

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790786

研究課題名 (和文) IL-23 誘導性抗腫瘍免疫における Th17 および制御性 T 細胞の役割

研究課題名 (英文) The role of Th17 and regulatory T cells in antitumor effect induced by IL-23.

研究代表者

鬼木 俊太郎 (ONIKI SYUNTARO)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50448180

研究成果の概要：マウス低免疫原性悪性黒色腫に IL-23 を遺伝子導入した細胞株を用いて、その抗腫瘍効果と腫瘍ワクチン効果における Th17 と制御性 T 細胞の関連を、IL-17 ノックアウトマウスを用いて検討した結果、Th17 の直接的な関連の裏づけはできなかった。これは、IL-23 が Th17 を誘導するという従来の見解とは異なる結果であり、今後の悪性黒色腫およびその他の固形腫瘍に対する、アジュバントとしての IL-23 の抗腫瘍免疫治療に対する重要な知見となりえる。また、同時に抗腫瘍効果を示す、IL-12、IL-21、および IL-27 においても IL-17 ノックアウトマウスを用いて検討した結果、Th17 の直接的関与は見られなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：抗腫瘍免疫、IL-23、Th17、制御性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍への免疫学的な治療の試みは、現在臨床応用の段階を迎えている。近年、我が国においても幾つかの臨床試験が試みられているが、その効果においては未だ十分とは言いがたいのが現状である。悪性黒色腫は、皮膚悪性腫瘍の中でも最も予後不良の腫瘍の 1 つであり、近年増加傾向にある。悪性黒色腫は、古くから腫瘍関連の白斑がしばしば出現することや、原発巣の自然消退現象がみられることなどが報告されており、腫瘍に対する宿主の免疫反応が臨床病態に強く関連しているこ

とが知られている。そのため、これまでに悪性黒色腫に対する癌の免疫療法の基礎および臨床研究が数多く成されており、その中には確かな有効例が存在しているが、その奏効率は低いと言わざるを得ない。そのため、悪性黒色腫に対するより効果的で副作用の少ない免疫療法の開発が望まれている。サイトカインはその単独使用だけでなく、他の抗腫瘍療法のアジュバントとしてもその活躍が期待されている。なかでも、interleukin(IL)-12は強い抗腫瘍活性をもつサイトカインとして全世界で研究が進められ、

実験動物モデルでは多種の腫瘍に対して腫瘍拒絶を誘導できることが明らかにされてきた。しかし、IL-12のヒトへの全身投与は体内のinterferon(IFN)- γ の産生を著しく高めるため、全身性に強い副作用を生じ臨床応用への大きな障害となっている。近年、IL-12と構造的に相同性を有するIL-23とIL-27が相次いで発見され、これらのサイトカインも抗腫瘍活性をもつことが様々なマウスの腫瘍モデルにおいて証明されてきた。申請者は、悪性黒色腫に対するIL-23とIL-27の有効性を検討するため、低免疫原性マウス悪性黒色腫B16F10メラノーマ細胞株に対して、それぞれのサイトカインの遺伝子導入を行ない、それらが異なる機序で抗腫瘍活性を發揮することをごく最近報告した(Cancer Res. 66:6395-404, 2006)。特にIL-23の遺伝子導入株に関しては、同系マウスの背部に皮下接種後約20日を経てから腫瘍増殖抑制を認め、一部の腫瘍は退縮傾向も示した。さらに、このIL-23の遺伝子導入株を腫瘍ワクチンとして接種すると、腫瘍特異的なB16F10マウスメラノーマ親細胞に対して予防効果が誘導され、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞を予め除去しておくとその効果はさらに増強し、完全な腫瘍拒絶が80%も認められることが分かった。この効果はIL-27には認められず、IL-23は今後の悪性黒色腫や転移性あるいは進行癌などの低免疫原性腫瘍に対する免疫学的治療に非常に有用である可能性が示唆された。

近年IL-23は特殊なpopulationのT細胞(IL-17産生細胞:Th17)を誘導し、自己免疫疾患や炎症性疾患発症に関与しているという報告がある(J. Exp. Med. 201:233-240, 2005)。従来のTh1とTh2という2つの両極のhelperT細胞のほかに、Th17という第3の極を形成するhelperT細胞が存在することが相次いで報告され、Th1細胞誘導におけるIL-12あるいはTh2細胞誘導におけるIL-4のように、IL-23はTh17を誘導する重要なサイトカインとして位置付けられるようになってきた。しかしながら、IL-23の抗腫瘍効果におけるTh17の役割は未だ明らかにされていない。興味深いことに、上述のIL-23遺伝子導入B16F10メラノーマ細胞のモデルにおいて、抗CD4抗体処理によってあらかじめCD4⁺T細胞を除去しておいたマウスに腫瘍を接種すると、接種後約20日目までは無処理群に比べて非常に遅い腫瘍増殖を示すにもかかわらず、20日目以降は急速な腫瘍増殖を示すことを確認している(未発表データ)。この腫瘍増殖動態の変化は著しいものであり、IL-23による抗腫瘍効果においてCD4⁺T細胞が非常に重要な役割を演じていることが推察される。IL-23がTh17の強力なinducerであることを考慮に入れると、腫瘍接種20日目以降の抗腫瘍効果のエフェクター細胞として、Th17が

関与している可能性も考えられる。また、CD4⁺T細胞除去による腫瘍接種後約20日までの抗腫瘍効果増強作用は、近年の研究結果から考えると、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞の除去による効果である可能性が高い。すなわち、IL-23による抗腫瘍効果には、CD4⁺T細胞中のいずれかのpopulationが深く関与していることは明らかであり、特にTh17およびCD4⁺CD25⁺制御性T細胞の両者が何らかの形で関与している可能性が高いと考えてられる。これらのことを明らかにすることによって、今後の癌免疫療法におけるIL-23の有効性を最大限引き出すことが可能になるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、IL-23による抗腫瘍効果において、IL-17産生T細胞および制御性T細胞が、それぞれどのような動態・役割を示すのか、その誘導・機能において相互作用はあるのか、について検討を行う。実際には、マウスの低免疫原性腫瘍であるB16F10マウスメラノーマ細胞を使用し、IL-23遺伝子導入株とcontrol遺伝子導入株もしくは親細胞との比較において、IL-17産生T細胞と制御性T細胞の抗腫瘍効果への関連性と、IL-17産生T細胞と制御性T細胞の抗腫瘍効果への相互作用を明らかにする。また、IL-23の腫瘍ワクチン効果についての研究においても、IL-17産生T細胞と制御性T細胞の関連性と相互作用を明らかにし、より有効なIL-23による抗腫瘍免疫療法の開発につながる基礎データを得ること、さらには、今後ヒトの悪性黒色腫や転移性癌もしくは進行癌などの低免疫原性腫瘍に対するIL-23を使用した免疫学的治療にも有用な研究であることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) IL-23遺伝子導入B16F10マウスメラノーマ組織内浸潤細胞の解析

IL-23遺伝子導入B16F10マウスメラノーマ細胞を同系マウスに皮下接種し、接種後の時間を定めた定点にてそれぞれの腫瘍組織を摘出して、RT-PCR用のRNA抽出を行う。組織から抽出したRNAを用いて、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、NK細胞、IL-17、IL-17受容体、foxp3に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行い、同様にその発現が経時的にどのように変化しているのかを確認する。

(2) IL-23遺伝子導入B16F10マウスメラノーマ腫瘍の所属リンパ節の検討

接種後の時間を定めた定点にてそれぞれの腫瘍組織を摘出して、RT-PCR用のRNA抽出を行う。組織から抽出したRNAを用いて、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、NK細胞、IL-17、IL-17受容体、foxp3に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行い、同様にその発現が経時的にどのように

変化しているのかを確認する。

(3) IL-23による抗腫瘍免疫反応におけるIL-17と制御性T細胞の関係

IL-17ノックアウトマウスに、IL-23遺伝子導入B16F10マウスメラノーマ細胞の皮下接種を行い、腫瘍組織および所属リンパ節を採取する。組織をRT-PCRによって確認・定量し、同系のワイルドタイプマウスと比較検討する。また、反対に抗マウスCD25抗体を投与によるCD4⁺CD25⁺制御性T細胞除去マウスに、IL-23遺伝子導入B16F10マウスメラノーマ細胞の皮下接種を行い、同様に腫瘍組織および所属リンパ節を採取する。それぞれの組織内におけるTh17あるいはIL-17の確認を、免疫組織染色及びRT-PCRによって行い検討する。

(4) IL-23の腫瘍ワクチン効果におけるTh17の役割についての検討。

既に効果を確認している IL-23 遺伝子導入 B16F10 マウスメラノーマ細胞の予防的ワクチンの系において IL-17 がどのような役割を果たしているのか確認するため、以下の4つの群を設定する。①腫瘍ワクチンの前のみ抗IL-17 中和抗体を全身投与する群、②腫瘍ワクチンの前、および B16F10 親細胞をチャレンジする前の両方に抗 IL-17 中和抗体を全身投与する群、③B16F10 親細胞をチャレンジする前のみ抗 IL-17 中和抗体を全身投与する群、④コントロール群。親細胞チャレンジ後の腫瘍径を経時的に測定し、コントロール群と比較を行う。

(5) Th17 の IL-12、IL-21 および IL-27 における抗腫瘍効果での役割の検討

IL-17 ノックアウトマウスもしくはワイルドタイプマウスに IL-12、IL-21 および IL-27 それぞれの遺伝子導入した B16F10 マウスメラノーマ細胞株を皮下接種し、その成長曲線を比較し検討した。

4. 研究成果

(1) IL-23遺伝子発現ベクターもしくは controlベクター遺伝子を、遺伝子導入した B16F10マウスメラノーマを、同系マウスおよびIL-17ノックアウトマウスの皮下に接種し、腫瘍径と生存率を比較検討した。IL-23遺伝子発現による抗腫瘍効果はIL-17ノックアウトマウスにて有意な差は認められず、IL-23の抗腫瘍効果にIL-17は直接的には関与していないかもしれないことが考えられた。

(2) 同様に皮下に接種した腫瘍の組織およびリンパ節を、経時的に摘出し、RT-PCRにてサイトカインなどのプロファイリングを施行した。ここでも有意な差は認めなかった。ここで、IL-23はこれまでIL-17を分泌するTh17との関連性が着目されてきたが、このモデルでの腫瘍免疫では、直接的に関与しないことが分かり、今後のIL-23を抗腫瘍免疫療法のアジュバントとして使用することへの重要な足がかりなると考えられる

(3) 同様にIL-23遺伝子発現ベクターを遺伝子導入したB16F10マウスメラノーマを、同系マウスおよびIL-17ノックアウトマウスの皮下に接種し、腫瘍径と生存率を比較検討した。ここではIL-17ノックアウトマウスに接種した腫瘍が、より抗腫瘍効果を示した。これはIL-23の抗腫瘍免疫反応にはTh17がなんらかの関連を示す結果であり、IL-23に関しては、欧米にて癌治療における臨床的治験も始まっており、重要な意義を持つと考えられる。

(4) 抗CD25抗体を接種し、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞を除去した、IL-17ノックアウトマウスもしくはワイルドタイプマウスに、それぞれマイトマイシン処理したIL-23発現遺伝子を導入したマウスメラノーマを、先に皮下にワクチン接種し、その後別の場所に同種メラノーマの親細胞を接種し、その腫瘍の成長曲線を検討した。IL-17ノックアウトマウスではワイルドタイプマウスと同様にワクチン効果が著しく観察された。腫瘍拒絶も見られたことより、IL-23と制御性T細胞の除去で増加したワクチン効果は、IL-17との関連はないかもしれないことが判明した。これは、Th17と制御性T細胞が相互に抑制しあうという以前の報告とは違う知見であった

(5) IL-23の抗腫瘍免疫反応に、直接およびワクチン効果のどちらにおいても、Th17の関連は否定的であった。そのため、他の抗腫瘍効果を持つことが報告されているIL-12サイトカインファミリーのIL-12およびIL-27にても、抗腫瘍効果をもつそれぞれのサイトカイン発現遺伝子導入マウスメラノーマをIL-17ノックアウトマウスもしくはワイルドタイプマウスに皮下接種し、その成長曲線を比較し検討した。結果IL-23同様に、有意な差は認めなかった。

最近Th17は、免疫反応の場で様々な役割が証明されており、抗腫瘍免疫反応においても何らかの役割を担うことが予想される。今後はそのTh17の腫瘍免疫での関わりを明らかにすることが重要な意義を持つと考えられる。

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2件)

①M Kumano, I Hara, J furukawa, S Oniki, H Nagai, H Miyake, M Fujisawa

“Interleukin-21 activates cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells to generate antitumor response in mouse renal cell carcinoma.”

Journal of Urology、2007年、178巻、1504

–1509

査読あり

②Yoshimoto T, Morishima N, Mizoguchi I, Shimizu M, Nagai H, Oniki S, Oka M, Nishigori C, Mizoguchi J

“Anitiproliferative activity of IL-27 on melanoma.”

Journal of Immunology、2008 年、180 巻、6527-6535

査読あり

[学会発表] (計 2 件)

①S Oniki, A Fukunaga, H Nagai, X Yu, K Ogura, C Nishigori, T Horikawa

“Rho kinase plays a crucial role in migration of epidermal Langerhans cells mediated by CCR7.”

The 32nd Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology

2007 年 4 月 19 日、パシフィコ横浜

②Ogura K, Oniki S, Fukunaga A, Nagai H, Okazawa H, Matozaki T, Nishigori C, Horikawa T

“CCR7-mediated migration of DCs through activation of Rho kinase is regulated by SHIP-1.”

International Investigative Dermatology 2008

2008年5月17日、京都国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼木 俊太郎 (ONIKI SYUNTARO)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50448180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし