

学位論文題名

Vaccination Effect of Interleukin-6-producing Pancreatic Cancer Cells in Nude Mice: A Model of Tumor Prevention and Treatment in Immune-compromised Patients

(ヌードマウスにおける膵癌細胞由来 IL-6 のワクチン効果について)

学位論文内容の要旨

I. 目的

膵癌では、その多発性肝転移を含む遠隔臓器への転移性の高さが予後を不良にする一因となっている。我々はこれまでに膵癌IL-6産生株と非産生株では産生株のほうが有意に肝転移率が低下することを明らかにし、IL-6非産生株にIL-6産生性を付加すると肝転移能が有意に低下することを*in-vivo*で証明してきた。即ち、IL-6の産生性は膵癌の肝転移を抑制する重要な因子であることを証明した。また、T/B細胞欠落のSCID beigeマウスでは膵癌細胞由来IL-6による腫瘍の退縮が認められない一方で、T細胞のみ欠落したヌードマウスでは腫瘍の退縮が認められた。今回、膵癌細胞由来IL-6の主として液性免疫を介した免疫反応へ及ぼす影響を明らかにするとともに、T細胞欠落ヌードマウスにおける膵癌細胞由来IL-6のワクチン効果について検討した。この検討は、免疫不全状態にある患者に対する効果を予見するモデルとしての役割が期待される。

II. 材料と方法

動物は雌の4<sup>6</sup>週齢のヌードマウス(BALB/C nu/nu)を用いた。全てのマウスは病原菌を持たない状態で管理され、 $\gamma$ 線照射の食餌と滅菌水が配給された。ヒト膵癌株は外科切除材料から新たに樹立したPCI-24, PCI-43を用いた。PCI-43にIL-6を遺伝子導入し、IL-6高産生株PCI-43hを得た。対照群としてOSRC-2(腎癌株)、MKN-28, HSC-42, TAKIGAWA(胃癌株)、HTOA(卵巣癌株)、SQ-5(肺癌株)、HUVECも用いた。これらの材料を用いて下記の実験を行った。

1. PCI43hを皮下注したヌードマウス血清中のPCI43を認識するIgGの経時的変化を間接フローサイトメトリーにて検討した。PCI43h  $1 \times 10^6$ /100ml PBSをヌードマウスに皮下注後、0,1,2,3,4,6週に犠牲死させ、その血清をプロテインAカラムを用いてIgGを精製し一次抗体として用いた。二次抗体には蛍光標識抗マウスIgGラビット抗体を用いて、PCI43を標的細胞として間接フローサイトメトリーを行った。対照群として一次抗体を正常ヌードマウス血清を精製したものをを用いた。

2. PCI43hを皮下注したヌードマウス血清中のIgGの免疫特異性について検討した。4週で犠牲死させて得られた血清中のIgGを一次抗体として用い、膵癌細胞株及び他の癌細胞株を標的細胞として間接フローサイトメトリーにて比較検討した。

3. PCI43hの皮下注がPCI43の腫瘍形成へ及ぼす影響を検討した。PCI43h  $1 \times 10^6$ /100ml PBSをヌード

マウスの左側腹部に皮下注すると同時にPCI43  $1 \times 10^7/100\text{ml}$  PBSを右側腹部に皮下注した。その後3日ごとに右側腹部の腫瘍径を測定した。対照群は左側腹部にPCI43hの代わりにPCI43を同量皮下注した群と左側腹部にPCI43h、右側腹部にPCI24を皮下注した群を用いた。

4. 脾臓に対するIL-6のワクチン効果について検討するため、PCI43h  $1 \times 10^6/100\text{ml}$  PBSをヌードマウスの左側腹部に皮下注し、4週後PCI43  $1 \times 10^7/100\text{ml}$  PBSを右側腹部に皮下注し、その後3日ごとに腫瘍径を測定した。対照群は左側腹部にPCI43hの代わりにPCI43を皮下注した群を用いた。

### III 結果

1. PCI43を認識するヌードマウス血清中のIgGはPCI43h皮下注群で有意に上昇を認めた。またPCI43h注入後4週まで上昇しその後も継続した。

2. PCI43h皮下注により誘導されたIgGはPCI43を認識したが、PCI24及び他の種々の細胞株は認識しなかった。

3. PCI43hの $1 \times 10^7/0.1\text{ml}$  PBS皮下注群は対照群に比べて腫瘍結節の増殖が3週半以降、有意( $P < 0.003$ )に抑えられた。

4. PCI43h  $1 \times 10^7/0.1\text{ml}$  PBS皮下注群はPCI43  $1 \times 10^7/0.1\text{ml}$  PBS皮下注した対照群に比べて腫瘍結節の増殖が2週以降、有意( $P < 0.008$ )に抑えられた。

### IV. 考察

PCI43hを注入したヌードマウスのPCI43に対する血清IgGの反応性は4週になるまで上昇を続け、それ以降も継続した。そしてPCI43hを注入したヌードマウスでは皮下注後約4週後でも腫瘍の自然退縮が見られたこともこのことに一致している。我々は以前の研究で、マウス血中で上昇したIL-6は、マウスではなくヒト由来であることを*in-vivo*で確認した。今回のモデルにおける主として液性免疫反応を介した腫瘍退縮の効果は、IgG反応性のあるPCI43では腫瘍退縮を認め、IgG反応性に乏しいPCI24では認められず抗原特異的と考えられた。また、PCI43hを注入してから4週以降に接種されたPCI43に対してもこの効果が残存していることからワクチン効果の存在も考えられた。我々は今回のような効果を認めるにはPCI43h皮下注部局所で高濃度のIL-6が持続的に存在することが重要であると考えている。しかしIL-6を大量産生していたとしても、免疫誘導可能な表面抗原が欠落しているとすれば、結果としてはあまり効果は期待できないかもしれない。

脾臓の治療は現段階では外科切除に負うところが多いが、肝転移、あるいは播種などにより手術療法だけでは限界があるのが実情である。また、患者がおかれた環境についても様々であり、今後は遺伝子療法、免疫療法などの治療とともに集学的な治療法によって原発巣以外の微小病巣や遺残癌の対策を練ることが急務である。今回の研究で腫瘍の産生するIL-6が液性免疫の賦活によって腫瘍の増殖を抑制することが明らかになった。また細胞性免疫不全動物においてワクチン効果が得られたことにより、いわゆる *immune-compromised host* に対する液性免疫賦活による抗腫瘍効果の可能性も示唆された。今後は脾臓細胞表面の、どの蛋白抗原が中心となって腫瘍増殖の抑制が起きているのかを解明し、脾臓における腫瘍増殖・転移形成の経路を証明していくと同時に、IL-6が及ぼすであろう副作用の低い有効な治療戦略を模索していく予定である。

### V. 結語

今回、我々はT細胞欠落のヌードマウスにおいて*in-vivo*で脾臓細胞由来のIL-6が、IgGを介して脾臓特異的なワクチン効果を誘導することを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 加 藤 紘 之  
副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

## Vaccination Effect of Interleukin-6-producing Pancreatic Cancer Cells in Nude Mice: A Model of Tumor Prevention and Treatment in Immune-compromised Patients

(ヌードマウスにおける膵癌細胞由来 IL-6 のワクチン効果について)

ヒトIL-6高産生膵癌細胞株PCI-43hは、T/B細胞の欠落したSCID/beigeマウスでは腫瘍の退縮が認められず、T細胞のみ欠落したヌードマウスでは一定期間後に腫瘍の退縮が認められる。この腫瘍抑制機序として、膵癌細胞由来IL-6が主として液性免疫を介して腫瘍減退縮を誘導していると考え、その機序を明らかにするために、T細胞欠落ヌードマウスにおける膵癌細胞由来IL-6の腫瘍抑制効果およびワクチン効果について、腫瘍反応性IgGの経時的变化と免疫特異性の確認を行って検討した。

その結果、ヒトIL-6非産生膵癌細胞株PCI-43を認識するヌードマウス血清中IgGの腫瘍反応性は、PCI-43h皮下注後4週まで上昇し、その後も継続することが判明した。免疫特異性に関する検討では、PCI-43hをヌードマウスに皮下注し、4週後に精製して得られた腫瘍反応性IgGはPCI-43を含む膵癌細胞3株を認識したが、PCI-24など認識されない株も認められた。他のヒト癌細胞株でも同様の結果であった。これらの結果をもとに、PCI-43hの皮下注がPCI-43の腫瘍形成へ及ぼす影響を検討するため、 $10^6$ 個のPCI-43hをヌードマウスの左側腹部に免疫源として皮下注すると同時に、 $10^7$ 個のPCI-43を反対側に皮下注した。その後3日ごとに右側腹部の腫瘍径を測定した。対照群は左側腹部にPCI-43hの代わりにPCI-43を同量皮下注した群と右側腹部にIgG反応性のないPCI-24を皮下注した群を用いた。その結果、PCI-43h皮下注群は対照群に比べて腫瘍結節の増殖が2週半以降、有意に抑えられた。また、膵癌に対するIL-6のワクチン効果について検討するため、 $10^6$ 個のPCI-43hをヌードマウスの左側腹部にワクチンとして皮下注後、4週目に $10^7$ 個のPCI-43を右側腹部に皮下注し、その後3日ごとに腫瘍径を測定した。ワクチンとしてPCI-43hを皮下注した群は対照群に比べて腫瘍結節の増殖が2週以降、有意に抑えられた。以上から、T細胞欠落のヌードマウスにおいて膵癌細胞由来のIL-6が、IgGを介して膵癌特異的なワクチン効果を誘導することが示唆された。

口頭発表において、副査の加藤紘之教授より膵癌細胞株での特異性と臨床応用への展望

について質問があった。申請者は他の細胞株における腫瘍抑制効果の可能性と腫瘍表面抗原の同定による臨床応用の可能性について答えた。ついで、副査の吉木 敬教授より腫瘍拒絶の免疫機序、腫瘍表面抗原の同定法、臨床材料での比較検討について質問があった。申請者は各々に対し、ADCCによる腫瘍拒絶、SEREX法による腫瘍抗原の同定および臨床材料での今後の検討の必要性について答えた。さらに、主査の今村雅寛教授より液体性免疫を誘導する膀胱癌細胞株での共通した特徴、SCID/beigeマウスでのIL-6高産生膀胱癌細胞株PCI-43hの腫瘍増大の機序、CDCCの関与、他の癌細胞株での検討について質問がなされた。申請者は各々に対し、中分化型腺癌であること以外に共通する因子はないこと、PCI-43h自体の増殖能の旺盛さ、CDCCの可能性の低さおよび他のヒト癌細胞株での検討の必要性について答えた。

本研究は膀胱癌細胞由来IL-6が主として液性免疫を介して抗腫瘍効果を発揮する可能性を示した点で学術的価値が高く、今後の癌免疫療法への展望を開くものと期待され、審査員一同は申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。