

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791632

研究課題名（和文） 頭頸部扁平上皮癌に対するサイトカイン免疫遺伝子治療の開発

研究課題名（英文） Cytokine Immuno-gene Therapy Against Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

中野 宏 (NAKANO HIROSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00405309

研究成果の概要（和文）：我々はIL-21、IL-27発現遺伝子をHydrodynamics法にてSCCVII担癌マウスに導入し、IL-21、IL-27がSCCVIIの腫瘍増殖を抑制することを示し（J. Gene Med 2006）、また、IL-21をin vivo electroporation法によって遺伝子導入することでマウスのSCCを抑制できた（未発表）。

さらに平成22年度には、治療後マウスのspleen cellを回収し、クロムで標識したSCCVIIと4時間co-cultureし、放出されるクロムをガンマ線シンチレーションカウンターで測定し、CTL活性を、また、クロムで標識したYAC-1細胞と4時間co-cultureして放出されるクロムを測定しNK細胞活性を評価することで、IL-27による腫瘍増殖抑制効果が主にNK細胞の細胞傷害活性によるものであることを示した。

また、IL-21およびIL-27の腫瘍増殖抑制効果はCDDPによるelectrochemotherapyと併用することで相加的に腫瘍増殖を抑制できることを示した。

また、IL-28もCDDPと相乗的に働きSCCを抑制することを報告した（J. immunother 2011）。

平成23年度はCD4・CD8・NKを除去したマウスに治療し、抗腫瘍効果を比較検討する実験を行ってきたが現在までのところ再現性のある結果が得られていない。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that IL-21 and IL-27 suppress SCCVII tumor growth(J. Gene Med 2006).

In 2010, we investigated the mechanisms of antitumor immunity elicited by IL-27 gene transfer. The results shows that IL-27 gene transfer augmented cytotoxic activity of NK cells.

Furthermore, we demonstrated antitumor effect induced be IL-21 or IL-27 gene transfer was enhanced by electrochemotherapy with CDDP.

In 2011, we have reported that IL-28 acts synergistically with CDDP to suppress the growth of SCCVII(J. immunother 2011).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部外科学

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌に対する治療は主に外科的切除・化学療法・放射線治療によってなされ、種々の工夫により治療成績は改善されつつあるが、いまなお満足できるものではなく、新しい治療法の開発が期待されており、その一つが免疫遺伝子治療である。

Interleukin-21(IL-21)は 2000 年にクローニングされたサイトカインであり、IL-2 や IL-15 と相乗的に働き、T cell、B cell、およびNK 細胞の増殖、分化、遊走を促進することが報告されていた。さらにはメラノーマ、大腸癌、悪性リンパ腫、膀胱癌に対する抗腫瘍効果についてのマウスモデルを用いた検討を行った報告があった。

我々は、C3H 由来頭頸部扁平上皮癌細胞株である SCCVII を C3H マウスに移植し、担癌マウスモデルを作成し、Hydrodynamics 法を用いて *in vivo* で IL-21 および IL-15 発現遺伝子を導入することにより IL-21 の抗腫瘍効果とそのメカニズムについて検討してきた。その結果、IL-21 は IL-15 と相乗的に作用して SCCVII の腫瘍増殖を抑制することが実証された。また、副作用は IL-12 や IL-2 と比較して軽微であることを示した。さらに IL-21 は IL-15 と相加的に作用してNK 細胞の細胞傷害活性を亢進させるとともに、cytotoxic T lymphocyte(CTL)の細胞傷害活性も増強することが示された。さらに興味深いことに IL-21 が SCCVII に特異的な抗体の産生を増強していることを初めて実証した。

一方、IL-27 は T-bet、IL-12R  $\beta$  2、GranzymeB を介して CTL の分化・維持を促進することが報告されていた。

### 2. 研究の目的

本研究においては以下の点について研究し、Th-1 サイトカイン遺伝子治療と electrochemotherapy の併用による抗腫瘍効果とその相乗効果のメカニズムについて解析することを目的とした。

- 1) IL-21、IL-23、IL-27 の腫瘍増殖抑制効果を比較検討し、さらに相乗効果の有無を検討する。
- 2) IL-21、IL-23、IL-27 遺伝子導入に CDDP による electrochemotherapy を併用して腫瘍増殖抑制効果を比較検討する。
- 3) 治療後のマウスの NK 細胞の殺細胞活性、CTL の殺細胞活性を比較検討する。
- 4) 治療後のマウスの血清中に含まれる IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  などのサイトカイン濃度を測定する。
- 5) 抗原性に対する抗癌剤の影響を検討する。
- 6) IL-21、IL-23、IL-27 による抗体産生増強効果に及ぼす抗癌剤の影響を検討する。

### 3. 研究の方法

- 1) electroporation 法を用いて IL-21、IL-23、IL-27 発現遺伝子を SCCVII 担癌マウスに導入し、腫瘍増殖抑制効果を比較検討する。
- 2) IL-21、IL-23、IL-27 遺伝子導入に CDDP による electrochemotherapy を併用して腫瘍増殖抑制効果を比較検討する。

3) 治療後のマウスのNK細胞の殺細胞活性、CTLの殺細胞活性をCr released assayを用いて測定し、比較検討する。

4) 治療後のマウスの血清中に含まれるIFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ などのサイトカイン濃度をELISAを用いて測定する。

5) 治療後のマウスリンパ節および脾臓に含まれる樹状細胞を回収し、SCCVII特異的抗原を解析することで抗原性に対する抗癌剤の影響を検討する。

6) 治療後のマウス血清中のSCCVII特異的抗体をELISAとFlowcytometryを用いて測定しIL-21、IL-23、IL-27による抗体産生増強効果に及ぼす抗癌剤の影響を検討する。

#### 4. 研究成果

我々はIL-21、IL-27発現遺伝子をHydrodynamics法にてSCCVII担癌マウスに導入し、IL-21、IL-27がSCCVIIの腫瘍増殖を抑制することを示し(J. Gene Med 2006)、また、IL-21をin vivo electroporation法によって遺伝子導入することでマウスのSCCを抑制できた(未発表)。

さらに平成22年度には、治療後マウスのspleen cellを回収し、クロムで標識したSCCVIIと4時間co-cultureし、放出されるクロムをガンマ線シンチレーションカウンターで測定し、CTL活性を、また、クロムで標識したYAC-1細胞と4時間co-cultureして放出されるクロムを測定しNK細胞活性を評価することで、IL-27による腫瘍増殖抑制効果が主にNK細胞の細胞傷害活性によるものであることを示した。

また、IL-21およびIL-27の腫瘍増殖抑制効果はCDDPによるelectrochemotherapyと併用することで相加的に腫瘍増殖を抑制できることを示した。

また、IL-28もCDDPと相乗的に働きSCCを抑制することを報告した(J. immunother 2011)

。平成23年度はCD4・CD8・NKを除去したマウスに治療し、抗腫瘍効果を比較検討する実験を行ってきたが現在までのところ再現性のある結果が得られていない。

#### 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1件)

1) Yoshimoto K, Kishida T, Nakano H, Matsui M, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Takeuchi M, Hisa Y, Mazda O. Interleukin-28B acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck squamous cell carcinoma. J immunother34 : 139-148, 2011.

[学会発表] (計3件)

1) 松井雅裕、岸田綱郎、中野 宏、吉本公一郎、島田剛敏、中井 茂、松田 修、久 育男. IL-27はNK細胞を活性化し抗体依存性細胞障害作用によりNK細胞抵抗性マウス扁平上皮癌を抑制する. 第33回日本頭頸部癌学会. 2009年6月11日;札幌.

2) 吉本公一郎、松井雅裕、中野 宏、島田剛敏、中井 茂、久 育男. Interleukin-28Bのマウス扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の検討. 第34回日本頭頸部癌学会. 2010年6月10日;東京.

3) 吉本公一郎、松井雅裕、中野 宏、島田剛敏、中井 茂、岸田綱郎、松田 修、久 育男. interleukin-28Bのマウス扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の検討. 第112回日本耳鼻咽喉科学会. 2011年5月20日;京都.

[図書] (計0件)

[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

中野 宏 (NAKANO HIROSHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00405309

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：