



Interleukin-21 Gene Transfection Into Mouse Bladder Cancer Cells Results in Tumor Rejection Through the Cytotoxic T Lymphocyte Response

古川, 順也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3724

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003724>

※ 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。



【 80 】

氏 名・（本 籍） 古川 順也 （ 長崎県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1778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18年9月25日

【 学位論文題目 】

Interleukin-21 Gene Transfection Into Mouse Bladder Cancer Cells
Results in Tumor Rejection Through the Cytotoxic T Lymphocyte
Response
(細胞傷害性T細胞を介したインターロイキン21遺伝子導入マウス
膀胱癌細胞株の抗腫瘍効果)

審 査 委 員

主 査 教 授 丹 生 健 一

教 授 黒 田 嘉 和

教 授 横 崎 宏

【緒言】

転移性膀胱癌に対する治療は抗癌化学療法が主体であるが、長期生存は稀で予後不良である。様々な新規抗癌剤が試行されているもののその成績は満足できるものではなく新たな治療薬の開発が望まれる。一方、ハイリスク表在性膀胱癌に対する BCG 膀胱内注入療法は確立した治療法であり局所制御の点では優れた抗腫瘍効果を示す。これは膀胱癌に対する免疫治療の有用性を示唆していると考ええる。

腫瘍免疫療法の一分野としてのサイトカイン療法はインターフェロンやインターロイキン-2(interleukin-2: IL-2)の発見とともに急速な発展をとげてきた分野である。腎細胞癌においてはすでにインターフェロンや IL-2 が臨床応用されているもののその治療成績はいまだ満足すべきものではない。その後も IL-12, IL-15 および IL-18 などを用いたサイトカイン療法が検討されているが、その抗腫瘍効果や副作用の面から IL-2 を凌駕するほどの効果は得られていないのが現状である。最近新しく同定された IL-2 サイトカインファミリーである IL-21 は強力な腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)の分化誘導や NK 細胞の細胞傷害活性を増加させることが知られており、癌に対する新たな治療薬として期待されている。そこで今回我々は膀胱癌において、IL-21 による免疫療法の有用性を探るため、マウス膀胱癌細胞株(MBT2)に IL-21cDNA を遺伝子導入し、その抗腫瘍作用と作用機序につき検討した。

【方法】

(1)IL-21 産生マウス膀胱癌株(MBT2/IL-21)の樹立

C3H マウス origin の MBT2 マウス膀胱癌細胞を用いた。IL-21 cDNA は RT-PCR 法にてマウス脾細胞より得た。PCR により得られた産物を発現ベクターに組み込み、MBT2 細胞にリポフェクトアミン法を用いて遺伝子導入を行った。得られた IL-21 遺伝子導入細胞株の培養上清中の IL-21 発現量をサンドイッチ ELISA 法にて確認し、高発現細胞株(MBT2/IL-21)を選択した。

(2)IL-21 遺伝子導入マウス膀胱癌細胞株(MBT2/IL-21)の腫瘍増殖能の評価

MBT2/IL-21 の in vitro および in vivo での増殖能を母細胞である MBT2 と比較した。6 well plate にて細胞を培養、連日細胞数を計測して in vitro での増殖曲線を調べた。また 1×10^6 個の細胞を同系マウスの右側腹部に皮下接種し in vivo での腫瘍サイズを経時的に計測した。

(3)各種免疫不全マウスにおける MBT2/IL-21 腫瘍増殖能の変化

抗 asialo GM1 抗体(抗 NK 細胞), GK1.5(抗 CD4+T 細胞), 53-6.72(抗 CD8+T 細胞) および HB170(抗 IFN- γ)のマウス腹腔内投与を行い、各々の細胞を欠失させた同系マウスを作成した。上記と同様の方法にて MBT2/IL-21 細胞を皮下接種し、増殖能の変化を調べることで抗腫瘍効果の作用機序を調べた

(4)MBT2/IL-21 拒絶マウスへの母細胞 MBT2 の再接種

同系マウスの右側腹部に MBT2/IL-21 を皮下接種し、腫瘍が完全に拒絶された後に再度母細胞を左側腹部に皮下接種し、母細胞の腫瘍サイズを経時的に計測した。

(5)MBT2/IL-21 のワクチン効果に関する検討

マイトマイシン C 処理にて増殖能を失活させた MBT2/IL-21 および母細胞を腫瘍ワクチンとして同系マウスの左側腹部皮下に接種し 7 日後に右側腹部に母細胞を接種し腫瘍サイズを経時的に計測した。

(6)腫瘍特異的細胞傷害活性の測定

MBT2/IL-21 および母細胞を同系マウスの側腹部に皮下接種し、14 日後に各々のマウスの脾細胞を採取し、in vitro で母細胞と 4 日間共培養後に母細胞に対する細胞傷害活性を CytoTox96 nonradioactive cytotoxicity assay を用いて測定した。また脾細胞の採取前に各マウスに抗 asialo GM1 抗体(抗 NK 細胞), 53-6.72 抗体(抗 CD8+T 細胞)を投与し NK 細胞および CD8+T 細胞を失させた場合にも同様の検討を行った。

(7)免疫組織学的検討

MBT2/IL-21 および MBT2 母細胞の皮下腫瘍を採取、凍結切片を作成し、抗 asialo GM1 抗体(抗 NK 細胞), GK1.5(抗 CD4+T 細胞), および 53-6.72(抗 CD8+T 細胞)抗体を用い免疫組織学的染色を行い、腫瘍内への浸潤細胞の評価を行った。

【結果】

(1)IL-21 産生マウス膀胱癌株(MBT2/IL-21)の樹立

IL-21 遺伝子導入によって樹立したマウス膀胱癌細胞株(MBT2/IL-21)の培養上清中には 500-1000pg/ml の IL-21 の分泌が認められた。一方で母細胞およびコントロールベクターのみを導入した細胞の培養上清中には IL-21 の分泌はほとんど認められなかった。

(2)IL-21 遺伝子導入マウス膀胱癌細胞株(MBT2/IL-21)の腫瘍増殖能の評価

MBT2/IL-21 細胞の in vitro での増殖能は母細胞と変わらず同等の増殖能を有していた。同系マウスへの皮下接種による in vivo の増殖能の検討では、母細胞がすみやかに腫瘍を形成するのと比較し、MBT2/IL-21 は同系マウスに完全に拒絶された。

(3)各種免疫不全マウスにおける MBT2/IL-21 腫瘍増殖能の変化

同系マウスへの皮下接種により示された MBT2/IL-21 の抗腫瘍効果は NK 細胞や CD4+T 細胞を欠失させたマウスでは変化は認められなかったが CD8+T 細胞を欠失させたマウスにおいてのみ減弱した。

(4)MBT2/IL-21 拒絶マウスへの母細胞 MBT2 の再接種

MBT2/IL-21 を拒絶したマウスに対する母細胞の再接種実験では 60%のマウスにおいて母細胞は拒絶され、無処置マウスに対し母細胞を接種した場合と比較し有意に腫瘍の生着を抑制した。

(5)MBT2/IL-21 のワクチン効果に関する検討

マイトマイシン C 処理した MBT2/IL-21 の先行投与は母細胞である MBT2 を同様に投与した場合と比べ、有意に優れたワクチン効果を示した。

(6)腫瘍特異的細胞傷害活性の測定

MBT2/IL-21 を同系マウスの側腹部に皮下接種し、14 日後に採取した脾細胞を用い測定した母細胞に対する細胞傷害活性は、母細胞を皮下接種した場合や無処置マウスの脾細胞と比べ強い活性を示し、この細胞傷害活性は CD8+T 細胞除去マウスにおいて消失した。

(7)免疫組織学的検討

免疫組織学的検討では、MBT2/IL-21 腫瘍内には母細胞の腫瘍と比較し有意に CD8+T 細胞の腫瘍内浸潤が増加していることが観察された。CD4+細胞および NK 細胞の腫瘍内浸潤の程度は母細胞と比較し差は認めなかった。

【考察】

IL-21 は活性型 CD4+T 細胞より産生され、そのレセプターは T 細胞、B 細胞、NK 細胞、および樹状細胞などに発現し様々な生理活性を示す。IL-21 の腫瘍免疫における主な生理活性としては、NK 細胞の成熟および細胞傷害活性の増強に関与し、その後 NK 細胞よりの IFN- γ の産生を亢進させ、さらには腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を分化誘導する作用が認められている。腫瘍に対する生体の免疫反応において、IL-21 は生得免疫から獲得免疫への橋渡しという重要な役割を担っていると考えられている。諸家の報告では IL-21 の抗腫瘍作用を担う免疫担当細胞は用いた癌腫の免疫原性の違いやマウスの種差により相違が生じていると考えられるが、主に NK 細胞および CD8+T 細胞と報告されている。初期段階では NK 細胞を惹起しその後細胞傷害性 T 細胞の誘導を中心とした免疫へと移行して行くのが妥当である。我々の実験では、(1)抗体投与により CD8+T 細胞を除去した時のみ MBT2/IL-21 の抗腫瘍効果は打ち消された。(2) IL-21/MBT2 腫瘍組織内への CD8+T 細胞の著明な浸潤像が認められた。(3)in vitro の細胞傷害活性の検討において IL-21/MBT2 拒絶マウス脾細胞の MBT2 母細胞に対する細胞傷害活性はコントロールと比べ強い活性を示し、この活性は CD8+T 細胞除去マウスにおいて減弱した。これらの結果より IL-21 遺伝子導入マウス膀胱癌細胞株 MBT2 における腫瘍拒絶のメカニズムは NK 細胞の関与は少なく、CD8+T 細胞が中心的役割を果たし細胞傷害性 T 細胞の誘導に重要であることが強く示唆された。また MBT2/IL-21 を拒絶したマウスに対する MBT2

母細胞の再接種実験およびワクチン効果に関する検討では MBT2/IL-21 のもつ MBT2 母細胞に対する強力なワクチン効果が示された。この作用は IL-12 に関する以前の検討と比較してもより強力なものであった。結論として、動物モデルで示された IL-21 の強力な抗腫瘍効果は今後臨床応用が大いに期待されており癌免疫治療におけるサイトカイン療法の中心的役割を担う可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1779号	氏 名	古川 順也
論文題目	<p>Interleukin-21 Gene Transfection Into Mouse Bladder Cancer Cells Results in Tumor Rejection Through the Cytotoxic T Lymphocyte Response</p> <p>細胞傷害性T細胞を介したインターロイキン21遺伝子導入マウス膀胱癌細胞株の抗腫瘍効果</p>		
審査委員	<p>主 査 丹生 健一</p> <p>副 査 黒田 嘉和</p> <p>副 査 横 崎 泰</p>		
審査終了日	平成 18 年 7 月 19 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

1. 序文

腫瘍免疫療法の一分野としてのサイトカイン療法はインターフェロンやインターロイキン-2(interleukin-2: IL-2)の発見とともに急速な発展をとげてきた分野である。最近新しく同定された IL-2 サイトカインファミリーである IL-21 は強力な腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞の分化誘導や NK 細胞の細胞傷害活性を亢進させることが知られており、癌に対する新たな治療薬として期待されている。申請者は、膀胱癌において、IL-21 による免疫療法の有用性を探るため、マウス膀胱癌細胞株(MBT2)に IL-21cDNA を遺伝子導入し、その抗腫瘍効果と作用機序につき検討した。

2. 方法

(1)IL-21 産生マウス膀胱癌株(MBT2/IL-21)の樹立および腫瘍増殖能の評価

マウス脾細胞より RT-PCR 法にて得た IL-21 cDNA を発現ベクターに組み込み、MBT2 マウス膀胱癌細胞にリポフェクション法にて遺伝子導入を行った。得られた IL-21 遺伝子導入細胞株の培養上清中の IL-21 発現量を ELISA 法にて確認し、高発現細胞株(MBT2/IL-21)を選択した。MBT2/IL-21 の in vitro および in vivo での増殖能を母細胞である MBT2 と比較した。6 well plate にて細胞を培養、連日細胞数を計測して in vitro での増殖曲線を調べた。また 1×10^6 個の細胞を同系マウスの右側腹部に皮下接種し in vivo での腫瘍サイズを経時的に計測した。

(2)各種免疫不全マウスにおける MBT2/IL-21 腫瘍増殖能の変化

抗 asialo GM1 抗体(抗 NK 細胞), GK1.5(抗 CD4+T 細胞), 53-6.72(抗 CD8+T 細胞)および HB170(抗 IFN- γ)のマウス腹腔内投与を行い、各々の細胞を欠失させた同系マウスを作成した。これら各種免疫不全マウスに MBT2/IL-21 細胞を皮下接種した際の抗腫瘍効果に与える影響を調べることにより、エフェクターとなる免疫担当細胞を同定した。

(3)MBT2/IL-21 のワクチン効果に関する検討

マイトマイシンC処理にて増殖能を失活させた MBT2/IL-21 およびコントロールとして同様の処理を行った母細胞(MBT2)を腫瘍ワクチンとして同系マウスの左側腹部皮下に接種し 7 日後に対側側腹部に母細胞を接種し腫瘍増殖を計測することにより腫瘍ワクチンとしての効果を調べた。

(4)腫瘍特異的細胞傷害活性の測定

MBT2/IL-21 および母細胞を同系マウスの側腹部に皮下接種し、14 日後に各々のマウスの脾細胞を採取し、in vitro で母細胞と 4 日間共培養後に母細胞に対する細胞傷害活性を cytotoxicity assay を用いて測定した。

(5)免疫組織学的検討

MBT2/IL-21 および MBT2 母細胞の皮下腫瘍を採取、凍結切片を作成し、抗

asialo GM1 抗体(抗 NK 細胞), GK1.5(抗 CD4+T 細胞), および 53-6.72(抗 CD8+T 細胞)抗体を用い免疫組織学的染色を行い、腫瘍内への浸潤細胞の評価を行った。

3. 結果

(1)IL-21 産生マウス膀胱癌株(MBT2/IL-21)の樹立および腫瘍増殖能の評価

MBT2/IL-21 の培養上清中には 500-1000pg/ml の IL-21 の分泌が認められた。MBT2/IL-21 細胞の in vitro での増殖能は母細胞と変わらなかったが、同系マウスへの皮下接種による in vivo の増殖能の検討では、母細胞がすみやかに腫瘍を形成するのと比較し、MBT2/IL-21 は完全に拒絶された。また MBT2/IL-21 を拒絶したマウスに対して母細胞を再接種した実験では 60%のマウスにおいて母細胞は拒絶され、MBT2/IL-21 が腫瘍ワクチンとしての効果も有することが示唆された。

(2)各種免疫不全マウスにおける MBT2/IL-21 腫瘍増殖能の変化

同系マウスへの皮下接種により示された MBT2/IL-21 の抗腫瘍効果は NK 細胞や CD4+T 細胞を欠失させたマウスでは変化は認められなかったが CD8+T 細胞を欠失させたマウスにおいてのみ減弱した。このことより MBT2/IL-21 の抗腫瘍効果には CD8+T 細胞が深く関与していることが示唆された。

(3)MBT2/IL-21 のワクチン効果に関する検討

マイトマイシン C 処理した MBT2/IL-21 の先行投与は母細胞である MBT2 を同様に投与した場合と比べ、有意に母細胞の腫瘍増殖を抑制した。このことより MBT2/IL-21 が強力なワクチン効果を有することが確認された。

(4)腫瘍特異的細胞傷害活性の測定

MBT2/IL-21 を皮下接種したマウスの脾細胞の母細胞に対する細胞傷害活性は、母細胞を皮下接種したマウスや無処置マウスの脾細胞と比べ有意に高かった。また、この細胞傷害活性は CD8+T 細胞除去マウスにおいて消失した。

(5)免疫組織学的検討

免疫組織学的検討では、MBT2/IL-21 腫瘍内には母細胞の腫瘍と比較し有意に CD8+T 細胞の腫瘍内浸潤が増加していることが観察された。CD4+細胞および NK 細胞の腫瘍内浸潤の程度は母細胞と比較し差を認めなかった。

4. 考察

IL-21 遺伝子導入 MBT2 は優れた抗腫瘍効果を示し、(1)抗体投与により CD8+T 細胞を除去した時のみ MBT2/IL-21 の抗腫瘍効果は打ち消された。(2)IL-21/MBT2 腫瘍組織内への CD8+T 細胞の著明な浸潤像が認められた。(3)in vitro の細胞傷害活性の検討において IL-21/MBT2 拒絶マウス脾細胞の MBT2 母細胞に対する細胞傷害活性はコントロールと比べ強い活性を示し、この活性は CD8+T 細胞除去マウスにおいて消失した。これらの結果より IL-21 遺伝子導

入マウス膀胱癌細胞株 MBT2 における腫瘍拒絶のメカニズムは NK 細胞の関与は少なく、CD8+T 細胞が中心的役割を果たしていることが強く示唆された。また MBT2/IL-21 を拒絶したマウスに対する MBT2 母細胞の再接種実験およびワクチン効果に関する検討では MBT2/IL-21 のもつ強力なワクチン効果が示された。動物モデルで示された IL-21 の強力な抗腫瘍効果は今後臨床応用が期待されており癌免疫治療におけるサイトカイン療法の中心的役割を担う可能性が示唆された。

以上のように、本研究は新規サイトカインである IL-21 をマウス膀胱癌細胞株に遺伝子導入しその抗腫瘍効果および作用機序につき研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった転移性膀胱癌に対する IL-21 を用いた新規サイトカイン療法の臨床応用に際する重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。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。