

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790387

研究課題名 (和文) LTB4 阻害時に GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍効果が長期維持される機序

研究課題名 (英文) To clarify mechanism by which long-term antitumor immunity induced by GM-CSF gene transduced tumor cells is generated in the absence of LTB4/BLT1 signaling.

研究代表者

井上 博之 (INOUE HIROYUKI)

九州大学 生体防御医学研究所

研究者番号：80529967

研究成果の概要 (和文)：本研究で、我々は BLT1-KO マウスにおける GM-CSF 遺伝子導入マウス白血病 (WEHI3B) 細胞 (WGM) の腫瘍形成拒絶後の同細胞接種の再拒絶過程において、CD4+T 細胞が重要な責任細胞である事を明らかにした。また、KO/WGM マウス群でステムセントラルメモリーT細胞を含む各種メモリーT細胞が促進されていた (day 46)。その誘導メカニズムとして、*in vivo* における BLT1 シグナル欠失は、腫瘍抗原貪食樹状細胞の遊走及び活性化、追従する適応免疫系の活性化及び免疫寛容系を抑制しながら、より強力な腫瘍抗原特異的メモリーCD4+T細胞を効率よく長期的に誘導することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we successfully identified CD4+T cells as a pivotal determinant responsible for developing long-term antitumor effect during re-rejection of rechallenge of WEHI3B cells, a mouse monocytic leukemia cell line, after observation of marked rejection of *in vivo* s.c. administration of GM-CSF gene transduced WEHI3B (WGM) cells. In addition, ratios of various memory CD4+T cells including stem central memory CD4+T and CD8+ T cells in lymph nodes (LNs) collected at day 46 were increased in BLT1 mice inoculated with WGM cells. As a prospective mechanism, our immunological findings suggest that absence of LTB4/BLT1 signaling facilitates effective and sustained generation of potent tumor associated antigens (TAAs) specific memory CD4+T cells by promoting activation of mature DCs in LNs and migration of TAAs phagocytosed DCs into LNs, subsequently leading to augmented adaptive immunities (Th1 and Th2 cells) and repressing a wide range of regulatory CD4+ T cells known to hinder antitumor immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：腫瘍免疫、メモリーT細胞、BLT1、LTB4、GM-CSF

1. 研究開始当初の背景

(1) GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞は、皮内接種すると局所のランゲルハンス細胞や樹状細胞

(抗原提示細胞) を遊走かつ成熟化させ、リンパ節中の Naive T 細胞へ腫瘍抗原を提示し、抗腫瘍効果を発揮することが知られて

いる (Miller G, *et al.*, *J Immunol* 2002)。これまで、欧米及び本邦において各種固形癌に GM-CSF 遺伝子導入した自家あるいは同種ワクチン腫瘍細胞を用いた免疫遺伝子治療の臨床研究が多数行われ (Tani K, *et al.*, *Mol Ther.* 2004)、その安全性、有効性が示されている。

(問題点) しかしながら、その抗腫瘍効果は症例により異なり、抗腫瘍効果の増強あるいは長期的な維持を一般的医療レベルとして実現させることが重要な課題である。

LTB4 は phospholipase A2 や 5-lipoxygenase (5-LO) により産生される強力な炎症性脂質メディエーターであり、好中球の活性化因子と知られている。また、LTB4 に対する受容体である BLT1 は、炎症性疾患の病因や病原体侵入に対する宿主の白血球活性及び走化性に関与している。近年、LTB4 と樹状細胞や適応免疫系との正の関連性が報告されているが、腫瘍免疫における LTB4 の役割は報告されていない。

(2) これまで、GM-CSF (マクロファージコロニー刺激因子) 導入自家腫瘍細胞 (GVAX) を用いた、固形癌に対する免疫遺伝子治療の臨床および前臨床研究が多数行われその抗腫瘍効果が示されてきた。体内に皮下接種された GVAX は、皮内の Langerhans 細胞を中心とした樹状細胞 (DC) を活性化し、腫瘍関連抗原の貪食を促進後、成熟する。成熟 DC は所属リンパ節内に遊走し、CD4 陽性 T リンパ球及びクロスプライミングにより、CD8 陽性 T リンパ球に対して効率よく抗原提示を行い、腫瘍特異的 CTL を誘導することで抗腫瘍効果を発揮するものと考えられている。

(3) しかし、これまでの研究から GVAX は患者体内で確かに抗腫瘍効果を誘導するが、腫瘍サイズが大きい場合は GVAX の抗腫瘍効果は限定的なものにとどまり、腫瘍の根絶には至らないことから、GVAX の抗腫瘍効果を増強するような新たな免疫遺伝子治療の開発が必須である。

2. 研究の目的

(1) 我々は、これまで GM-CSF 遺伝子導入マウス単球系白血病細胞株 WEHI3B を野生型及び BLT1 KO マウス (Balb/c) に皮下接種する腫瘍形成能試験を行った結果、GM-CSF 遺伝子非導入 WEHI3B (WGM) を接種した際、野生型マウス 6 匹中 5 匹、BLT1 KO マウス 6 匹中 6 匹においてその腫瘍形成は完全に拒絶され、さらに腫瘍接種後 50 日目に同数の WEHI3B 細胞を両拒絶マウスに再接種した際、BLT1 KO マウスにおいて有意に腫瘍再拒絶を認め、長期的な抗腫瘍効果が認められた。本研究に

において、LTB4 のシグナル阻害が、どのように GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍効果の増強及び長期的な維持に影響を与えているのかという疑問を、分子生物学的あるいは細胞学的観点 (免疫細胞のフェノタイプ解析) から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GM-CSF 遺伝子導入 WEHI3B 細胞の腫瘍拒絶に関わる責任細胞の同定実験、及び腫瘍抗原特異的メモリー T 細胞の誘導メカニズムを明らかにするため以下の免疫学的解析を施行した。まず、腫瘍接種から 46 日目に WT/WGM 群 (野生型マウスに WGM 細胞を皮下接種したマウス群) および KO/WGM 群 (BLT1-KO マウスに WGM 細胞を皮下接種したマウス群) の所属リンパ節における各メモリー T 細胞サブタイプ、及び免疫寛容系 T 細胞をフローサイトメトリー法により比較検討した。

(2) 上記腫瘍接種再拒絶現象に関わる責任免疫細胞の同定。各免疫担当細胞除去実験: WEHI3B 細胞皮下接種後 50 日目より腫瘍を拒絶した BLT1 KO マウスに CD4, CD8, NK 細胞の中和抗体を投与し腫瘍容積を測定し腫瘍再拒絶に関与する免疫細胞を同定した。

(3) 上記同腫瘍拒絶過程において、day 46 における両マウス群のリンパ節及び脾臓の複数のサイトカインを発現する T 細胞解析 (Multifunctional T cell assay) をフローサイトメトリー法により施行した。また、同時期における両マウス群の Th1/Th2 レパートア解析、及び 3 種類の CD3+CD4+抑制性 T 細胞の割合を比較解析した。

(4) 上記腫瘍拒絶過程での中期 (day 4-15) における両マウス群より採取した脾臓を WEHI3B 細胞により再刺激し、上清中の 5 種類の炎症性サイトカインを Cytometric Bead Array 法により比較定量解析した。

(5) 上記腫瘍拒絶過程での初期 (day 2) における両マウス群の樹状細胞の成熟化マーカー解析及び、予め PKH26 蛍光色素により標識した WEHI3B 細胞 (腫瘍関連抗原) を貪食した樹状細胞をフローサイトメトリー法により比較解析した。

(6) 臨床展開を念頭にし、LTB4 アンタゴニスト ONO-4057 を野生型マウスへ投与し、上記実験で認めた WEHI3B 細胞再接種 (day 50) の再拒絶が再現されるか否か検証する。LTB4 アンタゴニスト ONO-4057 を野生型マウスへ毎日腹腔内投与する。治療マウス群:
1 野生型マウス ONO-4057 投与なし
2 野生型マウス ONO-4057 毎日投与

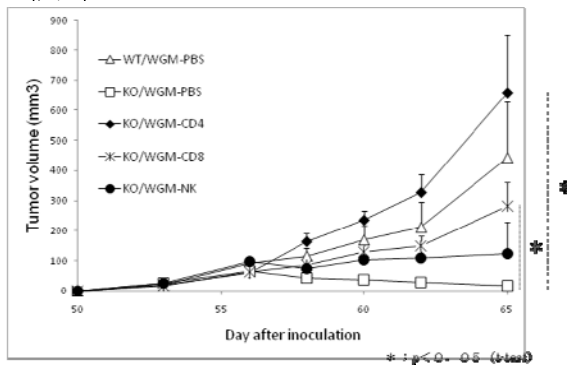
- 3 野生型マウス ONO-4057 投与(0-50 日)
 - 4 野生型マウス ONO-4057 投与(50 日以降)
 - 5 野生型マウス CMC(溶媒)のみ 毎日投与
- 上記各マウス群には 0 日目に WEHI3B あるいは WGM 細胞をそれぞれ皮下接種し、腫瘍径測定によりアンタゴニスト投与の影響を比較検討する。

4. 研究成果

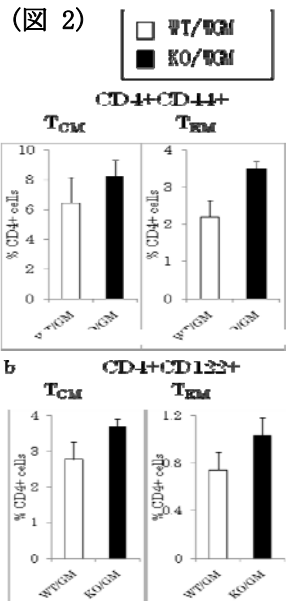
(1) まず、最初の WEHI3B 細胞接種より day 50 以降に観察された腫瘍再拒絶が、腫瘍細胞への LTB4/BLT1 を介した直接的シグナリングによる抗腫瘍効果の可能性を除外するために、WEHI3B 細胞の BLT1 mRNA の発現が無い事を RT-PCR 法により確認した (data not shown)。

次に、各免疫担当細胞中和抗体 (CD4、CD8 および NK) を用いた免疫細胞除去実験結果、CD4+細胞除去マウス群において、有意かつ著明に再拒絶が抑制された ($p < 0.05$)。従って、上記 WEHI3B 細胞再拒絶は、CD4+ (メモリー) T 細胞に主に依存し、CD8+T 細胞及び NK 細胞も関与することを明らかにした (図 1)。従って、LTB4/BLT1 シグナル阻害が GM-CSF 誘導により強力なメモリー T 細胞を誘導することにより、抗腫瘍免疫を活性化していることが強く示唆された。

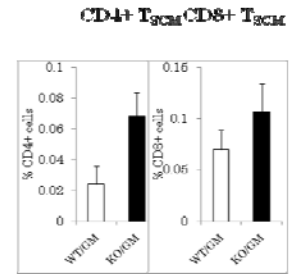
(図 1)



(2) KO/WGM群において、CD4+エフェクターメモリー T 細胞 (CD44+CD62L-, CD122+CD62L-)、セントラルメモリー T 細胞 (CD44+CD62L+, CD122+CD62L+)、及び CD4 あるいは CD8 陽性ステムセントラルメモリー T 細胞 (Tscm) の割合が WT/WGM 群より高かった (図 2)。上記各メモリー細胞、特に Tscm 細胞が抗腫瘍免疫活性が高いことが近年報告されており、これらの我々の結果

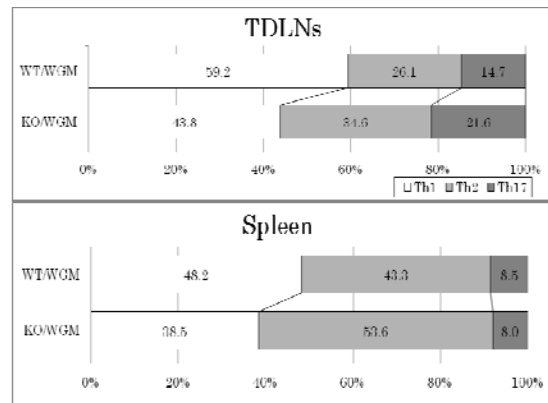


より、LTB4/BLT1 シグナル阻害が WEHI3B 細胞関連腫瘍抗原特異的 CD4 陽性メモリー T 細胞を効率よく誘導していることが示唆された。



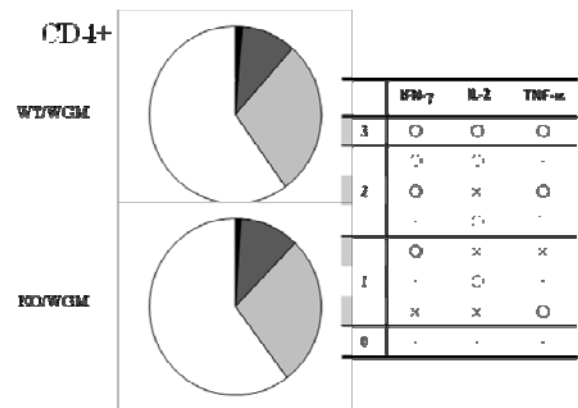
(3) また、上記 WEHI3B 細胞拒絶過程 day 46 において、所属リンパ節の Th1/Th2/Th17 細胞レパートア解析の結果、KO/WGM マウス群において、Th2 細胞及び Th17 細胞の相対的割合が高く (脾臓細胞においては、Th2 細胞の割合が高かった)、この結果により LTB4/BLT1 シグナル阻害が、Th2 細胞 (液性免疫) 優位に活性化を促進している事が示唆された (図 3)。

(図 3)



また、Multifunctional T cell assay の結果より、LTB4/シグナル阻害が T 細胞重複サイトカイン産生能 (IFN- γ , TNF- α , IL-2) には影響しないことが示された (図 4)。

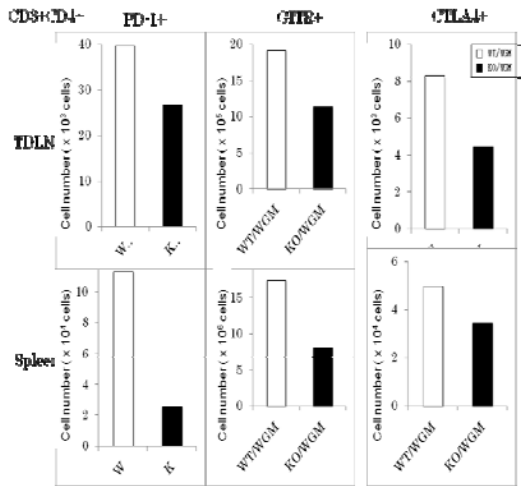
(図 4)



さらに、LTB4/BLT1 シグナル阻害の GM-CSF 刺激時における 3 種類の免疫寛容系である CD3+CD4+T 細胞誘導 (PD-1+, CTLA4+, GITR+) への影響をフローサイトメトリー法により定量比較解析した結果、KO/WGM マウス群において、いずれの寛容系 CD4+T 細胞の割合も

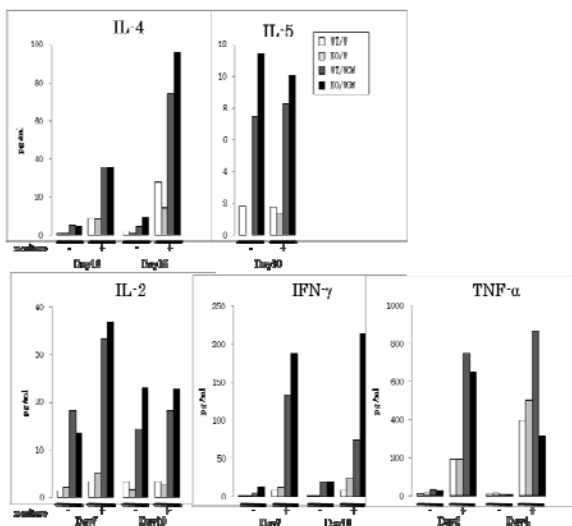
WT/WGMマウス群と比較して、有意に減少していた(図5)。以上の結果より、*in vivo*でのGM-CSF刺激下においてLTB4/BLTシグナル阻害は、これらの抑制性(制御性)CD4⁺T細胞を相対的に減少させることによりGM-CSF誘導による抗腫瘍免疫(腫瘍抗原特異的メモリーT細胞の誘導)を促進している可能性が示唆された。

(図 5)



(3) また、腫瘍形成試験中期(day7-15)におけるマウス脾臓を採取しWEHI3B細胞と共培養後、上清中の炎症性サイトカインを測定した結果、WT/WGMマウス群と比較した結果、KO/WGMマウス群の方がIL-2、IFN- γ (Th1サイトカイン) およびIL-4、IL-5(Th2サイトカイン)の産生量が高かった(図6)。

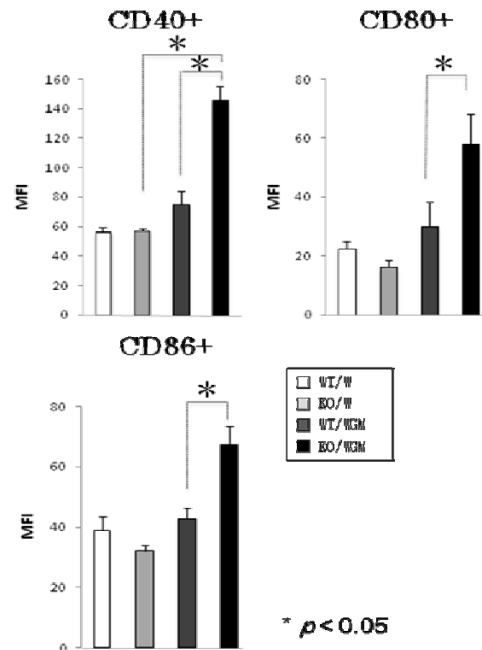
(図6)



