

平成21年6月1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790960
 研究課題名 (和文) LIGHT 導入腫瘍細胞を中心とした樹状細胞間質細胞複合融合癌ワクチンの基礎的検討
 研究課題名 (英文) Experimental study for fusion vaccine of dendritic cell/ stromal cell/tumor cell transfected with LIGHT
 研究代表者
 中村 哲 (NAKAMURA TETSU)
 神戸大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：10403247

研究成果の概要：

マウス腫瘍細胞の細胞膜上における LIGHT の発現は、今回の検討では困難であったが、COS7 細胞における LIGHT 発現の検討では細胞質内での発現は認められた。原因として C 末端における FLAG 修飾が起因している可能性があり今後発現ベクターの改良により細胞膜上に機能的な LIGHT 発現させることが可能と考える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	900,000	0	900,000
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	800,000	240,000	1040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	240,000	2,740,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：LIGHT、癌ワクチン、LT β R、樹状細胞、腫瘍細胞

1. 研究開始当初の背景

2004 年に Yu らは繊維肉腫腫瘍細胞に LIGHT を導入する実験を報告しているが、LIGHT 導入腫瘍細胞株を接種・感作され腫瘍発育の拒絶が得られた個体に、後日 LIGHT 導入なしの腫瘍細胞接種すると、この腫瘍細胞の発育も阻止が認められるとしている (Yu, P. et al. Priming of naive

T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. Nature Immunol. 4 Jan 2004)。間質系腫瘍細胞の LIGHT が LT β R を介して autocrine に作用する可能性がある実験系のなかで検討されており、臨床応用化のためには、ヒトの癌の多くを占める上皮系腫瘍を中心に関連を検討するとともに、これ

らの細胞を併用する必要性があると考え
る。

2. 研究の目的

悪性腫瘍に対する特異的免疫療法の主軸は腫瘍特異的抗原による樹状細胞感作である。動物実験では腫瘍拒絶が可能であるが、ヒトへの応用では期待された効果をあげられていないのが実情である。腫瘍と間質とを取り持つ重要な制御因子として重要視されている Tumor Necrosis Factor Superfamily の 1 つである LIGHT (TNFSF14) に着目し、効率的な癌ワクチン療法の開発を目指す。LIGHT は、T 細胞、樹状細胞、単球等に発現し T 細胞を介しては CTL (細胞傷害性 T 細胞 : cytotoxic T lymphocyte) 誘導の co-stimulatory molecule として働き、さらに樹状細胞の成熟化を促す。間質細胞に対してはリンホトキシン受容体 (LT β R) を介して CCL21 等の産生を促しナイーブ T 細胞を動員するとされている。本研究は、マウス腫瘍細胞を用い LIGHT 分子の導入発現による characterization の変化と間質細胞との interaction を解析するとともに上皮系腫瘍において CCL21 等のケモカインを介した T 細胞誘導を効率的に作動させるための癌ワクチンの作成を目標とする。

3. 研究の方法

マウス腫瘍細胞を用い LIGHT 分子の導入発現による characterization の変化と間質細胞との interaction を解析する。上皮系腫瘍において CCL21 等のケモカインを介した T 細胞誘導を効率的に作動させ

るための癌ワクチンの作成を目標とする。具体的には、①LIGHT の受容体である LT β R 発現を認めるマウス上皮系腫瘍細胞を用いて LIGHT 導入腫瘍細胞株を作成し、上皮系腫瘍における LT β R のシグナル伝達の下流である NF- κ B の発現とケモカインの産生の評価、②同様に間質系腫瘍細胞 (特に線維肉腫) 株と正常線維芽細胞における NF- κ B の発現とケモカインの産生を評価する。③併せて co-stimulatory molecule として CTL 誘導能を評価する。④LIGHT 導入上皮系腫瘍細胞、樹状細胞との融合ワクチンあるいは間質系細胞をさらに加えたトリプル融合ワクチンを作製し、効率的な抗腫瘍ワクチンの開発を目指す。

4. 研究成果

murine LIGHT の単離 cDNA の細胞内ドメインである C 末端に FLAG を導入後、pcDNA3.1 に導入して murine LIGHT 発現系を作成し、full sequence を行った。まず、COS7 cells に FUGENE6 を用いて一過性、強発現させた。抗 FLAG 抗体を用いた western blotting の検討では murine LIGHT と考えられる蛋白発現を確認した。さらに、蛍光免疫組織染色の検討では、抗 FLAG 抗体、抗 LIGHT 抗体両者を用いた検討とも、LIGHT 発現の局在は、その大部分は細胞質内に発現したが、細胞膜上への発現については評価不能であった。そこで、マウス大腸癌細胞株である CT26clone25 を用いて、FUGENE6 あるいは electroporation 法にて murine LIGHT 遺伝子の導入を試みた。遺伝子導入後、限界希釈法および western blot による蛋白発現の検討から murine LIGHT 高発現クローンを選択した。このクロ

ーンにおいて、western blot および蛍光免疫組織染色のみならず、LIGHT のリガンドの一つである LT β R と IgG1 Fc との融合蛋白を用いて Flow cytometry を行い、細胞膜上への発現を検討した。陽性コントロールとしてのマウス未成熟樹状細胞では約 50%の細胞が細胞表面の LIGHT 陽性であったが、LIGHT 導入 CT26clone25 細胞では細胞内での高い発現にも関わらず、細胞膜への発現はわずか 1.2%にとどまった。また、COS7 を用いた一過性発現系においても同様の結果であった。そして、その最も大きなとしては、C 末端の FLAG 導入が原因と考えている。

さらに、追試として LIGHT のリガンドの一つである LT β R と IgG1 Fc との融合蛋白を用いて Flow cytometry を行い、細胞膜上への発現を検討した。陽性コントロールとしてマウス骨髄細胞から分化させた未成熟樹状細胞を用意した。未成熟樹状細胞は強および弱発現を含めて 45.7%の細胞が LIGHT 陽性であったが、CT26CL25-LIGHT は 14.6%にとどまった。

腫瘍免疫への LIGHT 応用の際、副刺激分子として効率よく機能するには、細胞膜上へのより高い発現が理想的であり、今回作成した LIGHT 導入 CT26CL25 クローンは LIGHT を強発現しているとは考えにくい。今後はより強く LIGHT を細胞膜上に発現したクローンを作成するべく、導入ベクターの改良や CT26CL25 以外の腫瘍細胞株への導入を試行する方針である。

腫瘍免疫への LIGHT 応用の際、副刺激分子として効率よく機能するには、細胞膜上へのより高い発現が理想的であり、そこで現在、mLIGHT (TNFSF14) 含む pORF9-mLIGHT を用いて murine LIGHT 遺伝子を pVITRO1-mcs に導入して murine LIGHT 発現系を作成し、CMV と SV40 両者のプロモーターとエンハンサーを有す

る改良ベクターを用いて、今後はより強く LIGHT を細胞膜上に発現したクローンを作成するべく、マウス大腸癌細胞 CT26 および CT26CL25 への導入を試行する方針である。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Yasuda T, Kamigaki T, Kawasaki K, Nakamura T, Yamamoto M, Kanemitsu K, Takase S, Kuroda D, Kim Y, Ajiki T, Kuroda Y.

Superior anti-tumor protection and therapeutic efficacy of vaccination with allogeneic and semiallogeneic dendritic cell/tumor cell fusion hybrids for murine colon adenocarcinoma.

Cancer Immunol Immunother
56, 1025-1036, 2007

査読あり

[学会発表] (計 1 件)

① M Yamamoto, T Kamigaki, Y Iwatani, T Nakamura, Y Kuroda.

The anti-tumor efficacy by regulatory T cells depletion in addition to DC vaccines for murine pancreatic cancer

2008. 10. 29

第 67 回日本癌学会学術総会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 哲 (NAKAMURA TETSU)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10403247

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし