

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830117

研究課題名(和文) 制御性T細胞の細胞遊走制御による免疫抑制解除の基盤研究

研究課題名(英文) anti-tumor effect mediated the inhibition of regulatory T cell migration

## 研究代表者

榮川 伸吾 (Eikawa, Shingo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40635265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、制御性T細胞(Treg)の腫瘍局所の集積阻害による免疫抑制解除についての研究を行った。先行研究から、腫瘍局所ではIL-6、IL-8が強く産生されること、CD4陽性T細胞をIL-6存在下で培養すると、Foxp3陽性TregにおいてIL-8レセプターA(CXCR1)が非常に強く発現することがわかっている。以上のことは、腫瘍局所では両サイトカインによりTregが集積すること、および両因子を制御することで免疫抑制が解除できることを示唆するものである。本研究課題では、IL-8の走化性を制御するペプチドを用いたTreg遊走阻害が免疫抑制解除につながるかどうか検討した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether the regulation of Treg migration and accumulation into tumor tissues leads to reduce tumor growth using a peptide which blocks chemoattractants of IL-8. We previously reported rather high production of IL-8 in all tumors and IL-6 in one lung cancer, the malignant mesothelioma, and the malignant melanoma and observed enrichment of Foxp3+ CD4 Tregs in migrated T cells to both IL-6- and IL-8- producing tumors. Marked induction of CXCR1 expression on Foxp3+ CD4 Tregs by IL-6 followed by IL-8-mediated migration appeared to be responsible for enriched migration.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：制御性T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞は、CD4 陽性 T 細胞サブセットの一つであり、forkhead box p3 (Foxp3) という抑制性転写因子を発現し、免疫抑制能を有している。Treg は様々な自己免疫疾患に関与しており (Sakaguchi et al. J Immunol. 1995)、腫瘍の増大にも関与している (Onizuka et al. Cancer Res. 1999)。また、末梢血中の Treg の割合の上昇とともに抗腫瘍免疫応答の低下が起こり、腫瘍が増大した報告もあることから (Isobe et al. Cancer Immun. 2009)、がん患者自身の Treg の抑制機能と腫瘍の増大との因果関係は明らかである。我々は、がん患者検体の解析結果から、腫瘍局所では、高濃度の IL-6、IL-8 が検出され、局所に浸潤した Treg の割合が多いこと (Tsuji et al. Cancer Immunol. Immunother. 2008)、またヒト CD4 陽性 T 細胞を IL-6 存在下で培養すると Foxp3 陽性 Treg においてのみ IL-8 のレセプターである CXCR1 が強発現することを報告した (Eikawa et al. J Immunol. 2010)。以上より、この機構を使い Treg が腫瘍局所に集積することが予想される。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、これまでの予備的結果を元に、前述のペプチド(マウス CXCR1 ペプチド)が腫瘍局所の免疫抑制環境を解除できるかどうかをマウス腫瘍モデルで明らかにする。研究期間内には以下のことを解明する。

- 1) ペプチド投与後の腫瘍の増大を観察し、ペプチドによる腫瘍縮小効果を確認する。
- 2) ペプチド投与によって、腫瘍内の Treg の割合が減少するかどうかを明らかにする。
- 3) ペプチド投与によって、抗腫瘍応答を担う CD8 および CD4 陽性エフェクター T 細胞の割合が上昇するかどうかを明らかにする。
- 4) ペプチド投与後にマウス腫瘍が発現しているがん抗原に対して特異的な免疫応答が誘導されているかどうかを明らかにする。
- 5) ペプチド投与とマウス腫瘍細胞に発現するがん抗原のワクチンとの併用による抗腫瘍応答増強効果を検討する。

以上、IL-8 をケモカイン結合ペプチドにより阻害することで Treg の腫瘍組織集積を阻害し、腫瘍局所の免疫抑制環境が解除につながるかどうかをマウス腫瘍移植モデルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) マウス CXCR1 ペプチドによる腫瘍局所の Treg 集積阻害  
この項目では、マウス CXCR1 ペプチドの投与条件を担がんマウスを用いて決定した。また、マウス CXCR1 ペプチドを投与することによ

り腫瘍浸潤リンパ球(TIL)中の Treg の割合が減少するかどうかを明らかにした。

ペプチドの投与量、投与時期の決定(平成 25 年度)

マウス白血病細胞株 RLmale1 を用いた。RLmale1 は、抗 CD25(Treg に発現する IL-2R) 抗体 PC61 を投与することで拒絶できる腫瘍細胞株である (Onizuka et al. Cancer Res. 1999)。これは RLmale1 が in vivo において Treg 依存的に増殖することを示唆するものである。RLmale1 2x10<sup>5</sup> 個を BALB/c マウスに皮内接種し、マウス CXCR1 ペプチド投与群とコントロールペプチド投与群で腫瘍の増殖を比較した。in vitro の細胞遊走試験より効果的な投与濃度を予測し、0.25 mg/kg または 2.5 mg/kg でペプチド投与した予備的な実験では腫瘍の抑制効果が観察されている。本項目では、さらにペプチド投与量を検討し、効果範囲を決定した。将来、ヒトに対して臨床応用する際に重要な基礎データになると考えられる。これら投与量の検討を踏まえて、投与回数、投与時期、投与経路の詳細を決定する。

決定した投与条件で複数のマウス腫瘍細胞株を用いた腫瘍縮小効果の検討(平成 25 年度)

で決定した条件下で、マウス白血病細胞株 RLmale1、RLfemale8、線維肉腫細胞株 MethA、CMS17、骨髄腫細胞株 MOPC-70A を用いて、ペプチド投与による腫瘍縮小効果を観察した。RLmale1、MethA、CMS17、MOPC-70A は PC61 投与で拒絶でき、RLfemale8 は拒絶できない腫瘍細胞株である。それぞれについてマウス CXCR1 ペプチド投与群、コントロールペプチド投与群で腫瘍増殖を比較し、腫瘍縮小効果を検討した。さらに本項目の結果より、IL-8(マウスでは MIP-2)が媒介する Treg の腫瘍局所集積が普遍的な現象であることを明らかにした。

決定した投与条件下で TIL 中の Treg の割合が減少するかを検討する(平成 25 年度)  
RLmale1 2x10<sup>5</sup> 個を BALB/c マウスに皮内に接種し、マウス CXCR1 ペプチド投与する。マウス CXCR1 ペプチド投与ごとに、形成された RLmale1 腫瘍を切除し、フローサイトメーター前処理装置により TIL を回収する。回収された TIL について FACSCantoII により Foxp3+ Treg の割合を測定する。マウス白血病細胞株 RLmale1 を用い、腫瘍移植担癌マウスモデルを作製した。マウス CXCR1 ペプチドを用い、担癌マウスを治療し、治療経過毎に腫瘍組織を回収し、腫瘍内 Treg および CD8T 細胞の動態を観察した。既存の免疫療法、特にがんワクチンと同ペプチドの併用により、治療効果が向上されるかどうかを検討した。

## (2) 腫瘍局所の Treg 集積阻害による抗腫瘍免疫応答の増強効果

この項目では、前年度のマウス CXCR1 ペプチドによる腫瘍局所の Treg 集積阻害効果を踏まえて、腫瘍局所の抗腫瘍免疫応答の増強効果を明らかにした。

### 免疫不全マウス(SCID)を用いた腫瘍縮小効果の検討(平成26年度)

RLmale1 2x10<sup>5</sup> 個を BALB/c マウスおよび SCID マウスに皮内に接種し、マウス CXCR1 ペプチドまたはコントロールペプチド投与した。投与後、腫瘍の増大を観察し、BALB/c マウス群および SCID マウス群で比較した。これによりペプチド投与による腫瘍拒絶における免疫細胞の関与を明らかにした。

### 腫瘍局所のエフェクターCD8 および CD4 T 細胞の割合(平成26年度)

RLmale1 2x10<sup>5</sup> 個を BALB/c マウスに皮内に接種し、マウス CXCR1 ペプチド投与する。マウス CXCR1 ペプチド投与ごとに、形成された RLmale1 腫瘍を切除し、フローサイトメーター前処理装置により TIL を回収した。回収された TIL について FACSCantoII により CD8 および CD4 T 細胞の割合を測定し、さらに T 細胞における活性化分子の発現を解析した。解析結果から、ペプチド投与により抗腫瘍免疫応答が誘導されているかを明らかにした。

### 既知抗原に対する特異的免疫応答の検出(平成26年度)

RLmale1 は原がん遺伝子 Akt を発現し、BALB/c マウスのキラーCD8 T 細胞は MHC クラス I に提示された Akt 抗原内のペプチド pRL1a(IPGLPLSL)を認識し、腫瘍を拒絶する(Uenaka et al. JEM. 1994)。マウス CXCR1 ペプチド投与後に、pRL1a に対するキラーCD8 T 細胞の特異的免疫応答が増強されているかどうかを細胞内サイトカインの染色により明らかにした。RLmale1 2x10<sup>5</sup> 個を BALB/c マウスに皮内に接種し、マウス CXCR1 ペプチド投与した。マウス CXCR1 ペプチド投与マウスおよびコントロールペプチド投与マウスそれぞれから脾臓細胞および TIL を回収し CD8 T 細胞を精製単離した。in vitro で pRL1a+ 抗原提示細胞により刺激培養し、サイトカインの細胞内染色を行い、がん抗原特異的応答を検出した。

## (3) マウス CXCR1 ペプチドとがんワクチンとの併用効果の検討

この項目では、マウス CXCR1 ペプチドによる Treg の腫瘍局所集積阻害効果と使用するマウス腫瘍細胞株に発現する癌抗原タンパク由来のペプチドワクチンによる免疫増強効果により、さらなる抗腫瘍作用が得られるかどうかを検討した。

CXCR1 ペプチドとマウス腫瘍細胞株に発現するがん抗原タンパク由来のペプチドワクチンとの併用効果の検討(平成27年度)

平成26年度計画に示してあるように、RLmale1 は原がん遺伝子 Akt を発現し、BALB/c マウスのキラーCD8 T 細胞は MHC クラス I に提示された Akt 抗原内のペプチド pRL1a(IPGLPLSL)を認識し、腫瘍を拒絶する。BALB/c マウスにおいて pRL1a ペプチドワクチンモデルを構築し、マウス CXCR1 ペプチドとの併用効果を検討した。RLmale1 2x10<sup>5</sup> 個を BALB/c マウスに皮内に接種し、マウス CXCR1 ペプチド投与時に pRL1a をワクチン投与した。ワクチン未接種群および接種群で腫瘍径を測定し、CXCR1 ペプチドによる Treg の腫瘍局所集積阻害効果との相乗作用を観察した。腫瘍縮小効果が認められれば、既存のがんワクチンとの併用療法に活かすことができると考えられる。

## 4. 研究成果

平成25年、CXCR1 ペプチドの腫瘍抑制効果が、腫瘍組織に浸潤する Treg の減少によるものであるという結果が得られた。

平成26年、CXCR1 ペプチド投与によりがん高原特異的 CD8T 細胞応答の誘導が観察された。平成27年、CXCR1 ペプチドとがんワクチンの併用療法の治療効果を検討し、併用により治療効果の増大が認められた。

## 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 0 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 0 件)

該当なし

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴川 伸吾(EIKAWA, Shingo)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40635265

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし