

## 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 13 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22791740
研究課題名（和文）	皮内での腫瘍細胞の増殖と拒絶を制御する免疫細胞と因子による新しい 癌根治療法の開発に関する研究
研究課題名（英文）	Development of the new cancer radical cure treatment by the immune cells and the factor which control multiplicative growth and rejection of tumor cells in the skin.
研究代表者	
	井畑 峰紀 (IBATA MINENORI)
	大阪医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：	20548359

研究成果の概要（和文）： マウス皮内に同種同系の腫瘍細胞を移植すると自然拒絶される腫瘍細胞が 4/7 の頻度であり、その拒絶には IFN- $\gamma$  が必要であった。マウスの皮内へ移植した腫瘍細胞の自然拒絶では、TAM の浸潤はほとんどなく、エフェクター細胞はマクロファージと好中球で、CTL や NK 細胞は移植腫瘍細胞の傷害に関与しなかった。皮内免疫したマウスに、同じ腫瘍細胞を本来増殖する部位に移植しても拒絶され、主たるエフェクター細胞は CTL であった。皮内免疫の効果は、皮内に移植した腫瘍細胞に特異的だった。

研究成果の概要（英文）：

When the tumor cells were intradermally transplanted syngeneic of mice, the tumor cells were spontaneously rejected four sevenths of frequency, and the rejection required IFN- $\gamma$ . In spontaneous rejection of intradermally transplanted tumor cells did' induce infiltration of TAMs, the effector cells were macrophages and neutrophils and neither CTLs nor NK cells. The tumor cells were rejected from syngeneic mice sensitized intradermally once with them, the main effector cells were CTLs. The effect of intradermal immunization was specific to the tumor cells transplanted in the skin.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード： (1) 癌 (2) 免疫学 (3) マクロファージ (4) Meth A 線維肉腫細胞 (5)  $\text{INF-}\gamma$  (6) 細胞障害性 T リンパ球

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対して様々な治療法が試みられているが、根治が難しく死因の1位になって久しい。1980年から1990年代初頭にかけて、IL-2、-4、-6、-7、-12やTNF- $\alpha$ 、 $\text{INF-}\gamma$ やGM-CSFなどのサイトカイン遺伝子を組み込んだ腫瘍細胞が、主として顆粒球の浸潤と共に拒絶されることが、多くの研究室から報告された。が、別の部位に移植した、遺伝子操作をしてしない腫瘍細胞の増殖にはあまり阻害効果が見られなかったため、新しい治療法には繋がっていない。

### 2. 研究の目的

腫瘍細胞の増殖に微小環境が密接に関係し、サイトカイン遺伝子を組み込んだ腫瘍細胞が宿主免疫担当細胞の浸潤と共に拒絶されたことから、移植後、腫瘍細胞が拒絶される部位と機構を調べた。

### 3. 研究の方法

(1) B16メラノーマ、3LL肺癌細胞、KLN205扁平上皮癌細胞、Meth A 線維肉腫細胞、I-10精巣癌細胞、CL-S1前乳癌細胞やFM3A乳癌細胞(それぞれ $3 \times 10^6$ 細胞/マウス)を同種同系マウスに皮内注射(i.d.)し、その後、経時的に腫瘍径を計測した。

(2) 皮内に移植した7種類の腫瘍細胞の内、4種類の腫瘍細胞が自然拒絶され、特に、Meth A細胞は、細胞傷害性T細胞(CTL)に抵抗性で $\text{INF-}\gamma$ 依存的に傷害されるので、Meth A細胞をBALB/c  $\text{INF-}\gamma$ ノックアウトマウスの皮内に移植し、移植後4日から3日毎に3回、 $\text{INF-}\gamma$  ( $10^5$  U/50  $\mu$ l生理食塩水/マウス)あるいは生理食塩水(50  $\mu$ l/マウス)を腫瘍

の周囲に投与して腫瘍径を経時的に測定した。

(3) Meth A 線維肉腫細胞を皮内に移植し、経時的にH.E.染色や免疫組織染色を行い、腫瘍内とその周囲へ浸潤する細胞種を調べた。

(4) 皮内移植したMeth A細胞の自然拒絶時に浸潤する細胞種を調べるために、移植部位の皮膚をプロテアーゼ、コラーゲナーゼ、DNase処理し、遊離細胞を回収した。遊離細胞を種々の細胞の表面抗原に対する蛍光標識抗体で染色し、セルソーターを用いてその比率を経時的に解析した。さらに、蛍光標識抗体で染色された浸潤細胞を、セルソーターを用いて腫瘍から分離、精製し、それぞれの細胞(顆粒球、マクロファージ、樹状細胞、リンパ球など)のMeth A腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を、放射性同位元素( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ )を取り込んだMeth A腫瘍細胞からの $^{51}\text{Cr}$  release assayによって細胞傷害活性を測定した。

(5) Meth A腫瘍細胞を皮内免疫したマウスの腹腔内へ移植したMeth A腫瘍細胞の拒絶時、腹腔内に浸潤する細胞を種々の細胞の表面抗原に対する蛍光標識抗体で染色し、セルソーターを用いてその比率を経時的に解析した。さらに、種々の浸潤細胞をセルソーターで単離し、Meth A細胞に対する細胞傷害活性を $^{51}\text{Cr}$  release assayによって測定した。

(6) 皮内に移植した腫瘍細胞の拒絶機構とその抗原特異性を調べるために、I-10細胞で皮内免疫したマウスに、Meth A細胞を本来増殖する腹腔内に移植し、Meth A細胞数を経時的に調べた。また、Meth A細胞で皮内免疫し

たマウスに、I-10 細胞を本来増殖する筋肉内に移植し、腫瘍径を経時的に調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞を同種同系マウスに皮内移植すると、B16 メラノーマ、3LL 肺癌細胞、KLN205 扁平上皮癌細胞は増殖し続けたが、Meth A 線維肉腫細胞、I-10 精巣癌細胞、CL-S1 前乳癌細胞や FM3A 乳癌細胞は自然拒絶された。

(2) IFN- $\gamma$  ノックアウトマウスへ Meth A 細胞を皮内移植すると、腫瘍は増殖し続けたが、IFN- $\gamma$  を腫瘍周囲に投与すると腫瘍細胞は自然拒絶された。

(3) 腫瘍細胞の周囲には、大量のマクロファージおよび顆粒球と少量のリンパ球の浸潤がみられたが、腫瘍内へのマクロファージ (tumor-associated macrophage:TAM) の浸潤はほとんど見られなかった。

(4) F4/80 陽性細胞、CD11a 陽性細胞、CD11b 陽性細胞と Gr-1 陽性細胞 (マクロファージと好中球) が主に浸潤し、Meth A 細胞を傷害した。しかし、CD8 陽性細胞 (CTL) や NK-1.1 陽性細胞 (NK 細胞) には傷害活性がなかった。

(5) Meth A 細胞を未処理 BALB/c マウスの腹腔内に移植すると、腫瘍細胞は局所で増殖し続け約 2 週間後にマウスは死亡した。が、皮内接種後 1 ヶ月 (拒絶後約 10 日) のマウスに Meth A 細胞を腹腔内に移植すると、Meth A 細胞は腹腔内でほとんど増殖せず拒絶された。拒絶部位へ浸潤する宿主細胞の細胞傷害活性は、移植後 5 日で最も高く、主たるエフェクター細胞は CTL であった。

(6) Meth A 細胞を皮内免疫したマウスでは、腹腔内に移植した Meth A 細胞の増殖は阻害されたが、筋肉内に移植した I-10 腫瘍細胞は、正常マウス同様、増大した。また、I-10

細胞を皮内免疫したマウスでは、筋肉内に移植した I-10 細胞の増殖は阻害されたが、腹腔内に移植した Meth A 細胞は、正常マウス同様、増殖した。

#### 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)

① Minenori Ibata, Takeshi Takahashi, Tetsunosuke Shimizu, Yoshihiro Inoue, Shogo Maeda, Junko Tashiro-Yamaji, Masashi Okada, Koichi Ueda, Takahiro Kubota, Ryotaro Yoshida  
Spontaneous rejection of intradermally transplanted non-engineered tumor cells by neutrophils and macrophages from syngeneic strains of mice.

(非処理の腫瘍細胞を同種同系マウスへ皮内移植することでおこる

好中球とマクロファージの関与する同種同系腫瘍細胞の自然拒絶反応)

Microbiology and Immunology、査読有、  
2011 October、55(10):726-735,  
DOI: 10.1111/j.1348-0421.2011.00369.x.

[学会発表] (計 3 件)

①腫瘍細胞と宿主細胞との相互作用  
—皮内への移植後、増殖し続ける腫瘍細胞と拒絶される腫瘍細胞—

前田 尚吾、吉田 龍太郎、井畑 峰紀、高橋 猛、山名秀典、山路 純子、窪田 隆裕、上田 晃一

: 第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会  
2011 年 10 月 6 日～7 日 ハイアットリージェンシー東京

② 線維肉腫細胞のマウス皮内接種によるワクチン効果の抗原特異性について

(Tumor specificity of vaccine effect by fibrosarcoma cells injected i.d. into mice)

井畑 峰紀、吉田 龍太郎、高橋 猛、山路 純子、窪田 隆裕、上田 晃一

: 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会  
2010 年 9 月 16 日～17 日 パシフィコ横浜

③ A cancer vaccine: Rejection of intraperitoneally (i.p.) transplanted syngeneic Meth A tumor cells by cytotoxic T lymphocytes from mice that had rejected intradermally (i.d.) injected Meth A tumor cells by a type of macrophages.

Minenori Ibata, Takeshi Takahashi, Junko Tashiro-Yamaji, Tetsunosuke Shimizu, Yoshihiro Inoue, Masashi Okada, Koichi Ueda, Takahiro Kubota, and Ryotaro Yoshida  
: 14th international congress of immunology

2010年8月22日～27日 神戸

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井畑 峰紀 (IBATA MINENORI)  
大阪医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：20548359

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

吉田 龍太郎 (YOSHIDA RYOTARO)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10124760

山路 純子 (JUNKO TASHIRO-YAMAJI)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40340559

岡田 雅 (OKADA MASASHI)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10383283

窪田 隆裕 (KUBOTA TAKAHIRO)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10084906

上田 晃一 (UEDA KOICHI)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90257858