

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23380174

研究課題名(和文) サイトカイン遺伝子の導入による癌微小環境の改変がもたらす免疫療法増強効果の検討

研究課題名(英文) Manipulation of tumor microenvironment by cytokine gene transfection enhances dendritic cell-based immunotherapy

研究代表者

杉浦 喜久弥 (SUGIURA, KIKUYA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：30171143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：サイトカインの遺伝子を生体内の癌細胞に導入して腫瘍内の細胞性免疫を増強することによる樹状細胞(DC)による抗癌免疫の増強を検討した。C3H/Heマウスに増殖させた同系骨肉腫細胞株内に新規人工ベクターを用いてGFP遺伝子を含むプラスミドを導入したところ、10%前後の導入効率を得られた。同様に、インターフェロンガンマまたはCD40リガンドの遺伝子を導入した後DCを腫瘍内投与したところ、有意に高い成長抑制がみられ、さらにCD40リガンドの遺伝子を導入によって生存率の著しい向上が認められた。これらの結果から、遺伝子導入によるがん微小環境の改変により、DC治療の効果が著しく増強されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Using a novel synthetic vector of a cationic lipid bound with pH-sensitive liposomes, we transfected cytokine genes into tumor cells to manipulate tumor microenvironment for facilitating dendritic cell (DC) therapy. The efficiency of transfection into the LM8 osteosarcoma growing in syngeneic C3H mice was about 10% by both intratumor (i.t.) and intravenous (i.v.) injection of the vector enclosing GFP-expression plasmid. Therapeutic experiments were performed to inhibit LM8 growth by injection of the interferon (IFN)  $\gamma$ -vector or the CD40L-vector, followed by i.t. injection of the DCs presenting the LM8 antigens. Growth of the tumor was significantly suppressed by the treatment of the IFN  $\gamma$ -plasmid vector and the CD40L-plasmid vector. The CD40L-vector treatment led to significantly improved survival. These results indicate that gene transfection of the cytokine genes manipulate the tumor microenvironment effectively and significantly improve DC-based tumor immunotherapy.

研究分野：免疫学

キーワード：腫瘍免疫治療 遺伝子導入 人工ベクター CD40リガンド インターフェロン 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌微小環境重要性の向上：癌微小環境は、癌間質組織における細胞および液性成分の総称である。近年癌治療において、癌細胞の種類や組織型のみでなく、癌微小環境が癌細胞の増殖や治療効果に大きく影響することが明らかになってきた。とくに微小環境内の免疫状態は、非常に重要であり、たとえば、手術摘出した癌組織の微小環境内に、細胞性免疫を増強するタイプ1ヘルパーT細胞

(Th1) や細胞傷害性T細胞(CTL)などのTh1免疫系細胞およびDCが多い場合には、患者の生存率は非常に高く、反対に抑制性T細胞や免疫抑制因子を分泌するマクロファージが多い場合には、患者の生存率は低いことが判明している(Gao et al. J Clin Oncol 2007など)。これらの現象を翻せば、癌組織内にTh1免疫系細胞を集め、それらを活性化する微小環境を構築できれば、癌治療の効果を著しく高めることができると考えられる。この癌微小環境の構築には、細胞性免疫を高めるサイトカイン(Th1サイトカイン)を用いることがもっとも効率的である。

(2) DCを用いた癌免疫治療の問題点：DCを用いた癌免疫治療は、生体外で単球(Mo)や骨髄前駆細胞から分化させたDCに癌抗原を取り込ませて癌患者の生体内に戻すことによって、癌抗原に特異的なTh1免疫系を活性化し、癌細胞を排除しようとするものである。この治療法は、癌細胞に特異性が高く、正常細胞を傷害しないため、副作用の無い極めて安全な方法であるが、未だ高い治療効果を得られていない。この原因として、①生体におけるDC成熟・活性化因子の不足のため、生体内に戻されたDCが退行する；②DCのリンパ節への移動ができない；③癌微小環境が免疫抑制の状態にあることなどが挙げられる(Engell-Noerregaard et al, Cancer Immunol Immunother 2009など)。

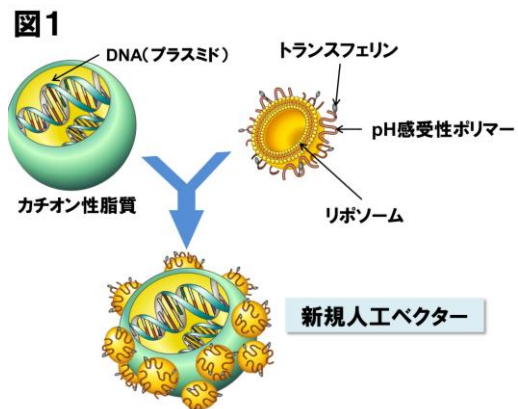
(3) これまでの研究成果：申請者らは、上記問題を解決するため、①DCの成熟・活性化に対するTh1サイトカインの影響を調べ、②それらサイトカインをDCとともに用いた場合の癌治療効果について検討した。その結果、Th1サイトカインであるインターフェロン(IFN)γ、インターロイキン-12およびCD40リガンド(CD40L)が未成熟DC(iDC)からDCへの成熟を誘導し、DCの免疫刺激活性を著しく亢進することが明らかになった(Vet Immunol Immunopathol 2010など)。さらに、IFNγに関して、DCによる癌細胞株のアポトーシス誘導を著しく増強することや、DCとともにイヌ自然発症癌の微小環境内に注入することによって画期的な治療効果(完全奏効率50%以上)をもたらすことを明らかにした(Cancer Res 2010)。

2. 研究の目的

Th1サイトカインの遺伝子を腫瘍細胞に導入して発現させることにより、持続的かつ効果的に微小環境の改善ができ、さらに、サイトカインを癌組織内に留まらせて全身への拡散を防ぐので、副作用を抑えることができる。そこで本研究では、非常に効果的で安全な腫瘍免疫療法を開発することを目的として、担癌マウスモデルを用いて、IFNγあるいはIFNγと同様にDCの成熟活性化の機能を持つCD40Lの遺伝子を腫瘍細胞へ導入し、それによるDC治療の効果改善を検討した。

3. 研究の方法

(1) 新規人工ベクターの作製：新規人工ベクターの作製は、既報(Yuba et al. Biomaterials 67:214-24, 2015)に基づいて行った。すなわち、トランスフェリンを結合させたpH感受性リポソームと、細胞膜との融合性の高いカチオン性脂質を結合させた新規人工ベクターを用いた。pH感受性リポソームは、ロータリーエバポレーターを用いて、卵黄由来ホスファチジルコリン(EYPC)にpH感受性ポリマーである3-メチルグルタミル化ポリグリシドール(MGluPG)を加えて作製した。さらに、腫瘍親和性を持たせるため、作製したpH感受性リポソームにトランスフェリンを結合した。遺伝子(cDNA)をカチオン性の脂質であるMultifectum(Promega社製)で内包し、そこにトランスフェリン結合pH感受性リポソームを結合させて、人工別ベクターを作製した。(図1)



(2) 新規人工ベクターの遺伝子導入効率の検討：GFP遺伝子を内包した人工ベクター溶液をC3Hマウス背側皮下に増殖させた同系の腫瘍内(i.t.)、あるいは尾静脈内(i.v.)投与した。投与48時間後に腫瘍組織を切り出して、凍結切片標本作製し、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon CIsi型：ニコン社製)において、総細胞数中のGFP発現細胞を計測し、人工ベクターの遺伝子導入効率を算出した。

(3) 腫瘍抗原の作製および抗原提示DCの調整：腫瘍抗原として、腫瘍ライセートをGeiger JDらの方法(Cancer Res 61:8513-8519, 2001)に従い、凍結融解を繰り返して作製し

た。マウス DC の作製にあたっては、牛胎子血清を 10% 含む RPMI1640 培地中で、マウス骨髄単核細胞をマウス組換え体 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (rmGM-CSF, 10 ng/ml : Peprotech 社製) と培養し、培養 6 日に細胞を回収し、DC として使用した。その後、腫瘍ライセート液に DC を浮遊させ、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間培養して DC に腫瘍抗原を取り込ませ、抗原提示 DC とした。

(4) サイトカイン遺伝子導入と DC 投与の併用による治療効果の検討 : IFN $\gamma$  遺伝子または CD40L 遺伝子を用いて、サイトカイン遺伝子導入と DC の i. t. 投与の併用による、担癌マウスへの治療効果の検討を行った。LM8 細胞を C3H マウスの背側皮下に接種し、接種後 12 日を治療開始 0 日目とした。処置群として、**A** : サイトカイン遺伝子含有プラスミドを内包した人工ベクターを i. t. 投与し、翌日に DC を投与する群 (Cytokine (i. t.) + DC 群)、**B** : A と同じプラスミド内包ベクターを i. v. 投与し、翌日に DC を投与する群 (Cytokine (i. v.) + DC 群)、**C** : サイトカイン遺伝子を含まない pcDNA3.1 プラスミドを内包した人工ベクターを i. t. 投与し、翌日に DC を投与する群 (Control (i. t.) + DC 群)、**D** : C と同じプラスミド内包ベクターを i. v. 投与し、翌日に DC を投与する群 (Control (i. v.) + DC 群)、**E** : A と同じプラスミド内包ベクターを i. v. 投与し、DC は投与しない群 (Cytokine (i. v.) 群)、**F** : A と同じ人工ベクターを i. t. 投与し、DC は投与しない群 (Cytokine (i. t.) 群) および無処置群を設けた。上記 A~F の処置を 7 日ごとに行い、これを 4 回繰り返した。治療開始後 60 日を実験の終了点とし、各処置マウスの生存率を観察し、また、治療開始から 2~3 日ごとに腫瘍体積を測定して治療効果を評価した。腫瘍体積の算出にあたっては、腫瘍の長径、短径を測定し、短径 $\times$ 短径 $\times$ 長径 $\times$ 0.5 の計算式もとに腫瘍体積を算出した。

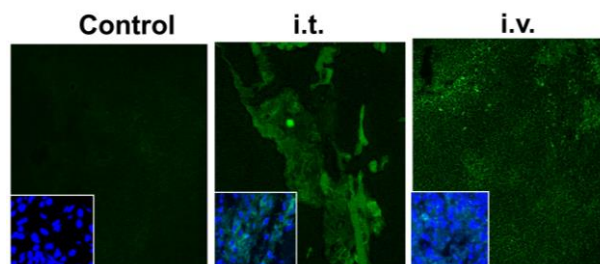
(5) 統計処理 : Student's *t* 検定、Tukey の多重比較検定により差の検定を行った。生存率の評価は Kaplan-Meier 法を用いた。 $p < 0.05$  の場合に有意差があったとした。

#### 4. 研究成果

(1) 新規人工ベクターの遺伝子導入効率 : GFP 遺伝子含有プラスミドを内包したベクターを i. t. あるいは i. v. 投与し、C3H マウスの背側皮下に増殖させた LM8 における GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察した。図 2 に示すように、いずれの投与方法においても GFP の発現が認められた。i. t. 投与では、GFP の発現が投与した部位の周辺に限局して見られたのに対し、i. v. 投与では、腫瘍内の血管を中心として巣状に GFP の発現が見られた。導入効率は、i. t. 投与では 8%、i. v. 投与では 10%

