

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 25年 6月 19日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591415

研究課題名（和文）腫瘍局所における IL-17 産生制御による新しい分子標的治療の開発。

研究課題名（英文）Development of novel therapy targeting IL-17 in tumor microenvironment.

研究代表者

岩橋 誠（IWAHASHI MAKOTO）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70244738

研究成果の概要（和文）：マウス皮下腫瘍モデル（MC38, B16 腫瘍細胞株）で、IL-17A siRNA 遺伝子発現 Adenovirus vector (Ad-si-IL-17)を腫瘍内投与し、腫瘍局所の IL-17A を抑制することでコントロール群と比較し有意に腫瘍増殖を抑制することがわかった。腫瘍局所の IL-17A を抑制することで、新生血管の抑制、腫瘍微小環境での抗腫瘍免疫の活性化することがわかった。つまり腫瘍微小環境の IL-17A は腫瘍増殖促進に関与することが明らかとなり、腫瘍局所の IL-17A は腫瘍増殖抑制の新たな分子標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：MC38 or B16 cells were inoculated subcutaneously into mice, and intratumoral injection of an adenovirus vector expressing siRNA against the mouse IL-17A gene (Ad-si-IL-17) significantly inhibited tumor growth in both tumor models compared with control mice. Blockade of IL-17A at tumor sites helped suppress tumor growth by inhibiting angiogenesis as well as activating antitumor immunity at tumor sites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

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：外科総論

1. 研究開始当初の背景

従来から慢性炎症と腫瘍増殖との関連に関

して報告されてきたが、その詳細な機序についてはいまだ解明されていない。近年自己免疫疾

患や、種々の炎症性疾患を惹起する炎症性サイトカイン IL-17 と腫瘍増殖との関連が報告された。しかしながら、IL-17 が腫瘍増殖を促進させるという報告や逆に腫瘍増殖を抑制するという報告もある。さらに IL-17KO マウスを使用した皮下腫瘍モデルにおいても、IL-17 の腫瘍増殖への作用については一定の見解が得られていない。

2. 研究の目的

腫瘍局所における IL-17 産生制御することで、腫瘍増殖を抑制できるか否かを検討し、そのメカニズムについて解明することで、腫瘍微小環境での IL-17A の腫瘍増殖に対する役割を明らかにし、腫瘍増殖抑制の新たな分子標的となりうるかを検討する。

3. 研究の方法

(1). 腫瘍局所における IL-17A 発現抑制による腫瘍増殖に及ぼす影響の検討

①. IL-17A siRNA 遺伝子発現 Adenovirus vector (Ad-si-IL-17)の作製

mIL-17A siRNA 発現 plasmid を作製し (TAKARA)、Adenovirus cosmid vector pAxcawt II (TAKARA)に mIL-17A siRNA fragment を ligation し、COS-TPC 法にて Ad-si-IL-17 を作製した。同様に scramble negative control siRNA 発現 Adenovirus vector (Ad-SNC)を作製した。

②. マウス皮下腫瘍モデルの作製

マウスメラノーマ細胞株 B16 を 1×10^6 個を皮下接種し、Day7, 10, 13 に PBS, Ad-SNC, Ad-si-IL-17 を 1×10^9 pfu 腫瘍内接種した。マウス大腸癌細胞株 MC38 は 5×10^5 個を皮下接種し、Day5, 8, 11 に PBS, Ad-SNC, Ad-si-IL-17 に 1×10^9 pfu 腫瘍内接種した。

③. マウス皮下腫瘍モデルにおける Ad-si-IL-17 腫瘍内投与による腫瘍内 IL-17A 抑制効果の検討

B16, MC38 皮下腫瘍モデルで、それぞれ経時的に腫瘍を採取し、cold PBS 中で細切

後、ソニケーターでホモジナイズし、遠心後、上清を tumor lysate とした。Total タンパク濃度を BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology)で測定し、IL-17A タンパク濃度を ELISA kit (R&D)にて測定した。統計解析は Student's *t* test 検定にて解析した。

④. マウス皮下腫瘍モデルにおける Ad-si-IL-17 腫瘍内投与の腫瘍増殖に及ぼす影響の検討

B16, MC38 皮下腫瘍モデルで、それぞれ経時的に皮下腫瘍の大きさを計測し、PBS, Ad-SNC, Ad-si-IL-17 腫瘍内投与群で比較した。統計解析は one-way ANOVA 検定にて解析した。

(2). 腫瘍局所の IL-17A 抑制による血管新生に及ぼす影響の検討

①. 免疫組織化学染色法による、腫瘍組織 CD31, MMP9 の発現解析

MC38 皮下腫瘍モデルの Day14 に腫瘍を採取し、新鮮凍結切片を作製し、アセトン固定の後、一次抗体 rat anti-mouse CD31 antibody (BD; dilution $\times 100$)を使用し、酵素標識ポリマー法 (DAKO; ENVISION kit)にて免疫組織化学染色を行った。また同様に、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、rabbit anti-mouse MMP9 (R&D; dilution $\times 100$)を使用し、酵素標識ポリマー法で免疫組織化学染色を行った。壊死のない視野において、 $\times 200$ の倍率 5 視野の陽性細胞数を画像解析ソフト(WinRoof)を用いて定量し、その平均値にて評価した。統計解析は Student's *t* test 検定にて解析した。

②. 腫瘍組織 VEGF の発現解析

MC38 皮下腫瘍モデルの Day14 に腫瘍を採取し、cold PBS 中で細切後、ソニケーターでホモジナイズし、遠心後、上清を tumor lysate とした。Total タンパク濃度を BCA

protein assay kit (Pierce Biotechnology)で測定し、VEGF タンパク濃度を ELISA kit (R&D)にて測定した。統計解析は Student's *t* test 検定にて解析した。

(3). 腫瘍局所の IL-17A 抑制による腫瘍免疫に及ぼす影響の検討

①. 腫瘍浸潤リンパ球(TIL), 脾細胞の分離

MC38 皮下腫瘍モデルの Day14 に腫瘍を採取し, collagenase 1mg/ml, hyaluronidase 0.2mg/ml, DNaseI 0.5mg /ml で酵素分解処理した後, Mesh にて単細胞浮遊液として, Ficoll 遠心法(80%/100%)にて TIL を分離した。また, 脾臓は Mesh にて単細胞浮遊液として, Ficoll 遠心法(100%)にて脾細胞を分離した。

②. 腫瘍浸潤リンパ球と脾臓における細胞傷害活性の検討

分離した TIL から autoMACS にて CD5 陽性細胞を分離し, 非動化した MC38 細胞と 100:1 の比率で, IL-2(50IU/ml)の存在下で, 共培養した。72 時間後に autoMACS にて CD8 陽性細胞を分離し, ⁵¹Cr 遊離試験を行った。Target 細胞を Na₂⁵¹CrO₄ で 37°C, 1 時間ラベルし, 種々の effector/target 比で 37°C, 4 時間培養し, 上清を γ -counter で解析した。統計解析は Mann-Whitney U 検定にて解析した。

③. Flow cytometry による Th1/Th2 バランスの解析

分離した TIL, 脾細胞を brefeldinA 存在下で PMA(10ng/ml), Ionomycin(500ng/ml)で 5 時間刺激した後, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD4 mAb で細胞表面染色し, Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD) で固定, 透過処理し, FITC-conjugated anti-IFN γ , PE-conjugated anti-IL-4 mAb, PE-conjugated anti-IL-17 mAb (BD)で細胞

内染色し, FACS Calibur (BD)にて解析した。統計解析は Student's *t* test 検定にて解析した。

④. Flow cytometry による regulatory T cells (Treg)の解析

分離した TIL, 脾細胞を FITC・PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD4 mAb (BD)で細胞表面染色した後, Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience)で固定, 透過処理し, PE-conjugated anti-FOXP3 mAb (eBioscience)で細胞内染色し, FACS Calibur (BD)にて解析した。統計解析は Student's *t* test 検定にて解析した。

⑤. Flow cytometry による myeloid-derived suppressor cells (MDSC)の解析

分離した TIL, 脾細胞を PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD45, FITC-conjugated anti-CD11b, PE-conjugated anti-Gr-1 mAb (BD)で細胞表面染色した後, FACS Calibur (BD)にて解析した。統計解析は Student's *t* test 検定にて解析した。

⑥. ELISA, CBA による腫瘍内 CCL2, IL-6 の発現解析

MC38 皮下腫瘍モデルの Day14 に腫瘍を採取し, cold PBS 中で細切後, ソニケーターでホモジナイズし, 遠心後, 上清を tumor lysate とした。Total タンパク濃度を BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology)で測定し, CCL2 タンパク濃度を ELISA kit (R&D), IL-6 タンパク濃度を CBA kit (BD)にて測定した。統計解析は Student's *t* test 検定にて解析した。

4. 研究成果

(1). 腫瘍局所における IL-17A 発現抑制による腫瘍増殖に及ぼす影響の検討

①. マウス皮下腫瘍モデルにおける Ad-si-IL-17 腫瘍内投与による腫瘍内 IL-17A

抑制効果

B16, MC38 皮下腫瘍モデルともに Ad-si-IL-17 腫瘍内投与で腫瘍内 IL-17A 発現を抑制した。

②. マウス皮下腫瘍モデルにおける Ad-si-IL-17 腫瘍内投与の腫瘍増殖に及ぼす影響

B16, MC38 皮下腫瘍ともに Ad-si-IL-17 腫瘍内接種することで腫瘍の増殖を抑制した。

(2). 腫瘍局所の IL-17A 抑制が血管新生に及ぼす影響の検討

①. 腫瘍局所 IL-17A 抑制による腫瘍組織 CD31, MMP9, VEGF 発現に及ぼす影響

腫瘍局所の IL-17 を抑制することで, 腫瘍組織の CD31, MMP9, VEGF の発現を有意に抑制した。

(3). 腫瘍局所の IL-17A 抑制が腫瘍免疫に及ぼす影響

①. 腫瘍局所の IL-17A 抑制による腫瘍浸潤リンパ球(TIL)と脾臓における細胞傷害活性の評価

脾臓 CD8 陽性細胞の細胞傷害活性は腫瘍局所の IL-17A を抑制により, 変化を認めなかった。しかし, 腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞の細胞傷害活性は腫瘍局所の IL-17A を抑制することにより, 有意に増強した。

②. 腫瘍局所の IL-17A 抑制が Th1/Th2 バランスに及ぼす影響

腫瘍局所の IL-17A 抑制することで, TIL における CD4⁺IFN- γ ⁺ 細胞は有意に増加したが, 脾細胞では変化を認めなかった。一方, CD4⁺IL-4⁺ 細胞は TIL, 脾細胞において両方ともに変化を認めなかった。

③. 腫瘍局所の IL-17A 抑制が免疫制御性 T 細胞(Treg), 骨髄由来免疫抑制性細胞(MDSC)に及ぼす影響

腫瘍局所の IL-17A 抑制により, TIL における CD4⁺Foxp3⁺ 細胞は有意に減少したが, 脾細胞では変化を認めなかった。また, Gr-1⁺CD11b⁺ 細胞も同様に TIL においては腫瘍局所の IL-17A 抑制により, 減少していたが, 脾細胞では変化を認めなかった。腫瘍内の CCL2タンパク発現, IL-6タンパク発現は腫瘍局所 IL-17 抑制することで有意に抑制された。

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1件)

Hayata K, Iwahashi M, Ojima T, Katsuda M, Iida T, Nakamori M, Ueda K, Nakamura M, Miyazawa M, Tsuji T, Yamaue H. Inhibition of IL-17A in tumor microenvironment augments cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes in tumor-bearing mice. PLoS One. 査読有, 2013;8(1):e53131
DOI: 10.1371/journal.pone.0053131.

[学会発表] (計5件)

- ① 早田啓治, 腫瘍微小環境で産生される IL-17A の制御による抗腫瘍経過の検討. 第 25 回バイオセラピー学会, 2012 年 12 月 13 日~14 日
- ② 早田啓治, Development of tumor immunotherapy targeting IL-17 in tumor microenvironment. 第 71 回日本癌学会, 2012 年 9 月 19 日~21 日, 札幌
- ③ 早田啓治, 微小環境で産生される炎症性サイトカイン IL-17 を標的とした新規腫瘍免疫療法. 第 112 回日本外科学会, 2012 年 4 月 12 日~14 日, 千葉
- ④ 早田啓治, Inhibition of IL-17 in tumor tissue suppressed tumor growth via anti-angiogenesis and CTL activation. 102th American Association for Cancer Research, 2013 年 4 月 3 日, Orlando, USA
- ⑤ 早田啓治, Knockdown of IL-17 in tumor microenvironment suppressed tumor growth. 第 69 回日本癌学会, 2010 年 9 月 23 日, 大阪

[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

岩橋 誠(IWAHASHI MAKOTO)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号:70244738

(2)研究分担者

山上 裕機(YAMAUE HIROKI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号:20191190

尾島 敏康(OJIMA TOSHIYASU)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号:20191190

中村 公紀(NAKAMURA MASAKI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号:20191190

(3)連携研究者

()

研究者番号:

