



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

無細胞蛋白発現系を用いたプロテオミクス時代の膠細胞腫瘍免疫治療法の開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): IL-2, IL-15, TNFRスーパーファミリー, 腫瘍内浸潤リンパ球, 無細胞蛋白発現, マウス キーワード (En): 作成者: 齊尾, 征直, 高見, 剛, 大江, 直行 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2789

目次

1. くはしがき
2. 研究組織
3. 交付決定額
4. 研究発表
 - (1) 学会誌等
 - (2) 口頭発表
 - (3) 出版物
5. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況
6. 研究成果
 - (1) 平成16年度の申請時研究目的
 - (2) 平成17年度初めの中間報告時研究目的
 - (3) 研究結果と考察
 - 1) 無細胞蛋白発現系の確立と評価
 - 1-1) 大腸菌溶菌液による蛋白の発現と産生
 - 1-2) 小麦胚芽溶菌液系による蛋白の発現・産生と精製
 - 1-3) 無細胞蛋白発現系で得られたサイトカインの生物学的活性の評価
 - 1-4) 無細胞蛋白発現系のまとめと課題
 - 2) サイトカインの腫瘍内浸潤免疫担当細胞活性化・分化の改善効果の検討
 - 2-1) サイトカイン遺伝子導入腫瘍株と作成
 - 2-2) 遺伝子導入腫瘍の生体内での増殖曲線・生存曲線
 - 2-3) 遺伝子導入の果たす生体内でのMHC抗原発現に及ぼす影響
 - 2-4) IL-2の導入とTNF阻害の腫瘍内浸潤T細胞及びマクロファージに及ぼす影響の評価
 - 3) 腫瘍内浸潤T細胞のヒト材料における評価(参考資料)
 - 4) まとめ
 - 5) 論文として報告された内容と今後の予定
7. 付記

1. <はしがき>

本研究は、無細胞蛋白発現系を用いたサイトカインの作成を通して、膠細胞腫瘍モデルの免疫治療を試みたもので、結果的には T 細胞を腫瘍内に誘導する作用は、インターロイキン 2 (IL-2) 単独で治療したときも腫瘍壊死因子 α (TNF) を併せて阻害したときもほぼ同様であったが、腫瘍内浸潤マクロファージの浸潤数は IL-2 を作用させる時に TNF の阻害を併用した方が、著明に減少し幼若となった。今回の研究報告書では、当初の目的である脳免疫特権部位としての特異性の解明等に関する結果のみではなく、腫瘍内でのマクロファージの分化と成熟にも焦点をあて、腫瘍内でのサイトカインの付加と阻害を併用することの意義を考察する。

2. 研究組織

研究代表者：齊尾 征直 (岐阜大学大学院医学系研究科助教授)
 研究分担者：高見 剛 (岐阜大学大学院医学系研究科教授)
 研究分担者：大江 直行 (岐阜大学大学院医学系研究科助手)

3. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	1,300,000	0	1,300,000
平成17年度	2,200,000	0	2,200,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

4. 研究発表

(1) 学会誌等

1. Tamakawa N, **Saio M**, Suwa T, Ohe N, Yoshimura S, Iwama T, Shinoda J, Sakai N, and Takami T: Interleukin-2 activated microglia engulf tumor infiltrating T cells in the central nervous system. *Int J Mol Med* 13: 497-503, 2004.
2. Kijima M, **Saio M**, Ouyang GF, Suwa T, Miyauchi R, Kojima Y, Imai H, Nakagawa J, Nonaka K, Umemura N, Nishimura T, and Takami T: Natural killer cells play a role in MHC class I in vivo induction in tumor cells that are MHC negative in vitro. *Int J Oncol* 26: 679-684, 2005.
3. Suwa T, **Saio M**, Umemura N, Yamashita T, Toida M, Shibata T, and Takami T: Preoperative radiotherapy contributes to induction of proliferative activity of CD8+ tumor-infiltrating T-cells in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 15: 757-763,

2006.

4. Ouyang GF, **Saio M**, Suwa T, Imai H, Nakagawa J, Nonaka K, Umemura N, Kijima M, Takami T: Interleukin-2 augmented activation of tumor associated macrophage plays the main role in MHC class I *in vivo* induction in tumor cells that are MHC negative *in vitro* Int J Oncol 28: 1201-1208, 2006.

(2) 口頭発表

国内

1. 大江直行, 近藤千紘, **齊尾征直**, 中川二郎, 矢野大仁, 高見 剛, 岩間亨, パラフィン切片上でのglioblastoma内浸潤CD8+ T cellにおける増殖活性評価, 第23回日本脳腫瘍学会, 平成17年10月30日~11月1日
2. 野中健一, **齊尾征直**, 今井寿, 天岡望, 高橋孝雄, 長尾成敏, 山口和也, 長田真二, 川口順敬, 杉山保幸, 安達洋祐, 高見剛, 大腸癌肝転移モデルに対するIL-2・可溶性TNF受容体併用療法, 第106回日本外科学会総会, 平成18年3月30日
3. **齊尾 征直**, 諏訪達彦, 欧陽観峰, 高見剛, 腫瘍内浸潤マクロファージの分化と成熟におけるサイトカイン導入効果の検討, 第95回日本病理学会総会, 平成18年5月2日
4. 欧陽観峰, **齊尾 征直**, 高見剛, 腫瘍内浸潤マクロファージの活性化がインターロイキン2導入腫瘍の生体内でのMHCクラスI誘導に果たす役割, 第95回日本病理学会総会, 平成18年5月2日
5. 中川二郎, **齊尾 征直**, 大江直行, 矢野大仁, 吉村紳一, 岩間亨, 高見剛, GL261 マウス膠細胞腫瘍に対するIL-2療法の作用機序の解明, 第24回日本脳腫瘍病理学会, 平成18年6月発表予定

海外

1. Regulation of development and maturation of tumor associated macrophage by cytokine therapy, **Saio M.**, Nonaka K. Suwa T., Ouyang GF., Imai H., Nakagawa J., Umemura N, and Takami T. 11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine 12-14 October, 2006, Creta Maris, Hersonissos, Crete, Greece (発表予定)

(3) 出版物

該当なし

5. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況 該当なし

6. 研究成果

(1) 平成16年度の申請時研究目的

マウス IL-2, IL-15 や腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーの可溶性蛋白を組換え DNA 技術及び、無細胞蛋白発現法で作製・精製する。また、それと平行してマウス膠芽細胞腫瘍 (GL261) の頭蓋内接種モデルの確立と基礎的な腫瘍内浸潤リンパ球の解析、皮下接種系との比較による頭蓋内環境の免疫特権部位としての特異性の検討を行う。

(2) 平成17年度初めの中間報告時研究目的

1) インターロイキン (IL) 2 及び IL-15 の遺伝子の無細胞蛋白発現用ベクターへの組換えと蛋白の産生及び質の評価:

IL-2, IL-15 いずれも無細胞蛋白発現系において、高率に反応液の上清分画に組み換え蛋白が回収でき、蛋白 C 末にヒスチジンタグを付けることで、ニッケルカラムによる高純度な蛋白の精製に成功した。収量は IL-2 において現時点で、120ug を 1ml の反応系から精製できることが分かった。一方、無細胞蛋白発現系では糖鎖の修飾が起こらないが、脾細胞を用いた自作 IL-2 の *in vitro* での投与により、脾細胞の活性化が得られ、自作蛋白が生物活性を持つことが判明した。来年度は、小動物用小型浸透圧ポンプを用いて持続的なインターロイキンの投与系を確立する。一方で、TNFR スーパーファミリーでは、s TNFR II, s Fas の遺伝子の GL261 への遺伝子組換えとクローンの作成が終了しているため、TNF α や Fas リガンドの T 細胞活性化や細胞死誘導への関与の解析に役立てる。

2) GL-261 の皮下及び脳内への接種系の確立と腫瘍内浸潤 T リンパ球の解析: GL261 の脳内及び皮下への接種で、脳内では 1×10^5 個、皮下では 1×10^6 個で腫瘍の生着が全例でみられた。また、腫瘍内浸潤リンパ球 (接種後 12 日目) を磁気ビーズ法で精製し表面マーカーを解析した。いずれも CD8⁺ T リンパ球で活性化抗原の CD25 の陽性率は 5% 以下であり、他の腫瘍 (MCA38 や B16) の場合と同様であった。また、回収細胞数は、GL261 が MHC クラス II 陰性であるにも拘らず腫瘍重量 1g 当たり約 5×10^5 個程度を回収できることが判明した。

よって、17年度は、さらなるリンパ球の解析をサイトカインや可溶性 TNFR スーパーファミリーの有無で検討し、論文執筆と最終年度の報告書作成を行う。

(3) 研究結果と考察

1) 無細胞蛋白発現系の確立と評価

1-1) 大腸菌溶菌液による蛋白の発現と産生

マウスIL-2及びIL-15の全長cDNAを脾細胞からPCR法にて増幅し、pCR2.1クローニングベクターに挿入した。その後、大腸菌での発現を目的に以下のように遺伝子を改変した。(図1)

IL-2

```

CTTTAAGAAGGAGATATACCatggcc agcatg cagctcgcat cctgtgtcac
attgacactt gtgctccttg tcaacagcgc acccacttca agctccactt caagctctac
agcggaaagca cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcacc tggagcagct
gttgatggac ctacaggagc tctgagcag gatggagaat tacaggaacc tgaaactccc
caggatgctc acctcaaat ttacttgcc caagcaggcc acagaattga aagatcttca
gtgcttagaa gatgaacttg gacctctgcg gcatgttctg gatttgactc aaagcaaaag ctttcaattg
gaagatgctg agaatttcat cagcaatata agagtaactg ttgtaaaact aaagggctct
gacaacacat ttgagtgcc aatcgatgat gagtcagcaa ctgtggtgga ctttctgagg
agatggatag ccttctgtca aagcatcatc tcaacaagcc ctcaataaa

```

IL-15

```

CTTTAAGAAGGAGATATACCatggcc a actggataga tgtaagatat gacctggaga
aaattgaaag ccttattcaa tctattcata ttgacaccac ttatacact gacagtgact tcatcccag
ttgcaaagtt actgcaatga actgctttct cctggaattg caggttattt tacatgagta cagtaacatg
actcttaatg aaacagtaag aaacgtgctc taccttgcaa acagcactct gtcttctaac aagaatgtag
cagaatctgg ctgcaaggaa tgtgaggagc tggaggagaa aaccttcaca gagtttttgc
aaagctttat acgcattgtc caaatgttca tcaacacgtc
cCCCGGGGGGGTTCATCATCAtga

```

図1 IL-2 および IL-15 の無細胞蛋白発現系用の遺伝子の設計：オリジナルの成熟 IL-2 及び IL-15 の配列の Open reading frame (ORF) の上流に、大腸菌で発現させるための配列を挿入した。また、挿入した遺伝子下流にヒスチジンの 6mer を挿入してあるベクターにつなぎかえる事を考え、終止コドンは削除した。

無細胞蛋白発現装置 (株式会社) 用大腸菌用蛋白発現ベクター p IVEX にそれぞれの cDNA を組み換えたが、p IVEX ベクターには cDNA の下流に His (ヒスチジン) の 6mer が挿入してあるため、抗 His 抗体で蛋白の検出が可能である。しかし、

産生された蛋白は全て沈殿の分画に存在したため、回収ができず (data not shown), 溶解度の高い蛋白の作成が必要であると判明した。そこで, 高等生物である小麦の胚芽を用いた無細胞蛋白発現系を行い, 翻訳後の修飾による溶解度の改善効果を期待し, 実験系を変更するべきと判断した。

1-2) 小麦胚芽溶菌液系による蛋白の発現・産生と精製

大腸菌などの原核生物は蛋白翻訳後の糖鎖修飾がなく, 蛋白が沈殿しやすい。そこで, 高等植物である小麦の胚芽を用いた無細胞蛋白発現系で試すこととした。各 cDNA を小麦胚芽発現用のロシュ社 p IVEX ベクターに組換え無細胞蛋白発現装置で蛋白を産生させた。

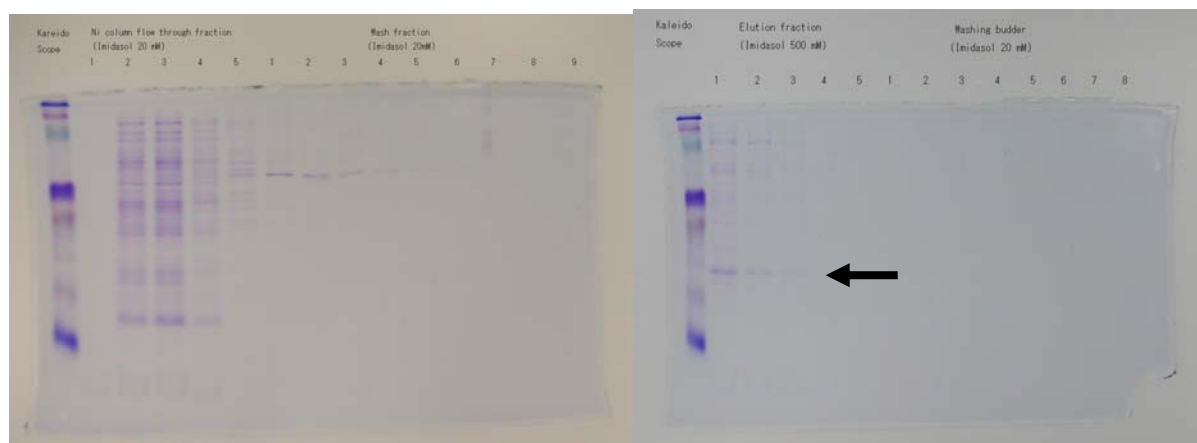
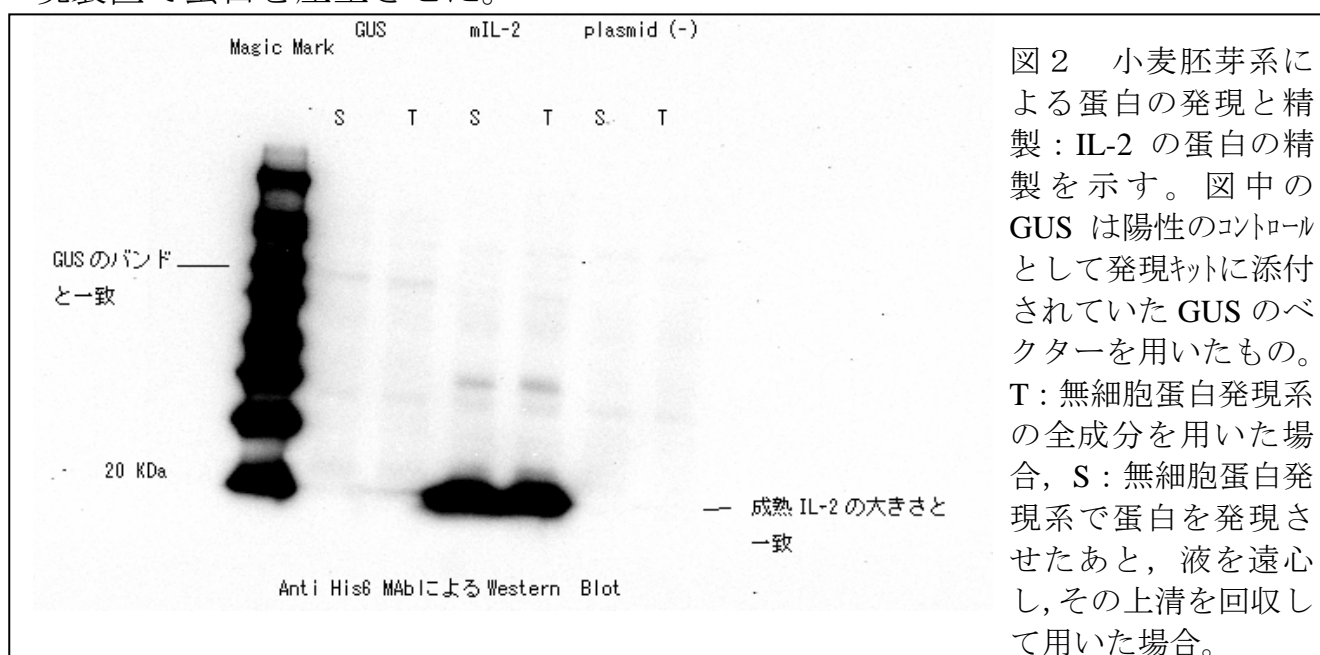


図3 ニッケルカラムによる精製: His tag を付加された IL-2 蛋白の例のクマシーブルーによる全蛋白の染色結果を示す。溶出分画の1~3分画に IL-2 蛋白が溶出されていることが分かる。(図中 Elution fraction 1 ~ 3 の下の方の矢印のバンドが, IL-2。)

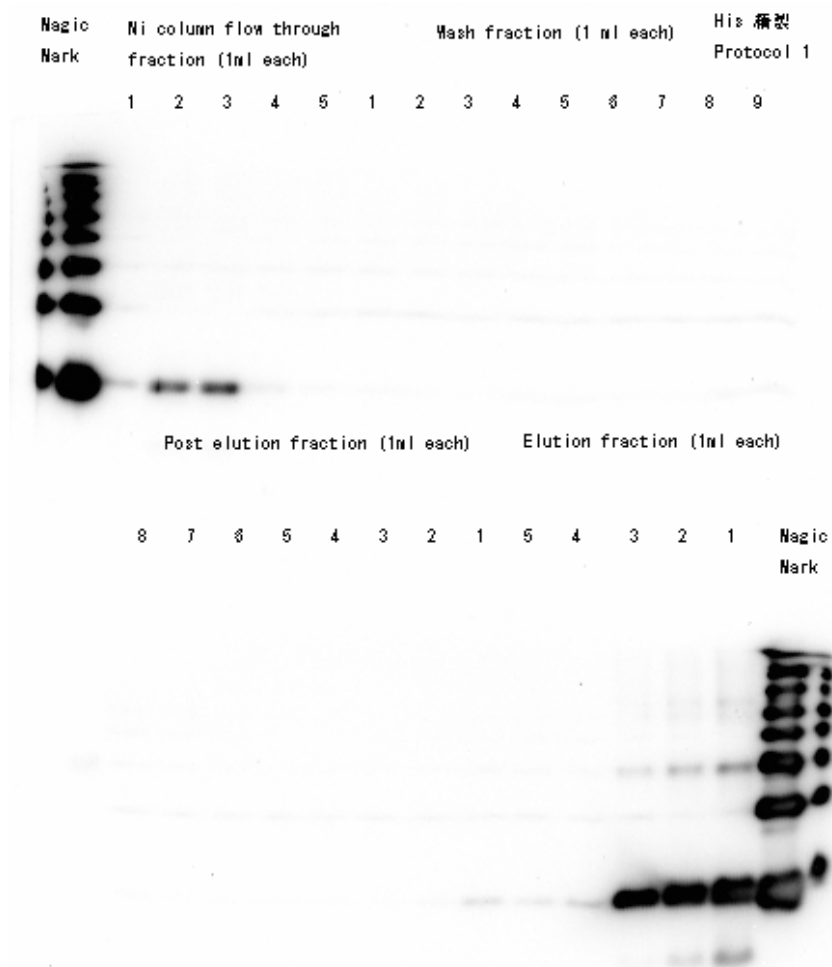


図4 ニッケルカラムを用いた His Tag を付加された IL-2 蛋白の精製。多少カラムに付かず素通りする蛋白があるが、一度カラムと反応した蛋白は、洗浄では遊離せず、溶出段階ですばやくカラムから溶出した。

表1 Ni カラムによるサイトカインの精製と各分画のサイトカイン濃度の ELISA による測定結果

	各 Fraction の IL-2 濃度 (ng/ml)
Ni カラム flow through 1ml 目	(-)
2ml 目	2.372
3ml 目	2.433
4ml 目, 5ml 目	いずれも(-)
Wash 1ml 目~10ml 目	いずれも(-)
Elution 1ml 目	57.565
Elution 2ml 目	27.391
Elution 3ml 目	20.647
Elution 4ml 目	1.987
Elution 5ml 目	1.29
Wash 1ml 目	1.546
2ml 目~10ml 目	いずれも(-)

図2に示すようにサイトカインは小麦胚芽系の無細胞蛋白発現系でほぼ全ての蛋白が上清中に存在した。そこで、上清分画をNiカラムに結合させ、イミダゾールで溶出したところ、**図3, 4**のようにほとんどカラムに結合し、洗浄では遊離せず、溶出分画に大半が回収された。**表1**に示すように各分画約1mlに総量で100 μ g程度のサイトカインが回収可能であった。図にはIL-2を示したが、IL-15でも同様の結果が得られた。つまり、小麦胚芽系は蛋白の沈殿が起こらず天然型のサイトカインの精製が可能であろうと推察された。

1-3) 無細胞蛋白発現系で得られたサイトカインの生物学的活性の評価
 上述の項で得られた結果から、小麦胚芽系無細胞蛋白発現系で得られたIL-2及びIL-15を市販のIL-2とIL-15を陽性コントロールとして用い、脾細胞に添加して脾細胞の活性化が得られるか検討した。

図5, 6には、市販のIL-15と無細胞蛋白発現系(RTS)で作成されたIL-15を用いた脾細胞の刺激の結果を示す。対照群と比べ、市販の組換えIL-15も我々が作成した無細胞蛋白発現系のIL-15もT細胞の増殖を促すが、市販のIL-15(生きた大腸菌で作成した組換えIL-15の方が、リンパ球を刺激する能力が高く、培養上清中に分泌されるIFN γ の量も多いことが分かった。

Recombinant IL-15とRTS IL-15の比較 (脾細胞刺激)

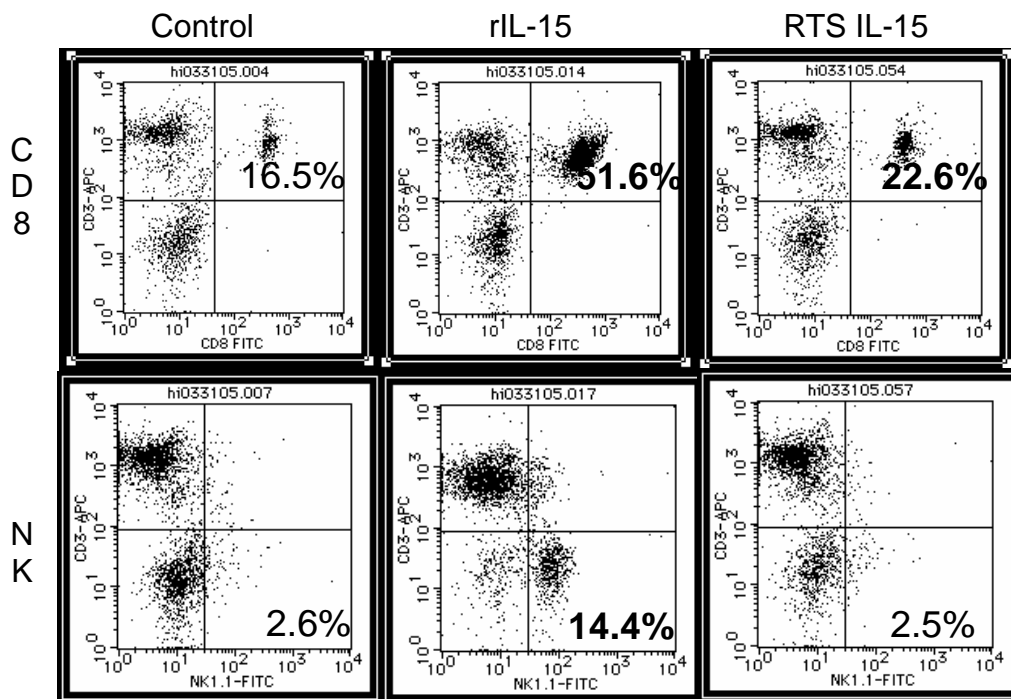


図5 市販の大腸菌由来組換えサイトカインとRTS作成サイトカインの比較：図にはIL-15の場合を載せたが、IL-2の場合もほぼ同様であった。

IL-15で脾細胞刺激後のIFN- γ 産生量

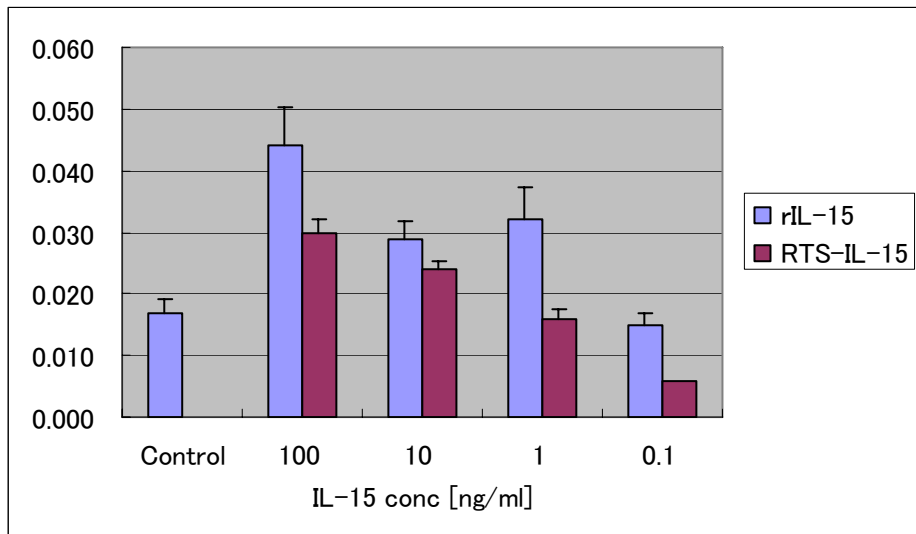


図6 市販の大腸菌由来組換えサイトカインとRTS作成サイトカインの比較:脾細胞を市販の大腸菌由来組換えサイトカインとRTS作成サイトカインで刺激し上清を回収して、IFN γ 濃度を測定した。図にはIL-15の場合を載せたが、IL-2の場合もほぼ同様であった。

また、IL-2とIL-15を比較すると、同一濃度ではIL-15の方がCD8T細胞、NK細胞のいずれも増殖刺激を与える効果が強く、上清中のIFN γ の分泌濃度も高いことが分かった(図7, 8)。

IL-15とIL-2の比較 (脾細胞刺激)

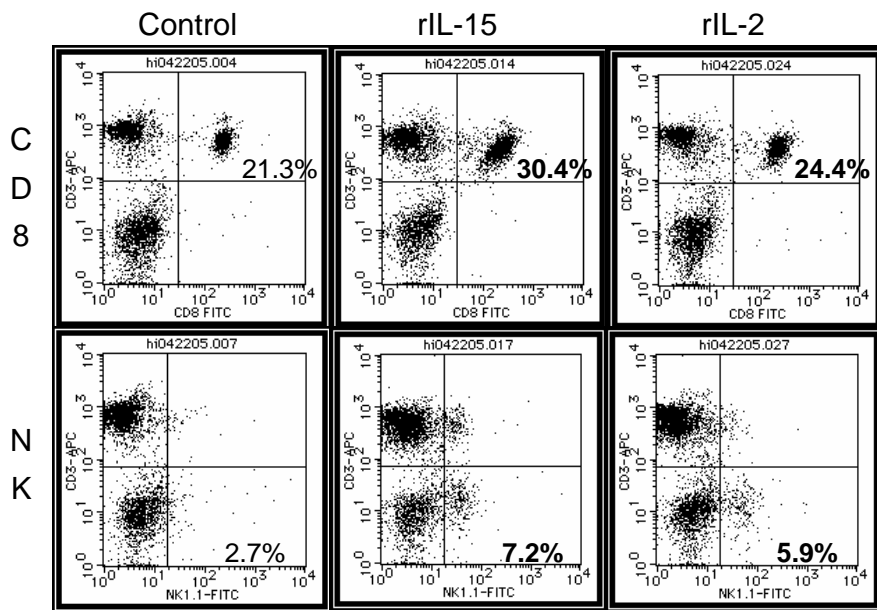


図7 市販の大腸菌由来組換えIL-2とIL-15の比較:全脾細胞を用いて、各サイトカインで試験管内で刺激し、その後CD8とNK細胞の比率をフローサイトメトリーで測定した。

IL-2, IL-15で脾細胞刺激後のIFN- γ 産生量

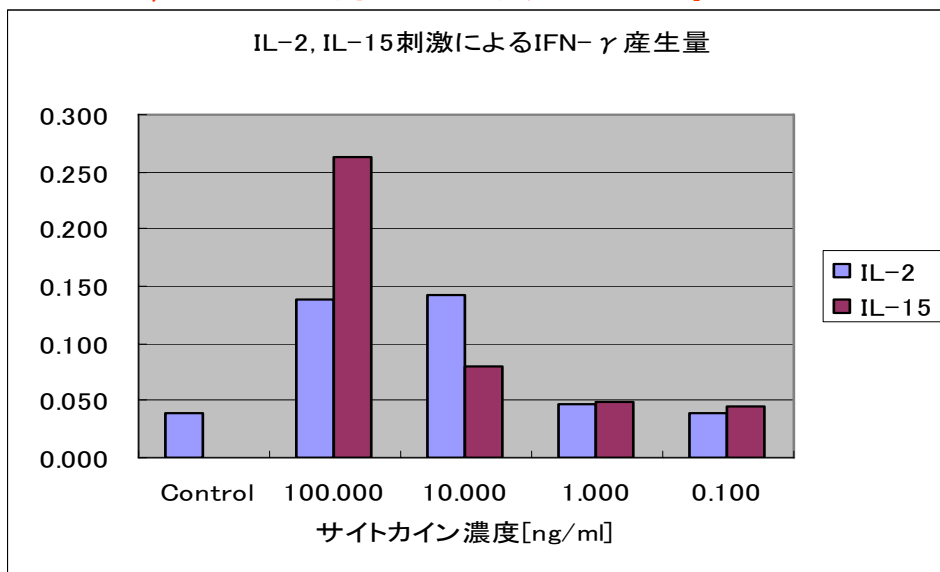


図8 市販の大腸菌由来組換えIL-2とIL-15の比較:脾細胞を市販の大腸菌由来組換えサイトカインで刺激し上清を回収して, IFN γ 濃度を測定した。

我々の精製したIL-2とIL-15でも同様にIL-15の方が, CD8T細胞やNK細胞を活性化させる能力は同一濃度で比較した場合高かったが (data not shown), 同一濃度で比較した場合, 無細胞蛋白発現系は大腸菌の組み換え蛋白より, 生物活性は図5, 6で示すように低かった。

その理由は無細胞蛋白発現系で産生された蛋白はS-S結合など蛋白発現後の修飾がなされないため高次構造が天然型蛋白とは若干異なっているからであると考えられた。

1-4) 無細胞蛋白発現系のまとめと課題

収量に対するコストの面から市販の蛋白より高価になってしまうため, 現時点でこれ以上無細胞蛋白発現系を生体内の腫瘍のサイトカイン治療に役立てることは断念せざるを得なかったが, 無細胞蛋白発現系でも生物活性が得られた事は意義がある。今後は如何にしてコストを低減させるかが課題として残された。

以上よりサイトカインの及ぼす免疫系への生体内での役割解明にはサイトカイン遺伝子導入腫瘍を用いたもので行うこととした。

2) サイトカインの腫瘍内浸潤免疫担当細胞活性化・分化の改善効果の検討

2-1) サイトカイン遺伝子導入腫瘍株と作成

IL-2及びIL-15 cDNAを哺乳類動物用発現ベクターp cDNA3.1 (インビトロジェン) に組換え発現を試みた。表2に示すごとく, IL-2 cDNAはMCA38大腸癌細

胞株, GL261 膠細胞腫瘍株, B16 黒色腫細胞株のいずれにおいても発現させることが可能で, 限界希釈法でも細胞のクローン化が可能であった。一方, IL-15 cDNA は全長 (5' 領域も含む) を組み込んでも MCA38, GL261 のいずれにも発現させることができなかったため (data not shown), 最終的には図9のように IL-15 のプロモータ領域を削り, 代わりに IL-2 のプロモータ領域を付加して発現を試みた。それにより一過性の発現は得られたもののクローン化させることはできなかった。一方可溶型 TNF 受容体 2 型と可溶型 Fas 蛋白については MCA 3 8 で導入を試みたところ可溶型 Fas を発現させることができなかったが, GL261 では, TNF 受容体 2 型と可溶型 Fas 蛋白のいずれも発現させることが可能であった。

表2 我々が遺伝子導入を試みた cDNA と導入結果

	遺伝子導入可能であった遺伝子	遺伝子導入が不可であった遺伝子
MCA38	IL-2, 可溶型 TNF 受容体 II 型	可溶型 Fas IL-15 (IL-2 の分泌シグナルをつけると一過性に発現)
GL261	IL-2, 可溶型 TNF 受容体 II 型, 可溶型 Fas	IL-15 (IL-2 の分泌シグナルをつけると一過性に発現)
B16	IL-2	

CACCCTTGCTAATCACTCCTCACAGTGACCTCAAGTCCTGCAGGCATGTACAGCAT
GCAGCTCGCATCCTGTGTACATTGACACTTGTGCTCCTTGTCAACAGCTGTGTCA
 GTGTAGGTCTCCCTAAAACAGAGGCCAACTGGATAGATGTAAGATATGACCTGGAG
 AAAATTGAAAGCCTTATTCAATCTATTCATATTGACACCACTTTATACTGACAGTG
 ACTTTCATCCCAGTTGCAAAGTTACTGCAATGAACTGCTTCTCCTGGAATTGCAG
 GTTATTTTACATGAGTACAGTAACATGACTCTTAATGAAACAGTAAGAAACGTGCTC
 TACCTTGCAAACAGCACTCTGTCTTCTAACAAGAATGTAGCAGAATCTGGCTGCAA
 GGAATGTGAGGAGCTGGAGGAGAAAACCTTCACAGAGTTTTTGCAAAGCTTTATA
 CGCATTGTCCAAATGTTTCATCAACACGTCCTGACTGCATGCGAGCCTCTTCCGTGTT
 TCTGTTATTAAGGTACCTCCACCTGCTGCTCAGAGGCAGCACAGCTCCATGCATTG
 AAATCTGCTGGGCAAACCTAAGCTTCCTAACAAGGAGATAATGAGCCACTTGGATCA
 CATGAAATCTTGAAATGAAGAGAGGAAAAGAGCTCGTCTCAGACTTATTTTTGCT
 TGCTTATTTTTAATTTATTGCTTCATTTGTACATATTTGTAATATAACAGAAGATGTGG
 AATAAAGTTGTATGGATATTTTATCAATTGAAATTTAAAAAAA

図9 IL-2 のシグナルシーケンスをもつキメラ遺伝子の配列: 下線部が IL-2 の 5' 領域からシグナルシーケンスまでで, 赤が翻訳開始部分, 青とオレンジが IL-2 の配列, オレンジと緑が IL-15 の配列である。(つまりオレンジは双方で重なっている塩基配列。)

以上より, IL-15は翻訳後修飾等の過程で発現の抑制がかかり MCA38, GL261のいずれも発現させることができないが, 可溶性 Fas 蛋白は MCA38 においては蛋白の組み込み自体が薬剤感受性を高めてしまう可能性が示唆された。

2-2) 遺伝子導入腫瘍の生体内での増殖曲線・生存曲線

2-1) で作成した遺伝子導入腫瘍株を用いて生体内(皮下, 肝内及び脳内)での腫瘍内浸潤細胞の増殖曲線と生存曲線の作成を行った。代表的な腫瘍の組織像を示す(図10)。

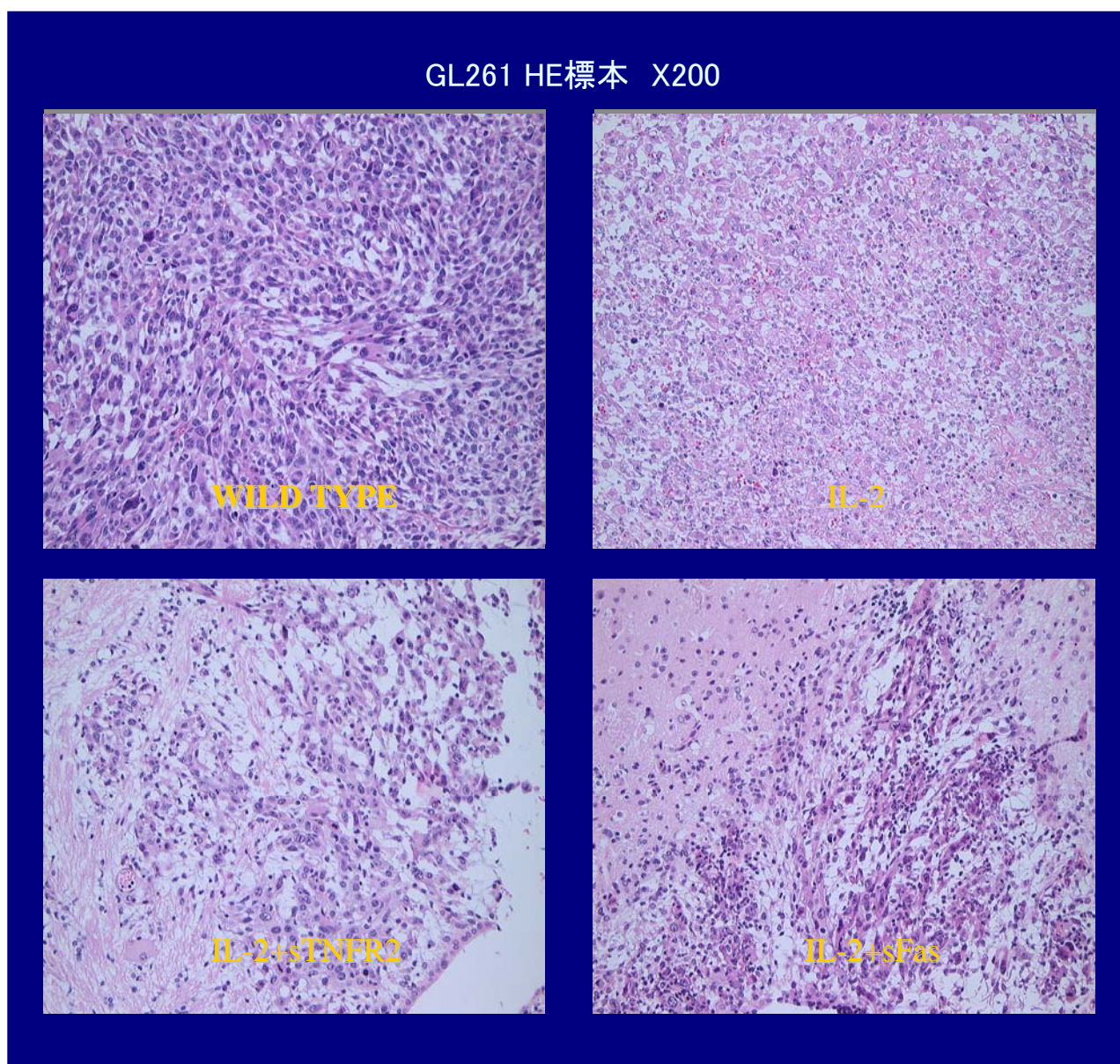


図10 GL261の遺伝子導入腫瘍の脳内接種14日目の組織所見

本研究の主体である膠細胞腫瘍GL261を用いた検討の結果をまず始めに示す。**図11**に脳内接種系、**図12**に皮下接種系を示す。

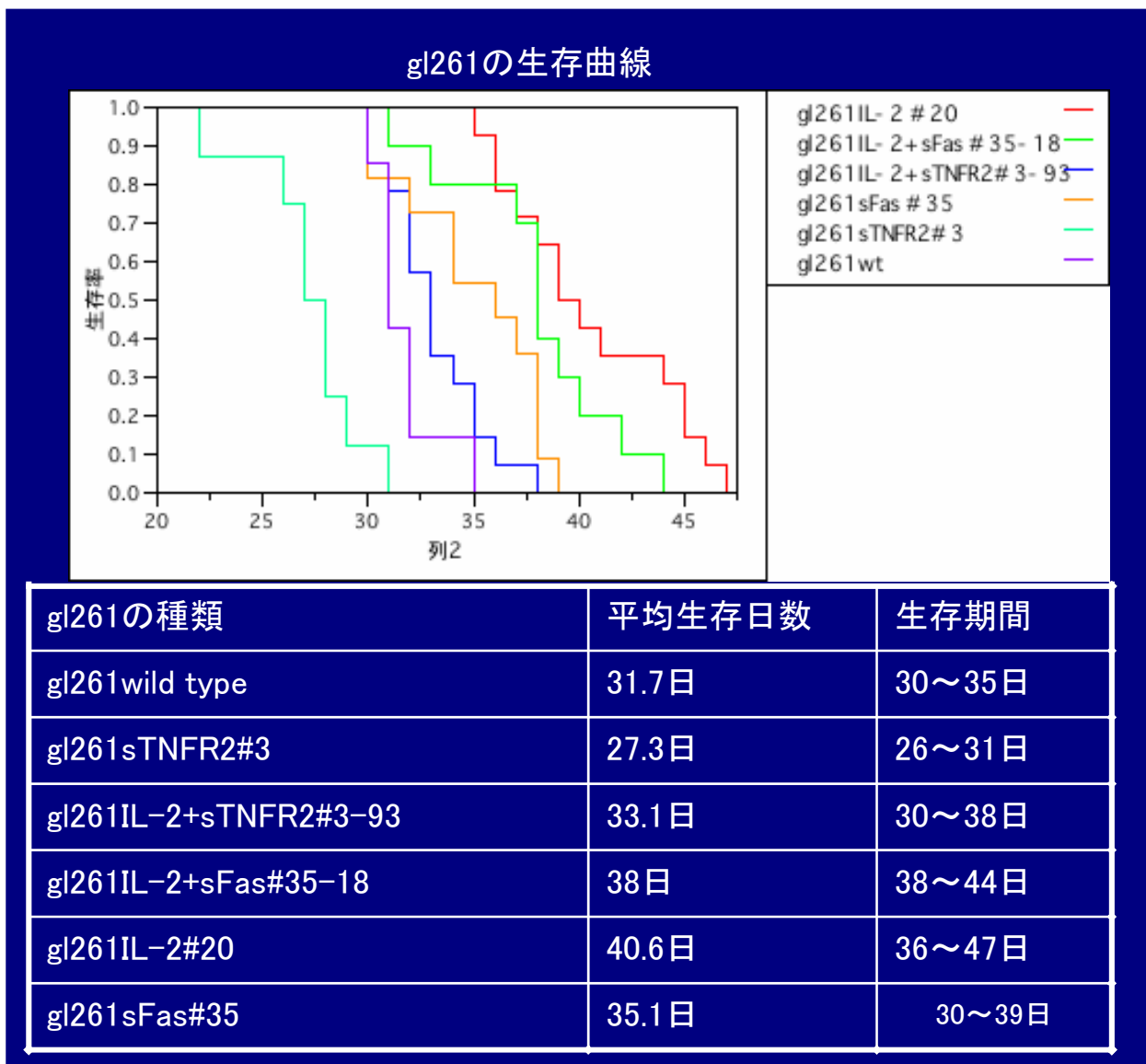


図11 : GL261 腫瘍の脳内接種系における各種遺伝子導入腫瘍の接種後の生存日数

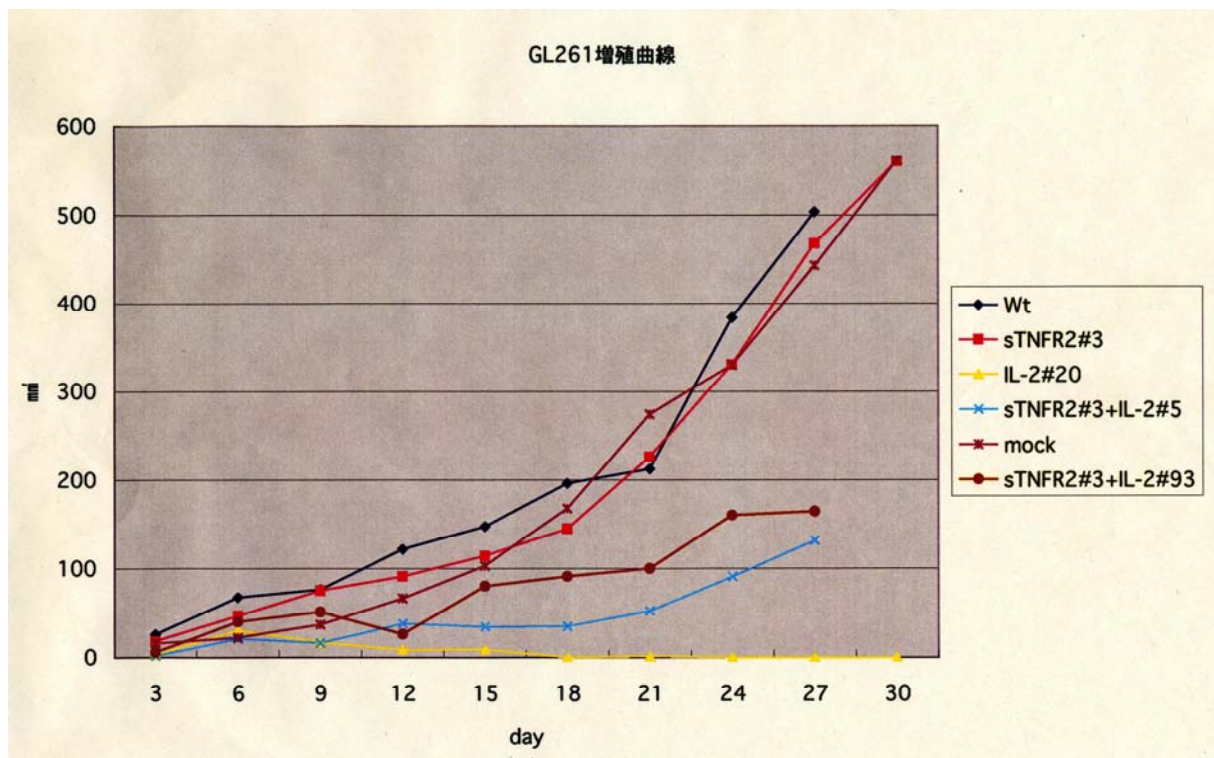


図 1 2 : GL261 腫瘍の皮下接種系における各種遺伝子導入腫瘍の接種後の生存日数

図 11, 12 に示されたように、皮下では GL261/mock と GL261/TNFR2 がほぼ同一、GL261/IL-2 が最も増殖抑制され、GL261/IL-2+TNFR2 が GL261/IL-2 より増殖抑制されない結果となった。脳内では、GL261/TNFR2 が最も生存日数が少なく GL261/mock, GL261/IL-2+TNFR2, GL261/IL-2 の順に生存日数の延長がみられた。つまり、脳内では GL261 は TNF の働きが阻害されている方が腫瘍の退縮が得られにくいという結果となった。

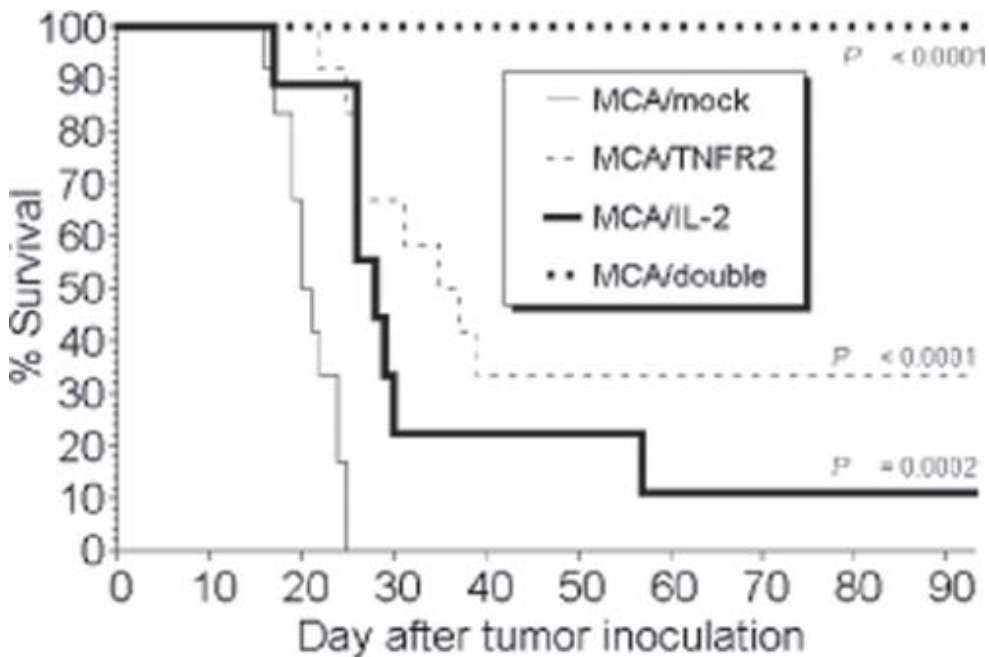


図1-3 : MCA38 腫瘍の脳内接種系における各種遺伝子導入腫瘍の接種後の生存日数

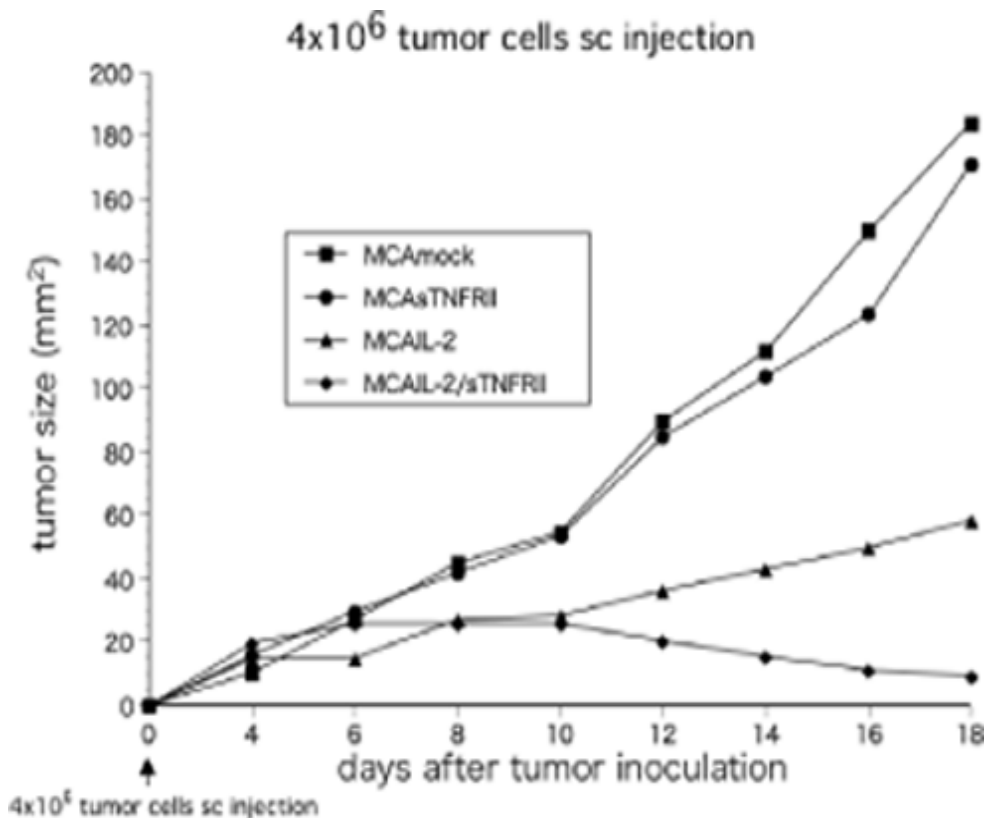


図1-4 : MCA38 腫瘍の皮下接種系における各種遺伝子導入腫瘍の接種後の生存日数

一方、**図 13,14** に示す如く、大腸癌細胞株 MCA 38 を用いた検討結果では、GL261 と異なった腫瘍の増殖がみられた。つまり、GL261 と違い、MCA38 では、IL-2 の存在下で TNF を阻害した場合、抗腫瘍効果が増強した。それは皮下でも脳内でも同様であった。

以上をまとめると、MCA38 と GL261 では TNF 阻害の果たす影響が異なっていた。つまり、IL-2 の存在下で TNF を阻害させた場合、MCA38 では抗腫瘍的に働くが、GL261 では親腫瘍的に働いた。これは腫瘍の性質が異なると TNF の果たす役割が異なることを意味していると考えられた。

2-3) 遺伝子導入の果たす生体内での MHC 抗原発現に及ぼす影響
MCA38 は培養中でも定常的に MHC クラス I を発現しているが (データ未公表)、GL261 や B16 は培養中では MHC 分子の発現はみられない (**図 15**)。

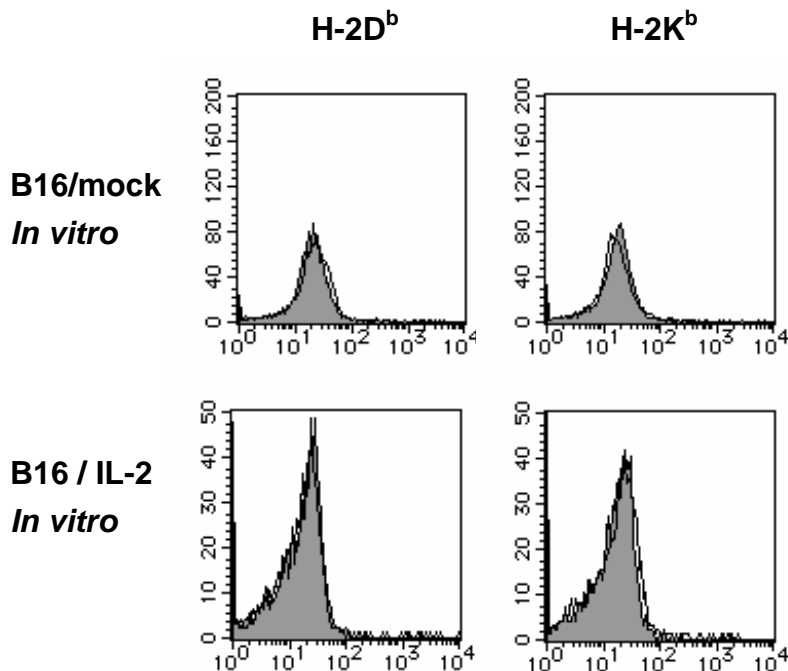


図 15 B16 の培養条件下での MHC 分子の発現の検討

ただし、腫瘍が生体内にある場合 MHC 分子の発現が誘導されている可能性があったため、腫瘍の接種後の腫瘍の MHC 分子の発現を検討した。

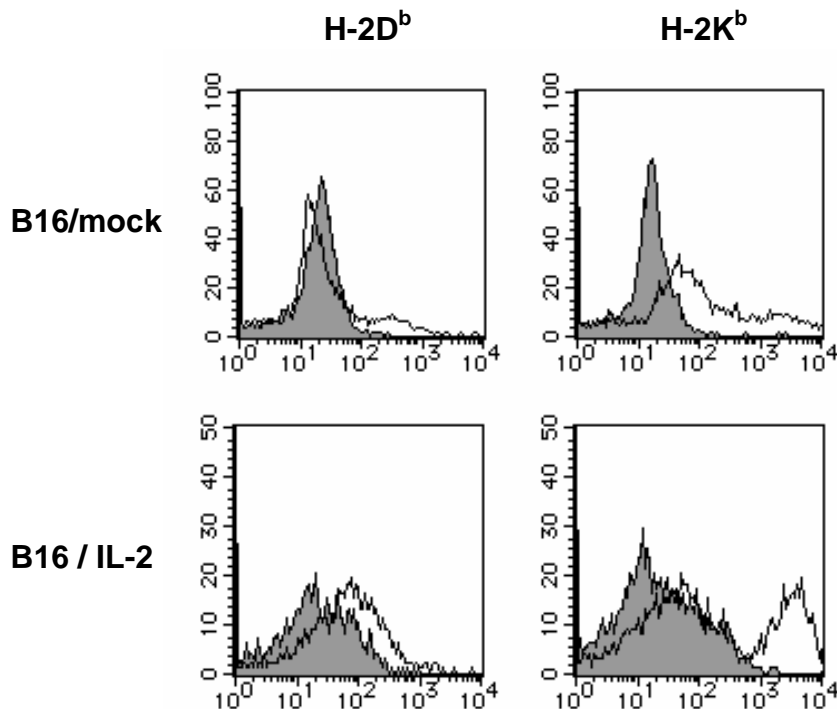


図16 B16におけるMHCクラスI分子の生体内での発現の検討

B16では図16に示すごとく、MHCクラスIが生体内では誘導され、B16/mockではNK、CD8、CD11b細胞の除去によりMHCクラスI分子の発現が消失したが、B16/IL-2ではCD11b（主にマクロファージに強く発現）陽性細胞除去によりMHC分子の発現は強く抑制された（図17, 18）。

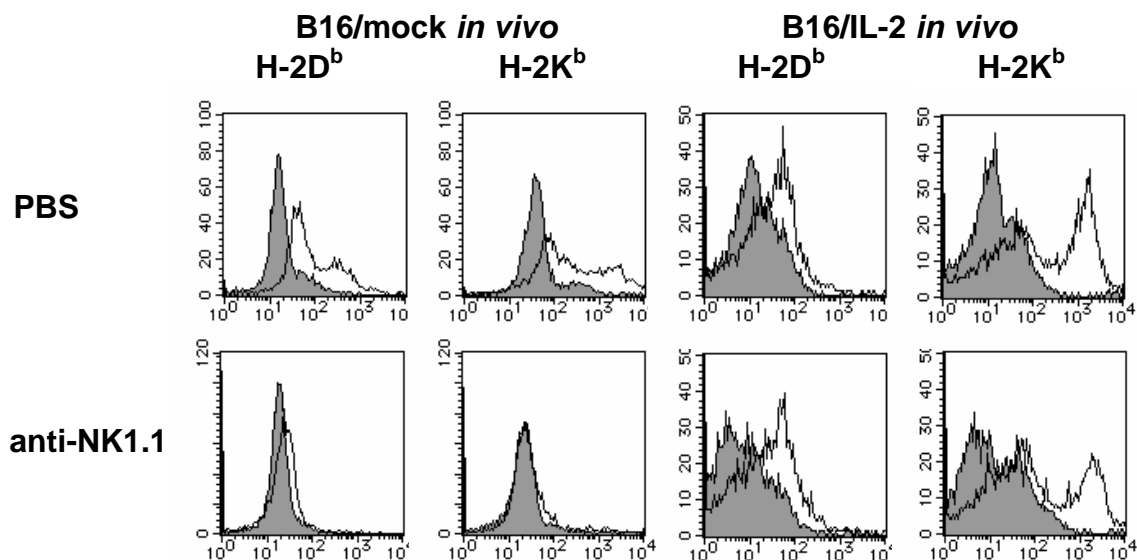


図17：細胞除去試験による腫瘍の生体内でのMHCクラスI分子発現の変化の検討：図のような抗体（対照はPBS）を計15日間投与し、その後に腫瘍を回収しMHCクラスI分子の発現の有無を検討した。

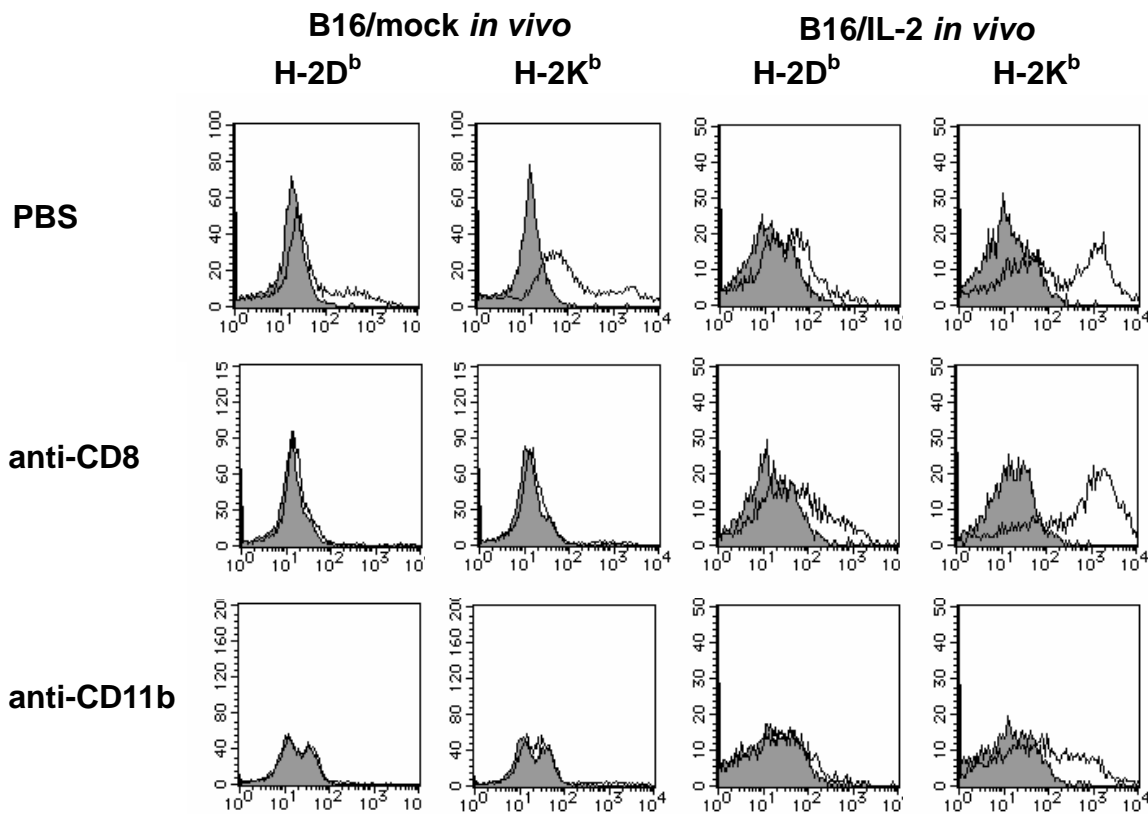


図18：細胞除去試験による腫瘍の生体内でのMHCクラスI分子発現の変化の検討：図のような抗体（対照はPBS）を計15日間投与し、その後に腫瘍を回収しMHCクラスI分子の発現の有無を検討した。

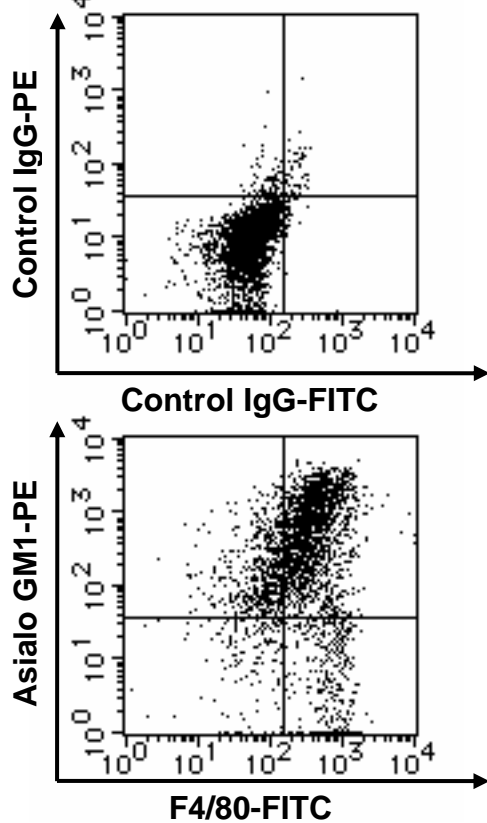


図19：腫瘍内のCD11b陽性細胞の検討：腫瘍内より得られたCD11b陽性細胞をマクロファージのマーカであるF4/80で染色した。

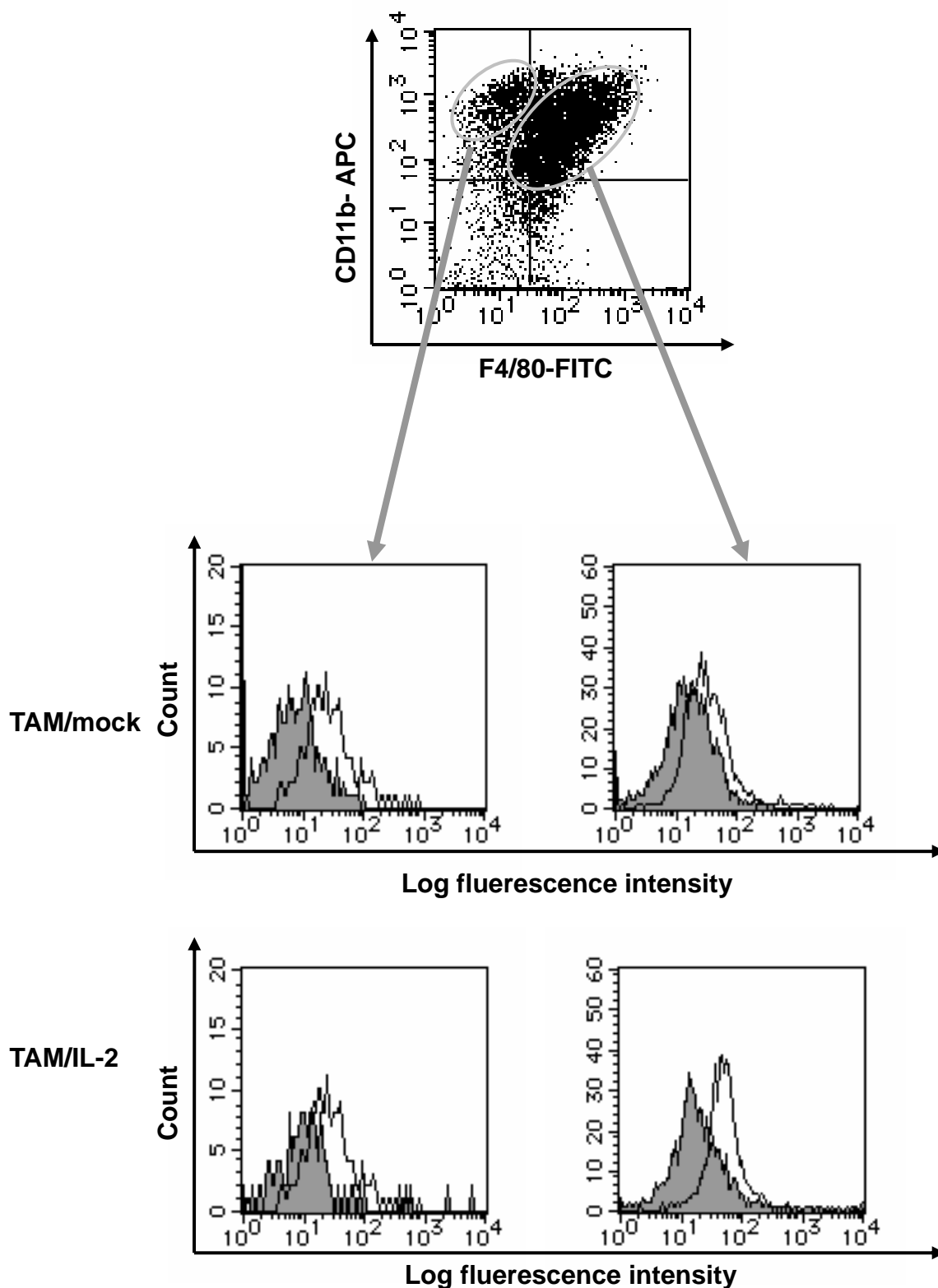


図 20 : 腫瘍内浸潤 CD11 b 陽性細胞の細胞内 IFN g 染色の結果 : IL-2 導入腫瘍の腫瘍内浸潤 CD11 b 陽性細胞の中でも F4/80 陽性細胞が IFN_g を強く産生していた。

CD11b陽性細胞の多くは、マクロファージであり（**図19**），インターフェロン γ （ $IFN\gamma$ ）はMHC分子の発現誘導作用があることが知られているため，腫瘍内浸潤マクロファージ（TAM）の $IFN\gamma$ 産生量を検討した。**図20**に示すようにB16ではIL-2導入群から得られたCD11b陽性細胞の $IFN\gamma$ 産生がmock群から得られたTAMに比べて著明に高まった。この結果から，腫瘍が生体内でMHC分子を発現する上で，通常環境ではNK細胞やCD8T細胞が大きく関与しているが，IL-2導入環境ではTAMが大きく関与していると考えられた。

2-4) IL-2の導入とTNF阻害の腫瘍内浸潤T細胞及びマクロファージに及ぼす影響の評価

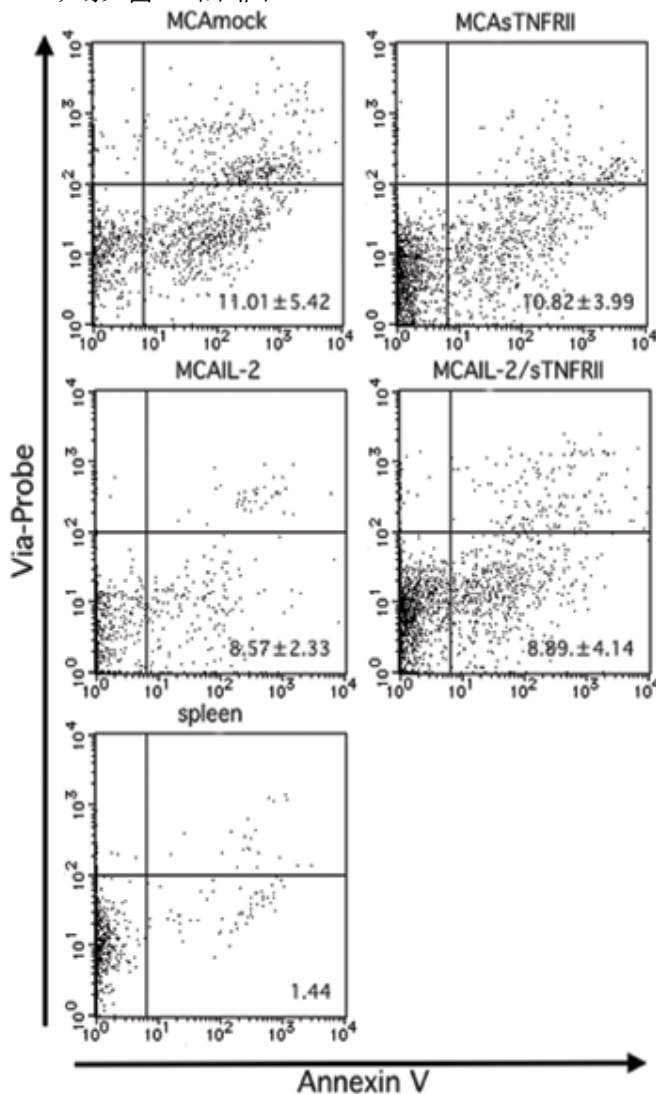


図21：各種遺伝子導入腫瘍内浸潤T細胞における細胞死の検討：図は皮下のデータを示す。

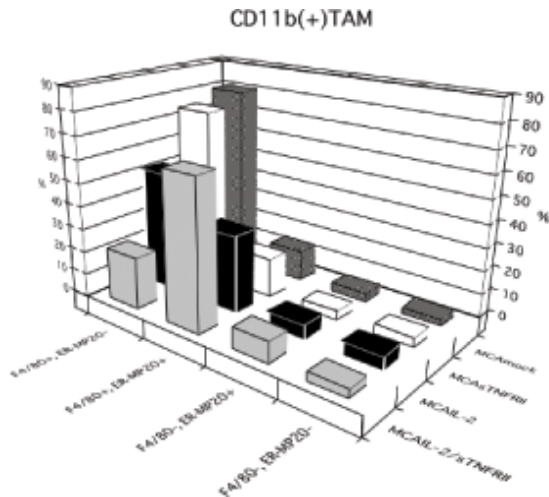


図22：腫瘍内浸潤マクロファージの分化成熟の検討

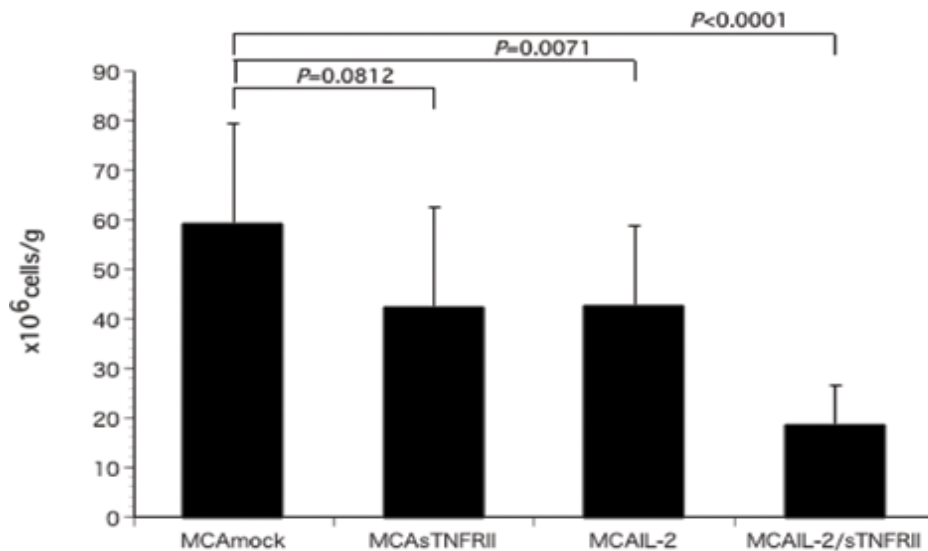


図23：腫瘍内浸潤マクロファージの浸潤数の検討

図21に示すとおり、T細胞の細胞死はMCA38内浸潤CD8T細胞では群間に差異がみられず、GL261でもT細胞の活性化の指標となるCD25の発現で検討した限りでは群間で差異がみられなかった。一方最もサイトカインの導入の影響を受けたのがTAMで、図22に示すようにMCA38では、皮下ではmock群、TNFR2導入群のマクロファージの成熟はほぼ同等、IL-2導入群では成熟が弱く抑制され、IL-2+可溶型TNFR2共導入群ではマクロファージの成熟が強く抑制された。この結果は、GL261でもMCA38と同様であった。以上より、マクロファージの成熟をIL-2の導入とTNFの阻害で抑制させることができることが分かった。一方で、TAMの腫瘍内浸潤数はMCA38では図23に示すごとくIL-2+可溶型TNFR2共導入群が最も少なく、腫瘍の増殖曲線と関連したが、GL261

では IL-2+可溶性 TNFR2 共導入において腫瘍内浸潤数の抑制作用はなかった。以上より、腫瘍の増殖抑制が GL261 の IL-2+可溶性 TNFR2 共導入群で得られなかったのは、マクロファージの成熟が強く抑えられたことで IFN γ の産生量が減り、MHC 分子の発現誘導作用が減弱したことが影響している可能性があると思われた。今後腫瘍の産生するサイトカインの差異なども含め、腫瘍の特性を考慮に入れたサイトカイン治療法の検討が必要であると思われた。

3) 腫瘍内浸潤 T 細胞のヒト材料における評価 (参考資料)

腫瘍内浸潤マクロファージの成熟分化と細胞性免疫の誘導能の関連が今後の検討課題として非常に興味のある分野であるが、それを考える上で、我々は T 細胞の浸潤数だけではなく、腫瘍内浸潤 T 細胞の活性化の有無が非常に大切であると考え学会報告と論文執筆を行った。**図24**はヒト悪性膠細胞腫瘍内浸潤リンパ球の増殖活性を CD8 陽性リンパ球膜表面の CD8 抗体と細胞の増殖マーカーの一つである MIB-1 の二重染色により検討した結果であるが、増殖活性をもった CD8 陽性 T 細胞の組織中の密度と腫瘍組織の micronecrosis の密度は正の相関をする傾向がみられた。

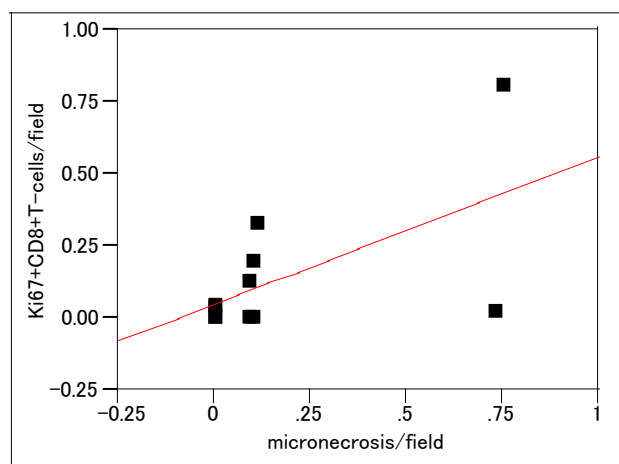


図24：悪性膠細胞腫瘍内浸潤 CD8T 細胞の Ki67 陽性数と腫瘍のマイクロネクロシスの関係

つまり、腫瘍の抗原が貪食されやすい状態の症例では、腫瘍内浸潤 CD8T 細胞の増殖活性が高まっていた。つまり、腫瘍が壊死することで抗原として捕捉されやすい環境がないと細胞性免疫の効果を発揮するエフェクター細胞である CD8T 細胞の活性化は得られないと考えられた。当該研究と同様の方法を用いて、ヒト扁平上皮癌でも評価を行ったが、その場合も術前に放射線照射を行った症例において有意に腫瘍上皮内浸潤 CD8T リンパ球の MIB-1 陽性率が高く、脳での解析を裏付ける結果となった。〔6-5) 論文として報告された内容と今後の予定 の項参照〕

4) まとめ

免疫特権部位とは免疫系のターゲットとはなるが、抗原提示能はない組織のことであり、以前我々は腫瘍に CD80 や CD86 分子を形質導入し腫瘍細胞を抗原提示細胞化したが、その場合は明らかに脳内浸潤 T 細胞の活性を得にくい環境であるとの結果を得た。詳細に述べると、抗原提示能を腫瘍に持たせたことで腫瘍内に浸潤した T 細胞が腫瘍を認識しやすい状況にはなったものの、脳内では完全な T 細胞の活性化は得られなかったのである。T 細胞の活性化は一般的に 2 次リンパ器官内で起こるため、たとえ腫瘍を抗原提示細胞化しても二次リンパ器官の中のようにヘルパー T 細胞が傍らに無いと腫瘍内では T 細胞は容易に活性化しないため、脳のセンチネルリンパ節である頸部リンパ節での T 細胞の活性化を効率よく誘導しない限り、当該治療法は免疫遺伝子療法とはなりえないと考えられる。よって我々は腫瘍内に IL-2 を導入し再び活性化する機能が脳内では弱いためであると考えられた。免疫特権部位としての脳組織の特異性という観点から今回の結果をみると、サイトカインの導入により CD8T 細胞の性質は皮下、脳内いずれも明らかには変わっていないと思われたが、腫瘍の増殖あるいは生存日数の変化という点からみると脳内は肝内とほぼ同様の結果を呈し、皮下とは明らかに異なることが分かった。肝も免疫学的には寛容な組織の一つであり、皮下と脳及び肝は免疫学的に異なることが示唆された。一方、今回の我々の研究結果では、IL-2 を作用させるときに TNF の阻害を併用した場合、大腸癌細胞株である MCA38 と膠細胞腫瘍 GL261 では腫瘍の治療効果に差異が出た。これは、脳の免疫特権部位可能性が高く、サイトカイン治療時は強制的に今回も脳内の特異性を CD8T 細胞の機能から考察する。今回の結果はそれとは異なり CD8T 細胞には腫瘍の成育部位による特異性はみられなかった。つまり、今回の我々の方法では、浸潤している CD8T 細胞の機能には影響を

通常腫瘍内浸潤マクロファージは、抗原提示細胞としてみた場合

1. 抗原を食胞で取り込んだ後水解酵素で分解してしまう。
2. 腫瘍内で分化成熟したマクロファージは腫瘍内にとどまる。
3. マクロファージは好中球と異なり死滅せず、生存日数が多い。

ことから、二次リンパ器官で T リンパ球に抗原を提示させ細胞性免疫を誘導させることはないと考えられる。

他方、樹状細胞は

1. 抗原を取り込んだ後プロセシングし MHC 分子上に提示する。
2. 樹状細胞は腫瘍内では未熟な状態であるが、抗原を取り込むと腫瘍外へ出て、二次リンパ器官に移動して T リンパ球に抗原を提示し細胞性免疫を誘導する。

つまり、腫瘍抗原は腫瘍内でマクロファージではなくできる限り樹状細胞により貪食される方が細胞性免疫誘導には効果的である。今回我々の検討したIL-2と可溶性TNF受容体による免疫治療法はMCA38など定常的に腫瘍上にMHC分子を発現している腫瘍にとってはマクロファージの成熟を抑制し浸潤数も抑制するため相対的に樹状細胞の抗原貪食が進んだと考えられ、腫瘍内浸潤マクロファージの活性化と浸潤を阻害した方が免疫系には有益であるが、GL261のように生体内でIFN γ の作用などでMHC分子が発現誘導される腫瘍では、マクロファージの活性化の果たすMHC分子発現誘導作用は無視すべきではないと考えられた。つまり、今後ヒトへの臨床応用を考える際は、手術で摘出した腫瘍を初代培養し、腫瘍表面のMHC分子が定常的に発現するのか培養中に消失するのかを指標としてIL-2単独療法とIL-2・可溶性TNF併用療法のどちらにすべきか検討して免疫療法を行うべきであると考えられた。

5) 論文として報告された内容と今後の予定

巻末の4編は、本報告書作成時既に掲載されたものであるが、上述の内容の中で論文掲載されていない内容は現在追加実験中であるとともに一部は論文作成中である。

7. 付記

本報告書の内容は平成18年3月までの実験データをまとめて報告書としたものである。