

平成 22 年 3 月 29 日現在

研究種目： 若手研究 ( B )

研究期間： 2008 ~ 2009

課題番号： 20790934

研究課題名 ( 和文 ) BRM による樹状細胞の機能修飾を用いた癌治療の試み

研究課題名 ( 英文 ) BRM cocktail treatment using PSK and OK432 significantly up-regulates the migration activity in human dendritic cells without losing effective CTL induction

研究代表者

星野 実加 ( HOSHINO MIKA )

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号： 00464511

研究成果の概要 ( 和文 ) : 樹状細胞 ( DC ) を用いた特異的癌免疫療法において抗腫瘍効果を得るには、十分な DC の成熟化と良好な遊走能を確保する事が必須である。今回我々は OK432 と PSK を用いて成熟化した DC の各機能について検討した。

OK-DC は成熟度・CTL 誘導能は優れ、遊走能は劣っていた。OK-PSK-DC は、成熟度・CTL 誘導能は OK-DC と同等で、遊走能が改善した。

PSK を OK432 に併用することにより、成熟度と CTL 誘導能を損なわずに、優れた遊走能を有する DC を作成し得た。OK432, PSK は GMP grade の BRM であるため、今後臨床における DC 療法への応用が期待される。

研究成果の概要 ( 英文 ) : Dendritic cells ( DCs ) based cancer immunotherapies are widely applicable for many kinds of human cancers; however, patient outcomes are still not acceptable. One of the major factors for successful DCs immunotherapy is thought to be the maintenance of the migratory activity of matured DCs. In the present study we evaluated the effectiveness of protein bound polysaccharide PSK on OK432-activated DCs, in terms of maturation, migration and induction of cytotoxic T lymphocytes. OK432 treated DCs induced higher level of cytotoxic activity with poor migration ability. When DCs were treated with both OK432 and PSK, migration ability of the DCs were significantly high as compared to OK432 alone preserving the beneficial effect of OK432 treatment. Biological Response Modifier cocktail treatment with OK432 and PSK induced high level of migration activity in activated DCs, suggesting a potential protocol for more effective DC immunotherapy for cancer.

交付決定額

( 金額単位 : 円 )

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：樹状細胞，OK432，PSK，遊走能

### 1. 研究開始当初の背景

近年、進行癌に対する治療のひとつとして樹状細胞を用いた特異的癌免疫療法が試みられているが、その効果は未だ充分ではない。樹状細胞療法において抗腫瘍効果を得るには、十分な樹状細胞の成熟化とCTL誘導能および良好な遊走能を確保する事が必須である。GMPgradeのBiological Response Modifierの一つとして知られているOK432はmulticytokine inducerとして機能し、樹状細胞の成熟化においても促進的に働くことが報告されている。我々の施設でも、OK432が従来使用されているTNFと比較して成熟化刺激およびCTL誘導能が優れていること、またその成熟化刺激後2時間後に最も樹状細胞のTLR発現が増加することを報告してきた。しかし、OK432によって成熟した樹状細胞では遊走能が低下することが問題点として指摘されており、その改善に向けた取り組みがなされてきている。一方、他のGMPgradeのBRMであるPSKは、担癌時の免疫能の低下を軽減あるいは回復させていることが報告されており、その免疫調節作用の一つとして樹状細胞による免疫応答を調節している可能性が示唆されているが、その機序については不明な点が多い。我々は、OK432とPSKの樹状細胞へのそれぞれの作用の違いを解析し、その併用によるさらなる樹状細胞機能の改善と臨床への応用を目標として本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

(1) OK432とPSKの単独投与と併用投与による樹状細胞に対する作用の変化、また従来樹状細胞の成熟化に用いられてきたTNFなどのサイトカインとの比較を以下の項目について検討する。

成熟化能	CTL誘導能
遊走能	サイトカイン産生能

(2) 十分な成熟化とCTL誘導能および良好な遊走能を有する樹状細胞を作成し、臨床における樹状細胞療法の効果を検討する。

ペプチドや自己の腫瘍を抗原として成熟樹状細胞を作成し、進行再発癌患者に投与する。

癌抗原が同定できない場合は未熟樹状細胞の腫瘍内局注を行う。局注した未熟樹状細胞が抗原を貪食し成熟化後、リンパ節に遊走

して抗原提示するためにも、良好な遊走能を有することが必要となる。

### 3. 研究の方法

(1) 樹状細胞の作成：健常人および担癌患者の末梢血から樹状細胞を作成する。比重遠心法にて単核球分画を採取し、45分間培養にて得られる付着細胞を、GM-CSF 50ng/mlとIL-4 50ng/mlを添加した無血清培地AIM-Vに懸濁して5日間培養して未熟樹状細胞を作成する。抗原刺激として未熟樹状細胞に抗原としてペプチド2μg/mlを添加し12時間培養する。成熟化刺激として、薬剤なし、TNF(100ng/ml)、OK432(0.1KE/ml)、PSK(10,30,100μg/ml)、OK432(0.1KE/ml)とPSK(10,30,100μg/ml)併用、の各条件を設定する。48時間刺激を行ったのちに得られる成熟樹状細胞について、検討を行う。

(2) 樹状細胞機能の解析：樹状細胞の成熟度については成熟度の指標となる表面発現抗原、CTL誘導能についてはCTLの細胞障害因子放出の指標となる表面発現抗原と殺細胞効果、遊走能については遊走能の指標となる表面発現抗原とリガンドへの遊走細胞数について解析を行う。またTH1, Th2サイトカインの産生量も測定する。

樹状細胞の成熟度について：健常人および担癌患者の末梢血より作成した樹状細胞を用いて、各条件下での成熟樹状細胞の表面発現抗原(MHC class 2, CD83, CD86)をフローサイトメトリーにて測定して比較検討する。

遊走能：健常人および担癌患者の末梢血より作成した樹状細胞を用いて、各条件下で得られた成熟樹状細胞について、遊走能の指標とされているCCR7の発現をフローサイトメトリーにて測定する。健常人および担癌患者の末梢血より作成した樹状細胞を用いて、各条件下での成熟化刺激を行ったのちに得られた成熟樹状細胞における、CCR7のligandであるケモカインMIP-3に対する遊走能を測定する。フィルター下部にMIP3、フィルター上部に樹状細胞を分注して培養後、フィルターの下部に遊走した細胞を回収し、CD86/CD11c陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにて測定して、遊走した成熟樹状細胞

数を算出する。

CTL の誘導能： 健康人および担癌患者の末梢血より各条件下に作成した成熟樹状細胞より誘導された CTL に抗原刺激を加え、細胞障害因子が放出される際に表面に現れる CD107 をフローサイトメトリーにて測定する。

健康人および担癌患者の末梢血より各条件下に作成した成熟樹状細胞より誘導された CTL と、抗原刺激に用いた HLA 型の適合している腫瘍細胞を共培養し、障害された腫瘍細胞より放出される LDH を測定する。

サイトカイン産生能：健康人および担癌患者の末梢血より作成した樹状細胞を用いて、各条件下の成熟樹状細胞の培養上清を採取し、上清中の IFN、IL12、IL10 を ELISA にて測定する。作成した機能改善樹状細胞の in vivo における効果を、マウスのモデルを用いて検討する。効果が認められるときには、内服時の局所の PSK 濃度を測定して臨床へ応用していく。

#### 4. 研究成果

(1) 成熟度において、OK432 により成熟化した DC (OK-DC) は他の条件に比較して高く、OK432 と PSK を併用した DC (OK-PSK-DC) でも、同様に高い成熟度を示した(図 1)。

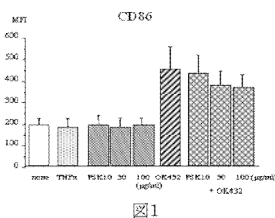


図1

(2) CCR7 の発現は、OK-DC に比較し OK-PSK-DC において PSK の濃度に比例して発現増強が認められた(図 2)。

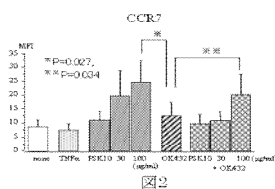


図2

(3) 遊走能の検討では、OK-PSK-DC は、MIP3 に対して遊走した成熟 DC が他の条件の約 2 倍となった(図 3)。

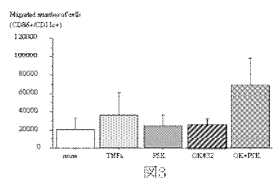


図3

(4) CTL 誘導能の検討では、OK-DC によって誘導された CTL は、高い細胞障害活性を有し、また抗原刺激に対して高い CD107a 陽性率を示した。OK-PSK-DC によって誘導された CTL でも、同等の結

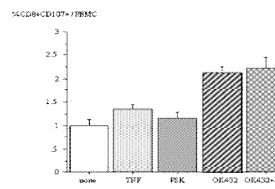


図4

果を得た(図 4)。

(5) DC 培養上清中の IFN、IL-12 は OK-DC で高値であり、OK-PSK-DC でも同等であった(図 5)。

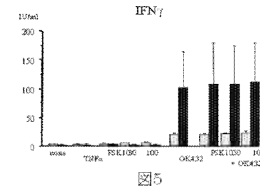


図5

OK432 によって成熟化した DC は成熟度と CTL 誘導能に優れるが、遊走能が低い。今回我々は、PSK を OK432 に併用することにより、成熟度と CTL 誘導能を損なわずに、優れた遊走能を有する DC を作成し得た。OK432、PSK は GMP grade の BRM であるため、今後臨床における DC 療法への応用が期待される。

#### 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)

長谷川剛生, 鈴木弘行, 塩豊, 樋口光徳, 星野実加, 米地敦, 後藤満一. CTL クローンの樹立と大量培養法. Surgery Frontier 15 (2) : 78-82, 2008. 査読無

鈴木弘行, 長谷川剛生, 岡部直行, 柳沼裕嗣, 米地敦, 星野実加, 樋口光徳, 塩豊, 見城明, 後藤満一. 樹状細胞の分離誘導法と樹状細胞による CTL の誘導法. Surgery Frontier 15 (2) : 187-191, 2008. 査読無

[学会発表](計 2 件)

Hoshino M. BRM cocktail treatment using PSK and OK-432 significantly up-regulates the migration activity in human DCs without losing the effective CTL induction. The10th International Symposium on Dendritic Cell 2008.10.1 Kobe, Japan

鈴木弘行. 当科での肺癌に対する樹状細胞療法の現状と評価法に関する検討. 第 29 回癌免疫外科研究会 2008.6.19-20 東京

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 実加 (HOSHINO MIKA)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 0 0 4 6 4 5 1 1

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし