



Antitumor effect of simultaneous transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes and its mechanism in a mouse bladder cancer model

彦坂, 玲子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3227

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003227>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 8 1 】

氏 名・(本 籍) 彦坂 玲子 (愛知県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1634号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

Antitumor effect of simultaneoustransfer of interleukin-12
and interleukin-18 genes and its mechanism in a mouse
bladder cancer model.

(マウス膀胱癌モデルにおけるインターロイキン12 遺伝子
およびインターロイキン18 遺伝子同時導入による抗腫瘍
効果の検討)

審 査 委 員

主 査 教 授 杉村 和朗

教 授 丹生 健一

教 授 横崎 宏

マウス膀胱癌モデルにおけるインターロイキン 12 遺伝子およびインターロイキン 18 遺伝子同時導入による抗腫瘍効果の検討

Abstract

Background; インターロイキン 12 (IL-12) およびインターロイキン 18 (IL-18) はいずれも CD8T cell および NK cell を活性化することにより抗腫瘍効果を有するサイトカインである。我々はこれら遺伝子を腫瘍細胞に導入し、腫瘍細胞自体からサイトカインを分泌させることにより、免疫担当細胞を賦活化し、腫瘍細胞が拒絶されることを報告してきた。今回の研究において双方の遺伝子を同時に腫瘍細胞に導入することにより、より強力な抗腫瘍効果が得られるか否かにつき検討した。

Methods; IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子を、リポソームを用いてマウス膀胱癌細胞 (MBT2) へ遺伝子導入した。それぞれのサイトカイン発現は ELISA 法にて確認した。母細胞株 (MBT2/P)、発現ベクターのみを導入したコントロールサブクローン (MBT2/C)、IL-12 遺伝子導入サブクローン (MBT2/IL-12)、IL-18 遺伝子導入サブクローン (MBT2/IL-18) および IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子を同時に導入したサブクローン (MBT2/ IL-12+ IL-18) を作成し、それらを同系マウス C3H へ皮下接種し、腫瘍の大きさを計測した。また、静脈内へ注入し形成された肺転移の数を計測した。抗腫瘍効果に関する免疫担当細胞を解析するため、各種免疫欠損マウスを用い、抗腫瘍効果が減弱されるか否かにつき検討した。

Results; 同系マウスに皮下注入、あるいは静脈内注入した MBT2/IL-12、MBT2/IL-18、MBT2/IL-12+ IL-18 は完全に拒絶された。ヌードマウスに接種すると、MBT2/IL-12 のみ腫瘍の発育を認めた。さらに、MBT2/IL-18 の抗腫瘍効果は、NK 細胞活性を失活させたヌードマウスで一部失われた。両者の遺伝子を同時導入した MBT2/ IL-12+ IL-18 では何れのマウスにおいても完全に拒絶された。

Conclusion; これらより、T 細胞と NK 細胞がそれぞれ IL-12 と IL-18 より誘導

される抗腫瘍効果の発現に重要な役割を担っていることが示された。また IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子の同時導入株では双方のメカニズムを介して抗腫瘍効果を発揮していることが確認された。

Introduction

近年膀胱癌の抗癌化学療法や手術療法はの進歩しているが、浸潤、転移機構等基礎的なことについては未だ不明な点が多く、西欧諸国では男性の癌死因の 4 位を占めている。

一方、Tepper から始まって、多くの研究者がサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞へ導入することにより抗腫瘍効果が認められることを報告してきた。このことは生体内でサイトカインを分泌するよう腫瘍細胞を改変することにより腫瘍細胞に対する免疫反応を誘導させることが可能であることを示している。特にインターロイキン 12 (IL-12) 遺伝子あるいはインターロイキン 18 (IL-18) 遺伝子の導入によりすぐれた抗腫瘍効果が示されている。IL-12 は、NK 細胞を活性化すると同時に CD8T cell の成熟や分化を誘導する。一方 IL-18 は、T 細胞を刺激することでインターフェロン γ の産生を促進するとともに、NK 細胞活性を増強することにより強力な抗腫瘍効果を発揮する。さらに、いくつかの研究では IL-12 と IL-18 が IFN γ 産生に関し相乗効果を有していることも明らかにされている。これらのことから、IL-12 と IL-18 の併用は腫瘍免疫に関して相乗効果が期待される。我々は IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子をマウス膀胱癌細胞 (MBT2) へ同時導入することにより相乗的な抗腫瘍効果が得られるか否かにつき検討した。

Methods

1. 腫瘍細胞株

C3H マウスの膀胱癌細胞株である MBT2 は、10%FBS 添加 RPMI-1640 メディウムにて継代培養した。

2. 発現ベクターへのサイトカイン遺伝子の組み込みと腫瘍細胞への導入

RT-PCR 法を用いて IL-12 及び IL-18 の cDNA を作成し、これをそれぞれ発現ベクターに組み込んだ。これらの発現ベクターを、リポソーム法を用いて MBT2 細胞へ遺伝子導入した。条件としては、 2×10^5 個の MBT2 細胞を 6cm Dish に培養し、翌日 IL-12 及び IL-18cDNA を組み込んだ発現ベクターをそれぞれ又は同時にリポフェクトアミンと共に培地に添加した。コントロールとしてサイトカイン遺伝子を組み込んでいない発現ベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入された細胞がコロニーを形成すると、これらをクローニングリングを用いて採取し、サブクローンとして培養した。

3. 遺伝子導入サブクローンの IL-12 及び IL-18 分泌能の測定

IL-12 及び IL-18 の遺伝子が導入された MBT2 サブクローンを 24 時間培養し、その培養上清を回収した。培養上清中の IL-12 および IL-18 の濃度を ELISA 法を用いて測定した。

4. In vitro での細胞増殖能の検討

In vitro での MBT2 サブクローンの増殖を比較するために、 5×10^3 の細胞を 12well 容器にまきこみ、連日トレパンブルーにて生細胞数の測定を行った。

5. 同系マウスにおける腫瘍増殖の検討

C3H/He マウス、メス 6～8 週を CLEA 社より購入、使用した。各群には 7 匹ずつマウスを用いた。腫瘍細胞はトリプシンで処理後、PEB で 2 回洗浄、皮下注入は 1×10^6 個の細胞を背部へ接種、静脈注入は 5×10^5 個の細胞を尾静脈より注入した。皮下腫瘍径はノギスを用いて最長径とそれに直行する腫瘍径を 2 回/週測定し、2 数の積を用いて腫瘍の大きさを表した。静脈注入では、腫瘍接種 2 週間後にマウスを処理して肺を摘出、ルーペを用いて表面の転移巣を数えた。

6. 各種免疫不全マウスにおける腫瘍増殖の検討

抗腫瘍効果に関する免疫担当細胞を解析する目的で、各種免疫不全マウスを

用いた。T cell の欠失については Balb/c nu/nu ヌードマウス、メス 6～8 週を用いた。NK 細胞の欠失については、 $50 \mu\text{l}$ アンチアシアロ GM1 抗体を $150 \mu\text{l}$ PBS に溶解し、腫瘍細胞接種 1 日前にマウス腹腔内へ 0.5ml ずつ注入、腫瘍細胞接種後は 5 日ごとに同量を腹腔内に注入した。

Results

1. IL-12、IL-18 遺伝子導入 MBT2 サブクローンのサイトカイン分泌能及び in vitro での増殖能

ELISA 法にて各々の遺伝子導入 MBT2 サブクローンの培養上清中のサイトカイン濃度を測定、発現の高い株を選択した。IL-12 遺伝子導入サブクローン MBT2/IL-12 の培養上清中の IL-12 濃度は 113pg/ml、IL-18 遺伝子導入サブクローン MBT2/IL-18 の培養上清中の IL-18 濃度は 147pg/ml であった。IL-12 と IL-18 遺伝子を同時に導入したサブクローン MBT2/IL-12+IL-18 の IL-12、IL-18 濃度はそれぞれ 121pg/ml、162pg/ml であった。母細胞 MBT2/P、発現ベクターのみを導入したサブクローン MBT2/C の培養上清中にはいずれのサイトカインも検出されなかった。in vitro での腫瘍増殖に関しては、各サブクローン間で有意な差を認めなかった (図 1)。

2. 同系マウスにおける腫瘍増殖能

1×10^6 細胞数の各サブクローンを同系マウス C3H の皮下へ接種した。母細胞である MBT2/P 及びコントロールベクターの遺伝子導入サブクローンである MBT2/C は腫瘍接種後 10～15 日で腫瘍が生着し急速に成長した。しかし、MBT2/IL-12、MBT2/IL-18、MBT2/IL-12+IL-18 はいずれも完全に拒絶された (図 2)。同様に肺転移に関する検討においても、MBT2/P、MBT2/C は多数の転移巣を形成したのに対し、MBT2/IL-12、MBT2/IL-18、MBT2/IL-12+IL-18 では転移巣の形成は全く認められなかった (表 1)。

3. 抗腫瘍効果のメカニズムに対する検討

T cell の欠失したヌードマウスにて MBT2/IL-12、MBT2/IL-18、MBT2/IL-

12+IL-18 の腫瘍増殖能を検討したところ、MBT2/IL-12 のみ腫瘍の生着を認めた (図 3)。一方、NK 細胞を除去したヌードマウスにて同様の実験を行ったところ、MBT2/IL-12 の腫瘍増殖には変化が認められなかったが、MBT2/IL-18 では MBT2/P に比較し、緩徐ではあるが、最終的に全てのマウスにて生着が認められた (図 4)。MBT2/IL-12+IL-18 はいずれの系においても完全に拒絶された。以上のことより、IL-12 分泌 MBT2 の抗腫瘍効果には T cell が、IL-18 分泌 MBT2 の抗腫瘍効果には NK cell が関与していることが示唆された。IL-12 と IL-18 の双方を分泌する MBT2 では、T cell 及び NK cell 双方を介したメカニズムが存在すると思われた。

Discussion

今回の研究で我々は、マウス膀胱癌モデルにおける IL-12 と IL-18 の遺伝子同時導入による抗腫瘍効果、およびそのメカニズムについて検討した。IL-12、IL-18、および双方のサイトカインを分泌する細胞株を遺伝子導入により作成し、*in vitro* で各細胞株間の増殖能に差がないことを確認した。同系マウスでの実験で、MBT2/P、MBT2/C は皮下注入後同様の腫瘍増殖をきたし、静脈注入では多数の転移巣を形成した。これに対し、MBT2/IL-12、MBT2/IL-18、MBT2/IL-12+IL-18 では皮下注入及び静脈内注入いずれにおいても腫瘍は完全に拒絶された。当初期待した MBT2/IL-12+IL-18 における相乗的な抗腫瘍効果の増強は証明できなかったが、これはそれぞれのサイトカイン単独においても十分な抗腫瘍効果が認められたため、それ以上の抗腫瘍効果を観察できなかったことが原因と思われた。

抗腫瘍効果のメカニズムを解明するため、ヌードマウスおよび NK 細胞活性を失活させたヌードマウスへの各 MBT2 サブクローンの接種実験を施行した。MBT2/IL-12 は、やや腫瘍生着速度は緩やかではあったが、いずれのヌードマウスでも同等の腫瘍生着パターンを示した。このことは MBT2/IL-12 の抗腫瘍効果に関し T cell が重要な役割を果たしていることを示している。一方、MBT2/IL-18 はヌードマウスでの腫瘍生着が認められなかったが、NK 細胞活

性を失活させたヌードマウスにおいて抗腫瘍効果が一部失われており、NK 細胞が関与していることが示唆された。IL-18 の抗腫瘍効果が T 細胞と NK 細胞活性の両方を失活させても完全には失われていないことから、ここには T 細胞や NK 細胞よりも他のメカニズムが働いていることが予想される。この点については今後の検討が必要である。さらに、IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子の双方を導入したサブクローン (MBT2/IL-12+IL-18) では、通常のヌードマウスだけでなく NK 細胞失活ヌードマウスでも腫瘍生着が拒絶されていることから、MBT2/IL-12 と MBT2/IL-18 のそれぞれが有するメカニズムを保有していることが推測された。以上のことより、MBT2/IL-12+IL-18 の相乗的な効果に関しては、これを直接的に証明することは出来なかったが、IL-12 と IL-18 に関する抗腫瘍効果のメカニズムのどちらも備えていることが示された。今後はこうした double transfectant の利点をどういった形で利用出来るかについて検討していきたい。

Conclusion

今回の結果から、局所的な IL-12、IL-18 あるいはその双方の分泌によって転移を抑制すると同時に腫瘍生着を完全に拒絶できること、T 細胞および NK 細胞がそれぞれ IL-12 と IL-18 の抗腫瘍効果発現に重要な役割を担っていること、この 2 点を提示した。さらに IL-12 と IL-18 の遺伝子を同時導入することによって、双方の作用機序を介して抗腫瘍効果が発現されていることが明らかにされた。

Fig 1

Cell proliferation assay

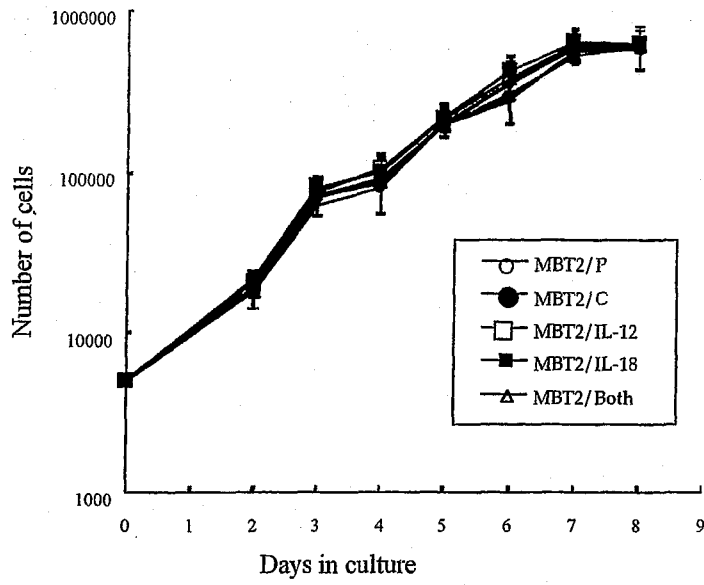


Fig 2

Tumor growth in C3H mice

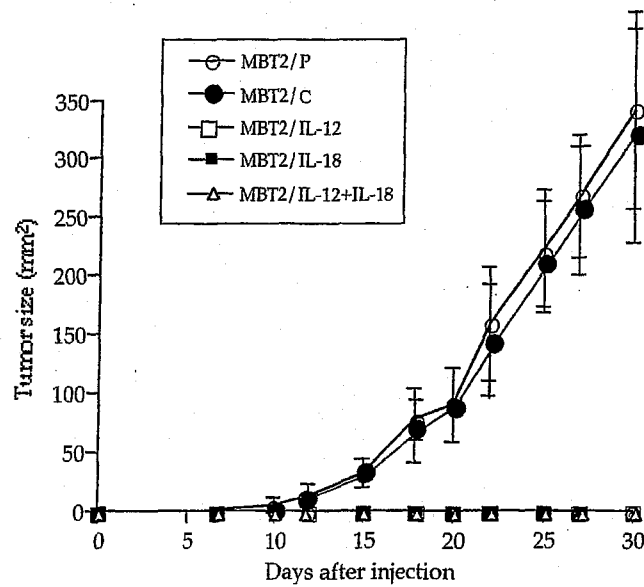


图 3

Tumor growth in nude mice

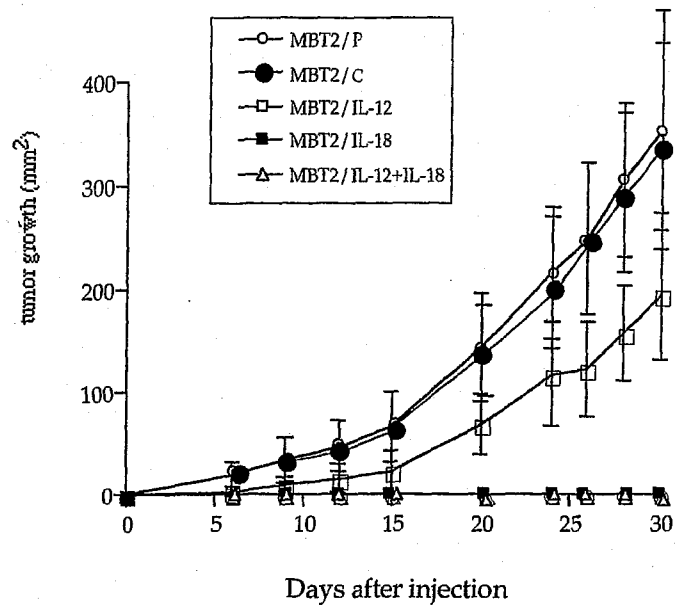
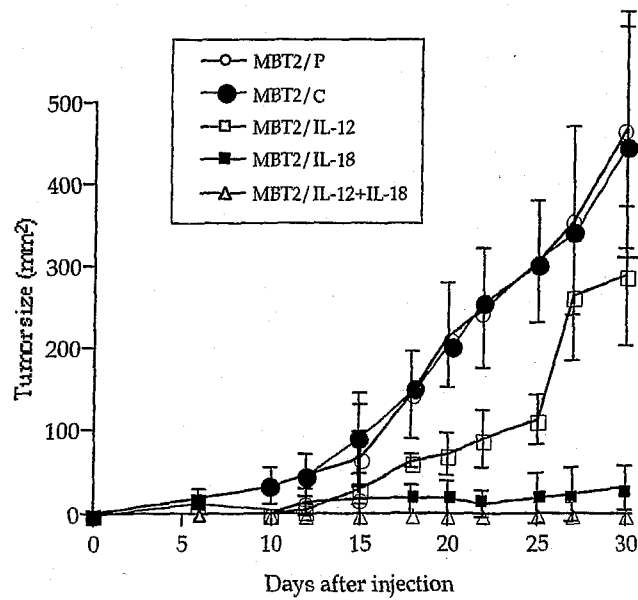


图 4

Tumor growth in the nude mice with NK cells depletion



論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1637 号	氏 名	彦坂 玲子
論文題目	<p>Antitumor effect of simultaneous transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes and its mechanism in a mouse bladder cancer model.</p> <p>マウス膀胱癌モデルにおけるインターロイキン 12 遺伝子およびインターロイキン 18 遺伝子同時導入による抗腫瘍効果の検討</p>		
審査委員	<p>主 査 杉村和朗</p> <p>副 査 丹生健一</p> <p>副 査 横崎 宏</p>		
審査終了日	平成 17 年 1 月 26 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

表 1

Production of metastatic nodules by MBT2 sublines after intravenous injection

Cell lines	No. of lungs nodules
MBT2/P	100 ± 21.0
MBT2/C	96 ± 15.8
MBT2/IL-12	0
MBT2/IL-18	0
MBT2/IL-12+IL-18	0

背景

インターロイキン 12 (IL-12) およびインターロイキン 18 (IL-18) は CD8T cell や NK cell を活性化し、抗腫瘍効果を示すサイトカインである。これら遺伝子を腫瘍細胞に導入しサイトカインを分泌させることにより抗腫瘍効果が得られるか否か、また双方の遺伝子を同時に腫瘍細胞に導入することによりさらに強力な抗腫瘍効果が得られるか否かにつき検討した。

方法

IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子をマウス膀胱癌細胞 (MBT2) へ遺伝子導入した。それぞれのサイトカイン発現は ELISA 法にて確認した。母細胞株 (MBT2/P)、発現ベクターのみを導入したコントロールサブクローン (MBT2/C)、IL-12 遺伝子導入サブクローン (MBT2/IL-12)、IL-18 遺伝子導入サブクローン (MBT2/IL-18) および IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子を同時に導入したサブクローン (MBT2/IL-12+ IL-18) を作成し、それらを同系マウス C3H へ皮下接種し腫瘍の増殖を比較した。また尾静脈内注入による肺転移の形成能について検討した。抗腫瘍効果に関する免疫担当細胞を解析するため、T cell が欠失したヌードマウスおよび NK 細胞に対する抗体を用いて NK 細胞の活性も失活させたヌードマウスにおいて抗腫瘍効果の減弱の有無を検討した。

結果

同系マウスに皮下注入あるいは静脈内注入した MBT2/P と MBT2/C はそれぞれ同程度の腫瘍増殖、転移を生じたが、MBT2/IL-12、MBT2/IL-18、MBT2/IL-12+ IL-18 では完全に拒絶され皮下腫瘍及び肺転移巣が形成されなかった。In vitro での各細胞株間の増殖能には差がなかった。

T cell の欠失したヌードマウスにて MBT2/IL-12 のみ腫瘍の生着を認めた。NK 細胞を除去したヌードマウスでは MBT2/IL-12 の腫瘍増殖には変化が認められなかったが、MBT2/IL-18 は MBT2/P に比較し緩徐ではあるが最終的に全てのマウスにて生着が認められた。MBT2/IL-12+IL-18 はいずれの系においても完全に拒絶された。以上のことより、IL-12 分泌 MBT2 の抗腫瘍効果には T cell が、IL-18 分泌 MBT2 の抗腫瘍効果には NK cell が関与していることが示唆された。IL-12 と IL-18 の双方を分泌する MBT2 では、T cell 及び NK cell 双方を介したメカニズムが存在すると思われた。

考察

今回の研究で、マウス膀胱癌モデルにおける IL-12 と IL-18 の遺伝子同時導入による抗腫瘍効果、およびそのメカニズムについて検討した。MBT2/P、MBT2/C は皮下注入後同様の腫瘍増殖をきたし、静脈注入では多数の転移巣を形成した。これに対し、MBT2/IL-12、MBT2/IL-18、MBT2/IL-12+IL-18 では皮下注入及び静脈内注入いずれにおいても腫瘍は完全に拒絶された。当初期待した MBT2/IL-12+IL-18 における相乗的な抗腫瘍効果の増強は証明できなかったが、これはそれぞれのサイトカイン単独においても十分な抗腫瘍効果が認められたため、それ以上の抗腫瘍効果を観察できなかったことが原因と思われた。抗腫瘍効果のメカニズムを解明するため、ヌードマウスおよび NK 細胞活性を失活させたヌードマウスへの各 MBT2 サブクローンの接種実験を施行した。MBT2/IL-12 は、ヌードマウスで腫瘍の生着を認め T cell が抗腫瘍効果に関し重要な役割を果たしていることが示された。一方、MBT2/IL-18 は NK 細胞活性を失活させたヌードマウスにおいて抗腫瘍効果が一部失われており、NK 細胞が関与していることが示唆された。さらに、IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子の双方を導入したサブクローン (MBT2/IL-12+IL-18) では、通常のヌードマウスだけでなく NK 細胞失活ヌードマウスでも腫瘍生着が拒絶されていることから、MBT2/IL-12 と MBT2/IL-18 のそれぞれが有するメカニズムを保有していることが推測された。以上のことより、MBT2/IL-12+IL-18 の相乗的な効果に関しては、これを直接的に証明することは出来なかったが、IL-12 と IL-18 に関する抗腫瘍効果のメカニズムのどちらも備えていることが示された。

また IL-12 遺伝子と IL-18 遺伝子の同時導入株では双方のメカニズムを介して抗腫瘍効果を発揮していた。

以上、本研究ではマウス膀胱癌モデルを用いて、IL-12 と IL-18 の遺伝子同時導入による抗腫瘍効果とそのメカニズムについて検討した。その結果、従来明らかにされていなかった IL-12 と IL-18 単独並びに相乗的抗腫瘍効果のメカニズムについての重要な知見が得られた。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。