

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590889

研究課題名（和文） 肺腫瘍に対するスーパー抗原を用いた樹状細胞ワクチンの開発

研究課題名（英文） Superantigen pulsed DCs supports the induction of tumor immunity

研究代表者

中村 祐太郎（NAKAMURA YUTARO）

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60436962

研究成果の概要：樹状細胞ワクチン（DC ワクチン）は、癌細胞の排除に最も重要とされる細胞性免疫を誘導することから、その臨床効果が期待されている。一方スーパー抗原は、細菌より産生される蛋白で、強力に T 細胞を活性化することが知られている。抗腫瘍効果の高い DC ワクチンを開発するために、スーパー抗原を添加した DC を作製し、そのワクチンとしての有用性を検討した。その結果、マウスにおける腫瘍の拒絶試験で、スーパー抗原を添加した DC ワクチンを接種した群で腫瘍の成長が明らかに抑制されていた。DC ワクチン療法におけるスーパー抗原の有用性が強く示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：呼吸器内科学・呼吸器病学

キーワード：免疫学，癌，細胞

1. 研究開始当初の背景

癌による社会的損失は多大であることから、新たな治療法が求められている。現在、代表的な治療法として化学療法、外科療法、放射線療法が用いられているが、その効果は不十分であり、さらに多くの副作用を呈するなどの弱点がある。したがってこれらの治療法より優れた効果を持った安全な治療法の開発が切望されている。最近、欧米諸国を中

心に各種免疫療法が開発され臨床試験がなされている。特に生体で最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞（Dendritic cell; DC）を用いた樹状細胞ワクチン（DC ワクチン）は、癌細胞排除に最も肝要とされる細胞性免疫を誘導することから、その臨床効果が期待されている。

一方スーパー抗原は、*Streptococcus* 属や *Staphylococcus* 属等の細菌より産生される

蛋白で DC の MHC 分子と T 細胞の T 細胞レセプター (TCR) に接着し、非特異的にまた強力に T 細胞を活性化することが知られている。更にスーパー抗原の存在下に DC と CD8⁺T 細胞を同時に培養し、その後 CD40L で刺激したところ DC より有意に抗腫瘍免疫の誘導を促し IL-12p70 の産生が増加することが確認された (J Exp Med, 2002)。以上より、スーパー抗原を DC にパルスしたワクチンを免疫することにより、T 細胞を活性化するのみならず、生体内で Th1 の免疫誘導を惹起することが予想され、より有効な抗腫瘍効果をきたすことが期待される。

2. 研究の目的

抗腫瘍効果の高い DC ワクチンを開発するために、スーパー抗原をパルスした DC を作製し、そのワクチンとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) DC ワクチンを作製する。マウス骨髄細胞を採取し、GM-CSF と IL-4 を用いて DC を誘導する。

(2) 作製した DC にスーパー抗原をパルスしワクチンを接種する。

(1) で誘導した DC に腫瘍抗原 (OVA257-264) とスーパー抗原 (SEA および SEB) をパルスし、 1×10^6 個 DC ワクチンを免疫する。同時に比較対照としてスーパー抗原をパルスしていない DC、腫瘍抗原とスーパー抗原ともにパルスしていない DC および PBS を投与する。

(3) 腫瘍モデルを作製する。

肺腫瘍に先立ち、腫瘍抗原の表出の明らかな EG7 (腫瘍抗原 OVA257-264 を表出したマウスのリンパ系腫瘍) を、DC ワクチン接種 4 週間後 1×10^6 個側腹部に皮下投与し 2-3 日間隔で腫瘍径の測定を行う。腫瘍径は $\pi \times r^2$ (面積) を計算し比較する。

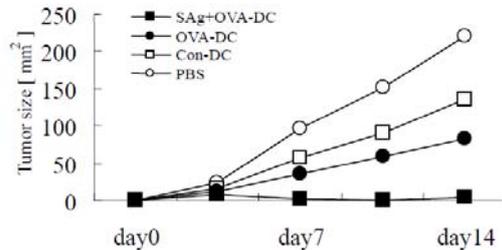
(4) DC ワクチンにより誘導される抗原特異的 CD8 陽性細胞の細胞障害機能を検討する。

(3) と同様な手順で免疫を行い、4 週間後にそれぞれのマウスより脾臓を摘出し、Homogenize したのちに、放射線照射にて分裂を停止させた腫瘍細胞と 5 日間培養 (in vitro stimulation) し得られた細胞を用いて LDH assay (CTL assay) を行う。標的細胞 (EG7 腫瘍) が Killing され、放出された LDH を測定し、抗原特異的な CTL の活性を解析する。また同様に脾細胞と腫瘍細胞を 2 日間培養した後上澄を回収し IL-4, IFN γ の測定を ELISA 法を用いて行う。

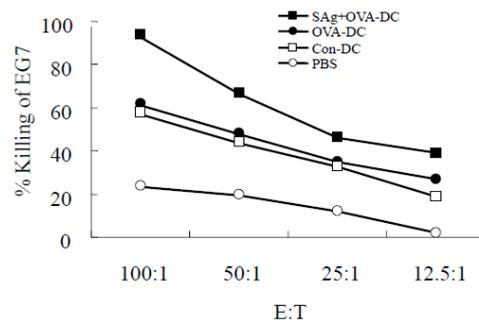
4. 研究成果

(1) スーパー抗原および腫瘍抗原をパルス

した樹状細胞ワクチンを投与した群 (SAg+OVA-DC) において、腫瘍抗原のみ (OVA-DC)、スーパー抗原および腫瘍抗原ともパルスしていない群 (Con-DC)、PBS 投与群に比し、有意に腫瘍の増殖が抑制されていた。

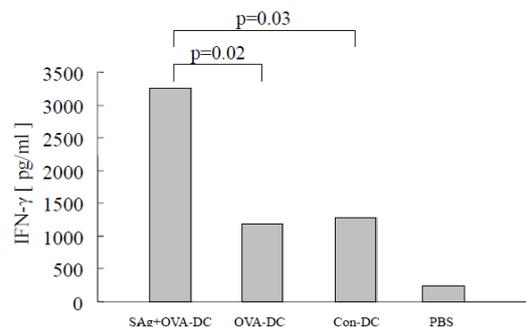


(2) スーパー抗原および腫瘍抗原をパルスした DC ワクチンを投与した群 (SAg+OVA-DC) において、その他の群に比し有意に抗原特異的な CTL が誘導されていた。



(3) 更にスーパー抗原および腫瘍抗原をパルスした DC ワクチンを投与した群

(SAg+OVA-DC) において、その他の群に比し有意に抗原特異的な IFN γ の産生が認められた。



これらの結果よりスーパー抗原を同時に投与することにより樹状細胞ワクチンの腫瘍抑制効果を強く補助する効果が明らかとなった。今後肺腫瘍である Lewis 腫瘍で治療モデルにおいても同様に検討を行い、臨床応用を目指す予定である。

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 16 件)

1. Memory CD8+ T cells protect dendritic cells from CTL killing. Watchmaker PB, Nakamura Y (他4名, 4番目) *J Immunol* 180:3857-3865, 2008 (査読あり)
2. Lung dendritic cells have a potent capability to induce production of immunoglobulin A. Naito T, Nakamura Y (他6名, 4番目) *Am J Respir Cell Mol Biol* 38:161-167, 2008 (査読あり)
3. *Mycobacterium avium* complex disease: prognostic implication of high-resolution computed tomography findings. Kuroishi S, Nakamura Y (他7名, 2番目) *Eur Respir J* 32:147-152, 2008 (査読あり)
4. Alterations in smoking habits are associated with acute eosinophilic pneumonia. Uchiyama H, Nakamura Y (他13名, 3番目) *Chest* 133:1174-1180, 2008 (査読あり)
5. Clinical usefulness of real-time PCR in induced sputum for diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients without HIV infection. Fujisawa T, Nakamura Y (他12名, 5番目) *Respirology (in press)*, 2008 (査読あり)
6. Possible therapeutic effect of direct haemoperfusion with a polymyxin B immobilized fibre column (PMX-DHP) on pulmonary oxygenation in acute exacerbations of interstitial pneumonia. Enomoto N, Nakamura Y (他16名, 14番目) *Respirology* 13:452-460, 2008 (査読あり)
7. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis successfully diagnosed, treated, and followed by ultrathin bronchoscope. Nakamura Y, Shirai M (他5名, 1番目) *Mycoses* 51:86-88, 2008 (査読あり)
8. Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8+ T-cell responses in the lung. Hashimoto D, Suda T (他7名, 2番目) *Vaccine* 26:5095-5100, 2008 (査読あり)
9. Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. Aoshi T, Suda T (他7名, 7番目) *Infect Immun* 76:1565-1571, 2008 (査読あり)
10. Drug lymphocyte stimulation test in the diagnosis of adverse reactions to anti-tuberculosis drugs. Suzuki Y, Suda T (他8名, 7番目) *Chest* 2008 (査読あり)
11. Effect of the inoculum size on carbapenem susceptibilities of beta-Lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Miyazaki H, Suda T (他4名, 4番目) *Curr Microbiol (in press)* 2008 (査読あり)
12. Anti-endothelial cell antibodies in patients with interstitial lung diseases. Matsui T, Suda T (他2名, 3番目) *Respir Med* 102:128-133, 2008 (査読あり)
13. Anti-endothelial cell antibodies in patients with sarcoidosis. Inui N, Suda T (4名, 3番目) *Chest* 133:955-960, 2008 (査読あり)
14. Helper function of memory CD8+ T cells: heterologous CD8+ T cells support the induction of therapeutic cancer immunity. Nakamura Y (他15名, 1番目) *Cancer Res* 67:10012-10018, 2007 (査読あり)
15. Immunization with dendritic cells loaded with alpha-galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T lymphocyte activity against infection by intracellular bacteria. Enomoto N, Nakamura Y (他6名, 5番目) *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:350-362, 2007 (査読あり)
16. Management of interleukin-2-induced severe bronchoconstriction. Suda T, Hashizume H (他8名, 1番目) *Eur Respir J* 29:612-613, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. D. Hashimoto, T. Nagata, Y. Koide, T. Suda, K. Chida : Intratracheal administration of third-generation Lentivirus vectors encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces specific T cell responses in lung. *American Thoracic Society*. 2007. 5. (San Francisco)

2. T. Naito, T. Suda, K. Suzuki, Y. Nakamura, N. Inui, J. Sato, K. Chida, H. Nakamura : Lung Dendritic Cells Have a Potent Capability To Induce Production of Immunoglobulin A. *American Thoracic Society*. 2008, 5. (TORONTO)
3. Y. Nakamura, T. Suda, Y. Kaida, N. Enomoto, S. Imokawa, K. Yasuda, S. Morita, H. Suganuma, H. Hayakawa, K. Chida, T. V. Colby, : Prognosis of Diffuse Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis: Comparison of Interstitial Pneumonia with Small Airway Disease. *American Thoracic Society*. 2008. 5. (TORONTO)

Surgery

[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]

5. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 祐太郎 (NAKAMURA YUTARO)
浜松医科大学附属病院 助教
研究者番号：60436962

(2) 研究分担者

須田 隆文 (SUDA TAKAFUMI)
浜松医科大学 医学部 助教
研究者番号：30291397
千田 金吾 (CHIDA KINGO)
浜松医科大学 医学部 准教授
研究者番号：40197611

(3) 研究協力者

加藤真人 (KATO MASATO)
浜松医科大学医学部 大学院生

小澤雄一 (OZAWA YUICHI)
浜松医科大学医学部 大学院生

Pawel Kalinski
University of Pittsburgh, Department of
Surgery

Robbie Mailliard
University of Pittsburgh, Department of
Surgery

Rachel Cumberland
University of Pittsburgh, Department of