

機関番号：33602
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ~ 2010
 課題番号：20592350
 研究課題名 (和文) 口腔癌に対する腫瘍免疫療法の確立—OK432 重合腫瘍ワクチンによる抗腫瘍効果—
 研究課題名 (英文) Establishment of Immunotherapy for oral cancer : antitumor effect of OK432-conjugated tumor vaccine on mouse cancer model
 研究代表者
 李 憲起 (LI XIANQI)
 松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
 研究者番号：60350831

研究成果の概要 (和文)：扁平上皮癌細胞株 KLN205 細胞と OK-432 を重合した腫瘍ワクチン (OK-432 ワクチン) を用いて、マウス舌癌に対する抗腫瘍効果を検討し、またその作用機序を解析したところ、OK-432 ワクチンにより Th1 サイトカインの産生が誘導され、細胞障害性 T 細胞 (CTL) およびマクロファージの活性化されることで、強い抗腫瘍免疫応答を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : Squamous cell cancer cell line (KLN-205 cells) was mixed with OK-432 serviced as OK-432 vaccine. In this research, we used OK-432 vaccine to clarify the mechanisms of antitumor in murine tongue cancer model. The result showed that OK-432 could induce Th1 cytokine production, activated cytotoxic T lymphocyte and macrophage. It is also clear that OK-432 induced strong an antitumor immune response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：腫瘍ワクチン, OK-432, サイトカイン, 腫瘍免疫療法

1. 研究開始当初の背景

OK-432 は溶血性連鎖球菌をベンジルペニシリンと加熱して凍結乾燥したもので、悪性腫瘍に対する免疫療法薬として臨床応用されている。しかし、本剤の効果は非特異的で、腫瘍細胞を標的にしたのではなく、その免疫賦活機序の詳細は未だ不明である。これまでの研究成果より、OK-432 が Interferon- γ (IFN- γ), IL-12 など Th1 タイプサイトカインの産生を促進させ、マクロファージの貪食能、NO 産生および NK 細胞の細胞障害作用を著明に上昇させることを見出した。さらに研

究代表者は、OK-432 が宿主の細胞性免疫を CD4⁺ Th1 細胞を活性化し、マクロファージや NK 細胞の抗腫瘍効果を促進するというマウス口腔癌モデルで実証した。

本研究は、腫瘍抗原という特異抗原と OK-432 という非特異抗原によってマクロファージ/樹状細胞に抗原提示を行うユニークな発想であり、腫瘍ワクチン療法という新たな特異的癌免疫療法分野を開拓することになる。生検 (biopsy) など個々の患者から分離した口腔癌 (粘膜癌) 細胞を用いて OK-432 重合腫瘍ワクチンを作製し、担宿主に用い

れば、腫瘍特異的癌免疫療法が施行できるものと期待される。さらに、外科的切除後には postoperative adjuvant immunotherapy として用いると、再発抑制が可能であると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、OK-432 と腫瘍細胞をグルタルアルデヒドで重合した OK-432 重合腫瘍ワクチンを作製し、その有効性と作用機序（シグナル伝達）について、*in vivo* マウス舌癌および転移モデルで OK-432 重合腫瘍ワクチンの有効性の検討、さらに、*in vitro* マクロファージ/樹状細胞/T 細胞混合培養実験系を用いて OK-432 重合腫瘍ワクチンの作用機序（細胞内シグナル伝達）の解明することを目指した。

3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するために、以下の方法で解析を遂行した。

(1) マウス舌癌モデルによる OK-432 重合腫瘍ワクチンの抗腫瘍効果の検討

① マウス脾臓または頸部リンパ節から分離したリンパ球を培養し、産生された Th1 系の IFN- γ 、IL-2、IL-12 と Th2 系の IL-10、IL-4、IL-6 を ELISA で定量した。

② マクロファージの活性化をケミルミネッセンス法で同定し、ワクチン接種による抗原提示と腫瘍細胞の殺細胞効果の促進を検討した。

③ リンパ節転移マウスに対し OK-432 重合腫瘍ワクチンを接種し、腫瘍増殖率および生存期間を比較検討した。また、リンパ節を摘出後、免疫組織学的細胞同定すると共に病理組織学的に浸潤細胞と腫瘍細胞の状態を観察し、さらにリンパ節組織をホモジネートし、Th1 系の IFN- γ 、IL-2、IL-12 と Th2 系の IL-10、IL-4、IL-6 を ELISA で定量した。

(2) OK-432 重合腫瘍ワクチンの接種による宿主マウスの反応の検索

① 細胞性免疫に及ぼす影響：KLN205 細胞を用いてマウスに移植し、実験的担癌状態にした後、マウスの腹腔大食細胞 (MP) を集めボイデンチャンパー法により遊走能と貪食能を測定した。

② 担癌宿主に及ぼす影響：抗腫瘍効果については、OK-432 重合腫瘍ワクチンの接種によるマウス舌癌細胞の縮小率に加え、宿主血中の Th1 系の IFN- γ 、IL-2、IL-12 と Th2 系の IL-10、IL-4、IL-6 を ELISA で定量した。

(3) 単球 (マクロファージ・樹状細胞) / T 細胞混合培養実験系による OK-432 重合腫瘍ワクチンの作用の検討

ワクチン添加により活性化された免疫担当細胞から産生される Th1 系の IFN- γ 、IL-2、IL-12 と Th2 系の IL-10、IL-4、IL-6、Mac 抗

原などを ELISA で定量し、さらにマクロファージの NO、活性酸素の産生能をケミルミネッセンス法で測定した。

4. 研究成果

(1) 対照群では腫瘍接種後 1 週間ほどに腫瘍が 100% 形成 (n=15) され、腫瘍接種後 30 日までにすべてが腫瘍死となった。一方、腫瘍ワクチン群 (n=14) では、腫瘍の発生率が 64.3% (n=9) におさえられ、腫瘍移植後 40 日の時点では 57.1% (N=8) の生存率であった。対照群と比較して、腫瘍発生率・死亡率ともに有意に低く上、腫瘍が生着したマウスでも腫瘍増殖が抑制された (Fig. 1)。

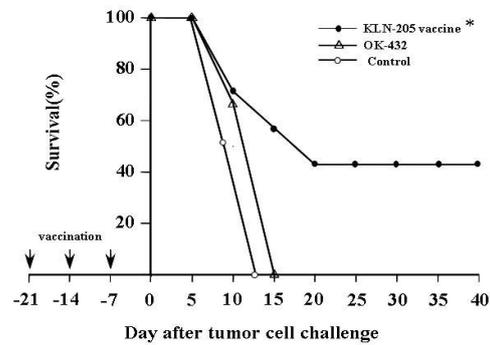


Fig. 1. Antitumor effects induced by immunization with KLN-205 vaccine. *Significant difference between the groups of KLN-205 vaccine and control. ($p < 0.05$).

(2) 血清中の IFN- γ (Fig. 2) と IL-2、IL-10、IL-12 の濃度を測定したところ、腫瘍ワクチン群は IFN- γ と IL-2、IL-10、IL-12 の濃度が高値を示し、対照群では有意なサイトカインの誘導はみられなかった。マウスのリンパ節より採取したリンパ球と腫瘍細胞混合培養 48 時間後、培養上清中のサイトカインの測定した結果、腫瘍ワクチン群のリンパ球では、Th1 サイトカインの産生が誘導されていることが明らかとなった。

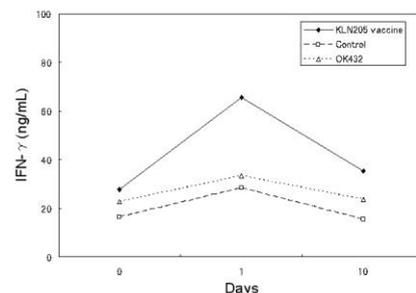


Fig. 2 INF- γ levels in serum after tumor challenge.

(3) 腫瘍移植後 24 時間 (Fig. 3)、10 日目の免疫組織化学的観察 (免疫染色) について、

KLN205 ワクチン接種群では、対照群に比べ、腫瘍細胞の周囲に CD4+ と CD8+ T 細胞とマクロファージの著明な浸潤が認められ、CD25 (IL-2R α)、CD69、CD122 (IL-2R β) も陽性であった。

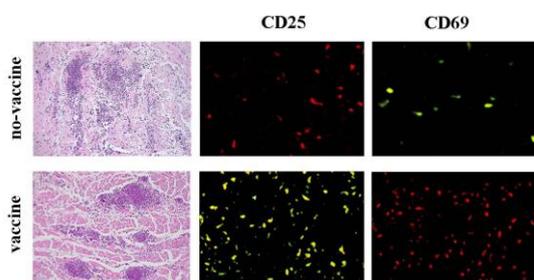


Fig. 3 Expression of anti-CD25 and CD69 in immunization with KLN-205 vaccine group and control group (no-vaccine) using immunofluorescent staining.

(4) OK432 重合腫瘍ワクチンにより TNF- α を誘導することも観察され、腹腔内マクロファージの NO 値も有意に高値を示した。さらに、免疫組織学的細胞同定を検討したところ、CD169 陽性マクロファージが確認された。

従って、OK-432 ワクチンにより細胞障害性 T 細胞 (CTL) およびマクロファージの活性化され、強い抗腫瘍免疫応答を誘導することによって、がん免疫を誘導する新たな治療につながるかと期待できる。

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 6 件)

- ① Zhao E, Li X, Wang J, Yang J, Uematsu T and Furusawa K. Immunohistochemical localization of aquaporin-6 and aquaporin-5 in the human submandibular gland. J Modern Stomatol, 24:370-372, 2010. 査読有
- ② 李 憲起, 王 金濤, 趙 二軍, 楊 静, 上松隆司, 古澤清文. 導管嚢胞を伴った耳下腺組織におけるアクアポリンの局在. 松本歯学, 36 : 115-119, 2010. 査読有
- ③ Yamaoka M, Ishizuka M, Ishihama K, Takahashi M, Takahashi M, Yamada H, Teramoto Y, Yasuda K, Shiba T, Uematsu T, Furusawa K: Bone formation without lamina dura in the middle-aged and elderly: possible dependence on enamel. Clin Interv Aging 5: 37- 43, 2010. 査読有
- ④ Usui Y, Uematsu T, Uchihashi T, Takahashi M, Takahashi M, Ishizuka M,

Doto R, Tanaka H, Komazaki Y, Osawa M, Yamada K, Yamaoka M, Furusawa K: Inorganic polyphosphate induces osteoblastic differentiation. J Dent Res 89: 504-509, 2010. 査読有

- ⑤ 丹羽 崇, 上松隆司, 堂東亮輔, 高橋美穂, 高田匡基, 丸川和也, 松尾浩一郎, 武田龍太郎, 前島信也, 古澤清文: 下顎歯肉と食道に発生した同時性重複癌の 1 例. 松本歯学, 36 : 7-15, 2010. 査読有
- ⑥ Wang R, Li X, Yang J, Xu Q, Yang Q. Stress distribution of different metal framework for metal-ceramic crown by three-dimensional finite element analysis. Journal of Modern Stomatology 23: 398-401, 2009. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 丹羽 崇: 口腔・食道同時性重複癌の一例. 第 29 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2011 年 1 月 28 日, 熊本県熊本市.
- ② 丹羽 崇: テトラスパニン は細胞遊走と DPP4 遺伝子ファミリーの発現を制御する. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 23 日, 大阪.
- ③ 李憲起: シンバスタチンによるインプラント体周囲の骨形成作用. 第 55 回日本口腔外科学会, 2010 年 10 月 17 日, 千葉幕張メッセ.
- ④ 丹羽 崇: CD82/KAI-1 発現癌細胞における DPP4 gene family の変動. 第 55 回日本口腔外科学会, 2010 年 10 月 18 日, 千葉幕張メッセ.
- ⑤ X LI: OK-432-conjugated tumor vaccine in mouse cancer model. 88th General Session & Exhibition of the IADR. July 16, 2010, Barcelona, Spain.
- ⑥ Niwa T: Tetraspanin influences cell migration and DPP IV gene expression. 88th General Session & Exhibition of the IADR. July 16, 2010, Barcelona, Spain.
- ⑦ 丹羽 崇: 培養癌細胞における DPP4 遺伝子ファミリーの発現. 2009 年 10 月 9 日, 札幌.
- ⑧ 高橋美穂: Alteration in the Expression of Dipeptidyl Peptidases in Tetraspanin-Expressed Cancer cells. 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1 日, 横浜.
- ⑨ X. LI: Antitumoral immunity by OK-432-conjugated tumor vaccine in mice cancer model. 第 57 回 JADR 学術大会, 2009 年 9 月 23 日, 武漢, 中国.

- ⑩ 丹羽 崇：口腔癌細胞における DPP4 遺伝子ファミリーの発現. 第 63 回日本口腔科学会学術集会総会, 2009 年 4 月 16 日, 浜松.
- ⑪ NIWA T: Cell migration and enzyme expression in tetraspanin-expressing cancer cells. 第 87 回国際歯科学研究学会議, 2009 年 4 月 3 日, マイアミ, アメリカ.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 憲起 (LI XIANQI)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：60350831

(2) 研究分担者

高橋 美穂 (TAKAHASHI MIHO)

松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00444795

丹羽 崇 (NIWA TAKASHI)

松本歯科大学・歯学部・助手
研究者番号：60507680

中澤 高志 (NAKAZAWA TAKASHI)

松本歯科大学・歯学部・助手
研究者番号：50582368