

機関番号：32622
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2010
 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

研究成果の概要(和文)：

マウスを用いてインターフェロン産生キラー樹状細胞(IKDC)の増殖、誘導法を検討した。マウス脾細胞に CpG、Flt-3 リガンド、IL-15、IL-18 を添加し、*in vitro* で培養すると、無添加群と比較し、1.34～6.38 倍に IKDC は増加した。また、マウス大腸癌細胞 MC38 を用いた実験系で、予め腫瘍細胞を接種し皮下腫瘍を形成したマウスに IKDC を投与して治療すると、対象群と比較し有意に腫瘍の増大が抑制された。今後、IKDC を用いた免疫治療は、臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Effective methods for inducing interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) in a mouse model were explored. When murine splenocytes were cultured with CpG, Flt-3 ligand, IL-15, and IL-18, the number of IKDCs was increased to 1.34 – 6.38 times as much as that in splenocytes without any stimulation. Then, the therapeutic effects of IKDC on the established tumors were assessed using a murine poorly immunogenic colorectal cancer, MC38 model. When IKDCs were inoculated in tumor-bearing mice, the outgrowths of the tumors were significantly suppressed compared with those in mice treated with myeloid dendritic cells. Therefore, IKDC-based immunotherapy should be considered for clinical application.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

(1) 末期の消化器癌では、全身に及ぶ侵襲の強い副作用のため集学的治療を十分に行うことができない症例も多く、副作用の少ない有効な治療法の開発が急務である。そのような観点から、現在、免疫療法が注目されている。一般に消化器固形癌は免疫原性が低く、生体の免疫監視機構を逃れやすい。また、担癌生体内では癌の進行と共に、免疫抑制性サイトカインの分泌や免疫抑制性分子の表出などで、腫瘍に対する免疫応答は抑制されていくことが多い。そこで、その免疫抑制状態を打破しようと様々な生体免疫を賦活化させる治療法が検討されている。

(2) 樹状細胞は、抗原提示細胞として MHC 分子や CD80 や CD86 といった共刺激分子などを高発現し、また IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α といった各種サイトカインを分泌して、複雑な生体の免疫反応を調節、制御する中心的な役割を担う細胞である。近年、樹状細胞の誘導・大量培養法が確立され、悪性腫瘍に対する免疫学的治療に応用されている。マウスモデルでは形成された大きな腫瘍が縮小することも多く報告されているものの、進行癌患者に臨床応用された報告では、十分に満足できる結果は得られていない。

(3) 平成 18 年になり、B220⁺、CD11c^{int}、NK1.1⁺、CD49b⁺、Gr-1⁻という表面マーカーの特徴を有する特定の樹状細胞の集団は、IFN- γ を大量に産生し、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) を介して直接腫瘍細胞を傷害し、さらに、in vivo で腫瘍の発育を抑制することが報告された。この樹状細胞のサブセットは、IFN 産生キラー樹状細胞 (interferon-producing killer

dendritic cell; IKDC) またはナチュラルキラー樹状細胞 (natural killer dendritic cell : NKDC) と呼ばれており、樹状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を果たすサブセットとして注目されている。そのエフェクター機能は NK 細胞様で、炎症反応が生じると所属リンパ節に移動し、抗原提示機能を増加させるといわれている。腫瘍に対する細胞免疫療法の新たな展開には不可欠と考えられる IKDC の成熟化や傷害能の増強についての詳細な検討は、未だ報告されていない。そこで、これまでの樹状細胞による抗腫瘍効果の研究を踏まえ、さらなる抗腫瘍効果が得られるような新規治療法を開発するため、IKDC を用いた細胞免疫療法について検討した。

2. 研究の目的

これまでに、IKDC を用いた抗消化器癌治療の報告は極めて少ないが、我々が以前から行ってきた樹状細胞を用いた研究成果や他施設からの報告から、IKDC の消化器癌に対する抗腫瘍効果は十分に期待できる。そして、その効果や作用機序を検討することは、今後の進行癌に対する細胞免疫療法の開発に大いに有意義であると考えられた。

- (1) IKDC/NKDC の分離、培養法を確立し、その性状を解析すること。
- (2) そして、IKDC を用いてマウスモデルで消化器癌を治療し、その抗腫瘍効果、ならびにその作用機序を検討すること。
- (3) それらの結果を基に、その臨床応用への可能性を探究していくこと。

以上の項目を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) IKDC の誘導

C57BL/6 マウスより *in vitro* で脾細胞から CD3 陽性細胞と CD19 陽性細胞を除去した後、抗 CD11c 抗体ビーズにより CD11c 陽性細胞のポジティブセレクションを行った。その後、B220 陽性 CD49 陽性細胞を FACS calibur を用いてソーティングした。こうして得られた IKDC の細胞数と比率を測定した。そして、IKDC の表面マーカーを FACS calibur で測定した。また、脾細胞に直接、IFN- α や IL-12、IL-4、TNF- α といったサイトカインや LPS、CpG などを添加し、得られる IKDC の数や phenotype などについて観察し、最も有効に IKDC を誘導する方法を検討した。

(2) IKDC による免疫細胞療法の抗腫瘍効果の検討

誘導した IKDC を用いて、*in vivo* でマウスモデルでの抗腫瘍効果の検討を行った。まず、あらかじめ 1×10^5 個の大腸癌細胞野生株の接種によりあらかじめ皮下腫瘍や肝転移を形成した担癌マウスに対して、1) HBSS (コントロール群)、または、 1×10^6 個の 2) 骨髄系樹状細胞 (mDC 群)、3) IKDC (IKDC 群) をそれぞれ皮下に投与し治療した後に、野生株皮下腫瘍を計測して腫瘍増殖抑制効果を比較検討した。IKDC にて免疫したマウスの脾臓を摘出し、*in vitro* で樹状細胞と腫瘍細胞で刺激することにより、腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞の誘導を試みた。

4. 研究成果

(1) IKDC の誘導

1) マウス脾細胞からの IKDC の誘導

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。 7.4×10^8 から 1.1×10^9 個の脾細胞から分離した NK1.1 陽性樹状細胞は、 2.2×10^4 から 2.3×10^4 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。

2) 免疫活性物質添加によるマウス脾細胞からの IKDC の誘導

次に、*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免疫活性物質を添加してマウス脾細胞を培養した。何も添加しないで培養したコントロール脾細胞と比較し、細胞培養後に IKDC 細胞分画細胞数は、IL-4 添加で 1.2-5.2 倍、IL-15 添加で 1.8-4.0 倍、IL-18 添加で 0.8-5.2 倍、GM-CSF 添加で 2.3-2.5 倍、TNF- α 添加で 1.2-4.5 倍、FLT-3 リガンド添加で 1.4-2.5 倍、CpG 添加で 2.2-2.6 倍、LPS 添加で 1.4-2.8 倍にそれぞれ変化していた。

3) CD11c 陽性細胞分離後に免疫活性物質を添加した際の IKDC の誘導

マウスの脾細胞からまず未熟樹状細胞を分離してから、種々の免疫活性物質と *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 ± 1.73 倍、FLT-3 リガンド 1.75 ± 1.32 倍、IL-15 が 1.53 ± 0.44 倍、IL-18 が 1.60 ± 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。

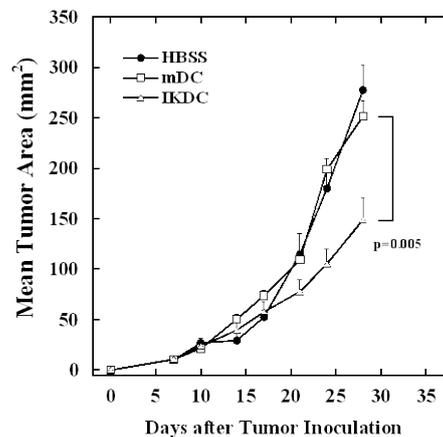
4) 4種の免疫活性物質を添加して混合培養した際のIKDCの誘導

そこで、上述のCD11c陽性細胞に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。培養開始後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。1匹のマウスの脾細胞からCD11c細胞は、ポジティブセレクションにより約 $1 - 2 \times 10^6$ 個分離可能であった。CD11c⁺NK1.1⁺細胞数は、無添加群では24時間後で 4.9×10^4 、7日後で 3.6×10^3 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 6.6×10^4 、7日後で 8.3×10^3 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。共刺激分子(CD80, CD86)の発現増強も観察された。

(2) IKDCによる免疫細胞療法の抗腫瘍効果の検討

低免疫原性マウス大腸癌細胞野生株MC38 1×10^5 個をマウスの背部に皮下接種し、予め腫瘍を形成させた担癌C57BL/6マウスに対して、野生株投与7日後に①HBSS、または、 1×10^6 個の②骨髓系樹状細胞、③IKDCをそれぞれ腫瘍の近傍に皮下に投与した。骨髓系樹状細胞はC57BL/6マウスの骨髓細胞にGM-CSF 10ng/ml, IL-4 10ng/mlを添加した後、7日間培養した細胞を用いた。治療後に、野生株皮下腫瘍を計測して腫瘍増殖抑制効果を比較検討した。すると、野生株接種28日後には、HBSS投与群や骨髓系樹状細胞投与群(mDC)と比較して、

IKDC投与群では有意に野生株腫瘍の大きさが小さいことが分かった (Day 28; HBSS 277.50 ± 24.30 , mDC 251.60 ± 24.30 , IKDC 149.00 ± 21.32 ; $p=0.005$)。



(3) 今後の検討課題

今後はマウス大腸癌モデルで認められた抗腫瘍効果の、免疫学的作用機序を、免疫組織染色や腫瘍特異的細胞傷害活性を測定することで検索していく予定である。

これまでマウス脾細胞より様々な方法を用いてIKDCの分離誘導を試みてきたが、1匹のマウスから得られるIKDC細胞数にはかなりの差異がみられるため、安定した実験系を確立するためには、今後、さらなる誘導法の工夫が必要である。

これらのマウスでの研究データをもとに、ヒトIKDCについて詳細に検討していく。IKDCの表面マーカーやサイトカイン産生能、アロリンパ球刺激能、癌細胞傷害能を、健康者と担癌患者で比較検討する。そして、それらの機能を増強するサイトカインや薬物を探索し、臨床への応用を探求していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] 計 3 件)

1. Hiroishi, K., Eguchi, J., Ishii, S., Hiraide, A., Sakaki, M., Doi, H., Omori, R., Imawari, M. (1 番目) Immune response of cytotoxic T lymphocytes and possibility of vaccine development for hepatitis C virus infection. J Biomed and Biotech 2010: 263810, 2010. 査読有り
2. Hiroishi, K., Eguchi, J., Baba, T., Shimazaki, T., Ishii, S., Hiraide, A., Sakaki, M., Doi, H., Uozumi, S., Omori, R., Matsumura, T., Yanagawa, T., Ito, T., Imawari, M. (1 番目) Strong CD8+ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 45 (4): 451-458, 2010. 査読有り
3. Hiraide, A., Hiroishi, K., Ishii, S., Eguchi, J., Imawari, M. (2 番目) Dendritic cells stimulated with CpG oligodeoxynucleotides and IFN-alpha -expressing tumor cells effectively reduce outgrowth of established tumors in vivo. Cancer Sci 99 (8): 1663-1669, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

1. 江口潤一、広石和正、土肥弘義、石井成明、平出綾子、坂木理、大森里紗、馬場俊之、松村卓哉、魚住祥二郎、井廻道夫。(2 番目) 消化器癌における IL-4 と CpG 併用による抗腫瘍効果と作用機序の検

討. 第 52 回日本消化器病学会大会, 横浜 2010.10.13

2. 土肥弘義、広石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、井廻道夫。(2 番目) 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, 札幌 2009.5.9
3. Doi, H., Hiroishi, K., Eguchi, J., Baba, T., Ishii, S., Hiraide, A., Sakaki, M., Imawari, M. (2 番目) 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, San Diego, USA 2008.4.14
4. 広石和正、平出綾子、江口潤一、坂木理、土肥弘義、井廻道夫。(1 番目) 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, 福岡 2008.5.10
5. 平出綾子、広石和正、土肥弘義、江口潤一、井廻道夫。(2 番目) インターフェロン α 遺伝子導入癌細胞と樹状細胞との融合細胞による消化器癌治療. 第 93 回日本消化器病学会総会, 青森 2007.4.19
6. Eguchi, J., Hiroishi, K., Hiraide, A., Doi, H., Ishii, S., Okada, H., Imawari, M. (2 番目) IL-4 transfected tumor cell vaccines activate tumor infiltrating dendritic cells and promote Type-1 immunity. 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜 2007.10.4
7. 広石和正、平出綾子、江口潤一、土肥弘義、井廻道夫。(2 番目) 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，神戸
2007.10.19

[その他]

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣石 和正 (HIROISHI KAZUMASA)

研究者番号：80296996

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし