

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790948
 研究課題名（和文）分子標的治療薬 TGFbeta 阻害剤の樹状細胞による胃癌ワクチン療法への応用
 研究課題名（英文） Impact of TGFbeta Inhibitor on dendritic cells and vaccine therapy for gastric cancer
 研究代表者
 田中 浩明（TANAKA HIROAKI）
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：90382168

研究成果の概要：

TGF beta 阻害剤は樹状細胞（DC）DC による L P S 刺激によるインターロイキン 12(IL-12)の産生を増加させた。また TGF beta 阻害剤は DC の T 細胞増殖能も増強させた。スキルス胃癌細胞株 lysate をパルスした DC によって刺激された T 細胞による細胞傷害活性（CTL）反応の増強が認められた。CTL に加え、NK 活性の増強効果も示した。また in vivo では、腫瘍特異的 CTL 活性の増強効果が認められた。すなわち TGF beta 阻害剤は DC の抗腫瘍サイトカイン産生を増強する効果を有し、癌宿主の免疫寛容を克服しワクチン療法に応用できることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 420,000 | 3,520,000 |

研究分野：医歯薬

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：胃十二指腸外科学

1. 研究開始当初の背景

癌は、本邦における主要な死亡原因のひとつであり、特にスキルス胃癌など容易に腹膜播種性あるいはリンパ節性転移をきたしやすい癌については生存率も低く、有効な治療法の確立が特に望まれる。現在、手術療法、抗

癌剤による化学療法、放射線療法の有用性は認められているが、新しい治療法の一つとして、免疫療法は国内外の臨床医および研究者より注目されてきた。

樹状細胞(DC)は、ナイーブT細胞に腫瘍抗原を提示しこれを活性化させる唯一の抗原提

示細胞であり、抗腫瘍免疫において中心的役割を担う。国内外で施行されている癌免疫療法の多くは DC を用いることが多く、DC ワクチンと呼ばれ、患者より採取した DC を体外で培養し、腫瘍抗原を提示させた後、患者体内に戻す方法である。しかしながら、現在のところ、この DC ワクチン療法を用いた臨床試験の成績は、当初の期待通りとは言いがたいのが現状である。その要因の一つとして、腫瘍に対し、移植臓器の移植抗原のような強力な免疫応答を惹起されない状態（免疫寛容）の存在が考えられている。抗腫瘍免疫反応を誘導するには、腫瘍抗原を取り込んだ DC が成熟化し、T 細胞に抗原を提示しかつ腫瘍障害性 T 細胞が増殖することが必要である。しかし、癌周囲環境では、免疫抑制性サイトカインが過剰に産生され、癌周囲に存在する DC や T 細胞の腫瘍障害機能が抑制され、免疫寛容が誘導されるとされている。中でも代表的なものは Transforming growth factor beta (TGFbeta) あるいは Vascular endothelial growth factor (VEGF) であり、これらは DC の成熟化と抗原提示機能などを抑制することが報告されている。スキルス胃癌患者においては、腹水中の TGFbeta が多く存在することが知られており、NK 活性の低下などの要因とされている。

一方、近年癌に対する新しい治療として分子標的治療が注目されており、すでに国内外において VEGF レセプターや c-kit に対する分子標的治療薬の臨床応用が報告され、その有効性も証明されている。TGF R 阻害剤については、開発研究段階であるが、癌に対する抑制効果を有し、近い将来の臨床応用が期待されている薬剤である。現在のところ、胃癌に対する分子標的治療薬や DC ワクチン療法の検討は少ない。さらに、癌全体においてもその両者の併用療法の検討は少ない。従って、本研究は、新しい分子標的治療薬 TGF R 阻害剤を用いて、癌の進展を抑制するとともに、DC の機能亢進による抗腫瘍免疫の増強を目的とし、難治性癌に対する治療法開発に新しい開拓面を有した研究と位置づけられる。

2. 研究の目的

TGFbeta および VEGF は DC の成熟化を抑制することが知られているが、まず *in vitro* において培養した DC へ TGFbeta 受容体 (R) 阻害剤を添加し、この抑制シグナルを遮断し、DC の成熟化を促進することを検討する。特に、Th1 サイトカインである IL-12 や IL-18 の産生増強の効果を中心に検討する。かつ同時に DC の表現型についても検討し、T 細胞を増殖させるために必要な CD86、CD83 などの共刺激因子の発現が増強されることを明らかにする。最終的に、抗原特異的 T 細胞増殖を誘導し、細胞障害活性の増強効果を明らかにする。*In vivo* においては、マウスの DC ワクチン療法モデルにおいて TGFbetaR 阻害剤投与による治療効果について検討する。

3. 研究の方法

(1) 分子標的治療薬 TGFbeta receptor 阻害剤の DC に及ぼす影響

腫瘍周囲に存在する DC は、腫瘍が産生する TGF などのサイトカインの作用により成熟化および抗原提示機能が制御されており、腫瘍に対する免疫寛容状態を引き起こすと考えられている。そこで、分子標的治療薬 TGF receptor 阻害剤による腫瘍周囲の未成熟 DC の活性化について検討する。本研究で用いる TGFbetaR 阻害剤は、TGFbeta receptor の胃癌細胞におけるシグナル伝達を抑制することは *in vitro* のレベルで明らかにしている。

TGFbeta の DC の phenotype に及ぼす影響 (*in vitro*)

DC は、マウス髓細胞を GM-CSF の存在下に 5 日から 7 日培養して得られる未成熟 Bone Marrow DC (BM-DC) を使用する。ヒトでは、末梢血より分離した単核球 (PBMC) を GM-CSF, IL-4 存在下に 6 日より 7 日間培養することにより得られる未成熟 DC を使用する。

ヒトあるいはマウス DC を TGFbeta 存在下に、TGFbetaR 阻害剤を添加し、24 時間後の CD86, CD83, CD40, 及び MHC class II の発現量を FACS にて検討する。薬剤による DC に対する細胞毒性も検討する。

DC による Th1 サイトカイン産生に及ぼす影響 (*in vitro*)

DC は TLR4 リガンドで刺激することにより、IL-12 などの Th1 サイトカインを産生するが、TGFbeta がその産生を抑制する。そこで、マウス及びヒト DC を TGFbeta 存在下に LPS で刺激した後、TGFbetaR 阻害剤を添加し、24 時間後の培養上清中の IL-12 産生を ELISA にて測定する。

TGF シグナル伝達系への影響につ

いて (in vitro)

Smad ファミリーは TGFbeta receptor から核への細胞内シグナル伝達において中心的役割を担う。そこで、TGF R 阻害剤を添加させたマウスあるいはヒト DC における、Smad3.4 のリン酸化阻害についてウエスタン・ブロッティングにて検討する。

TGFb 阻害剤の、DC の抗原貪食能の検討 (in vitro)

TGFbeta は、DC の抗原貪食能を抑制する。そこで、未成熟 DC を TGF 存在下、TGF R 阻害剤を添加し、37C での FITC Dextran の取り込みを FACS で検討する。

TGFbeta 阻害剤による T 細胞増殖への影響について (in vitro)

TGFbeta は T 細胞増殖も抑制する。そこで、マウス脾臓より分離した CD8T 細胞の PMA、ionomycin 刺激による増殖反応に対する TGFbetaR 阻害剤による影響を 3H-Thymidine 取り込みにて検討する。

DC の抗原提示能に及ぼす影響について (in vitro)

DC が抗原特異的な T 細胞増殖を引き起こす能力への影響は、allogenic T 細胞と DC を反応させ 3H-Thymidine 取り込みによる増殖効果を検討する。

(2) TGFbeta R 阻害剤による抗腫瘍免疫増強効果

マウスモデルとして、colon 26 大腸癌細胞を用いる。DC ワクチンは、抗原 (腫瘍細胞 lysate) を体外で DC にパルスして体内に戻す方法、あるいは、直接に抗原自体をアジュバント (OK-432 など) とともに皮下注射する方法にて行う。

colon 26 は、盲腸に移植した場合、血中の TGFbeta が上昇する。また、この腫瘍は免疫反応により発育を抑制することが可能であり、VEGF 阻害効果によっても腫瘍が抑制される。そこで、上記 DC ワクチンモデルにおいて、TGFbeta 阻害剤による腫瘍抑制効果について検討する。腫瘍特異的細胞障害活性を Cr releasing assay にて検討する。ヒトでは、スキルス胃癌細胞 lysate をパルスした DC と CD8T 細胞とを TGFbeta 阻害剤、のもとで共培養した後、胃癌細胞に対する細胞障害性について検討する。

4. 研究成果

(1). 分子標的治療薬 TGFbeta receptor 阻害剤の DC に及ぼす影響

TGFbeta の DC の phenotype に及ぼす影響 (in vitro)

マウス DC の CD86、ヒト DC の LPS 刺激による CD83 発現が、TGFbeta receptor 阻害剤により増強された。

(図 1, 2)

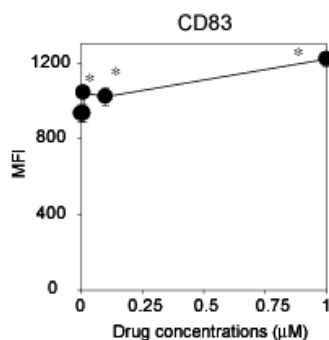


図 1

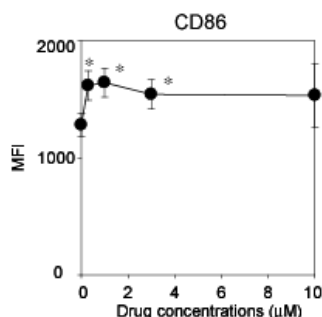


図 2

DC による Th1 サイトカイン産生に及ぼす影響 (in vitro)

マウス DC、ヒト DC の LPS 刺激による IL-12 産生が、TGFbeta receptor 阻害剤により増強された。

(図 3, 4)

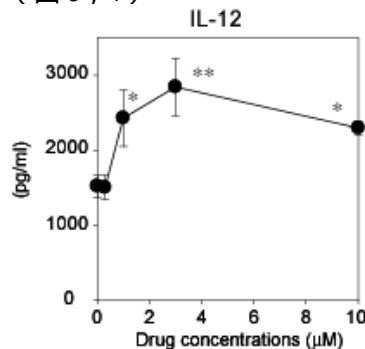


図 3

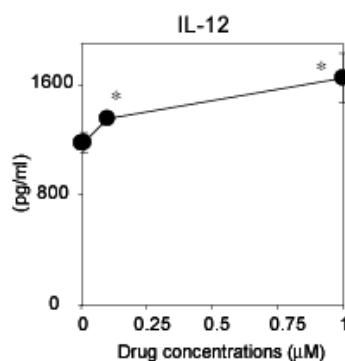


図 4

TGF シグナル伝達系への影響について (in

in vitro)
 TGFbeta 阻害剤は、濃度依存性に Smad2 のリン酸化を抑制した。(図 5)

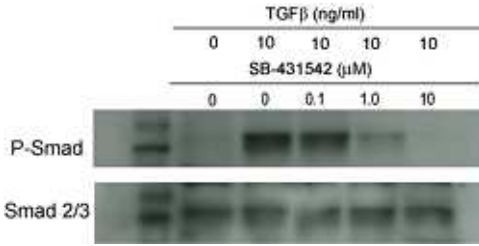


図 5

TGFb 阻害剤の、DC の抗原貪食能の検討 (in vitro)
 FITC-DX 取り込みは、TGFbeta 阻害剤により抑制されなかった。(図 6)

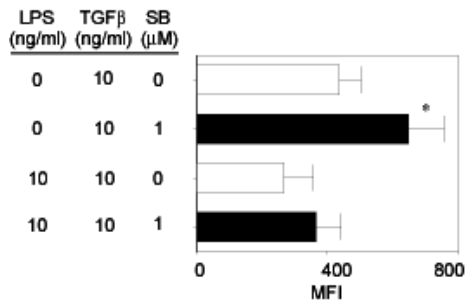


図 6

TGFbeta 阻害剤による T 細胞増殖への影響について (in vitro)
 高濃度の TGFbeta 阻害剤は、T 細胞の増殖を抑制した。(図 7)

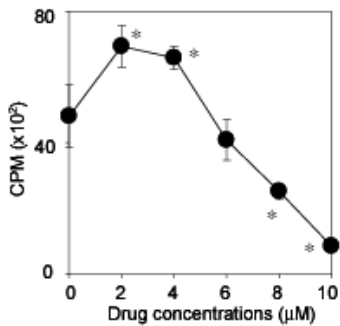


図 7

DC の抗原提示能に及ぼす影響について (in vitro)
 DC は TGFbeta 阻害剤により、T 細胞への抗原提示能が増強された (図 8 , 9)

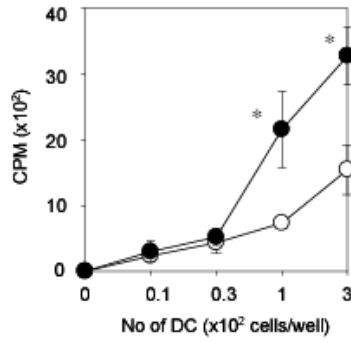


図 8

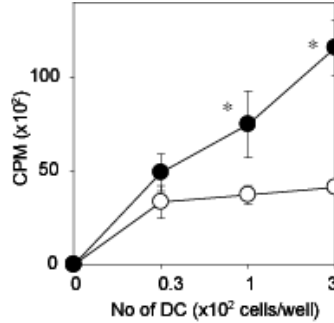


図 9

(2) . TGFbeta R 阻害剤による抗腫瘍免疫増強効果

TGFbeta 阻害剤の投与により、腫瘍特異的 CTL 活性の増強が認められた。(図 1 0 , 1 1)

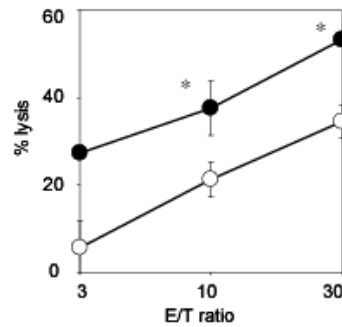


図 1 0

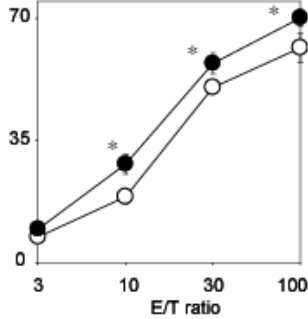


図 1 1

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)

[学会発表](計4件)

発表者：田中 浩明

発表標題：スキルス胃癌に対する低分子 TGFbetaR 阻害剤による免疫療法の可能性

学会名：第81回日本胃癌学会総会

発表年月日：2009.3.4

発表場所：東京都

発表者：田中 浩明

発表標題：TGFbetaR 阻害剤による腹膜播種モデルにおける癌特異 CTL 活性の増強

学会名：第21回日本バイオセラピー学会総会

発表年月日：2008.11.8

発表場所：東京都

発表者：田中 浩明

発表標題：分子標的治療薬 TGFbeta レセプター阻害剤の癌免疫療法への応用

学会名：第108回日本外科学会定期学術集会

発表年月日：2008.5.15

発表場所：長崎市

発表者：田中 浩明

発表標題：分子標的治療薬 TGF beta レセプター阻害剤の樹状細胞へ及ぼす影響

学会名：第20回 日本バイオセラピー学会

発表年月日：2007.10.24

発表場所：東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 浩明 (TANAKA HIROAKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90382168

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし