細胞の活性化、抗 TGF- $\beta$  抗体、抗 CTLA-4 抗体により Treg が抑制した状態で抗腫瘍効果が増強した結果を確認したが、エフェクター T 細胞に Treg をターゲットにさせるという異なるアプローチである。これらのデータをさらに蓄積することで臨床応用に向けたより正確な結果が得られるものと考えている。

#### 4. 研究成果

我々はこれまで行ってきた Regulatory T cells (Tregs) の機能を抑制し DC を併用する研究を継続した。今のところ抗 glucocorticoid-induced TNFR family related gene (GITR) 抗体と DC を併用すると Treg の腫瘍への集積が抑制され、同時に Treg が放出する免疫抑制因子 (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6) の発現が低下していることを real-time PCR, 腫瘍組織のウェスタンブロットで確認した。すでに他の癌腫で証明されていたが、我々はマウス骨肉腫細胞 (LM8) にも同様の免疫活性上昇が発生しないか調査した。肉腫に対する化学療法で用いられる adriamycin (ADM) を LM8 に反応させると in vitro, in vivo とともに calreticulin (CRT), heat shock protein (HSP) 70 の細胞表面への高発現, high mobility group box 1 (HMGB1) の細胞外放出を確認し、さらにマウス DC の活性化を確認しこのモデルでの ICD を証明した。

#### 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 13 件)

1) Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Miyazaki M, Ikeda S, Tsumura H. Dendritic cells combined with doxorubicin induces immunogenic cell death and exhibits antitumor effects for osteosarcoma. *Oncology Letters* 2016.11(3):2169-2175 (査読有り) .

2) Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H. MicroRNA-301a promotes cell proliferation via PTEN targeting in Ewing's sarcoma cells. *Int J Oncol*. 2016. 48(4):1531-40 (査読有り) .

3) Tanaka K, Kawano M, Itonaga I, Iwasaki T, Miyazaki M, Ikeda S, Tsumura H. Tumor suppressive microRNA-138 inhibits metastatic potential via the targeting of focal adhesion kinase in Ewing's sarcoma cells. *Int J Oncol*. 2016.48(3):1135-44 (査読有り) .

4) c-Myc Represses Tumor-Suppressive microRNAs, let-7a, miR-16 and miR-29b, and Induces Cyclin D2-Mediated Cell Proliferation in Ewing's Sarcoma Cell Line.

Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H. PLoS One. 2015 Sep 22;10(9):e0138560 (査読有り).

5) microRNA-93 promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Osteosarcoma cells. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Ikeda S, Iwasaki T, Tsumura H. J Exp Clin Cancer Res. 2015 Aug 5;34:76 (査読有り).

6) Dendritic cells combined with anti-GITR antibody produce antitumor effects in osteosarcoma. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Miyazaki M, Ikeda S, Tsumura H. Oncol Rep. 2015 Oct;34(4):1995-2001 (査読有り).

7) Prevalence and distribution of thoracic and lumbar compressive lesions in cervical spondylotic myelopathy. Miyazaki M, Kodera R, Yoshiiwa T, Kawano M, Kaku N, Tsumura H. Asian Spine J. 2015 Apr;9(2):218-24. doi: 10.4184/asj.2015.9.2.218. Epub 2015 Apr 15 (査読有り).

8) Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells. Iwasaki T, Tanaka K, Kawano M, Itonaga I, Tsumura H. Int J Oncol. 2015.46(4):1543-50 (査読有り).

9) Enhancement of the effects of exfoliated carbon nanofibers by bone morphogenetic protein in a rat femoral fracture model. Miyazaki M, Toyoda M, Yoshiiwa T, Kawano M, Kaku N, Tsumura H. J Orthop Res. 2015 Feb;33(2):185-92.

10) Miyazaki M, Yoshiiwa T, Ishihara T, Kaku N, Kawano M, Tsumura H. Symptomatic spinal cord kinking due to focal adhesive arachnoiditis, with ossification of the ligamentum flavum: a case report. Spine. 2014, 39(8):E538-41 (査読有り).

11) Kodera R, Miyazaki M, Toshiiwa T, Kawano M, Kaku N, Tsumura H. Manipulation of anabolic and catabolic responses with bone morphogenetic protein and zoledronic acid in a rat spinal fusion mode. Bone, 2014, 58: 26-32 (査読有り).

12) Miyazaki M, Yoshiiwa T, Kodera R, Kawano M, Tsumura H.; Analysis of the prevalence and distribution of cervical and thoracic compressive lesions of the spinal cord in lumbar degenerative disease. Asian Spine J. 2014, 8(1):19-26 (査読有り).

13) Yoshiiwa T, Miyazaki M, Kodera R, Kawano M, Tsumura H. Predictable imaging signs of cauda equine entrapment in thoracolumbar and lumbar burst fractures with greenstick lamina fractures. Asian Spine Journal. 2014, 8(3):339-345 (査読

有り).

〔学会発表〕(計 6 件)

1) microRNA-93 promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Osteosarcoma cells. Annual research meeting of the Japanese orthopedic association (Toyama, Toyama).

2015.10.22-23. M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura.

2) Orthopaedic Research Soci in Las Vegas; 2015.3.31. “ Tumor-suppressive

microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells “. M Kawano, K Tanaka, I Itonaga, T Iwasaki, H Tsumura (ラスベガス, USA) .

3) Japan Muscular Skeletal Tumor Society Meeting 2015.7.9. “ microRNA-301a promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Ewing 's sarcoma cells“ . M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura (Kagawa, Takamatsu).

4) Annual research meeting of the Japanese orthopedic association. 2014.10.10. “ microRNA-138 inhibits metastatic potential of Ewing 's sarcoma cells via targeting of focal adhesion kinase “. M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura (Kagoshima, Kagoshima).

5) Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2014.9.26. “ Inhibition of E2F2 expression and cell proliferation of osteosarcoma cells by tumor-suppressive microRNA-let-7a “. M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura (Yokohama, Kanagawa).

6) Japan Muscular Skeletal Tumor Society Meeting 2014.7.17. “ Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 oncogene in osteosarcoma “. M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura. (Osaka, Osaka)

〔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

河野 正典 ( KAWANO masanori )  
大分大学・医学部整形外科・助教  
研究者番号：30571773

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：