

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10820

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌に対する免疫遺伝子治療と分子標的薬併用治療についての検討

研究課題名(英文) immuno-gene therapy and molecularly-targeted agent for head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

中野 宏(nakano, hiroschi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00405309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：1) in vivo electroporation法によるサイトカイン遺伝子導入：IL-21、IL-27、IL-28 発現遺伝子をEBV plasmid vectorに組み込み、electroporation法を用いてSCCVII担癌マウスに導入し、SCCVII の腫瘍増殖が抑制されることを確認した。
2) セツキシマブとの併用治療：さらにセツキシマブとの併用でIL-21、IL-28では相乗的に、IL-28では相加的に腫瘍の増殖を抑制できることを確認した。
3) CTL・NK細胞の細胞傷害活性の検討：抗腫瘍効果のメカニズムを解明するため、NK細胞・CTLの細胞傷害活性を解析したが有意差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that IL-21, IL-27, IL-28 expression gene can suppress SCCVII tumor growth with in vivo electroporation method.
Moreover, we elucidated that combination therapy with Cetuximab and IL-21 or IL-28 can synergistically suppress tumor growth.
In order to elucidate the mechanism, we analyzed cytotoxic activity of NK cell and CTL, but significant difference could not be apparent.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：サイトカイン 頭頸部扁平上皮癌 免疫遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

IL-21 は IL-2 や IL-15 と相乗的にはたらき、T 細胞、B 細胞、および NK 細胞の増殖、分化、遊走を促進することが報告されている。我々は、これまでに C3H マウス由来頭頸部扁平上皮癌株である SCCVII を C3H マウスに移植し、担癌マウスモデルを作成し、Hydrodynamics 法を用いて *in vivo* で IL-21 および IL-15 発現遺伝子を導入することにより IL-21 の抗腫瘍効果とそのメカニズムについて検討してきた。その結果、IL-21 は IL-15 と相乗的に作用して SCCVII の腫瘍増殖を抑制することが実証された。さらに IL-21 が IL-15 と相加的に作用して NK 細胞の細胞傷害活性を亢進させるとともに、cytotoxic T lymphocyte (CTL) の細胞傷害活性も増強することを示した。また、IL-21 が SCCVII に特異的な抗体の産生を促進していることを示した。

IL-27 は T-bet、IL-12R₂、Granzyme B を介して CTL の分化・維持を促進することが報告されている。我々は IL-27 発現遺伝子を Hydrodynamics 法を用いて SCCVII 担癌マウスに遺伝子導入することにより、IL-27 が antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) を活性化するとともに、NK 細胞の細胞傷害活性を増強することができることを示した。

IL-28 は interferon(IFN)- γ とも称され、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用を有することが知られている。その受容体は、IL-28R および IL-10 や IL-22、IL-26 と共有する IL-10R2 の複合体で構成され、IFN- γ は、受容体から Tyk2、Jak を介して STAT 1、STAT 2 をリン酸化するという Type 1-IFN と同様のシグナル伝達を惹起する。我々はこれまでに SCCVII 担癌マウスモデルに IL-28 を皮下投与

することで CTL、NK 細胞の細胞傷害活

性が増強されることを示した。また、IL-28 と CDDP の併用治療により CDDP 単独治療に比べて、抗腫瘍効果ならびに全身の CTL、NK 細胞の細胞傷害活性が増強されることを示し、IL-28 が骨髄細胞の増殖を抑制しないことも示した。

2. 研究の目的

そこで本研究においては、Interleukin-21 (IL-21)、IL-27、IL-28 を用いたサイトカイン遺伝子治療と近年、頭頸部扁平上皮癌での有効性が注目されているセツキシマブをはじめとする分子標的薬を併用することによる頭頸部癌治療の開発とその抗腫瘍効果のメカニズムについて解析する。

3. 研究の方法

1) In vivo electroporation 法によるサイトカイン遺伝子導入

我々はこれまでに IL-21、IL-27 発現遺伝子を EBV plasmid vector (pGEG.4) に組み込んだプラスミド (pGEG.mIL-21、pGEG.mIL-27) を構築し、これを Hydrodynamics 法を用いて SCCVII 担癌マウスモデルに導入し、IL-21、IL-27 が SCCVII の腫瘍増殖を抑制することを示した (J. Gene Med 2006、Cancer Research 2009)。本研究ではさらに IL-28 発現遺伝子を pGEG.4 に組み込んだプラスミドを作成し、in vivo electroporation 法を用いて遺伝子導入し、抗腫瘍効果について検討する。

2) 分子標的薬との併用治療

セツキシマブをはじめとする分子標的薬を全身投与(腹腔内投与、静脈内投与)および局所投与(electrochemotherapy)し、抗腫瘍効果を検討する。

Electrochemotherapy は抗悪性腫瘍剤を電気刺激によって細胞膜を透過させることで、より効率的に腫瘍増殖を抑制できる方法として知られている。

3) CTL・NK 細胞の細胞傷害活性の検討

各治療後マウスの脾臓を摘出し、脾細胞を回収し、Cr で標識した SCCVII と co-culture し、放出される Cr を線シンチレーションカウンターで測定することで CTL の細胞傷害活性を、また Cr で標識した YAC-1 細胞と co-culture し、放出される Cr を測定することで NK 細胞の細胞傷害活性を測定し、各治療の抗腫瘍免疫に与える作用について検討する。

4) 血清中の IFN- γ 、TGF- β などのサイトカイン濃度および腫瘍組織内の EGFR

濃度の測定

治療後マウスの血清中に含まれる IFN- γ 、TGF- β などのサイトカイン濃度および腫瘍組織内の EGFR 濃度を ELISA にて測定し、副作用および EGFR に及ぼすサイトカインの影響について検討する。

5) SCCVII specific T cell clone の樹立

C3H/HeN マウスから回収した脾細胞をマイトマイシン C で処理した SCCVII と IL-2 存在下に co-culture し、増殖のよい clone を cloning し、この clone をマイトマイシン C で処理した SCCVII とさらに co-culture し、細胞増殖能を測定。さらに培養上清中の IL-2 を ELISA で測定し、SCCVII に対する特異性を確認する。

6) 抗原性に対する影響の検討

治療後マウスのリンパ節および脾臓に含まれる樹状細胞を回収し、Flowcytometry を用いて樹状細胞をソーティングする。回収した樹状細胞を樹立した SCCVII specific T cell clone と co-culture し培養上清中の IL-2 を ELISA にて測定することで、SCCVII の抗原性に対する各治療の影響を検討する。

7) 抗体産生増強効果の検討

治療後マウスの血清を回収し、固相化した SCCVII に回収した血清を加え、固相化した SCCVII に結合する IgG を ELISA にて定量する(indirect cellular ELISA)。同様に SCCVII に回収したマウス血清を加え、SCCVII 特異的 IgG を Flowcytometry を用いて比較検討する。

4. 研究成果

1) in vivo electroporation 法によるサイトカイン遺伝子導入：

IL-21、IL-27、IL-28 発現遺伝子を EBV plasmid vector に組み込んだ。

それぞれの plasmid vector を in vitro で培養細胞に導入し、培養上清中の IL-21、IL-27、IL-28 濃度を ELISA で測定することにより、サイトカインが発現していることを確認した。

IL-21、IL-27、IL-28 発現遺伝子を in vivo electroporation法を用いて SCCVII 担癌マウスに導入し、経時的に腫瘍径を測定したところ、いずれの治療でも SCCVII の腫瘍増殖が有意に抑制されることを確認した。

2) セツキシマブとの併用治療：

さらに SCCVII 担癌マウスに IL-21 単独、IL-27 単独、IL-28 単独、IL-21 + セツキシマブ、IL-27 + セツキシマブ、IL-28 + セツキシマブ、セツキシマブ単独治療を行ない腫瘍増殖抑制効果を比較検討したところ、IL-21 + セツキシマブでは IL-21 単独治療に比して相乗的な腫瘍増殖を抑制できることを確認した。

同様に IL-27 + セツキシマブでは IL-27 単独治療と比して相乗的な腫瘍増殖抑制効果を示した。

一方、IL-28 + セツキシマブでは IL-28 単独治療と比して相乗的な腫瘍増殖抑制効果は見られず、相加的な効果に限られた。

3) CTL・NK 細胞の細胞傷害活性の検討：

抗腫瘍効果のメカニズムを解明するため、NK 細胞・CTL の細胞傷害活性について検討した。IL-21 単独治療群、ならびに IL-21 + セツキシマブ併用群のマウス脾細胞を採取し、Cr で標識した SCCVII と co-culture し、放出される Cr を 線シンチレーションカウンターで測定することで CTL の細

胞傷害活性を、また Cr で標識した YAC-1 細胞と co-culture し、放出される Cr を測定することで NK 細胞の細胞傷害活性を測定したが、いずれも IL-21 + セツキシマブ群と IL-21 単独治療群で有意差を認めなかった。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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

中野 宏(Hiroshi Nakano)

京都府立医科大学・耳鼻咽喉科学教室・講師

研究者番号:00405309

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()