

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460679

研究課題名(和文) NKT細胞活性化と免疫抑制因子の制御を用いた癌転移に対する新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Inhibition of iNOS activity enhances the anti-tumor effects of alpha-galactosylceramide in cancer model

研究代表者

伊藤 弘康 (Ito, Hiroyasu)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80373075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NKT細胞の活性化と免疫抑制因子(一酸化窒素(iNOS))の発現制御を用いた転移性肺腫瘍モデルおよび腫瘍皮下接種モデルでの抗腫瘍効果の検討を行い、効果的な治療法の開発を目指した。マウス悪性黒色腫細胞株を用いた転移性肺腫瘍モデルおよび悪性リンパ腫細胞株であるEG7細胞を用いた腫瘍皮下接種モデルいずれにおいてもiNOSの発現を抑制することによりalpha-galactosylceramide(GalCer)の抗腫瘍効果が増強した。腫瘍抗原特異的細胞性免疫が促進し、腫瘍の増大が抑制されたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Alpha-galactosylceramide (GalCer) has anti-tumor effect in the basic research and clinical studies. However, anti-tumor effect of GalCer is limited. GalCer increases the production of IFN- γ which is involved in the suppression of tumor growth. On the other hand, the enhancement of IFN- γ production increases immunosuppressive factors such as nitric oxide (NO). This suppressive action might impair the anti-tumor effect. In the present study, we evaluated the anti-tumor effect of GalCer in the absence of inducible nitric oxide synthase (iNOS). In lung metastatic model, the number of tumor nodules in the lung of iNOS-KO mice treated with GalCer was significantly reduced compared with that in WT mice. The subcutaneous tumor experiments revealed that the administration of GalCer in the absence of iNOS expression enhanced the induction of tumor antigen-specific Th1 response. Our results indicated that the inhibition of iNOS expression could enhance the therapeutic efficacy of GalCer.

研究分野：免疫学

キーワード：NKT細胞 腫瘍免疫 一酸化窒素 免疫抑制因子

1. 研究開始当初の背景

本邦においてがんは死因の第一位であり、その治療成績は決して十分なものとは言えないのが現状である。この原因として、がんの遠隔臓器への転移が挙げられる。したがって、がんによる転移巣を制御することは、生命予後を改善する上で極めて重要なことであると考えられる。特に、転移性肺腫瘍および肝腫瘍はその発生頻度も転移性腫瘍の中では多く認められ、直接死因に関わることが多い。NKT 細胞は、活性化により多量のサイトカインなどを産生するので、NKT 細胞を活性化する α -galactosylceramide (GalCer) の感染症や腫瘍への、さまざま治療効果が報告されている (Vivier et al, Nat Rev Immunol, 2012. BerZins SP et al, Nat Rev Immunol, 2011)。一方、この GalCer は、IDO や iNOS などの発現を増強することが知られている。特に肝臓内では、GalCer 投与後に IDO の誘導が強く起こり、肝内の免疫担当細胞に大きな影響を及ぼしていることを申請者は報告した。IDO や iNOS は、リンパ球や NK 細胞の増殖を抑制することにより免疫の賦活化を抑える作用を有しているため、これらの発現の増強はがん細胞の宿主免疫からの逃避機構に一役を買っていると考えられている。そのため、GalCer による NKT 細胞活性化を抗腫瘍免疫療法として用いる際、これらの免疫抑制因子を制御することが、より効果的な腫瘍免疫療法につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、NKT 細胞の活性化と免疫抑制因子 (一酸化窒素 (iNOS) やインドールアミン酸素添加酵素 (IDO)) の発現制御を用い転移性肺腫瘍モデルおよび腫瘍皮下接種モデルでの抗腫瘍効果の検討を行い、効果的な治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

1) 野生型 (WT) マウス、iNOS ノックアウト (KO) マウスを用いて転移性肺腫瘍モデルを作製する。転移性腫瘍モデルを作製するために、悪性黒色腫細胞株 (B16-F10) を各マウスへ経静脈的に移入した。がん細胞株移入後、10 日にて GalCer 2 μ g/マウスにて腹腔内投与し、さらにその 2 週後に抗腫瘍効果の判定を行った。抗腫瘍効果の判定は、肺表面の転移巣の結節数を肉眼的に観察・カウントすることにより行った。

2) 転移性肺腫瘍モデルを作製後、気管支洗浄液 (BALF) を回収して、BALF 内のリンパ球の表現型をフローサイトメトリー法にて検討した。腫瘍皮下接種モデルでは、腫瘍内リンパ球を比重分離法で単離後、表現型をフローサイトメトリー法にて検討した。

3) 転移性肺腫瘍モデルを作製後、肺でのサ

イトカインおよびケモカインの発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。

4) WT マウスおよび iNOS-KO マウスを用いて皮下腫瘍モデルを作製する。マウスリンパ腫細胞株の EG7 細胞を皮下接種し作製する。作製後、10 日目に GalCer 2 μ g/マウスにて腹腔内投与する。経時的に腫瘍径を測定することで抗腫瘍効果を評価した。

4. 研究成果

1) WT マウスにおける GalCer 投与後の iNOS 発現

WT マウス B16-F10 細胞を経静脈的に投与し転移性肺腫瘍モデルを作製後、GalCer 投与により治療を行った。治療後、経時的に肺組織を採取し、mRNA を抽出後、iNOS の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。GalCer 投与により iNOS の mRNA 発現が増強した。また、非担癌 WT マウス、担癌マウスおよび GalCer 処置を行った担癌マウスから BALF を採取し、CD11b 陽性細胞の iNOS の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。GalCer 処置を行った担癌マウスから採取した CD11b 陽性細胞での発現が最も増強されていた。

2) iNOS 発現制御による転移性肺腫瘍に対する GalCer の抗腫瘍効果の検討

WT および iNOS-KO マウスに B16-F10 細胞による転移性肺腫瘍モデルを作製後、GalCer にて処置を行った。GalCer 処置後、肺表面の腫瘍結節数は、iNOS-KO マウスに GalCer 投与群で明らかに減少していた。また、iNOS 阻害剤である L-NAME と GalCer を WT マウスに同時投与することにより B16-F10 細胞による転移性肺腫瘍モデルにおいて腫瘍結節数は減少していた。また、マウス大腸がん細胞株である CT26 細胞を使用して肺転移モデルを作製した場合においても、L-NAME と GalCer による共投与は肺の腫瘍結節数を明らかに減少させた。

3) 転移性肺腫瘍モデルでの WT マウスおよび iNOS-KO マウスの BALF 中のリンパ球の解析

WT マウスおよび iNOS-KO マウスに B16-F10 細胞による転移性肺腫瘍モデルを作製後、GalCer の投与を行った。その後、BALF 中の CD4、CD8、CD11b/Gr-1 細胞の表現型をフローサイトメトリー法にて検討した。CD8 陽性細胞は、iNOS-KO マウスに GalCer 処置を行ったマウスにて有意に増加していた。また、CD11b/Gr-1 陽性細胞は iNOS-KO マウスにて GalCer 投与による増加は認められなかった。また、リンパ球増殖試験では、iNOS-KO マウスの BALF 中の細胞のリンパ球抑制能が低下していた。

4) 転移性肺腫瘍モデルにおける WT マウス

および iNOS-KO マウスの肺でのサイトカインおよびケモカイン発現の検討

WT マウスおよび iNOS-KO マウスに B16-F10 細胞による転移性肺腫瘍モデルを作製後、GalCer の投与を行った。その後、肺を採取し、mRNA を抽出し、IFN- γ 、FasL、CCL2、XCXL9 の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。いずれの発現も iNOS-KO マウスに GalCer を投与することにより増強した。

5) iNOS 発現制御による腫瘍皮下接種モデルに対する GalCer の抗腫瘍効果の検討

WT および iNOS-KO マウスにマウスリンパ腫細胞株である EG7 細胞による腫瘍皮下接種モデルを作製後、GalCer にて処置を行った。処置後、経時的に腫瘍の大きさを測定したところ、iNOS-KO マウスにて有意に GalCer 投与による腫瘍増大抑制効果が認められた。また、所属リンパ節から細胞を単離して、EG7 細胞の腫瘍抗原である卵白アルブミンにて刺激を行い IFN- γ の産生を ELISPOT アッセイにて検討したところ、iNOS-KO マウスに GalCer の処置を行ったマウスからの細胞が最も IFN- γ 産生能が高かった。また、CFSE ラベルを用いた細胞傷害性試験も行ったが、GalCer の処置をした iNOS-KO マウスからの細胞が最も EG7 に対する細胞傷害能が高かった。

6) 腫瘍皮下接種モデルでの WT マウスおよび iNOS-KO マウスの腫瘍内リンパ球および脾細胞の解析

WT および iNOS-KO マウスにマウスリンパ腫細胞株である EG7 細胞による腫瘍皮下接種モデルを作製後、GalCer にて処置を行った。処置後、腫瘍内からリンパ球を比重分離法にて単離し、CD4、CD8、CD11b/Gr-1 細胞の表現型をフローサイトメトリー法にて検討した。GalCer 処置後、WT マウスに比し、iNOS-KO マウスにて CD8 陽性細胞の比率が増加していた。また、免疫抑制性の細胞群である CD11b/Gr-1 陽性細胞の比率は iNOS-KO マウスにて低下していた。さらに、CD11b 陽性脾細胞を用いたリンパ球増殖試験では、GalCer 処置した WT マウスでは、リンパ球増殖抑制能を有していたが、GalCer 処置した iNOS-KO マウスその抑制能は消失していた。

7) まとめ

以上の実験結果より、担癌マウスモデル（転移性肺腫瘍モデル、腫瘍皮下接種モデル）において、iNOS の発現または活性を抑制することは GalCer による抗腫瘍効果を増強させることが示唆された。iNOS を抑制することにより CD11 陽性細胞のリンパ球抑制能が減弱し、腫瘍抗原特異的細胞性免疫能が増強することは抗腫瘍効果の増強に繋がるものと考えられた。また、腫瘍でのケモカイン

の発現増加も抗腫瘍効果増強に寄与している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

(以下すべての論文で査読有)

1. Hara T, Matsumoto T, Shibata Y, Nakamura N, Nakamura H, Ninomiya S, Kitagawa J, Nannya Y, Shimizu M, Ito H, Saito K, Tsurumi H. Prognostic value of the combination of serum L-kynurenine level and indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 13:1-4. 2016.
2. Shibata Y, Hara T, Nagano J, Nakamura N, Ohno T, Ninomiya S, Ito H, Tanaka T, Saito K, Seishima M, Shimizu M, Moriwaki H, Tsurumi H. The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Diethylnitrosamine- Induced Liver Carcinogenesis. *PLoS One*. 11(1):e0146279. 2016.
3. Ito H, Ando T, Seishima M. Inhibition of iNOS activity enhances the anti-tumor effects of alpha-galactosylceramide in established murine cancer model. *Oncotarget*. 6(39):41863-74. 2015.
4. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Ando T, Ito H, Hatano Y, Tomita H, Kuno T, Saito K, Seishima M, Hara A. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression alters immune response in colon tumor microenvironment in mice. *Cancer Sci*. 106(8):1008-15. 2015.
5. Nakamura N, Hara T, Shimizu M, Mabuchi R, Nagano J, Ohno T, Kochi T, Kubota M, Shirakami Y, Goto N, Ito H, Saito K, Tanaka T, Moriwaki H, Tsurumi H. Effects of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor in non-Hodgkin lymphoma model mice. *Int J Hematol*. 102(3):327-34. 2015.
6. Mabuchi R, Hara T, Matsumoto T, Shibata Y, Nakamura N, Nakamura H, Kitagawa J, Kanemura N, Goto N, Shimizu M, Ito H, Yamamoto Y, Saito K, Moriwaki H, Tsurumi H. High serum concentration of L-kynurenine predicts unfavorable outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 24:1-24. 2015.
7. Ito H, Ando T, Ogiso H, Arioka Y, Saito K, Seishima M. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity accelerates skin wound healing. *Biomaterials*. 53:221-8. 2015.
8. Ito H, Ando T, Ogiso H, Arioka Y, Seishima M. Inhibition of induced nitric oxide synthase enhances the anti-tumor effects on cancer immunotherapy using TLR7 agonist in mice. *Cancer Immunol*

Immunother. 64(4):429-36. 2015.

9. Ando T, Ito H, Arioka Y, Ogiso H, Seishima M. Combination therapy with α -galactosylceramide and a Toll-like receptor agonist exerts an augmented suppressive effect on lung tumor metastasis in a mouse model. *Oncol Rep.* 33(2):826-32. 2015.

10. Ito H, Ando T, Arioka Y, Saito K, Seishima M. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity enhances the anti-tumour effects of a Toll-like receptor 7 agonist in an established cancer model. *Immunology.* 144(4):621-30. 2015.

11. Fukuno K, Hara T, Tsurumi H, Shibata Y, Mabuchi R, Nakamura N, Kitagawa J, Shimizu M, Ito H, Saito K, Moriwaki H. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in leukemic cells indicates an unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *LeukLymphoma.* 56(5):1398-405. 2015.

12. Hoshi M, Osawa Y, Ito H, Ohtaki H, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Saito K, Seishima M. Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase reduces mortality from peritonitis and sepsis in mice by regulating functions of CD11b+ peritoneal cells. *Infect Immun.* 82(11):4487-95. 2014.

13. Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T, Hoshi M, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. Kynurenine production mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase aggravates liver injury in HBV-specific CTL-induced fulminant hepatitis. *Biochim Biophys Acta.* 1842(9):1464-71. 2014.

14. Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M. Induction of HBsAg-specific cytotoxic T lymphocytes can be up-regulated by the inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Immunology.* 142(4):614-23. 2014.

15. Nagano J, Shimizu M, Hara T, Shirakami Y, Kochi T, Nakamura N, Ohtaki H, Ito H, Tanaka T, Tsurumi H, Saito K, Seishima M, Moriwaki H. Effects of indoleamine 2,3-dioxygenase deficiency on high-fat diet-induced hepatic inflammation. *PLoS One.* 8(9):e73404. 2013.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、長良川国際会議場、岐阜県岐阜市、2015.11.19-21.
Toll 様受容体アゴニストと一酸化窒素合成酵素の抑制を用いた

抗腫瘍効果の検討

伊藤弘康、安藤達也、小木曾英介、清島 満
2. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、長良川国際会議場、岐阜県岐阜市、2015.11.19-21.

インドールアミン酸素添加酵素による肝線維化進展の制御

小木曾英介、伊藤弘康、安藤達也、清島 満
3. JDDW 2014 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸国際会議場、兵庫県神戸市、2014.10.24.
肝線維化進展におけるインドールアミン酸素添加酵素の役割

小木曾英介、伊藤弘康、安藤量基、石川哲也、森脇久隆、清島 満

4. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、福岡国際会議場、福岡県博多市、2014.11.22-25.

NKT 細胞の活性化と Toll 様受容体アゴニストを用いた肺転移に対する新規免疫療法の開発

安藤達也、伊藤弘康、有岡祐子、清島 満

5. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、福岡国際会議場、福岡県博多市、2014.11.22-25.

皮膚創傷治癒におけるインドールアミン酸素添加酵素の解析

伊藤弘康、安藤達也、有岡祐子、清島 満

6. 第 40 回日本肝臓学会西部会、長良川国際会議場、岐阜県岐阜市、2013.12.6

インドールアミン酸素添加酵素の発現抑制による HBV 特異的細胞障害性 T 細胞誘導効果
伊藤弘康、安藤量基、石川哲也、森脇久隆、清島 満

7. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会、神戸国際会議場、兵庫県神戸市、2013.11.1

インドールアミン酸素添加酵素の発現抑制を用いた HBV 特異的細胞障害性 T 細胞誘導効果の検討

伊藤弘康、安藤達也、石川哲也、清島 満

8. 第 49 回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、東京都新宿区、2013.6.7

マウス B 型急性肝炎モデルにおけるインドールアミン酸素添加酵素の役割

伊藤弘康、大瀧博文、安藤達也、安藤量基、石川哲也、森脇久隆、清島 満

9. 第 53 回日本臨床化学会、あわぎんホール、徳島県徳島市、2013.8.31

Toll 様受容体アゴニストとインドールアミン酸素添加酵素制御を用いた抗腫瘍効果の検討

伊藤弘康、安藤達也、清島 満

〔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

伊藤 弘康 (ITO, Hiroyasu)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80373075

(2) 研究分担者

清島 満 (SEISHIMA, Mitsuru)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10171315

白上 洋平 (SHIRAKAMI, Yohei)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50632816