

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5月25日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791953

研究課題名（和文） 生体内における CpG のがん細胞に対するアジュバント効果の検討

研究課題名（英文） Examination of an adjuvant effect to the cancer cell of CpG *in vivo*

研究代表者 桑島 精一（KUWAJIMA SEIICHI）

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：40569448

研究成果の概要（和文）：

【平成22年度】（1）悪性黒色腫株のB16melanoma（以下、B16）を購入し、培養にて増殖させ保存した。（2）抗腫瘍薬である5-FUをマウスに投与し、7日目前後でnadirといわれる骨髄抑制が起こることを確認した。（3）免疫賦活剤でアジュバント効果のあるCpGをマウスに投与して、炎症性サイトカインが生産されることを確認した。

【平成23年度】（1）B16を野生型マウスに皮下注射し、生着することを確認した。（2）末梢血液中に8%程度常在する Gr-1 陽性 CD11b 陽性細胞（myeloid derived suppressive cells=MDSC）が、5-FU投与後の好中球減少症、所謂 nadir である7日前後では4%以下に減少していた。5-FUの抗腫瘍効果を維持しつつ、nadirを補償する目的で、5-FUを投与する前にCpGを投与した。その結果、MDSCはnadirでも20%程度にまで増加していた。

研究成果の概要（英文）：(2010) (1) B16 melanoma were purchased from RIKEN, incubated for proliferation. (2) Anticancer drug, 5-FU were administered to WT mice(C57BL/6), and myelosuppression was observed, so called nadir, at 7days Flowcytometry and HE staining. (3) An adjuvant CpG were administered, the production of inflammatory cytokine were observed by ELISA. (2011) (1) B16 melanoma were inoculated s.c., as a result, confirmed engrafted model. Myeloid derived suppressive cells(MDSC) resident in peripheral blood at 8%, but 7days after 5-FU injection, MDSC were decreased at 4%. On the other, 5-FU and CpG combined injected, MDSC were increased at 20%.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：がん

1. 研究開始当初の背景

CpGは細菌やDNAウィルスに特徴的な配列であり、強力なアジュバント活性を有する

ことが知られており、さまざまな感染症・がん・アレルギーなどの予防や治療に有効なワクチンの応用に関する研究が行われている

(*Nat. Rev. Immunol.* 4:249 (2004)). CpG はその特異的受容体である Toll 様受容体 (TLR9) と結合すると、シグナル伝達が起こり、最終的には AP-1 と NF- κ B が核内に移行し免疫の活性化を誘導する遺伝子が発現する (*Nature* 408:740 (2000)). 抗原の消化・分解や抗原提示に関わる遺伝子が発現し、炎症性サイトカインの生産の誘導が促進する (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2879 (1996); *Nat. Rev. Immunol.* 4:249 (2004)). 申請者は、CpG の細菌感染におけるアジュバント効果のメカニズムを解析してきた。

2. 研究の目的

CpG は様々な病原体に対する強い免疫賦活能が誘導されるほか、がんやアレルギーなどの予防や治療に有効なワクチンへの応用が模索されている。今後は CpG を含めた Toll 様受容体リガンドによるがんに対するアジュバント効果について検討していく予定である。

3. 研究の方法

本研究では、CpG をはじめとする TLR リガンドおよび抗腫瘍薬を用いて生体内での腫瘍細胞に対する反応、とりわけ免疫細胞の動向を検討することで、TLR リガンドのがんに対するアジュバント効果と免疫細胞とがん細胞との関わりを明らかにしたい。以下、研究目的ごとに研究方法と研究内容を詳述する。B16 (マウス悪性黒色腫細胞株) を野生型マウスに投与し生着させた後に CpG を追加投与して、生体内での炎症性サイトカインの生産、免疫細胞の数的な変化および活性化の状態、リンパ組織内での分布と発現抗原の変化を検討する。これらの実験を行うことで、がん細胞または CpG によって誘導される生体内での免疫細胞の変化を検討する。生体内での CpG のアジュバント効果を検討するため、実験系は全て *in vivo* で行う。a. がん細胞を野生型マウスに投与し、血清中に IL-12p40 や IL-6, I 型 IFN (IFN- α , β) などの炎症性サイトカインが生産されるかを ELISA 法にて検討する。また、脾臓をはじめとしたリンパ組織や骨髄における、がん細胞によってもたらされる免疫細胞の数的変化と活性化を免疫組織染色法にて検討する。数的変化と活性化の状態は、各細胞種の分化抗原および活性化抗原を免疫染色し、蛍光顕微鏡を用いた免疫組織染色法にて検討する。同時にがん細胞による個体の生存率も検討する。この実験系から、生体内でのがん細胞と免疫細胞との関わりについての見解を得たい。b. 先に述べた方法と同様に、CpG を野生型マウスに投与し、血清中の炎症性サイトカインの生産を ELISA 法にて検討する。ま

た、脾臓をはじめとしたリンパ組織や骨髄における、CpG によってもたらされる免疫細胞の数的変化と活性化を、各細胞種の分化抗原抗体および活性化抗原抗体で免疫染色し、免疫組織染色法にて検討する。この実験系から、生体内での CpG 刺激による免疫細胞の動向についての見解を得たい。

CpG による抗腫瘍効果の検討

がん細胞を野生型マウスに投与し生着させた後、CpG を投与して血清中のサイトカインの生産、免疫細胞の数的変化と活性化、病巣部の縮小効果および個体の生存率を比較検討する。この結果から、生体内でのがん細胞に対する CpG のアジュバント効果についての見解を得たい。以上のことから、生体内でのがん細胞と CpG による免疫細胞の反応、および CpG のアジュバント効果とそのメカニズムについて、新たな知見が得られると考えている。

抗悪性腫瘍薬によって誘導される生体内での免疫抑制反応

野生型マウスに CpG を投与すると、数日内に脾臓の腫大がみられる。このことは、CpG を投与することによって、骨髄中の造血幹細胞に対して増殖を促すシグナル伝達が起こっていることに起因する。一方で、抗悪性腫瘍薬を投与すると、その副作用として細胞の周期を阻害し、骨髄抑制が起こることは広く知られた事実である。CpG による細胞の増殖と、抗悪性腫瘍薬の骨髄抑制という相反する作用がありながら、どちらも悪性腫瘍細胞に対して抑制的に作用することは非常に興味深い。また、CpG が悪性腫瘍に対しては細胞増殖に抑制的に作用するのに対して、正常細胞には細胞の増殖に促進的に作用することを検討することも、臨床的に非常に意義深いものである。これらを踏まえて、平成 22 年度の実験で得られた結果と以下の実験で得られる結果をを比較することで、CpG による抗悪性腫瘍効果を生体レベルで解析する予定でいる。

B16 細胞を野生型マウスに生着させた後、抗悪性腫瘍薬の 5-FU を投与する。上記と同様に、抗悪性腫瘍薬投与後に血清中のサイトカインの生産、脾臓をはじめとしたリンパ組織や骨髄および末梢血液での免疫細胞の数的変化と活性化を免疫組織染色法にて検討する。また、抗悪性腫瘍薬の効果みるべく個体の生存率も検討する。この実験系から、生体内での抗悪性腫瘍薬と免疫細胞との関わりについての見解を得たい。以上から、抗悪性腫瘍薬と CpG による免疫細胞の動向を比較検討することで、CpG が生体内において発

揮する免疫賦活作用および抗悪性腫瘍作用のメカニズムを明らかにするとともに、悪性疾患に対する副作用の少ない治療と CpG の臨床への応用を考える突破口としていきたい。

4. 研究成果

悪性腫瘍細胞の生着

マウスに投与するB16 melanoma (マウス悪性黒色腫) を研究資源バンクより購入した。初めに、腫瘍細胞を培養液中で増殖させた。増殖方法はそれぞれのプロトコールに従って行った。約50匹投与分のストックを作成し、凍結保存した。これらの 1×10^6 をC57BL/6 マウスに皮下投与したところ、約1か月で腫瘍塊の形成を認めた (図1)。



図 1. マウスの皮下に B16 を投与したところ、1 か月後に腫瘍塊の形成を確認した。

CpG の効果判定

アジュバントである CpG を北海道システムサイエンス社より購入しマウスに投与した。その結果、投与群では3日目に全個体において脾腫がみられた (図 2-a)。CpG 投与により、血清中には p40 (図 2-b)、IL-6、TNF- α が ELISA にて検出された。以上から、CpG の生体内での効果を確認することができた。

抗腫瘍薬 (5-FU) の効果判定

抗腫瘍薬である 5-FU をマウスに投与し、その効果判定を行った。投与 7 日目の全個体において、大腿骨の HE 染色、末梢血の血算値を検討したところ著明な骨髓細胞の減少を認めた (図 3)。

悪性細胞投与後の免疫細胞の動向

腫瘍の中心部に存在し、転移を促すと言われている MDSC について、フローサイトメトリーで検討した。平常時では末梢血液中に Gr-1 陽性細胞(MDSC)が 8%程度存在していた (図 4-a)。5-FU 投与後 7 日目では好中球減少である nadir がみられ、MDSC も 4%に減少していた (図 4-b)。一方で、5-FU 投与後に CpG を追加投与した場合には MDSC が 20%に増殖していることが確認された (図

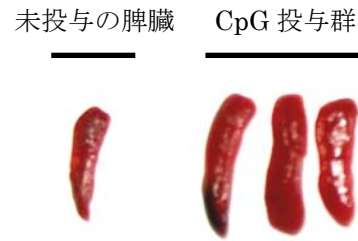


図 2-a. CpG 投与による脾腫

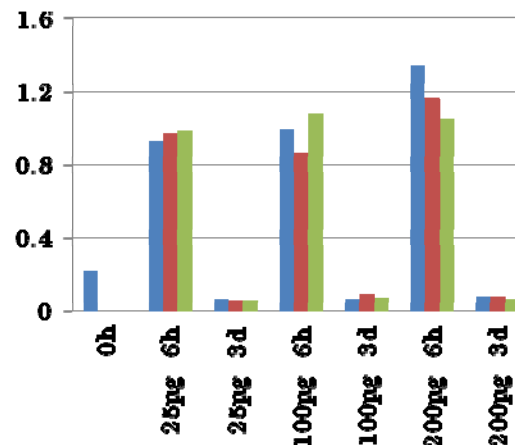


図 2-b. p40 生産 (ng/ml)

4-c)。

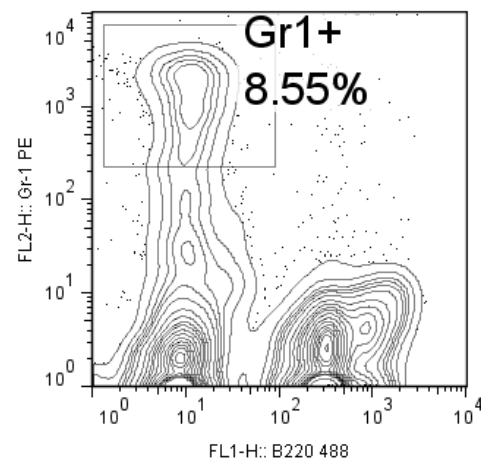


図 4-a. 平常時の末梢血液中の MDSC

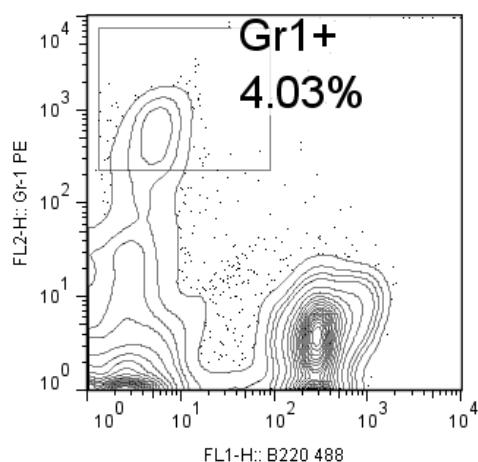


図 4-b. 5-FU 投与後の MDSC

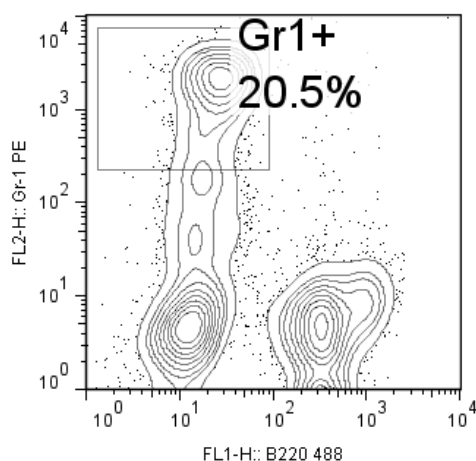


図 4-c. 5-FU+CpG 投与後の MDSC

これらの結果から、二つの仮説を考えた。第一に、5-FU によって誘導される nadir は、CpG を投与することで回避することが考えられる。このことは抗腫瘍薬の副作用を減少させ、許容投与量の増加を可能にし、抗腫瘍効果を高めることが期待される。第二に腫瘍の転移に関わるとも言われている MDSC が増えることで、抗腫瘍効果が減弱する可能性がある。しかしながら、生体内で CpG が単独で MDSC に作用し抗腫瘍効果をもたらす報告があることから (*J.Immunol*, 2012, 188: 1592-1599) この仮説は考えにくい。

以上、CpG 投与により MDSC が増殖すること、つまり 5-FU の副作用を減弱させることで抗腫瘍効果を高めることが期待される。

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 平成 23 年 日本口腔科学会総会「非メチル化 DNA による樹状細胞を介した免疫賦活機構」
2. 平成 23 年 日本口腔外科学会「歯源性明細胞癌との鑑別診断に苦慮した低分化型扁平上皮癌の 1 例」

〔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

桑島 精一 (KUWAJIMA SEIICHI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：40569448