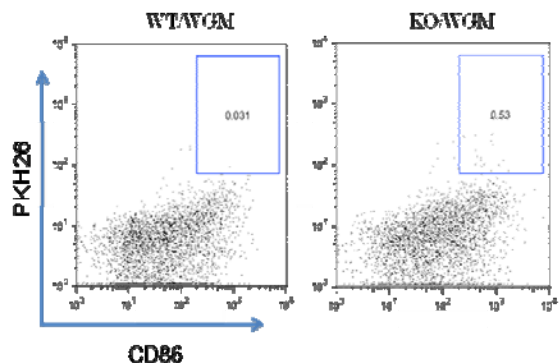
これらの結果より、腫瘍拒絶過程中期においても、LTB4/BLT1シグナル阻害は、液性免疫及び細胞性免疫系をそれぞれ強力に活性化させる事が示唆された。

(4) 次に、上記結果より上記腫瘍拒絶過程初期(day 2)において、適応免疫系への重要なリンカーである両マウス群の樹状細胞(DCs: CD11c陽性細胞)へのLTB4/BLT1阻害の影響を検証した。その結果、WT/WGMマウス群と比較し、KO/WGMマウス群の所属リンパ節におけるDCsの共刺激因子、成熟化マーカー発現(CD40+CD11c+, CD80+CD11c+, CD86+CD11c+) (図7)、及び所属リンパ節へのWEHI3B細胞抗原貪食樹状細胞(PKH26+CD11c+)の遊走が有意に増強促進されていた(p<0.05) (図8)。

(図 7)



(図 8)



(5) 最後に、臨床展開を念頭にし、LTB4アンタゴニスト ONO-4057 を野生型マウスへ各観察機関において定期的に腹腔内投与し、同マウスにおいて上記実験で認めたWEHI3B細胞再接種(day 50)の再拒絶が再現されるか否か検証した。

その結果、様々な投与期間に ONO-4057 を投与した3マウス群と野生型マウス群間の腫瘍容積に有意差は認められなかった(data not shown)。

以上の我々の結果より、*in vivo* における LTB4BLT1 シグナルの欠失は、GM-CSF による抗腫瘍免疫記憶を、強力な CD4+メモリーT細胞を誘導にすることにより長期的に維持することが明らかとなった。その誘導メカニズムとして、詳細な分子学的機序は不明ではあるが、LTB4BLT1 阻害は、GM-CSF により感作及び活性化された腫瘍抗原食細胞の遊走及び成熟活性化をより促進し、それに引き続き追従する適応免疫系 (Th1, Th2 レパートア) を、免疫寛容系を抑制しながら活性化することにより、より強力な腫瘍抗原特異的メモリーCD4+T細胞を誘導することが強く示唆された。

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 0 件)
現在論文作成中

[学会発表] (計 3 件)

① Blocking of the LTB4 Signaling Maintains the *in vivo* Antitumor Effects of GM-CSF in the tumor challenged BLT1^{-/-} mice
Haruka Nabeta, Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Yosuke Yokota, Ryo Kurita, Fumiyouki Sasaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani.
第 70 回日本血液学会総会(国立京都国際会館) 2008 年 10 月 10-12 日

② Blocking LTB4 Signaling Confers the Long-Term Antitumor Effects Induced by GM-CSF-Transduced Tumor in BLT1 Deficient Mice
Hiroyuki Inoue, Yosuke Yokota, Haruka Nabeta, Mutsunori Iga, Chika Sakamoto¹, Fumiyouki Sasaki, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani.
第2回グローバルCOE国際シンポジウム/
第18回九州大学生体防御医学研究所ホットスプリングハーバーシンポジウム (福岡市)
2008年11月9、10日

③ Loss of LTB4 Signaling Confers the Long-Term Antileukemia Effects Induced by GM-CSF -Transduced Tumor in BLT1 deficient Mice
Hiroyuki Inoue, Yosuke Yokota, Haruka Nabeta, Mutsunori Iga, Chika Sakamoto, Fumiyouki Sasaki, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani.
第 50 回米国血液学会 (サンフランシスコ)

2008 年 12 月 6-9 日

[図書] (計 1 件)
井上 博之、谷 憲三朗
サイトカインと癌治療
臨床検査 (医学書院) 第 54 巻 6 号
p670-676 2010 年 6 月 15 日発行

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
井上博之 (INOUE HIROYUKI)
九州大学 生体防御医学研究所 助教
研究者番号 : 30536850

(2) 研究分担者 ()
研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :