

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 30 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462607

研究課題名(和文) 免疫抑制状態を解除する抗腫瘍エフェクター細胞の構築と卵巣癌免疫療法への応用

研究課題名(英文) Establishment of anti-tumor effector cells that cancel immune-suppressive status and application for immunotherapy for ovarian cancer

研究代表者

鈴木 元晴 (SUZUKI, MOTOHARU)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：50406443

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)：ヒトインバリアントNKT (iNKT) 細胞は、alpha-GalCerを負荷した樹状細胞 (DC) におけるIL-27産生を促進した。また、iNKT細胞由来のIFN-gammaがIL-27産生に重要な役割を演じることを明らかにした。iNKT細胞はDC機能を修飾してIL-27産生を促進することで、がん免疫応答に促進的に作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the role of human iNKT cells in the regulation of dendritic cells (DCs) function. The activation of iNKT cells by their specific ligand alpha-galactosylceramide enhanced the IL-27 production by DCs. The up-regulation of IL-27 is associated with a production of IFN-gamma from iNKT cells. These findings indicate that iNKT cells modify the DC function to enhance the IL-27 that promotes the cell-mediated anti-tumor immune responses.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣がん 免疫

1. 研究開始当初の背景

NKT 細胞を活性化すると「がん」の進行が抑制されることが知られている。この効果は、主に NKT 細胞と樹状細胞 (DC) の相互作用によって誘導される IL-12 が重要であり、これの下流で細胞傷害性 T 細胞 (CTL) やナチュラルキラー (NK) 細胞が活性化することによるものと考えられてきた。しかしながら、NKT 細胞の活性化によって得られる抗腫瘍効果は極めて強力であり、他の因子が関与する可能性が示唆されてきた。卵巣癌組織は、炎症状態にあり、細胞性免疫応答が著しく抑制されている。NKT 細胞機能を応用して、免疫抑制状態を解除できれば、予後不良の卵巣癌患者の生命予後を改善することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究課題は、NKT 細胞のアジュバント効果を詳細に解析し、「卵巣癌」に認められる免疫抑制状態を解除しうる新たな作用点を探索する。これを用いて免疫抑制機構を解除するとともに細胞性免疫応答を惹起する新たな免疫療法を開発することを目的とする。

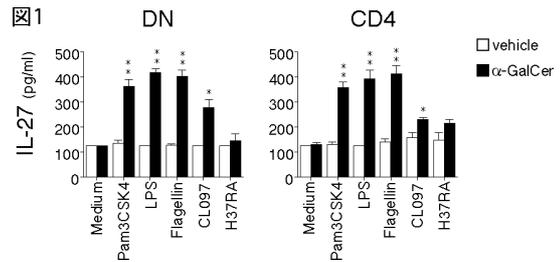
3. 研究の方法

- (1) 健常人末梢血単核球を α -galactosylceramide (α -GalCer) にて刺激して α -GalCer 特異的ヒトインバリエント NKT (iNKT) 細胞の増殖を誘導した。高速自動セルソーターを使用して、V 24+V 11+6B11+ ヒト iNKT 細胞を精製分離し、7-9 日おきに複数回刺激することで株化した。さらにヒト iNKT 細胞の 2 つの代表的なサブセット、 $CD4^+CD8\beta^-$ (DN: double negative) と $CD4^+CD8\beta^+$ (CD4) をセルソーターにて分離した。
- (2) DC と iNKT 細胞の相互作用を解析することを目的に、末梢血単核球より CD14 陽性細胞を磁気分離して、ヒトリコンビナント IL-4 および GM-CSF を添加することで、モノサイト由来 DC を誘導した。これと iNKT 細胞との共培養を行い、DC における炎症性サイトカイン産生性を ELISA 法、リアルタイム PCR 法にて評価した。
- (3) iNKT 細胞由来の液性因子が IL-27 産生制御に関与する可能性の検証は、LPS 刺激 DC あるいは CD40L 遺伝子を導入した線維芽細胞と DC との共培養系により評価した。
- (4) iNKT 細胞が産生する候補液性因子は、フローサイトメトリーベースのマル

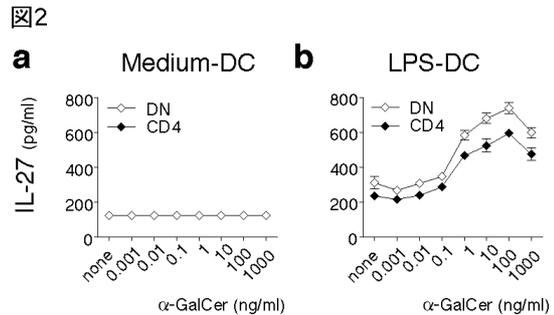
チプレックスアッセイにより決定した。これらに対する中和抗体、リコンビナントサイトカインを用いた評価系によって IL-27 産生制御における責任液性因子を同定した。

4. 研究成果

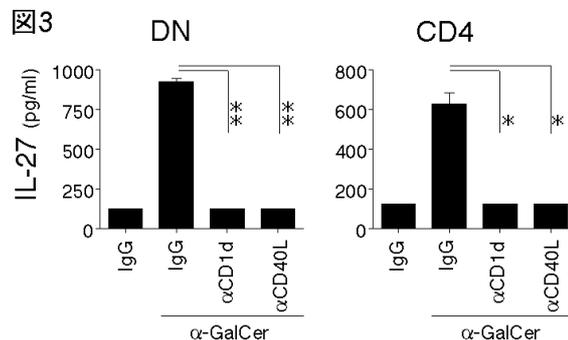
- (1) 活性化 iNKT 細胞は、Toll 様受容体刺激した成熟 DC の IL-27 産生を促進した (図 1)。



- (2) IL-27 産生の上昇は、 α -GalCer 濃度依存性であり、この現象は、未成熟 DC を用いた場合には観察されなかった (図 2)。

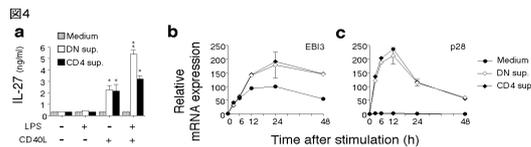


- (3) 抗 CD1d 抗体、抗 CD40L 抗体を用いた阻害試験により、CD40L が IL-27 産生上昇に関与することが示唆された (図 3)。



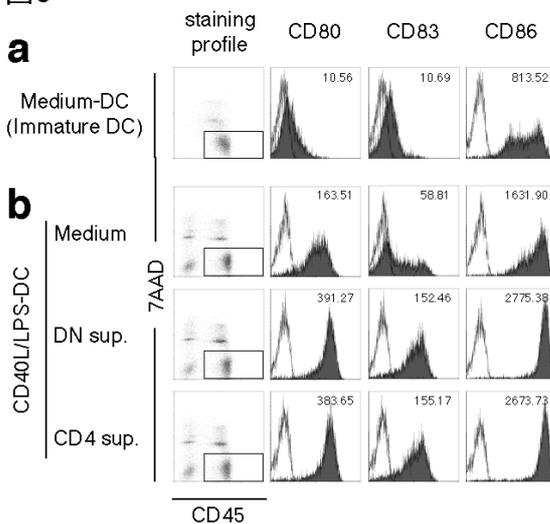
- (4) DC に抗 CD3 抗体刺激した iNKT 細胞の培養上清を添加したところ IL-27 産生が上昇したため、培養上清中に IL-27 促進因子分子が存在

することが示唆された(図4)。遺伝子発現解析により、iNKT細胞の液性因子は、IL-27を構成する2つの分子、EBI3およびp28の遺伝子上昇を誘導することが明らかとなった。



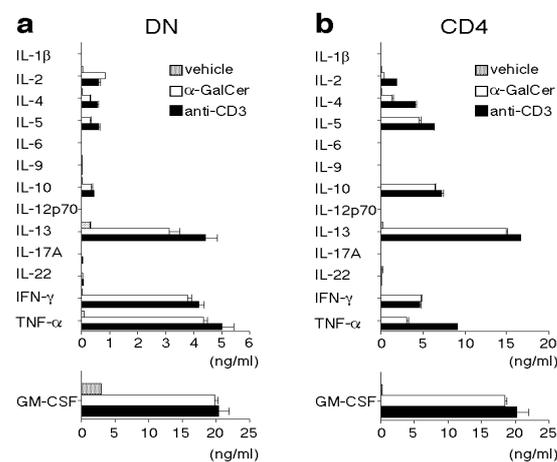
(5) iNKT細胞の液性因子は、DCにおけるCD80, CD83, CD86分子の上昇を促進することが明らかとなった(図5)。

図5



(6) iNKT細胞の液性因子は、IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSFを含むことが分かった(図6)。

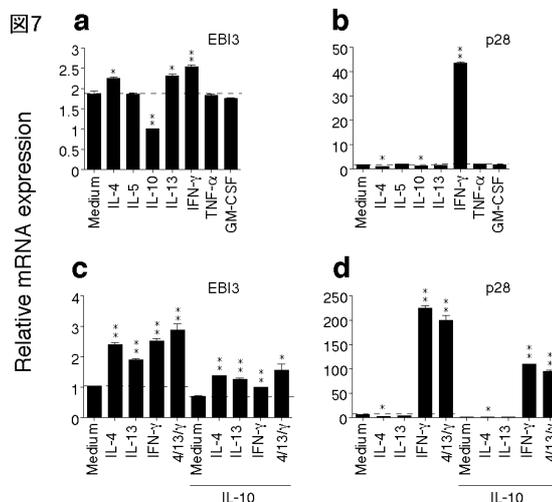
図6



(7) iNKT細胞由来の候補サイトカインのリコンビナントサイトカインを用いた解析により、EBI3上昇にはIL-4, IL-13, IFN- γ が重要であ

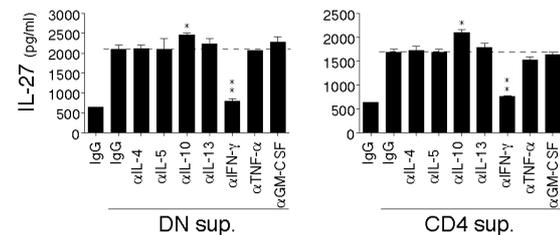
り、p28上昇には、IFN- γ が重要であることが明らかになった(図7)。

図7



(8) 中和抗体を用いた解析により、IL-10がIL-27産生に抑制的であること、IFN- γ が促進的に作用することが明らかになった。また、この観察は遺伝子発現レベルで制御されていることが明らかになった。

図8



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7件)

(1) Zhang R, Liu TY, Senju S, Haruta M, Hirose N, Suzuki M, Tatsumi M, Ueda N, Maki H, Nakatsuka R, Matsuoka Y, Sasaki Y, Tsuzuki S, Nakanishi H, Araki R, Abe M, Akatsuka Y, Sakamoto Y, Sonoda Y, Nishimura Y, Kuzushima K, Uemura Y.

Generation of mouse pluripotent stem cell-derived proliferating myeloid cells as an unlimited source of functional antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Res.* 3(6): 668-77, 2015 (査読あり)

doi: 10.1158/2326-6066

(2) 岡垣竜吾、新澤 麗、仲神宏子、木村真智

子、鈴木元晴、難波 聡、三木明德、梶原健、石原 理、永田一郎
当院における 3 種類の腔閉鎖術の比較検討 日本女性骨盤底医学会誌 12(1): 151-4, 2015 (査読なし)

- (3) 新澤 麗、三木明德、難波 聡、鈴木元晴、亀井良政、石原 理、板倉敦夫
当科で経験した精神疾患合併妊娠の母体・新生児予後と地域医療における役割分担について
埼玉産科婦人科学会雑誌 44(2): 154-8, 2014 (査読なし)
- (4) 新澤 麗、岡垣竜吾、鈴木元晴、亀井良政、荒木隆一郎、永田一郎、石原 理
骨盤臓器脱(POP)患者を対象とした、FRAX 問診票による骨粗鬆症性骨折リスク評価
埼玉県医学会雑誌 49(1): 327-30, 2014 (査読なし)
- (5) 瀬戸さち恵、岡垣竜吾、鈴木元晴、菊地真理子、三木明德、荒木隆一郎、板倉敦夫、石原 理
産科異常出血例における凝固異常の発生
日本産婦人科・新生児血液学会誌 23(2): 81-8, 2014 (査読なし)
- (6) 張エイ、劉天懿、鈴木元晴、廣澤成美、坂本安、葛島清隆、植村靖史
iNKT 細胞と樹状細胞の相互作用による IL-27/osteopontin 産生制御
臨床免疫・アレルギー科 61(2): 158-63, 2014 (査読なし)
- (7) 岡垣竜吾、木村真智子、西林 学、菊地真理子、鈴木元晴、難波 聡、三木明德、梶原 健、石原 理、永田一郎
当院における TVM 手術後の再発・合併症：導入後 3 年間とその後 2 年間の成績の比較
日本女性骨盤底医学会誌 10(1):187-91, 2013 (査読なし)

〔学会発表〕(計 22 件)

- (1) Seto S, Okagaki R, Suzuki M, Kajihara T, Kamei Y, Ishihara O A case of heterotopic pregnancy due to clomiphene with live birth IFFS/JSRM 2015 (PACIFICO Yokohama / Yokohama) 2015.4.25-29
- (2) 新澤 麗、仲神宏子、佐藤加寿子、田丸俊輔、木村真智子、鈴木元晴、難波 聡、三木明德、亀井良政、石原 理、永田一郎、岡垣竜吾 骨盤臓器脱手術の中長期成績：術式別解剖学的再発率および追加手術率の比較検討
第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会

(パシフィコ横浜 / 横浜市)
2015.4.9-12

- (3) 鷹野夏子、三木明德、仲神宏子、佐藤加寿子、鈴木元晴、難波 聡、梶原 健、岡垣竜吾、亀井良政、石原 理 母体搬送切迫早産症例における tocolysis 中止後の分娩転帰に関する後方視的研究
第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 (パシフィコ横浜 / 横浜市) 2015.4.9-12
- (4) 鈴木裕之、三木明德、水上順智、栃木秀乃、仲神宏子、鈴木元晴、難波 聡、梶原健、岡垣竜吾、亀井良政、石原 理 異なる経過をたどった先天性横隔膜ヘルニアの 2 例
第 129 回関東連合産科婦人科学会総会・学術集会(日本都市センターホテル / 東京都) 2015.6.20-21
- (5) 仲神宏子、三木明德、佐藤加寿子、木村真智子、鈴木元晴、難波 聡、岡垣竜吾、亀井良政、石原 理 前置胎盤と多胎妊娠における輸血の実施と自己血の必要性についての検討
第 51 回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会(ヒルトン福岡シーホーク / 福岡市) 2015.7.10-12
- (6) 鷹野夏子、三木明德、新澤 麗、仲神宏子、佐藤加寿子、鈴木元晴、難波 聡、亀井良政、石原 理 妊娠 35 週まで妊娠継続できた切迫早産症例の Tocolysis 終了後分娩までの期間及び新生児予後に関する検討
第 51 回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会(ヒルトン福岡シーホーク / 福岡市) 2015.7.10-12
- (7) 秋山絵里子、三木明德、仲神宏子、佐藤加寿子、難波 聡、鈴木元晴、亀井良政、石原 理 妊娠高血圧(PIH)症例におけるターミネーション理由と新生児予後
第 51 回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会(ヒルトン福岡シーホーク / 福岡市) 2015.7.10-12
- (8) 湊口美紀、三木明德、瀬戸さち恵、鈴木元晴、難波 聡、亀井良政、板倉敦夫、石原 理
妊婦全血貯血式自己血による凝固因子補充の有用性 妊婦自己血貯血中の凝固因子活性の推移
第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 (東京国際フォーラム / 東京都) 2014.4.18-20
- (9) 瀬戸さち恵、岡垣竜吾、鈴木元晴、三木明德、板倉敦夫、亀井良政、石原 理

- 産科 DIC に対する乾燥ヒトフィブリノゲン製剤の投与：低フィブリノゲン血症が遷延し追加投与を行った例の検討
第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会（東京国際フォーラム / 東京都）
2014.4.18-20
- (10) 鷹野夏子、三木明德、鈴木元晴、難波 聡、板倉敦夫、亀井良政、石原 理
化学的検査法によって診断された Preterm PROM の予後
第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会（東京国際フォーラム / 東京都）
2014.4.18-20
- (11) 瀬戸さち恵、岡垣竜吾、鈴木元晴、三木明德、板倉敦夫、亀井良政、石原 理
当院で作成した、産科 DIC に対する輸血プロトコルの有効性 - PT%と血漿フィブリノゲン値に基づいた乾燥ヒトフィブリノゲンおよび FFP 投与法 -
第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会（ワークピア横浜 / 横浜市）
2014.6.13-14
- (12) 瀬戸さち恵、鈴木元晴、梶原 健、岡垣竜吾、亀井良政、石原 理
子宮内外同時妊娠で生児を得た一例
第 86 回埼玉産科婦人科学会・埼玉県産婦人科医会平成 26 年度後期学術集会（埼玉県県民健康センター / さいたま市）
2014.11.8
- (13) 岡垣竜吾、西林 学、菊地真理子、木村真智子、鈴木元晴、難波 聡、三木明德、梶原 健、永田一郎、石原 理
高齢女性における骨盤臓器脱治療の選択
80 歳以上の手術症例の解析
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会（ロイトン札幌 / 札幌市） 2013.5.10-12
- (14) 梶原 健、菊地真理子、鈴木元晴、岡垣竜吾、板倉敦夫、石原 理
フィブリンゲル 3 次元培養システムを用いた子宮内膜症 in vitro モデルの超微形態学的研究とその応用
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会（ロイトン札幌 / 札幌市）
2013.5.10-12
- (15) 仲神宏子、梶原 健、木村真智子、瀬戸さち恵、鈴木元晴、三木明德、岡垣竜吾、板倉敦夫、石原 理
子宮底部横切開による帝王切開で羊水塞栓症を発症した 1 例
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会（ロイトン札幌 / 札幌市）
2013.5.10-12
- (16) 瀬戸さち恵、岡垣竜吾、鈴木元晴、菊地真理子、三木明德、板倉敦夫、石原 理
当院で作成した、産科 DIC に対する輸血プロトコルの有用性：PT%と血漿フィブリノゲン値に基づいた乾燥フィブリノゲンおよび FFP 投与法
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会（ロイトン札幌 / 札幌市）
2013.5.10-12
- (17) 神垣多希、岡垣竜吾、三木明德、古郷有佳子、菊地真理子、高橋幸子、木村真智子、鈴木元晴、難波 聡、梶原 健、石原 理、板倉敦夫
低置胎盤の分娩方式 - 胎盤と内子宮口の距離が 10-20mm の場合、経膈分娩を試みるべきか
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会（ロイトン札幌 / 札幌市）
2013.5.10-12
- (18) 三木明德、仲神宏子、佐藤加寿子、木村真智子、新澤 麗、鈴木元晴、難波 聡、亀井良政、板倉敦夫、石原 理
自己血貯血量増加のために EPO 製剤投与を考慮すべき妊婦について
第 49 回日本周産期・新生児医学会（パンフィコ横浜 / 横浜市） 2013.7.14-16
- (19) 佐藤加寿子、三木明德、仲神宏子、木村真智子、新澤 麗、鈴木元晴、難波 聡、亀井良政、板倉敦夫、石原 理
破水後に痙攣発作にて発症した臨床的羊水塞栓症の一例
第 49 回日本周産期・新生児医学会（パンフィコ横浜 / 横浜市） 2013.7.14-16
- (20) 仲神宏子、三木明德、佐藤加寿子、新澤 麗、木村真智子、難波 聡、鈴木元晴、亀井良政、板倉敦夫、石原 理
当院における自己血貯血の現状と高い自己血廃棄率に関する考察
第 49 回日本周産期・新生児医学会（パンフィコ横浜 / 横浜市） 2013.7.14-16
- (21) 水上順智、梶原 健、鈴木元晴、亀井良政、石原 理、板倉敦夫、小野 啓、栗原 進
当院での妊娠糖尿病 OGTT1 点異常での管理と予後
第 37 回日本産科婦人科栄養・代謝研究会（防衛医科大学校 / さいたま市）
2013.8.29-30
- (22) 新澤 麗、三木明德、相馬廣明、鈴木元晴、難波 聡、亀井良政、石原 理、村井則子、田中嘉代子、小黑辰夫、藤田浩司、峯尾松一郎
2013 年度 臍帯一動脈欠損（SUA）例の急増に対する考察

第 21 回日本胎盤学会学術集会(ウインク
あいち / 名古屋市) 2013.10.25-26

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 元晴 (SUZUKI MOTOHARU)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 50406443