

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19591704  
 研究課題名 (和文) 活性型グリオーマワクチンの開発 (免疫賦活型ワクチン誘導法の検討)  
 研究課題名 (英文) Induction of active anti-glioma vaccine  
 研究代表者：赤崎 安晴 (AKASAKI YASUHARU)  
 東京慈恵会医科大学、医学部、助教  
 研究者番号：00256322

## 研究成果の概要

IL-10-siRNA と double-stranded RNA を、樹状細胞とグリオーマ細胞との融合細胞に導入した場合、MHC、CD80 および CD86 を高発現する IL-10 低分泌・IL-12 高分泌型融合細胞が得られた。この融合細胞で CD4+T 細胞を刺激したところ、コントロールに比べて著明な抗腫瘍免疫反応の誘導が確認された。従って、本研究で開発した方法により、免疫賦活型ワクチンが確実に誘導できると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学／脳神経外科学

キーワード：樹状細胞、グリオーマ、Th-1、免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、悪性グリオーマ患者に対する免疫治療として、患者本人の手術検体から単離した腫瘍細胞と自家樹状細胞との融合細胞を腫瘍ワクチンとして用いる治療法の基礎的研究ならびに臨床研究を行い、その有効性を報告してきた。専門的抗原提示細胞である樹状細胞は、その成熟状態が免疫系の調節に深く関与していることが以前より指摘されている。抗原を取り込んだ樹状細胞はその成熟過程において、主要組織適合抗原 (MHC) や、CD80、CD86 などの co-stimulatory molecules を細胞表面に発現し、これらの働きによってリンパ球を活性化

していることが知られている。また、樹状細胞はインターロイキン (IL)-12 や IL-10 等の分泌能を有しており、細胞周囲の環境に応じてこれらの分泌量を調節することによっても免疫系をコントロールしているものと考えられる。すなわち、樹状細胞が、免疫賦活型抗原提示細胞として作用する場合は、MHC、CD80 や CD86 を高発現するとともに、IL-12 を高度に分泌し、抗腫瘍免疫に必要な不可欠な helper T 細胞 (Th-1) や細胞障害性 T 細胞の誘導に働く一方で、時として免疫抑制型抗原提示細胞に変化し、IL-10 等の免疫抑制性サイトカインを高度に分泌し、免疫系に対して抑制的に作用する regulatory T 細胞 (Treg)

等を誘導する場合があると考えられる。これまでの報告から、グリーマ細胞が分泌する TGF- $\beta$ 、IL-10 やプロスタグランディン E2 などの免疫関連因子による刺激は、担癌固体の樹状細胞に対して複雑に作用し、樹状細胞における IL-10 分泌亢進や IL-12 分泌抑制、MHC および CD80/86 などの表面マーカーの発現減弱に関与していることが知られるようになってきた。つまり、当施設での臨床試験で使用中の融合細胞は、その作成段階において腫瘍細胞の影響により、一部の細胞が免疫賦活型から免疫抑制型へ変貌を余儀なくされている可能性が否定できない。そして、この免疫抑制型融合細胞が治療効果を減衰させている可能性があるため、確実な免疫賦活型ワクチン誘導法の確立が急務と考えられた。

## 2. 研究の目的

悪性グリオーマ患者に対する自家樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を用いた免疫治療において、更なる治療効果を発現させるために、融合細胞自身からの IL-10 分泌抑制、IL-12 分泌促進、MHC や CD80/86 などの表面マーカーの発現増強など、免疫賦活型抗原提示細胞として不可欠な要素を十分に満たした活性型腫瘍ワクチンを作成し、臨床応用という点からも実現性のある免疫賦活型ワクチン誘導法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 倫理対策：研究検体としてヒトグリオーマ細胞や樹状細胞が必要となるため、当施設倫理委員会に本研究計画の詳細について報告した。また、検体提供者に対しては、実験趣旨や検体利用法などを十分説明し、同意を得たうえで検体を作成・使用した。
- (2) 各種細胞の誘導：健常者の末梢血単核球 (PBMC) あるいはグリオーマ患者 PBMC を IL-4, GM-CSF 及び TNF- $\alpha$  存在下で 7 日間培養し、樹状細胞を誘導した。健常者樹状細胞に対する腫瘍細胞として LN-18 (glioma cell line) を、グリオーマ患者樹状細胞に対する腫瘍細胞として、手術摘出検体から単離した primary culture 自家腫瘍細胞を用いた。樹状細胞 2 に対して腫瘍細胞 1 の比率で混和し、ポリエチレングリコールを用いて両者の融合細胞を作製した。
- (3) RNA の細胞内導入：STAT-3 を抑制し樹状細胞を活性化することを目的に STAT-3-siRNA を、樹状細胞からの IL-10 分泌抑制を目的に IL-10-siRNA を、IL-12 の分泌促進を目的に double-stranded RNA (dsRNA) を用いた。コントロール RNA として ON-TARGETplus Non-targeting pool (Dharmacon) を用

いた。トランスフェクション試薬としてカチオンリポソーム LIC (LIC; 日本新薬) を用いた。 $1 \times 10^6$  個の細胞に対して、siRNA (500pmol) + LIC (25mg) 混合液および dsRNA (25mg) + LIC (25mg) 混合液を作成し、培養液中に添加した。

- (4) 導入効率の検討：樹状細胞あるいは腫瘍細胞に対し各 RNA を導入した後、両者の融合細胞を作成した。また、融合細胞を作製した直後に RNA を直接導入する方法も試み、western blotting による STAT-3 測定、ELISA による IL-10・IL-12 の分泌量測定や、FACS による CD80, CD83 および CD86 等の発現率を比較することで、それぞれの方法における導入効率を検討した。
  - (5) Western Blot：検体として健常者融合細胞を用いた。細胞から抽出したタンパク質  $30 \mu\text{g}$  に対して、SDS-PAGE に引き続いて immunoblotting を施行した。Immunoblotting においては、anti-STAT-3, anti-pY705-STAT-3 抗体 (BD Pharmingen) を用いた。
  - (6) ELISA：検体として健常者融合細胞及びグリオーマ患者融合細胞を用いた。Human IL-10 及び IL-12p70 ELISA kit (R&D Systems) を用いて、製造所プロトコールに準じて培養上清中 (融合後 24 時間後および 48 時間後) のサイトカイン測定を行った。
  - (7) FACS：検体として、健常者融合細胞およびグリオーマ患者融合細胞 (融合後 24 時間後) を用いた。PE-conjugated mouse anti-human CD80, FITC-conjugated mouse anti-human CD83, CD86, HLA-DR (BD Pharmingen) を融合細胞と反応させた後に、FACSscan にて陽性率を解析した。
  - (8) ELISPOT：解析検体として、グリオーマ患者融合細胞を用いた。自家リンパ球 ( $5 \times 10^6$  cells/well) と融合細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/well) を 6 well plate で 7 日間共同培養した。Microbead-conjugated anti-human CD4 Ab 及び MiniMACS cell isolation unit (Miltenyi Biotec) を用いて、CD4+ リンパ球を単離した。Human IL-10 及び IFN- $\gamma$  ELISPOT kit (BD Pharmingen) を用いて、製造所プロトコールに準じて CD4+ リンパ球の解析を行った。結果は、それぞれの群における 3 well ごとの spot 数の平均にて比較した。
- ## 4. 研究成果
- (1) STAT-3-siRNA を導入した群では、western blot の結果から、STAT-3 発現

の低下が確認された (data not shown)。しかし、樹状細胞、腫瘍細胞、および融合細胞の全ての細胞群で、STAT-3-siRNA 導入後に細胞の多くが apoptosis に陥ってしまい、樹状細胞を活性化することを目的に使用するには、細胞毒性が強すぎるものと考えられた。この結果から、以下の実験では、STAT-3-siRNA は使用せずに行った。

- (2) IL-10-siRNA を単独導入した場合、樹状細胞 (Table 1a)、腫瘍細胞 (Table 1b)、および融合細胞 (Table 1c) の全ての細胞群で、IL-10 の分泌抑制が確認された。また、全ての細胞群で IL-12p70 の分泌は、IL-10-siRNA 単独導入の有無にかかわらず、何れも検出されなかった (data not shown)。

Table 1a 樹状細胞の IL-10 分泌量  
(単位 : pg)

	コントロール	IL-10-siRNA
健常者 1	19.6	11.1
健常者 2	14.1	7.9
健常者 3	9.5	0
患者 1	9.7	0
患者 2	13.8	8.0

Table 1b 腫瘍細胞の IL-10 分泌量  
(単位 : pg)

	コントロール	IL-10-siRNA
LN-18	26.7	8.5
患者 1	12.1	0
患者 2	33.4	10.2

Table 1c 融合細胞の IL-10 分泌量  
(単位 : pg)

	コントロール	IL-10-siRNA
健常者 1	9.8	0
健常者 2	19.3	7.9
健常者 3	8.1	0
患者 1	9.2	0
患者 2	24.7	11.5

- (3) IL-10-siRNA を、①樹状細胞に導入した後に融合細胞を作成した場合、②腫瘍細胞に導入した後に融合細胞を作成した場合、③両者の融合細胞を作製した後に導入した場合、で導入効果を比較したところ、③融合細胞に導入した場合が最も効率が良く、②腫瘍細胞に導入した場合がこれに続いた (data not shown)。この結果から、以下の実験では、RNA の導

入を樹状細胞と腫瘍細胞との融合細胞を作製した直後に行うこととした。

- (4) 融合細胞に対して、dsRNA を単独導入することにより、IL-12p70 高分泌性融合細胞が誘導されたが (Table 2a)、同時に IL-10 分泌も高まった (Table 2b)。そこで、dsRNA と IL-10-siRNA の両方を融合細胞内に導入したところ、IL-10 分泌を抑制すると同時に、dsRNA 単独群に比べて IL-12p70 分泌が更に増加する傾向を認めた (Table 2a)。また、dsRNA 単独導入群の IL-12p70 分泌は、24 時間後に比べて 48 時間後で著明に減弱していたのに対して、dsRNA+IL-10-siRNA 導入群では、48 時間後の IL-12p70 分泌が高い値で維持されていた (Table 2c)。以上の結果から、融合細胞から IL-12p70 分泌を促進させるには、dsRNA による刺激が必要と考えられた。また、dsRNA の刺激は、同時に IL-10 分泌も促進させるため、IL-10 分泌の抑制を目的に、IL-10-siRNA を併用すべきと考えられた。更に、IL-10-siRNA の導入による IL-10 分泌量の低下に伴い、IL-12p70 分泌亢進が長時間に亘って持続される点においても、免疫賦活型ワクチンとして適しているものと考えた。

Table 2a 融合細胞 (24 時間後)  
の IL-12p70 分泌量  
(単位 : pg)

	コントロール	dsRNA 単独	dsRNA + IL-10-siRNA
健常者 1	0	23.5	36.7
健常者 2	0	23.1	30.8
健常者 3	0	59.3	72.3
患者 1	0	68.4	77.5
患者 2	0	151	162

Table 2b 融合細胞 (24 時間後)  
の IL-10 分泌量  
(単位 : pg)

	コントロール	dsRNA 単独	dsRNA + IL-10-siRNA
健常者 1	10.4	26.2	16.9
健常者 2	17.8	70.9	48.1
健常者 3	12.0	54.6	27.4
患者 1	0	31.7	19.3
患者 2	12.1	24.8	14.4

Table 2c 融合細胞（48時間後）  
の IL-12p70 分泌量  
（単位：pg）

	コントロール	dsRNA 単独	dsRNA + IL-10-siRNA
健常者 1	0	9.2	28.3
健常者 2	0	8.1	27.9
健常者 3	0	10.4	60.5
患者 1	0	18.4	55.1
患者 2	0	48.7	122

(5) 融合細胞（健常者 1）に対する FACS の結果、本研究で使用した融合細胞は、CD80 および HLA-DR は共に陽性率 80%以上、CD86 は陽性率 90%以上であり、リンパ球活性化に必要な細胞表面マーカーは十分に発現していると考えられた（Table 3）。また、dsRNA や IL-10-siRNA の導入は、融合細胞における CD80、CD86 及び HLA-DR の発現に影響を及ぼさず、RNA 導入後も高い陽性率を呈した（Table 3）。同様の結果は、健常者 2 および健常者 3 でも得られた（data not shown）。

Table 3 融合細胞（健常者 1）  
表面マーカー発現率（単位：%）

	CD80	CD86	HLA-DR
コントロール	81.1	93.8	87.9
IL-10-siRNA	84.1	95.6	85.2
dsRNA	87.7	91.6	87.0
dsRNA + IL-10-siRNA	84.1	90.9	80.6

(6) 融合細胞と共同培養して得られた自家の活性化リンパ球を用いた ELISPOT assay の結果、dsRNA 及び IL-10-siRNA の細胞内導入によって誘導された IL-10 低分泌・IL-12 高分泌型融合細胞は、インターフェロン $\gamma$ （IFN $\gamma$ ）を高度に分泌するリンパ球（Th-1 反応）を効率的に誘導し（Table 4a）、同時に IL-10 を高度に分泌するリンパ球（Treg 反応）の出現を顕著に抑制することができた（Table 4b）。

Table 4a IFN $\gamma$  ELISPOT（spot 数）

	コントロール	dsRNA 単独	dsRNA + IL-10-siRNA
患者 1	23	41	158
患者 2	38	117	261

Table 4b IL-10 ELISPOT（spot 数）

	コントロール	dsRNA 単独	dsRNA + IL-10-siRNA
患者 1	86	165	59
患者 2	142	150	34

(7) まとめ：樹状細胞とグリオーマ細胞との融合細胞に対して、融合直後に IL-10-siRNA と dsRNA を導入するという臨床応用という点からも十分に実現性のある方法を用いて、活性型融合細胞を作成することができた。本研究によって得られた IL-10 低分泌・IL-12 高分泌型融合細胞は免疫賦活型ワクチンとして高い有効性が期待できると考える。

## 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) 赤崎安晴、活性型グリオーマワクチンの開発（免疫賦活型ワクチン誘導法の検討）、第26回日本脳腫瘍学会、2008年11月30日、愛媛県松山市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤崎 安晴 (AKASAKI YASU HARU)  
東京慈恵会医科大学・医学部、助教  
研究者番号：00256322

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無