

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007年～2010年

課題番号：19590738

研究課題名(和文) 消化器癌におけるインターフェロン産生キラー樹状細胞の治療効果と臨床応用

研究課題名(英文) Interferon-producing killer dendritic cell-based immunotherapy for gastrointestinal cancer

研究代表者：

廣石 和正 (HIROISHI KAZUMASA)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：80296996

研究代表者の専門分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、インターフェロン、免疫療法、抗腫瘍効果

1. 研究計画の概要

IFN 産生キラー樹状細胞(interferon-producing killer dendritic cell: IKDC)は B220+, CD11cint, NK1.1+, CD49b+, Gr-1-という表面マーカーを表出し、IFN- γ を大量に産生するとともに、直接腫瘍細胞を傷害する。これらの細胞は、抗原提示細胞として免疫応答の誘導調節に重要な役割を果たすだけでなく、エフェクター細胞としての機能も果たすサブセットとして注目されている。本研究は、IKDCのサブセットの分離、培養法を確立し、その性状を解析し、マウス生体内での抗腫瘍効果とその作用機序を検討することを目的とする。

2. 研究の進捗状況

マウスの脾臓から IKDC の誘導を試みた。C57BL/6 マウスより脾細胞を分離し、CD4 陽性細胞、CD8a 陽性細胞、B 細胞、好中球、赤血球を磁気により分離して NK 細胞分画を採取した後、CD11c 陽性細胞をマイクロビーズで分離した。7.4x10⁸ から 1.1x10⁹ 個の脾細胞から分離した NK1.1 陽性樹状細胞は、2.2x10⁴ から 2.3x10⁴ 個とかなり少数であり、その後、細胞の特性を測定するには困難であった。したがって、in vitro で IKDC 細胞分画を増加させる試みとして、これまでに報告されている種々の物質を添加してマウス脾細胞を培養した。これらの試薬を添加しないコントロールと比較し、細胞培養後に IKDC 細胞分画細胞数は、IL-4 で 1.2-5.2 倍、IL-15 で 1.8-4.0 倍、IL-18 で 0.8-5.2 倍、GM-CSF で 2.3-2.5 倍、TNF- α で 1.2-4.5 倍、FLT-3 リガンドで 1.4-2.5 倍、CpG で 2.2-2.6 倍、LPS

で 1.4-2.8 倍にそれぞれ変化していた。マウスの脾細胞に CpG、FLT3 リガンド、IL-15、IL-18 すべてを培養上清中に添加して培養すると、無添加群と比較し添加群は 1.34 倍から 6.38 倍の CD11c+NK1.1+細胞を誘導することが可能であった。また、共刺激分子(CD80, CD86)の発現増強も観察された。

次に、マウスの脾細胞から樹状細胞を分離してからサイトカインなどと in vitro で培養し、IKDC を増殖させる方法を試みた。まず MACS システムにより、マウス脾細胞から CD11c 陽性細胞を分離した。マウス脾細胞に CpG-ODN 30 μ g/mL, FLT-3 リガンド 50 ng/mL, IL-15 50 ng/mL, IL-18 50 ng/mL をそれぞれ添加して培養すると、無添加群と比較し CpG-ODN が 2.81 \pm 1.73 倍、FLT-3 リガンド 1.75 \pm 1.32 倍、IL-15 が 1.53 \pm 0.44 倍、IL-18 が 1.60 \pm 0.49 倍と CD11c+NK1.1+細胞を増加させたことが、フローサイトメトリーで観察された。

そこで、CpG、FLT3 リガンド、IL-15、IL-18 のすべてを培養上清中に添加して培養を試みた。24 時間後、または 7 日後に細胞を回収し、MHC class I, class II 分子や共刺激分子(CD80, CD86)などの表面マーカーをフローサイトメトリーで検討した。CD11c+NK1.1+細胞数は、無添加群では 24 時間後で 4.9 x 10⁴、7 日後で 3.6 x 10³であったのに対し、サイトカイン等を添加した群では 24 時間後で 6.6 x 10⁴、7 日後で 8.3 x 10³であり、各回において 1.34 倍から 6.38 倍の CD11c+NK1.1+細胞が誘導できた。それらの細胞上の共刺激分子(CD80, CD86)の発現増強も観察された。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

(理由) IKDC の分離・誘導法は未だ確立されていない。種々の方法を試みたが、解析に十分な細胞数を確保するのが困難であった。また、マウスにより誘導される IKDC の数にかなり差異がみられ、収量を予測するのが困難であることも頻回の実験が必要であった理由である。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの結果からは、マウス脾細胞から CD11c 陽性細胞をまず分離し、その後、CpG、FLT3 リガンド、IL-15、IL-18 のすべてを培養上清中に添加して、24 時間後には比較的多くの IKDC を得られることが分かった。今後はこの方法で得られた細胞を用い、CD11c+NK1.1+細胞の IFN- γ などのサイトカイン産生能を ELISA で、またアロリンパ球刺激能を MTT アッセイで検討していく。IKDC は TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) を介して直接腫瘍細胞を傷害するとの報告があり、誘導した細胞上の TRAIL の発現も検索する予定である。

そして、予めマウス大腸癌 MC38 細胞を接種し腫瘍を形成したマウスに対し、サイトカイン等で誘導した CD11c+NK1.1+細胞を皮下に投与して in vivo での治療を行い、MC38 腫瘍の大きさを測定して抗腫瘍効果を観察する。さらに、治療後に MC38 腫瘍の免疫組織染色や、腫瘍内浸潤リンパ球の表面マーカーをフローサイトメトリーで検索することにより、免疫学的作用機序を検討していく予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 1 件)

- ① Hiraide A, Hiroishi K, Eguchi J, Ishii S, Doi H, Imawari M. Dendritic cells stimulated with CpG oligodeoxynucleotides and IFN-alpha-expressing tumor cells effectively reduce outgrowth of established tumors in vivo. 99: 1663-1669, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 廣石和正、井廻道夫. IFN- α 遺伝子導入癌細胞と樹状細胞との融合細胞による抗腫瘍免疫誘導作用の検討. 第 49 回日本消化器病学会大会. 2007. 10. 19. 神戸
- ② Doi H, Hiroishi K, Hiraide A, Eguchi J, Ishii S, Matsumura T, Sakaki M, Imawari M. Efficacy and mechanism of dendritic

cell-based immunotherapy with CpG and IFN-alpha-expressing tumor cells for murine colorectal cancer. 2008 American Association of Cancer Research 99th Annual Meeting. 2008.4.14. San Diego, USA.

- ③ 廣石和正、平出綾子、江口潤一、坂木 理、土肥弘義、井廻道夫. 樹状細胞とインターフェロン α 、CpG併用療法による抗腫瘍効果の作用機序. 第 94 回日本消化器病学会総会. 2008. 5. 10. 福岡
- ④ 土肥弘義、廣石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、井廻道夫. インターロイキン-4 とCpGを用いた消化器癌に対する免疫療法の検討. 第 95 回日本消化器病学会総会. 2009. 5. 9. 札幌

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記すべきことなし