で、投与方法によって差は見られなかった。

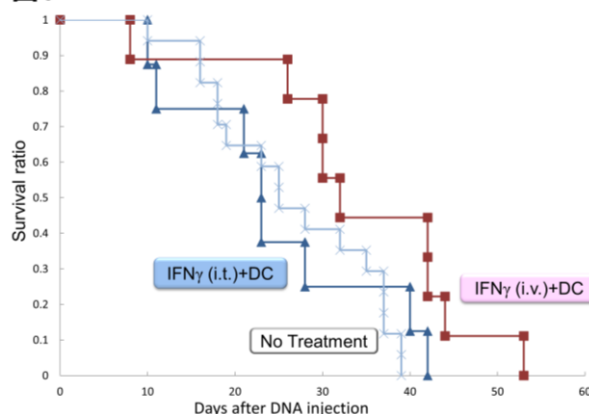
図 2

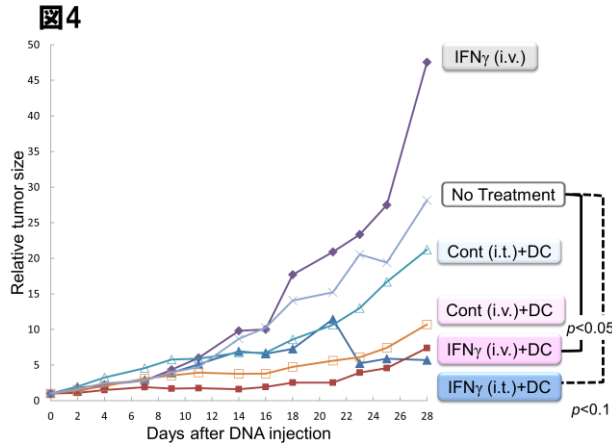


(2) IFN $\gamma$  遺伝子導入と DC 投与の併用による治療効果 : 担癌マウスを用いて、IFN $\gamma$  遺伝子、CD40L 遺伝子を i. t. または i. v. 投与によって腫瘍細胞へ導入する遺伝子治療と DC 療法を併用し、治療効果を検討した。

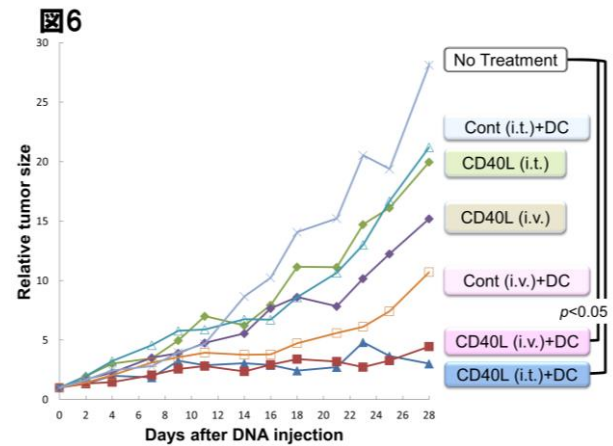
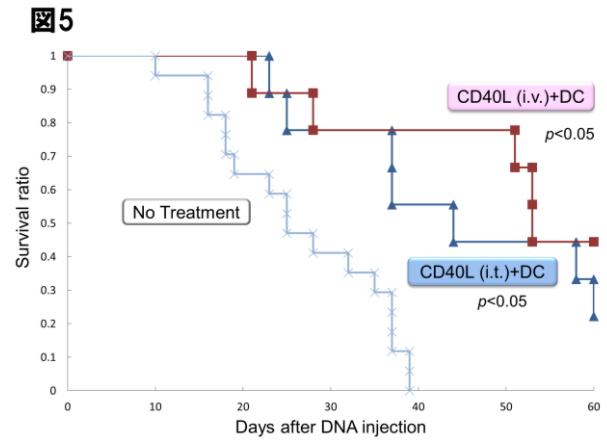
① IFN $\gamma$  遺伝子導入 DC 療法を併用による治療効果 : 図 3 に示すように、全ての処置群においてエンドポイントである治療開始後 60 日までの生存が認められなかった。最も長い生存がみられた、IFN $\gamma$  (i. v.) + DC 群も無処置群と比較して生存期間に有意な差はみられなかった。しかしながら、図 4 に示すように、腫瘍の成長に関して、全群で比較可能な治療終了後 7 日 (治療開始後 28 日) の時点での腫瘍の大きさは、無処置群と比較し、IFN $\gamma$  (i. v.) + DC 群で有意に抑制された。また、IFN $\gamma$  (i. t.) + DC 群では、抑制傾向 ( $p < 0.1$ ) が認められた。IFN $\gamma$  (i. t.) + DC 群および IFN $\gamma$  (i. v.) + DC 群の腫瘍の成長率をみると、IFN $\gamma$  (i. t.) + DC 群では、9 匹中 8 匹の個体で、治療開始から腫瘍の成長がみられた。個体によっては、壊死による腫瘍組織の崩壊と皮膚の自壊によって腫瘍体積が減少するものもあったが、損傷部位からの細菌感染などにより死亡した。

図 3





②CD40L遺伝子導入とDC投与の併用による治療効果：図5に示すように、治療開始後60日までの生存率は、CD40L (i. t.) +DC群およびCD40L (i. v.) +DC群で、無処置群と比較して有意な差がみられた。また、CD40L (i. t.)群でも比較的長い生存がみられた。図6に示すように、治療開始後28日までの腫瘍の成長は、CD40L (i. t.) +DC群、CD40L (i. v.) +DC群で、腫瘍の成長においても無処置群と比較して有意な差がみられた。また、IFN $\gamma$  (i. t.)群平均成長率が無処置の平均成長率を上回っていたのに対し、CD40L (i. t.)群の腫瘍の平均成長率は、無処置の平均成長率を下回っていた。CD40L (i. t.) +DC群およびCD40L (i. v.) +DC群の腫瘍成長率を見ると、CD40L (i. t.) +DC群では、治療開始後60日間生存していたマウスは9匹中2匹で、2匹とも肉眼的に腫瘍が認められなかった。また、この群では、ほとんどの個体で腫瘍の縮小と増大のサイクルがみられた。このサイクルの繰り返しによりマウスが衰弱し、そのため、腫瘍のサイズがあまり大きくならないにもかかわらず死亡したのではないかと思われた。CD40L (i. v.) +DC群では、治療開始後60日間生存していたマウスは、9匹中3匹で、その中の2匹には肉眼的に腫瘍が認められなかった。この群においては、CD40L (i. t.) +DC群でみられたような腫瘍の縮小と増大のサイクルは見られず、9匹中7匹のマウスで、治療終了後7日（治療開始後28）まで腫瘍の成長がほぼ抑えられていた。しかし、治療によって寛解が得られた個体（2匹）を除いて、治療終了12~17日後から急速な腫瘍の成長がみられ、5匹中4匹が死亡あるいは腫瘍の過増殖による安楽殺の対象となった。それに対し、腫瘍が肉眼的に認められなくなった個体では、組織的にも腫瘍細胞は認められず、また、リンパ球などの免疫細胞も認められなかった。



③IFN $\gamma$ およびCD40Lの遺伝子導入とDC投与の併用による治療効果：図7に示すように、治療開始後60日までの生存率は、CD40L+IFN $\gamma$  (i. t.) +DC群およびCD40L+IFN $\gamma$  (i. v.) +DC群で、100%であった。また、DC治療を行わず遺伝子治療のみの群も無処置群と比較して有意に生存率の向上が認められた。CD40L+IFN $\gamma$  (i. t.) +DC群では、6匹中3匹で腫瘍の消失（寛解）を認めたが、CD40L (i. t.) +DC群と同様に腫瘍の縮小と増大のサイクルがみられた（図8）。CD40L+IFN $\gamma$  (i. v.) +DC群では、図9に示すように、6匹中4匹で寛解を認め、全てのマウスで治療開始後から継続的に腫瘍の成長が抑制されていた。腫瘍の成長は、CD40L+IFN $\gamma$  (i. v.)群でも、治療中では抑えられていたが、治療終了後では急速にみられた。

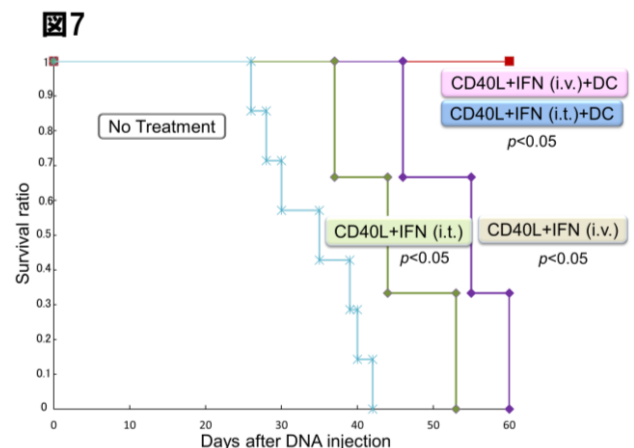


図8

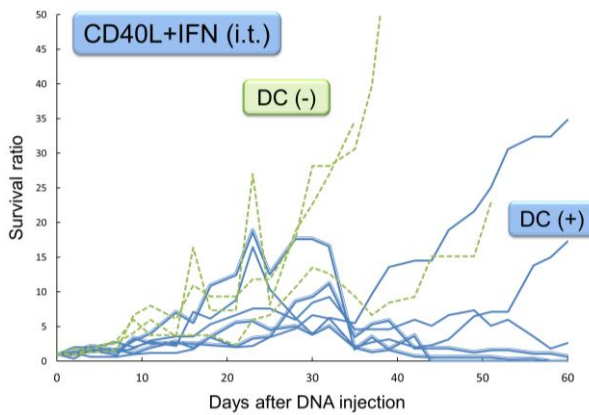
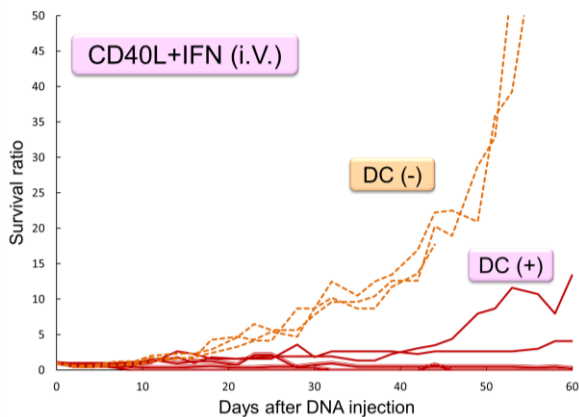


図9



(3) まとめ: 以上のように、IFN $\gamma$ やCD40LのようなDCをも成熟、活性化するTh1サイトカイン遺伝子の生体内腫瘍への導入によって効果的な微小環境の改変ができ、DC治療との併用により、非常に良好な治療効果を得ることができた。腫瘍を一旦成長させた後に、治療によって完全寛解と長期的な再発防止を実現させた報告は、マウスの実験モデルにおいてもほとんどなく、本治療法は、非常に有効なものであり、今後、治療条件および安全性を検討していくことで、動物のみでなく、ヒトのがん免疫治療においても非常に有用な手段になり得ると思われる。

#### 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8件)

- ① Yuba E, Kanda Y, Yoshizaki Y, Teranishi R, Harada A, Sugiura K, Izawa T, Yamate J, Sakaguchi N, Koiwai K, Kono K. pH-sensitive polymer-liposome-based antigen delivery systems potentiated with interferon- $\gamma$  gene lipoplex for efficient cancer immunotherapy. *Biomaterials* 67:214-224, 2015. 査読有

doi:10.1016/j.biomaterials  
2015.07.031.

- ② Wijewardana V, Sugiura K, Wijesekera DPH, Hatoya S, Nishimura T, Kanegi R, Ushigusa T, Inaba T. Effect of ovarian hormones on maturation of dendritic cells from peripheral blood monocytes in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 77(7): 771-775, 2015. 査読有 doi:10.1292/jvms.14-0558.
- ③ Koyama Y, Sugiura K, Yoshihira C, Inaba T, Ito T. High effective non-viral antitumor gene therapy system comprised of biocompatible small plasmid complex particles consisting of pDNA, anionic polysaccharide, and fully deprotected linear polyethylenimine. *Pharmaceutics* 7(3): 152-164, 2015 査読有 doi:10.3390/pharmaceutics7030152.
- ④ Akazawa T, Ohashi T, Nakajima H, Nishizawa Y, Kodama K, Sugiura K, Inaba T, Inoue N. Development of a dendritic cell-targeting lipopeptide as an immunoadjuvant that inhibits tumor growth without inducing local inflammation. *Int. J. Cancer.* 135(12):2847-2856, 2014 査読有 doi: 10.1002/ijc.28939.
- ⑤ Wijesekera DPH, Sugiura K, Yuba E, Ueda K, Wijewardana V, Kanegi R, Nishimura T, Ushigusa T, Hatoya S, Kono K, Inaba T. Enhancement of anti-tumor immune responses by transfection of IFN $\gamma$  gene into tumor using a novel type synthetic vector. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 162 (1-2): 59-64, 2014 査読有, doi: 10.1016/j.vetimm.2014.08.016.
- ⑥ Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kamishima H, Izawa T, Hatoya S, Sugiura K, Ide C, Inaba T. Evaluation of serum phosphotylated neurofilament subunit NF-H as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation. *Vet. Surg.* 43(3): 289-293, 2014, 査読有, doi: 10.1111/j.1532-950X.2014.12144.x.
- ⑦ Wijewardana V, Sugiura K, Yahata M, Akazawa T, Wijesekera DPH, Imamoto S, Hatoya S, Inoue N, Inaba T. Production of canine soluble CD40 ligand to induce maturation of monocyte derived dendritic cells for cancer immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 156 (1-2):121-127. 2013 査読有, doi:10.1016/j.vetimm.2013.09.016
- ⑧ Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Sugiura K, Wijewardana V, Kuwamura M, Tanaka M, Yamate J, Izawa T, Takahashi M, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T.

Generation of functional platelets from canine induced pluripotent stem cells. Stem Cells Dev 22(14):2026-2035, 2013 査読有, doi:10.1089/scd.2012.0701.

[学会発表] (計9件)

- ① 杉浦喜久弥 サイトカイン遺伝子治療と樹状細胞療法の併用によるがん免疫治療、平成27年度獣医学術学会年次大会、2016年2月26日、秋田キャッスルホテル、(秋田県秋田市)
- ② 杉浦喜久弥 コンパニオンアニマルのガン免疫療法、第5回バイオ・メディカル・フォーラム/第2回産学連携ヘルスケアナレッジセミナー、2016年2月19日、大阪府立大学(大阪府堺市)
- ③ 杉浦喜久弥 免疫療法(療法原理の基礎、基礎研究、臨床応用)第11回日本獣医再生医療学会、2016年2月5日、ホテルクライントン新大阪(大阪府大阪市)
- ④ De Silva H. Nadeeka, Sugiura Kikuya, Wijesekera H. Daluthgamage Pasty, Hatoya Shingo, Inaba Toshio Effect of ovarian hormones on maturation of dendritic cells from peripheral blood monocytes in dogs、第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月19日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- ⑤ Wijesekera H. Daluthgamage Pasty, Sugiura Kikuya, Hatoya Shingo, Inaba Toshio Manipulation of tumor microenvironment by cytokine gene transfection enhances dendritic cell-based cancer immunotherapy、第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月19日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- ⑥ 市田千尋、杉浦喜久弥、Wijesekera H Daluthgamage Pasty、弓場英司、鳩谷晋吾、河野健司、稲葉俊夫 サイトカイン遺伝子治療と樹状細胞療法の併用によるがん免疫治療、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月8日、北里大学(青森県十和田市)
- ⑦ 太田敦子、杉浦喜久弥、赤澤隆、鳩谷晋吾、稲葉俊夫、他4名 マウス内臓腫瘍転移モデルにおける抗腫瘍免疫反応を増強した樹状細胞療法の治療効果の検討、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日、北海道大学(北海道札幌市)
- ⑧ 杉浦喜久弥 樹状細胞による癌免疫療法、平成25年度獣医学術学会年次大会、2014年2月22日、幕張メッセ(千葉県千葉市)
- ⑨ 東彩夏、杉浦喜久弥、赤澤隆、鳩谷晋吾、稲葉俊夫、他5名 全身的抗腫瘍免疫反応を増強した樹状細胞療法の改善、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月21日、岐阜大学(岐阜県岐阜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉浦 喜久弥 (SUGIURA Kikuya)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：30171143

### (2) 研究分担者

赤澤 隆 (AKAZAWA Takashi)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター・研究所、腫瘍免疫部門・主任研究員  
研究者番号：80359299

鳩谷 晋吾 (HATOYA Shingo)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：40453138

稲葉 俊夫 (INABA Toshio)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：00137241

### (3) 連携研究者

河野 健司 (KOUNO Kenji)  
大阪府立大学・工学研究科・教授  
研究者番号：90215187