

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701076

研究課題名(和文) Cyclooxygenase-2 発現細胞を標的にした腫瘍免疫の制御

研究課題名(英文) Regulation of anti-tumor immunity by targeting cyclooxygenase-2 expressing cells

研究代表者

井上 浄 (Inoue, Joe)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00433714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：がんによる免疫抑制は、腫瘍組織におけるcyclooxygenase (COX)-2発現がその抑制に大きく関与することが報告され、またこのCOX-2発現は腫瘍細胞によるものとされてきた。本研究から、腫瘍に浸潤するCD11c+細胞にも高いCOX-2発現が認められ、この細胞が免疫抑制性のサイトカイン産生等を介して、免疫抑制に大きく関与することを明らかにした。また、この細胞を標的としたliposome (COX-2選択的阻害剤封入liposome)を新たに開発し、腫瘍組織においてCOX-2発現CD11c+細胞による免疫抑制状態を改善できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The immunosuppression in tumor tissue has been attributed to tumor cells expressing cyclooxygenase (COX) -2. From this study, COX-2 was also expressed in tumor infiltrated CD11c+ cells. It was shown that through the production of immunosuppressive cytokines by COX-2+CD11c+ cells, the cells are largely responsible for immunosuppression in tumor tissues. Moreover, liposome (COX-2 selective inhibitor encapsulated liposome) which newly prepared to target the COX-2+CD11c+ cells, it showed the possibility to improve the immunosuppression by COX-2+CD11c+ cells in tumor tissues.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：cox-2 tumor dendritic cell liposome

1. 研究開始当初の背景

近年、がんの免疫療法に関する研究は目覚しく発展し注目を集める中、がんによる免疫抑制がその治療における大きな問題となってきた。中でも腫瘍組織における COX-2 発現上昇を介したプロスタグランジン (PG)E2 や IL-10 などの免疫抑制性のサイトカイン産生や、COX-2 発現上昇による腫瘍組織中の Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) の発現誘導などが、抗腫瘍免疫に対して抑制的に働くことが知られている。すなわち、腫瘍組織で発現する COX-2 はその腫瘍局所において免疫抑制ネットワークを築くことで、宿主の免疫系から回避しているものと考えられる。これまで腫瘍組織中における過剰な COX-2 発現は腫瘍細胞によるものとされてきた。そこで、様々な腫瘍細胞株の接種および化学物質により誘導した腫瘍組織を採取し、腫瘍細胞と免疫系細胞とを分離し、それぞれの COX-2 発現の確認を行ったところ、予想通りほぼ全例の腫瘍細胞に COX-2 発現が認められている。しかし驚くことに、全ての種類の腫瘍組織中から採取した CD11c⁺細胞で高い COX-2 発現が認められた。そこで本研究では、腫瘍組織中の CD11c⁺COX-2 発現細胞の機能解析およびこの細胞を標的にした免疫療法を開発することを目的とした。

2. 研究の目的

(1)腫瘍組織における COX-2⁺CD11c⁺細胞の免疫抑制作用を中心とした機能を検討することで、COX-2⁺CD11c⁺細胞が腫瘍免疫に及ぼす影響を明らかにする。また、この細胞に COX-2 選択的阻害剤を効率よくデリバリーするため、COX-2 選択的阻害剤を封入した liposome を作製する。

(2)作製した liposome を担癌マウスに投与することにより、腫瘍組織に浸潤する COX-2⁺CD11c⁺細胞における COX-2 の作用を明らかにする。様々な種類の腫瘍細胞および化学発がん物質で誘導した担癌マウスを用いて作製した liposome の効果を検討し、新規免疫療法の開発を行う。

3. 研究の方法

本研究は、腫瘍組織中の COX-2⁺CD11c⁺細胞の機能および特徴の解明と、COX-2 選択的阻害剤を封入した liposome による新規免疫療法を開発するため、以下の事項を検討した。

(1)COX-2⁺CD11c⁺細胞が発現する細胞表面分子の検討

腫瘍組織中存在する CD11c⁺細胞はその特徴として、「未熟な樹状細胞」と同じような特徴が見られ、免疫活性化分子の発現が低い。また免疫抑制ネットワークに関わるサイトカイン等を産生することが知られている。そこでまず、腫瘍組織から採取した COX-2⁺CD11c⁺細胞の、CD80、CD86、CD40

および MHC の発現をフローサイトメーターにより解析し、現在までに報告のある未熟な樹状細胞や免疫抑制性の樹状細胞の特徴と比較する。また、採取した COX-2⁺CD11c⁺細胞を COX-2 選択的阻害剤で処理した後に、上記と同様の検討を行い比較することで、COX-2 の役割を明らかにする。

(2)COX-2⁺CD11c⁺細胞が産生する液性因子の定量

COX-2 は免疫抑制ネットワークに関わる PGE2 や TGF-β、IL-10 などの免疫抑制性の脂質メディエーターやサイトカインの産生に大きく関わることが知られている。そこで腫瘍組織から採取した COX-2⁺CD11c⁺細胞を培養し、その培養上清中の PGE2 や TGF-β、IL-10 などの産生量を ELISA により定量する。さらに LPS などで刺激を行った場合における炎症性サイトカイン産生を、これまでに報告のある種々の樹状細胞と比較する。また、採取した COX-2⁺CD11c⁺細胞を COX-2 選択的阻害剤で処理した後に、上記と同様の検討を行い比較することで、COX-2 の役割を明らかにする。

(3)COX-2⁺CD11c⁺細胞が産生する液性因子による免疫細胞の活性化阻害効果の検討

COX-2⁺を発現する CD11c⁺細胞は、(2)に示したように、COX-2 によりその産生が誘導される免疫抑制性の液性因子を産生していることが強く示唆される。そこで次に、腫瘍組織から採取した COX-2⁺CD11c⁺細胞の培養上清を用いて、CD4T 細胞、CD8T 細胞、NK 細胞および NKT 細胞の活性化に及ぼす影響を検討する。正常マウスの脾臓から採取した CD4T 細胞、CD8T 細胞、NK 細胞および NKT 細胞に、COX-2⁺CD11c⁺細胞の培養上清を加え、anti-CD3 抗体刺激または PMA + Ionomycin 刺激した際の細胞増殖ならびにサイトカイン産生を測定することで、COX-2⁺CD11c⁺細胞が産生する液性因子による免疫細胞の活性化への影響を明らかにする。

(4)COX-2 選択的阻害剤を封入した liposome の作製

カチオン性脂質である DOTAP とポリエチレングリコール(PEG)を修飾した DPPE を用いて liposome を作製する。この脂質 2 重膜を有する liposome には、脂質部分に脂溶性薬剤を、内部には水溶性薬剤を封入することができる。今回用いる COX-2 選択的阻害剤は脂溶性であるため、liposome の作製際に脂質部分に組み込むことで COX-2 選択的阻害剤を封入した liposome を新たに作製する。

(5)作製した liposome による COX-2⁺CD11c⁺細胞の機能変化の検討

まず、作製した liposome に蛍光物質を封入し、この liposome が腫瘍組織中の

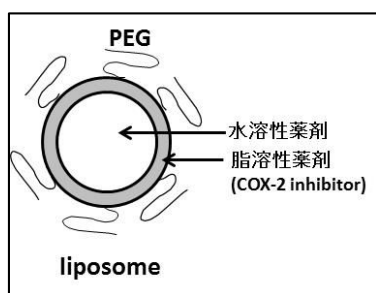
COX-2⁺CD11c⁺細胞のみに取り込まれていることをフローサイトメーターにより確認する。次に、COX-2 選択的阻害剤を封入した liposome を担癌マウスに投与し、その後腫瘍組織から COX-2⁺CD11c⁺細胞採取して、(1)~(3)で行ってきた検討を行う。liposome 投与群と非投与群を比較することで、COX-2 選択的阻害剤封入 liposome の効果ならびに、COX-2⁺CD11c⁺細胞の *in vivo*での役割等を明らかにする。

(6)種々の担癌マウスで、作製した liposome の効果を検討

EL-4、B16、colon26、4T1 等の腫瘍細胞株を接種した担癌マウス、もしくは 3-Methylcholanthrene により誘導した担癌マウスに、本研究で新たに作製する COX-2 選択的阻害剤封入 liposome を投与し、腫瘍体積の変化を測定することでその効果を評価する。また liposome 投与群と非投与群の腫瘍浸潤リンパ球を採取し、CTLの誘導やTh1、Treg、Th17、 $\gamma\delta$ T 細胞等変化をフローサイトメーターによって解析することによって、COX-2⁺CD11c⁺細胞が腫瘍免疫に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1)腫瘍組織から採取した COX-2⁺CD11c⁺細胞の細胞表面マーカーは、未熟樹状細胞や免疫抑制性の樹状細胞の特徴と類似し、その培養上清中には PGE2 や TGF- β 、IL-10 といった免疫抑制性のサイトカインが認められた。この培養上清は、*in vitro*における CD4T 細胞、CD8T 細胞、NK 細胞および NKT 細胞の活性化を抑制することを明らかとした。また、COX-2 選択的阻害剤を脂質部分に組み込んだ、COX-2 選択的阻害剤封入 liposome (iCOX-liposome) を作製した。



(2)iCOX-liposome を担癌マウスに投与したところ、COX-2⁺CD11c⁺細胞に選択的に取り込まれていることが確認された。iCOX-liposome 投与群の CD11c⁺細胞では、CD80 や CD86 に代表される補助刺激分子の発現上昇が認められ、その培養上清中の PGE2 や TGF- β 、IL-10 産生は極めて低下していた。またこの培養上清は、CD8T 細胞および NK 細胞の活性化を抑制しないことが示された。

(3)種々の担癌マウスにおいて iCOX-liposome の効果を検討した。EL-4、B16 の腫瘍細胞株を接種した担癌マウス、3-Methylcholanthrene により誘導した担癌マウスにおいて、iCOX-liposome 投与群の腫瘍体積は有意に小さく、また生存率も上昇した。腫瘍に浸潤する Treg の割合は iCOX-liposome 投与群によって変化は認められなかった。

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 2 件)

Watanabe S[#], Kumazawa Y, Inoue J^{**}
Liposomal lipopolysaccharide initiates TRIF-dependent signaling pathway independent of CD14. ***PLoS One.* 8(4)**, e60078 (2013) [#]contributed equally, ^{*}corresponding author 査読有

Watanabe S[#], Inoue J^{**}
Intracellular delivery of lipopolysaccharide induces effective Th1-immune responses independent of IL-12. ***PLoS One.* 8(7)**, e68671(2013) 査読有

[学会発表](計 0 件)

[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 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
http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-010/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 浄 (INOUE, Joe)

京都大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号：00433714

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：