

## 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 5 月 20 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591466

研究課題名（和文）ジフテリアトキシン融合蛋白と PSK の消化器癌に対するペプチドワクチン療法への応用

研究課題名（英文） Impact of PSK and DT on peptide vaccine against gastrointestinal cancer

研究代表者

田中 浩明（TANAKA HIROAKI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90382168

研究成果の概要（和文）：胃癌細胞株によって DC の MHCclass II の発現は低下し、PD-L2、CD11b 発現が増強した。CD11bDC の胃癌組織内浸潤は、胃癌の臨床的進行度と関連していた。すなわち、癌細胞により DC は免疫抑制性に機能すると考えられた。免疫抑制性 DC は、in vitro において PSK および R-848 の添加により MHC-II の発現が回復した。しかしながら、ジフテリアトキシンを添加した場合、1ng/ml の濃度で DC および CTLclone の viability が低下した。PSK や TLR Ligand は、DC 機能の回復に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We investigated production of cytokines by gastric cancer cell lines and examined the effect of supernatant of cancer cell lines on phenotypes of monocyte-derived DCs. Also we examined infiltration of CD11c and CD11b positive cells in clinical specimens of gastric cancer. Addition with supernatant of gastric cancer cell culture decreased expression of MHC class II increased negative signals CD11b, PD-L1, and PD-L2 on DC surfaces. After culturing DC in the medium with supernatant of gastric cancer and protein-bound polysaccharide K (PSK) or R-848, The expression of HLA-DR as positive costimulatory molecule of DC was decreased, and that of programmed death-ligand 2 (PD-L2), as negative costimulatory molecule was increased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道外科学

## 1. 研究開始当初の背景

消化器癌においては、一般的に外科治療、放射線治療、化学療法を中心とした集学的治療が行われているが、食道癌、スキルス胃癌などの治療成績は未だに不良である。そこで、癌免疫療法は外科治療、化学療法、放射線治

療など従来の治療法を補完する治療として期待されている。癌免疫療法として最近、T 腫瘍抗原ペプチドを用いた多くのペプチドワクチン療法の臨床試験が本邦においても行われるようになり、その成果が報告されてきている。しかしながら、現状では癌免疫療

法における国内外の臨床試験において、期待されたほどの抗腫瘍効果が得られていない。この現状を打破するためには、強い抗腫瘍免疫を誘導するばかりでなく、免疫逃避機構の克服が極めて重要と考えられる。

腫瘍免疫逃避機構は、宿主側の要因として、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化を阻害する制御性 T 細胞 (Treg) による抗腫瘍免疫の抑制が注目されている。CTL が増殖するためには、樹状細胞 (DC) など抗原提示細胞 (APCs) による抗原提示とともに co-stimulatory signal の伝達が必要である。しかしながら、DC は一方で、negative co-stimulator を発現し、Treg を増殖させるあるいは、CTL の機能を抑制する機能も有している。

## 2. 研究の目的

食道癌やスキルス胃癌などの消化器癌に対する癌免疫療法、特に HLA 拘束性のペプチドワクチン療法は本邦でも臨床試験が進みつつあり、新しい癌治療として注目されているが、まだ現状では課題は多い。その一つの要因が上記の癌宿主の抗腫瘍免疫逃避機構であり、その中心は制御性 T 細胞 (Treg) である。本研究では、腫瘍に浸潤する DC の性格の検討と Treg との関連について検討する。続いて、

Treg を誘導する DC (tolerogenic DC) を toll like receptor ligand と PSK やジフテリアトキシンにより抑制することを検討する研究である。これにより、現在行われている癌ペプチドワクチン療法の効果を高めることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)腫瘍浸潤 regulatory T cell 及び DC の検討  
 教室で切除したスキルス胃癌組織内の原発巣および所属リンパ節のパラフィン包埋切片を使用した免疫組織染色を行い、腫瘍内における MHC-II、FOXP3 および CD11b の発現について検討した。

(2) In vitro における癌細胞による樹状細胞への影響とその制御

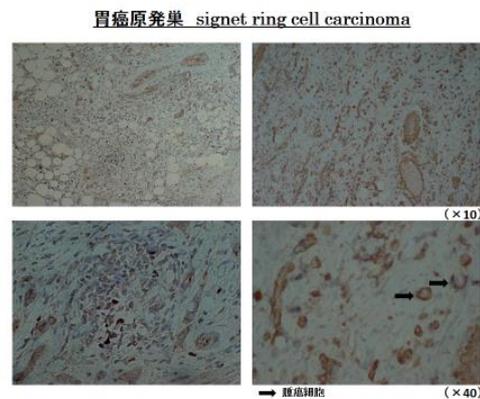
mDC に対して胃スキルス胃癌細胞株 OCUM-8(HLA-A\*2402)、食道癌細胞株 TE6 の培養上清を 20% 添加した RPMI1640 で 6 日間培養し作成した tolerogenic DC の phenotype を FACS で検討した。また、添加した癌細胞によるサイトカイン産生能について検討した。また、PSK 及び R-848、の添加による変化について検討した。スキルス胃癌由来の癌抗原 Eras より HLA-A\*2402 拘束性エピトープペプチドの同定を行い、PSK、や Diphtheria Toxin の添加による影響につ

いて検討した。

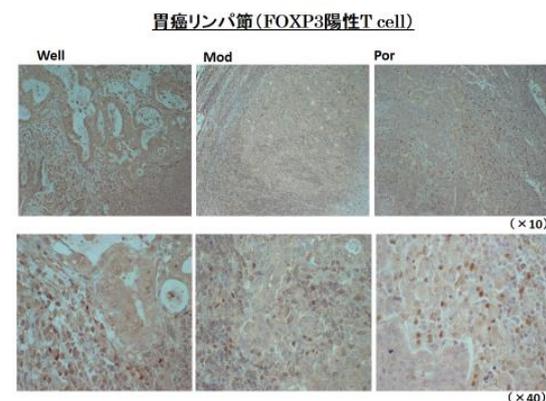
## 4. 研究成果

(1)腫瘍浸潤 regulatory T cell 及び DC の検討  
 スキルス胃癌原発巣、および転移リンパ節内に CD11b および CD11c 陽性 DC の浸潤を認めた。胃癌原発巣、および転移リンパ節において、腫瘍浸潤 Treg を認め、胃癌リンパ節転移と相関を認めた。また、腫瘍細胞上に FOXP3 発現が認められ、印環細胞癌に高い発現率を認めた。他の組織型においては明らかでなかった。signet ring cell carcinoma は約 76% において腫瘍細胞で FOXP3 の発現が認められた。(図 1,2) 印環細胞癌の中で Foxp3 陽性症例は世顔が不良であった。また、Foxp3 陽性胃癌細胞からは、免疫抑制性サイトカインの産生が認められ、癌細胞による免疫抑制機構が示唆された。

(図 1)



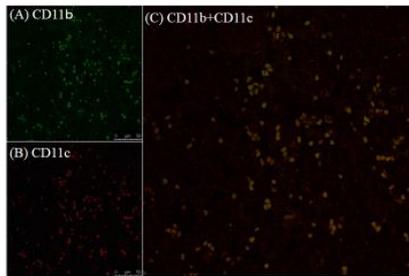
(図 2)



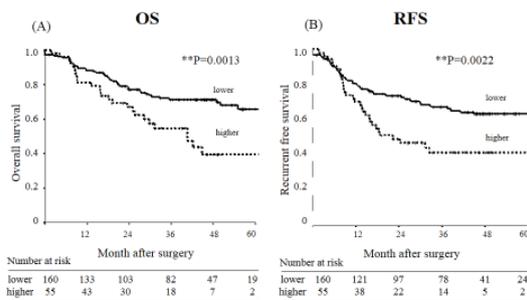
腫瘍浸潤 CD11b 陽性細胞は、二重染色により CD11c 陽性がほぼ 90% であり、DC あるいは macrophage と考えられた(図 3)。CD11b 免疫組織染色の結果、CD11b<sup>+</sup>DC は腫瘍周囲にあるいは腫瘍内部に多く存在し、CD11b 陽性細胞数は未分化型、静脈侵襲陽性例、腫

瘍径 6cm 以上のものに多く認められた。また CD11b 細胞浸潤が多い症例の予後は不良であった(図 4)

(図 3)



(図 4)

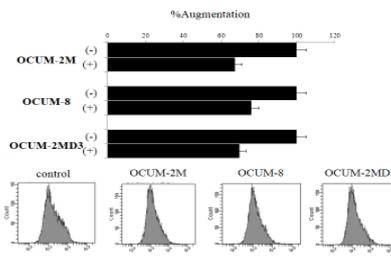


(2) In vitro における癌細胞による樹状細胞への影響とその制御

DC の IL-10 産生能はスキルス胃癌細胞 OCUM-8 の培養上清添加により増強した。癌細胞からは、TGF-β などの免疫抑制性サイトカインが産生されており、胃癌細胞株上清添加によって DC の MHC class II の発現は低下し、programmed death-ligand 2 (PDL-2)、CD11b の発現が増強した。DC の FITC-Dextran 取り込みは低下しなかった。DC の抗原提示に関連する転写因子である Aire 発現量はスキルス胃癌細胞上清添加により減少したすなわち、癌細胞により DC は、immature であり、免疫抑制性に機能することが示唆された。

PSK および R-848 の添加により DC の MHC-II の発現が回復した。しかしながら、ジフテリアトキシンを添加した場合、1ng/ml の濃度で DC および CTLclone の viability が低下した

(図 5)



(図 6)

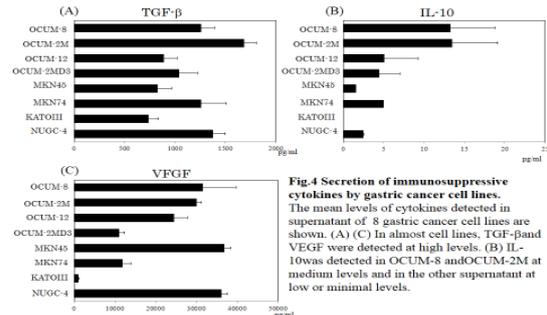
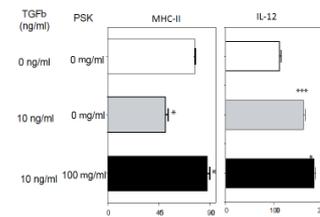


Fig.4 Secretion of immunosuppressive cytokines by gastric cancer cell lines. The mean levels of cytokines detected in supernatant of 8 gastric cancer cell lines are shown. (A) (C) In almost cell lines, TGF-β and VEGF were detected at high levels. (B) IL-10 was detected in OCUM-8 and OCUM-2M at medium levels and in the other supernatant at low or minimal levels.

(図 7)



## 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 8 件)

1. Tanaka H, Ohira M, Kubo N, Muguruma K, Yamashita Y, Sawada T, Hirakawa K. Association of location of lymph node metastases with postoperative recurrence of esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Research 査読有 32:3421-3426, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843925> 査読有
2. Tanaka H, Muguruma K, Ohira M, Kubo N, Yamashita Y, Maeda K, Sawada T, Hirakawa K. Impact of adjuvant immunochemotherapy using protein-bound polysaccharide-K on overall survival of patients with

- gastric cancer. *Anticancer Research* 32:3427-3433, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843926> 査読有
3. Yoshii M, Tanaka H, Ohira M, Muguruma K, Iwauchi T, Lee T, Sakurai K, Kubo N, Yashiro M, Sawada T, Hirakawa K. Expression of forkhead box P3 in tumour cells causes immunoregulatory function of signet ring cell carcinoma of the stomach. *British Journal of Cancer* 106:1668-1674, 2012. doi:10.1038/bjc.2012.141. 査読有
  4. Ito G, Tanaka H, Ohira M, Yoshii M, Muguruma K, Kubo N, Yashiro M, Yamada N, Maeda K, Sawada T, Hirakawa K. Correlation between efficacy of PSK postoperative adjuvant immunochemotherapy for gastric cancer and expression. *Experimental and Therapeutic Medicine* 査読有 3: 925-930, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22969994> 査読有
  5. Hoshi H, Sawada T, Uchida M, Saito H, Iijima H, Toda-Agetsuma M, Wada T, Yamazoe S, Tanaka H, Kimura K, Kakehashi A, Wei M, Hirakawa K, Wanibuchi H. Tumor-associated MUC5AC stimulates in vivo tumorigenicity of human pancreatic cancer. *International Journal of Oncology* 38: 619-627, 2011. doi:10.3892/ijo.2011.911. 査読有
  6. Hoshi H, Saito H, Iijima H, Uchida M, Wada T, Ito G, Tanaka H, Sawada T, Hirakawa K. Anti-protein-bound polysaccharide-K monoclonal antibody binds the active structure and neutralizes direct. *Oncology Reports* 25:905-913, 2011. doi:10.3892/or.2011.1155. 査読有
  7. Yamazoe S, Tanaka H, Iwauchi T, Yoshii M, Ito G, Amano R, Yamada N, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. Identification of HLA-A\*0201- and A\*2402-restricted epitopes of mucin 5AC expressed in advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 40:896-904, 2011. doi:10.1097/MPA.0b013e31821ad8d1. 査読有
  8. Iwauchi T, Tanaka H, Yamazoe S, Yashiro M, Yoshii M, Kubo N, Muguruma K, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. Identification of HLA-A\*2402-restricted epitope peptide derived from ERas oncogene expressed in human scirrhous gastric cancer. *Cancer Science* 査読有 102: 683-689, 2011. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01843.

[学会発表] (計 7 件)

1. 田中浩明、胃癌転移リンパ節における免疫細胞プロファイルの検討 第 67 回日本消化器外科学会総会 2012.7.19 富山市
2. 田中浩明、胃癌による CD11b 陽性樹状細胞誘導の意義 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012.4.12 千葉
3. Tanaka H, Relationship between loss of heterozygosity of HLA-A gene and HLA class I expression in gastric cancer. American Association for Cancer Research 103rd Annual Meeting. 2012.4.1 Chicago USA
4. 田中浩明、胃癌細胞による樹状細胞 phenotype の変化 第 84 回日本胃癌学会総会 2012.2.9 大阪
5. 田中浩明、胃癌に発現する ERas をターゲットとした HLA-A\*2402 拘束性エペトープペプチドの同定 第 36 回日本外科系連合学会学術集会 2011.6.16 東京
6. 田中浩明、スキルス胃癌細胞による樹状細胞の直接的機能抑制 第 111 回日本外科学会定期学術集会 2011.5.26 東京
7. 田中浩明、制御性 T 細胞浸潤と胃癌組織型との関係 第 111 回日本外科学会定期学術集会 2011.5.26 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 浩明 (TANAKA HIROAKI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：90382168

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし