

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790773

研究課題名 (和文) GM-CSF 遺伝子導入肺癌細胞の抗腫瘍効果に関わる樹状細胞重要因子の同定

研究課題名 (英文) Identification of the important factor of GM-CSF sensitized dendritic cells that involves with the process of antitumor effect induced by GM-CSF

研究代表者

田中 芳浩 (TANAKA YOSHIHIRO)

九州大学病院先端分子・細胞治療科

研究者番号：30536850

研究成果の概要 (和文)：

GM-CSF による抗腫瘍効果誘導メカニズムの解明を目的とし、GM-CSF 遺伝子導入肺癌細胞のマウス皮下接種後の拒絶過程における所属リンパ節中樹状細胞 (GM-DCs) の網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイ法を用いて施行した。その結果、I 型インターフェロン産生形質細胞様樹状細胞 (pDCs) 関連遺伝子の有意な発現変動が確認された。また、pDCs 欠失実験、TLR7 アゴニスト併用 *in vivo* 実験結果より pDCs が上記抗腫瘍効果の中心的役割を果たしている事が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

To identify the mechanism of antitumor effect induced by s.c. administration of GM-CSF gene transduced LLC (LLC/SeV/GM) cells, we conducted cDNA microarray analysis by using GM-CSF-sensitized DCs harvested from tumor-derived lymph nodes. The result showed that the genes involved in type I interferons-producing DCs (plasmacytoid DCs; pDCs), upon activation, were robustly upregulated in GM-DCs compared with its counterpart. Furthermore, the results of both *in vivo* depletion of pDCs and s.c. co-administration of TLR7 agonist with LLC/SeV/GM cells indicated that pDCs plays central roles on the antitumor effect induced by GM-CSF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：GM-CSF, 樹状細胞, センダイウイルスベクター, 肺癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は日本人男性の癌死亡原因の1位であり、喫煙対策が重要視されている今日においても、未だ増加傾向にある。しかし、化学療法、放射線治療等有効な治療法がないのが現状で、新しい治療法の開発が急務である。

(2) これまで、GM-CSF (マクロファージコロニー刺激因子) 遺伝子導入自家腫瘍細胞 (GVAX 療法) を用いた固形癌に対する免疫遺伝子治療の臨床および前臨床研究が多数行われその抗腫瘍効果が示されてきた。体内に皮下接種された GVAX は、皮内の樹状細胞 (DCs) を活性化し、腫瘍関連抗原の貪食を

促進後、成熟する。成熟 DCs は所属リンパ節内に遊走し、CD4 陽性 T リンパ球、及びクロスプライミングにより CD8 陽性 T リンパ球に対して効率よく抗原提示を行い、腫瘍特異的 CTL を誘導することで抗腫瘍効果を発揮するものと考えられている。

(3) しかしながら、これまでの研究から GVAX は患者体内で確かに抗腫瘍効果を誘導するが、腫瘍サイズが大きい場合は GVAX 療法の抗腫瘍効果は限定的なものにとどまり、腫瘍の根絶には至らないことから、GVAX 療法の抗腫瘍効果を増強するような新たな免疫遺伝子治療の開発が必須である。

## 2. 研究の目的

(1) GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍効果を増強させるために、同腫瘍拒絶マウスモデルにおける腫瘍抗原特異的 T 細胞プライミングに参与していると考えられる GM-CSF 感作樹状細胞 (GM-DCs) の遺伝子発現パターンを cDNA マイクロアレイ法により網羅的に比較検討し、同過程に重要と考えられる因子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) GM-CSF 遺伝子搭載非伝播型センダイウイルスベクター (SeV/GM) もしくはコントロールベクター (SeV/GFP) を用いて遺伝子導入を行ったマウス肺癌 LLC 細胞  $2.0 \times 10^5$  個をメスの C57/BL6N マウスの右側腹部に皮下接種し、腫瘍拒絶マウスモデル作成する。同担癌モデルマウスの腫瘍拒絶過程において、所属リンパ節 (右腋窩リンパ節) 容積が最大となる時期 (day X) を特定する。

(2) 上記 day X およびその前後日の所属リンパ節より磁気分離法 (MACS 法) を用いて DCs (CD11c 陽性細胞) を分離後、 $\gamma$  線 (30 Gy) 照射によって細胞増殖を抑制する。同様に MACS 法を用いて分離し、CFSE で染色した Balb/cN マウス脾臓由来の T 細胞 (CD3 陽性細胞) と DCs をそれぞれ、DCs : T cell = 1 : 1 の割合で 96 穴プレートに撒き、3 日間もしくは 5 日間共培養する。共培養後、プレート上の細胞を回収し多重染色フローサイトメトリー法によって、T 細胞増殖能を比較測定し、GM-DCs による T 細胞プライミングの最大時期 (day Y) を決定する。

(3) 上記 day Y における、腫瘍所属リンパ節中の樹状細胞の成熟度およびフェノタイプを多重染色フローサイトメトリー法によって比較解析する。(成熟樹状細胞: CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, MHC-Class II<sup>+</sup>. DCs phenotypes: B220<sup>+</sup>(plasmacytoid), B220<sup>-</sup>CD8a<sup>+</sup>(lymphoid), B220<sup>-</sup>CD8a<sup>-</sup>(myeloid))

(4) 上記 day Y の右腋窩リンパ節において、蛍光色素 PKH26 でラベリングした腫瘍細胞貪食成熟 CD86<sup>+</sup>DCs を高速セルソーター (ARIA) を用いて分離する。分離 DCs より mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイを行い、LLC/SeV/GM 接種群と LLC/SeV/GFP 接種 (対照) 群における遺伝子の発現変動を網羅的に比較解析する。

(5) 上記マイクロアレイ法で GM-DCs において顕著に亢進した遺伝子群を抽出同定し、蛋白レベルでの発現量を確認後、これらの同定遺伝子が LLC/SeV/GM 細胞による抗腫瘍効果に参与しているかを、in vivo 実験において検討する (gain of function)。

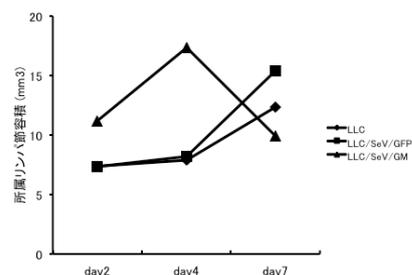
## 4. 研究成果

(1) LLC/SeV/GM および各対照群 (LLC、LLC/SeV/GFP) を接種した C57/BL6N マウスの所属リンパ節 (右腋窩リンパ節) 容積を、接種より 2、4、7 日後 (day 2, 4, 7) に測定した結果、同容積は接種後 2-4 日目までは増大し、4 日目以後は退縮しており、前述 day X を day 4 と想定した。

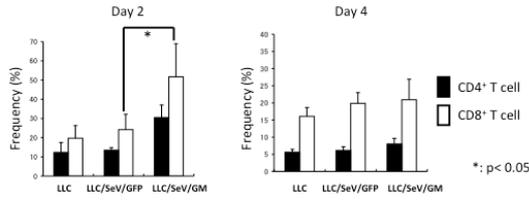
(2) 次に、上記決定した day 4 および day 2 のマウス右腋窩リンパ節由来 DCs の成熟マーカーを多重染色フローサイトメトリー法で比較解析した結果、LLC/SeV/GM 群において、コントロール群と比較し、共刺激因子である CD80 及び CD8、成熟マーカー MHC class II の発現亢進が確認された。

(3) また、day 2 および day 4 のマウス右腋窩リンパ節より分離した DCs と、Balb/cN マウス脾臓由来 T 細胞を共培養して MLR を行った結果、day 2 において、両マウス群 (GM-DCs, GFP-DCs) の特に CD8 陽性 T 細胞の顕著な増殖が促進されていた。更に、LLC/SeV/GM 接種群は、対照群と比較し、有意に CD8 陽性 T 細胞の増殖が促進されていた。上記 (2), (3) の結果と併せて、GM-DCs の T 細胞プライミングの最大誘導時期 (day Y) を day 2 と決定した (図 1, 図 2)。

(図 1) Day 2-day 7 における所属リンパ節 (右腋窩リンパ節) 容積の経時的変化

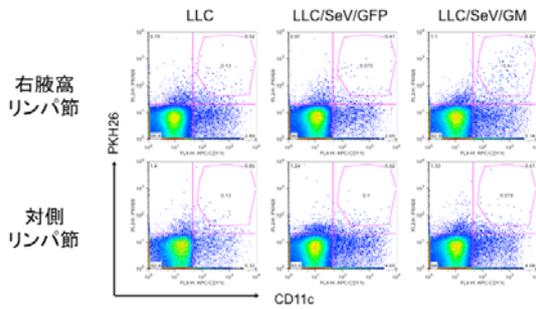


(図 2) Day 2 および day 4 における MLR 結果

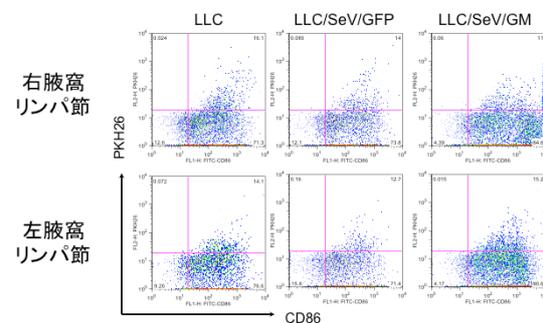


(4) (3)で決定した day 2 において、GM-DCs 遺伝子を網羅的比較解析する際、腫瘍関連抗原食 DCs 分画を同定するため、予め PKH26 蛍光色素で標識した LLC 細胞をマウス皮下接種後の右腋窩リンパ節における PKH26 陽性 DCs をフローサイトメリー法により比較解析した。その結果、LLC/SeV/GM 群において、各対照マウス群と比較し PKH 陽性 DCs 頻度が顕著に増加しており (図 3)、更にこれら PKH26 陽性 DCs は CD86 陽性成熟 DCs であることを明らかにした (図 4)。

(図 3) 所属リンパ節における PKH26 陽性腫瘍抗原食 DCs の比較定量 (day 2)



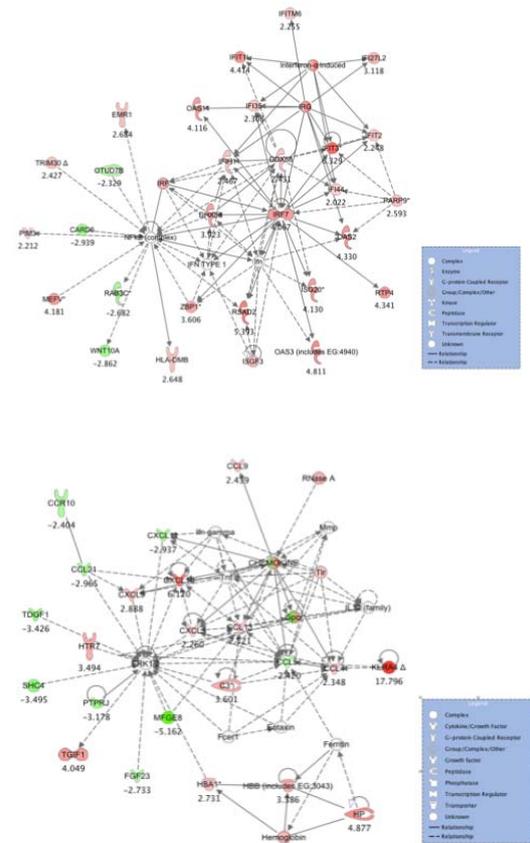
(図 4) PKH26 及び CD86 陽性 DCs 比較定量 (day 2) (CD11c 陽性細胞をゲーティング展開)



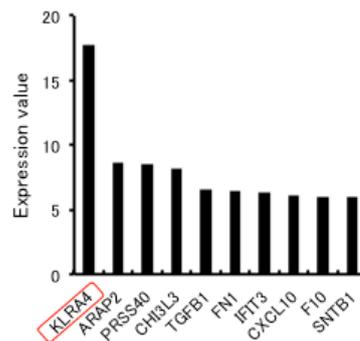
(5) 以上の結果より、LLC/SeV/GM 細胞接種マウス群および LLC/SeV/GFP 細胞接種マウス群右腋窩リンパ節より CD86 陽性 DCs を高速セクターによって分離後 mRNA を抽出し、

cDNA マイクロアレイ法により網羅的に遺伝子発現を比較解析した結果、対照群と比較し LLC/SeV/GM 群において、各種免疫応答や細胞間相互作用に関するパスウェイに属する遺伝子群の発現変動が観察された。その中で、特に I 型インターフェロン関連転写因子 IRF7、I 型インターフェロン誘導蛋白質 IFIT3 を含む I 型インターフェロン関連パスウェイの遺伝子発現、II 型インターフェロン誘導ケモカイン CXCL10 (IP-10)、最も高い発現亢進を呈した遺伝子として C 型レクチン受容体である Ly49D の有意な遺伝子発現亢進が認められた (図 5, 6)。

(図 5) cDNA マイクロアレイ法に基づいた各遺伝子相互パスウェイ解析 (IPA)

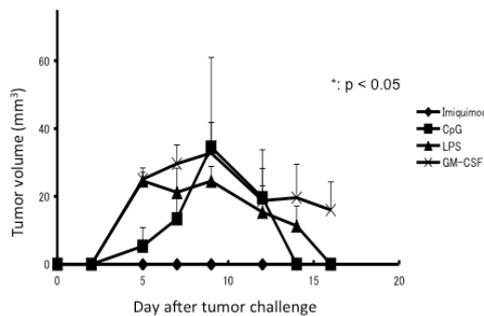


(図 6) GM-DCs において著明な発現亢進を認めた遺伝子リスト



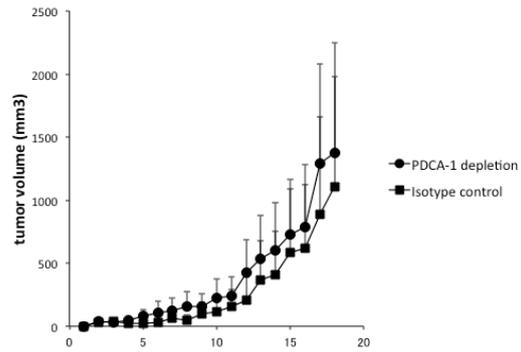
(6) 上記マイクロアレイ法の結果、IRF7 や IFIT3 等の I 型インターフェロングナルが GM-DCs において発現亢進している点に着目し、同遺伝子をリガンド刺激により強く I 型 IFNs を誘導することが知られている形質細胞様 DCs (plasmacytoid DCs : pDCs) に注目した。また、IRF7 は pDCs に発現する TLR7 あるいは TLR9 受容体を介して活性化する。従って、我々は次に上記腫瘍拒絶過程マウスモデルにおいて、LLC/SeV/GM 細胞群に各 TLR アゴニスト (TLR4 アゴニスト : LPS, TLR7 アゴニスト : Imiquimod, TLR9 アゴニスト : CpG-A) をそれぞれに加え、それらの抗腫瘍効果に対する影響を検証した。その結果、Imiquimod 併用群において、LLC/SeV/GM 細胞皮下接種が速やかかつ強力に拒絶されることを見出した (図 7)。この結果より、Imiquimod の TLR7 を介した GM-DCs へのアジュバント効果、及び pDCs の T 細胞プライミングへの主要的役割を担っている可能性が示唆された。

(図 7) TLR7 のアジュバントと LLC/SeV/GM の併用による強力な抗腫瘍効果誘導



(7) (6)の結果より IRF7 を発現する pDCs の関与が GM-DCs による抗腫瘍効果誘導に関与していることが示唆されたため、次に pDCs に特異的に発現する B220 以外の抗原として知られる PDCA-1 に対する特異的中和抗体あるいはアイソタイプコントロール抗体を用いて、マウスに腹腔内投与により PDCA-1 陽性細胞を一時的に欠損したマウスにおける LLC/SeV/GM 細胞接種による腫瘍拒絶応答への影響を解析した。この結果、PDCA-1 陽性細胞欠損群の方がアイソタイプコントロール群と比較して、有意ではないものの腫瘍造性が増大する傾向を認めた。従って、PDCA-1 陽性細胞 (pDCs) は GM-DCs による抗腫瘍効果誘導に中心的役割を果たしていることが示唆された (図 8)。

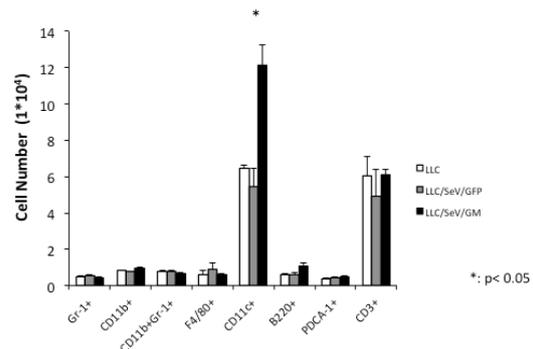
(図 8) PDCA-1 陽性細胞一時欠損マウスにおける LLC/SeV/GM 接種による腫瘍拒絶応答への影響



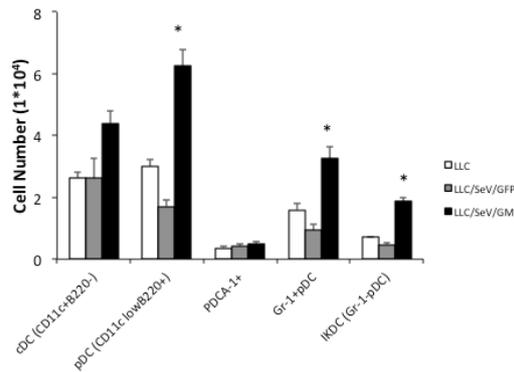
(8) 次に、我々は NK 細胞に発現することが知られている Ly49D 分子が今回 GM-DCs において最も有意な発現変動を呈していることに注目した。同腫瘍拒絶過程における day 2 の右腋窩リンパ節において Ly49D を発現している細胞のフェノタイプをフローサイトメトリーで解析した結果、対照マウス群と比較して LLC/SeV/GM 細胞接種群において、各種免疫担当細胞の中で Ly49D を発現する CD11c 陽性 DCs 数が顕著に増加していることを確認した (図 9)。次にどの DCs サブタイプが Ly49D を優位に発現しているか調べるため目的で、上記実験と同様にフローサイトメトリー法にて比較解析した。その結果、pDCs (CD11c<sup>low</sup>B220<sup>+</sup>) において、Ly49D 陽性細胞数の増加が顕著であり、さらにこの pDCs 分画中において、タイプ I インターフェロン産生キラー DCs (IKDC: CD11c<sup>low</sup>B220<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>) 分画よりも CD11c<sup>low</sup>B220<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 分画の優位な誘導が認められた (図 10)。

マイクロアレイ法により顕著な発現変動の確認された Ly49D は、マウス NK 細胞に発現し、NK 細胞による非自己の認識 (ターゲット細胞の MHC class I の認識) に関与する受容体との報告があるが、今回、我々は初めて GM-CSF 感作により pDCs を中心とした各種 DCs サブタイプにおける Ly49D 発現を増強することを見出した。今後、Ly49D 蛋白の所属リンパ節における T 細胞プライミングにおける機能的意義を明らかにする目的で、同分子陽性及び陰性細胞を用いた MLR 試験を施行する予定である。

(図 9) Ly49D 陽性各種免疫細胞サブタイプ



(図 10) Ly49D 陽性 DCs のサブタイプ解析



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 2 件)

① 成澤 慈、井上 博之、田中 芳浩、横田 洋介、坂本 千香、宮本 将平、井上 朋子、井上 誠、長谷川 護、谷 憲三朗、Comparable transcriptional profile of murine mature dendritic cells in draining lymph node during tumor rejection by non-transmissible Sendai virus encoding GM-CSF infection、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010. 12. 7-10、神戸

② Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Yoshihiro Tanaka, Yosuke Yokota, Chika Sakamoto, Shohei Miyamoto, Tomoko Inoue, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani, Comparative microarray analysis implicates the pivotal participation of Type I Interferon related signaling pathway in antitumor effect provoked by in vivo GM-CSF gene transduced lung cancer cells, ASGCT 14<sup>th</sup> Annual Meeting, 2011. 5. 18-21, SEATTLE, WA. (査読有, 採録決定済)

[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

田中 芳浩 (TANAKA YOSHIHIRO)  
九州大学病院先端分子・細胞治療科・学術  
研究員  
研究者番号：30536850

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：