

学生レポート

DC ワクチンをリンパ節投与した際の局所滞留性と免疫誘導能の検討

太田裕士¹⁾ 徐明利²⁾ 溝口出²⁾
 高梨正勝³⁾ 須藤カツ子⁴⁾ 黒田雅彦³⁾
 善本隆之²⁾ 粕谷和彦⁵⁾ 土田明彦⁵⁾
 畝崎榮¹⁾

¹⁾東京薬科大学医療実務薬学教室

²⁾東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門

³⁾東京医科大学分子病理学講座

⁴⁾東京医科大学動物実験センター

⁵⁾東京医科大学外科学第三講座

【要旨】「目的」腹腔内腫瘍に対する樹状細胞 (dendritic cell、以下 DC) ワクチンのリンパ節内投与の有効性を検討するため、マウスを用い、DC のリンパ節内投与時の滞留性と細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte、以下 CTL) 誘導能について検討した。「方法」リンパ節局所の滞留性は、IVIS XenoLight DIR で蛍光染色した BALB/c マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を別の同系マウスの左鼠径部リンパ節内に投与し、蛍光強度を経時的に *in vivo* イメージングで解析した (対照: 皮下投与群、静注群)。CTL 誘導能は、卵白アルブミン (OVA) 蛋白でパルスした C57BL/6 マウスの BMDC を別の同系マウスの左鼠径部リンパ節内に投与し、1 週間後、リンパ節を取りだし OVA テトラマー・PE と抗 CD8 抗体—FITC で染色し、抗原特異的 CTL の誘導を解析した (対照: PBS 投与群)。「結果」DC はリンパ節局所の滞留性については、投与 1 時間後から拡散し始めたが、5 日間の滞留を示した。CTL 誘導能は、DC 投与群では PBS 投与群に比し、有意に高かった ($p < 0.05$)。「結論」DC のリンパ節内投与は DC ワクチン療法における投与経路の候補になり得ると考えた。

はじめに

樹状細胞 (dendritic cell、以下 DC) ワクチン療法は腫瘍における新たな治療法として期待されている。DC ワクチン療法における DC の投与経路は、皮下、リンパ節、または静脈内投与の報告がある¹⁾²⁾。投与経路の違いによる細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic

T lymphocyte、以下 CTL) の誘導性の優劣について、マウスモデルとメラノーマ患者を対象とした試験があり、リンパ節内の投与の優位性を報告している¹⁾²⁾。しかしながら、投与された DC がどの程度局所に留まるかの詳細な報告はない。抗原提示された DC によりナイーブ T 細胞を活性化させることが DC ワクチンの主たる目的である。ナイーブ T 細胞はリン

平成 24 年 4 月 17 日受付、平成 24 年 8 月 10 日受理

キーワード: 樹状細胞、免疫ワクチン療法、抗原特異的 T 細胞

(別紙請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学病院消化器外科 粕谷 和彦)

TEL: 03-3342-6111 (5080) FAX: 03-3340-4575

パ組織（節）にもっとも存在する。そこで、我々はリンパ節、またはごく近傍に注入したDCが同部位に滞留するほど、より強くナイーブT細胞が活性化するのではないかという仮説をたてた。もし皮下投与のDCもリンパ節周囲に注入したDCも同じように組織流に乗って広く拡散した場合は、わざわざリンパ節へ投与する意味はない。そこで、リンパ節内に投与されたDCを蛍光ラベルすることで可視化し経時的に観察することで、他の経路である皮下、または静脈内投与されたDCとの局所滞留性を比較検討した。また、リンパ節内に投与されたDCの抗原特異的CTLの誘導性についても併せて検討したので、文献的知見を加えて報告する。

研究材料、および方法

DCの調製

BALB/c マウスと C57BL/6 マウス（7-10 週齢、メス）の大腿骨と腓骨から骨髓を採取し、赤血球溶解液を用いて溶血処置した後、培養液 RPMI 1640 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) +10% Fetal bovine serum (ニチレイバイオサイエンス、東京) に 100 μ l の 2-Mercaptoethanol と 10 ng/ml の顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子 (Granulocyte macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)、R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) にて、5%CO₂ 存在下に 37°C で培養した³⁾⁴⁾。培養液は 2 日おきに 75% ずつ交換した。培養 1 週間後に細胞を回収し、洗浄の後、GM-CSF (10 ng/ml) とリポ多糖 (1 μ g/ml) を添加した培養液に OVA 蛋白 (0.3 mg/ml) を加え、一晚 5%CO₂ 存在下に 37°C で培養した (OVA パルス DC)。同 DC の純度は 60% であった。

OVA パルス DC の局所滞留性測定

BALB/c マウス由来の OVA パルス DC を用いた。麻酔薬ネブタールにて麻酔下の同系マウス ($n=2$) の左単径部リンパ節直上を皮切し、同リンパ節を同定した。40 μ l/ml の IVIS XenoLight DIR (Caliper Life Sciences Inc., Hopkinton, MA, USA) で蛍光染色した OVA パルス DC を 27G の針を用いて、同部リンパ節内に 4×10^5 細胞 /100 μ l/ マウスを局所投与した。その後、測定機器 IVIS Spectrum を用いて、投与 5 分、および 1、6、24、48 時間、5 日後の蛍光強度において DC のリンパ節内への滞留性について解析した。対照として、マウス左側腹部に皮下注射、およ

び尾静脈経由で静注したマウスを用いた。

OVA パルス DC のリンパ節内 CTL の測定

C57BL/6 マウス由来の OVA パルス DC を用いた。DC 投与前日に、OT-I マウス (日本クレア) から精製した CD8⁺T 細胞 (2×10^6 細胞 / マウス) を C57BL/6 マウス ($n=5$) に静注した。前述の方法で左単径部リンパ節内に OVA 蛋白パルス DC を投与した。1 週間後、OVA 蛋白パルス DC を投与したマウスからリンパ節を摘出し、 1×10^6 個の細胞に調製した。その後、50 μ l のフローサイトメトリー用バッファー (2%FCS/0.05%NaN₃/PBS) で懸濁し、ブロッキング試薬として anti-CD16/32 (2.4G2、医学生物研究所、名古屋) を添加し、H-2K^bOVA テトラマー (Siinfekl、医学生物研究所) と抗 CD8 抗体-FITC (53.6.7、eBioscience, San Diego, CA, USA) で染色し、FACScan (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) を用いて、PE (+)、かつ CD8 (+) の血球比を算出し、抗原特異的 CTL 値とした。対照として、PBS を投与し、比較した ($n=5$)。

尚、本研究は動物実験に関する東京医科大学動物実験指針 (東京医科大学雑誌 51 巻 3 号 1993 年) を遵守し、同大動物実験委員会の承認 (研究課題「サイトカインによる免疫制御と疾患に関する研究—免疫」承認番号 大学 S-23043) に基づき実験を行った。

統 計

CTL 誘導の血球比の比較は Mann-Whitney の U 検定を行い、P 値 0.05 未満を有意差とした。

結 果

DC 投与 5 分、30 分、1 時間、6 時間、24 時間、48 時間、5 日後に測定した蛍光強度 (Photons/sec/cm²、平均値) を図 1A に示し、5 分、1 時間、6 時間、5 日後の蛍光写真を呈示した (図 1B)。DC の局所滞留性は、DC 投与から 6 時間後まではリンパ節投与群で最も高く、24 時間後で皮下投与群と逆転した。皮下投与群は投与直後から 5 日目まで安定して皮下に留まった。すなわち、皮下投与された DC も局所に留まり、ナイーブ T 細胞の豊富な周囲リンパ節までは拡散されなかった。一方、リンパ節投与の DC も局所に留まり、リンパ節から周囲へはほぼ拡散されなかった。静注群では、投与後、1 時間か

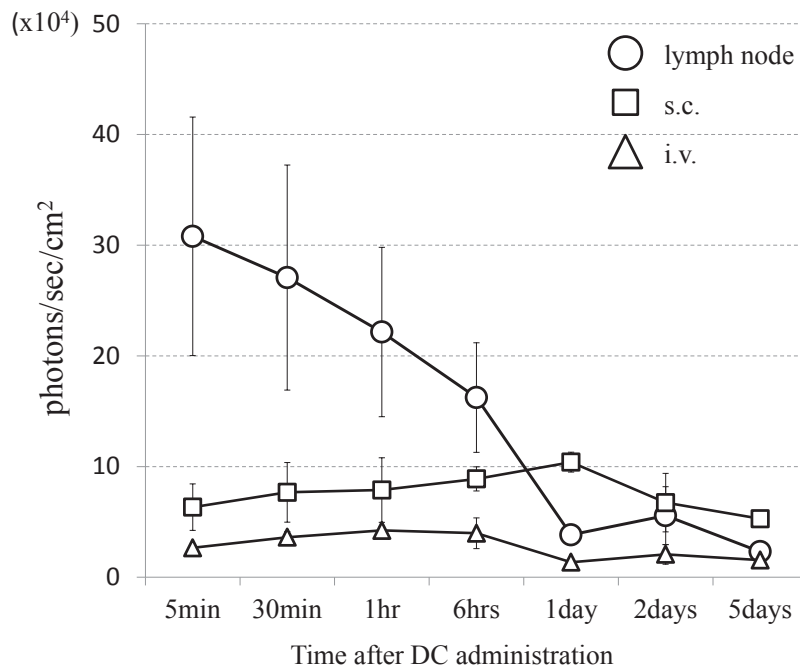


Fig. 1A Fluorescence levels of the retention of DCs. Average and standard deviation (error bar). X-axis, time. Y-axis, average of fluorescence level (photons/sec/cm²). Mice given DCs in lymph nodes (circles), mice given DCs by subcutaneous injection (s.c., squares) and mice given DCs via intravenous injection (i.v., triangles).

ら6時間で肺や脾臓で弱い蛍光強度の上昇が見られ、5日後開腹所見では脾臓と肝に蓄積が見られた。一方、リンパ節と皮下投与群では少ないが脾臓に蓄積が見られた(データは示していない)。全ての群において蛍光強度は少ないが5日間の滞留が見られた。

OVAパルスDCを投与したマウスリンパ節のFACS結果を示し、誘導された抗原特異性CTL血球を円内に示した(図2A)。同血球比の平均値±標準偏差は、リンパ節内OVAパルスDC投与群では0.836%±0.238、PBS投与群では0.38%±0.149であった($P<0.05$ 、図2B)。

考 察

DCは最も強力な抗原提示細胞と考えられており、一般的にDCワクチンの投与経路は皮内、または皮下投与である⁵⁾。Lambertら¹⁾は、マウスを用いMCA-105マウス肉腫細胞のlysateにてパルスしたDC(2.5×10^5 と 10×10^5 個)を皮下とリンパ節に投与し、その後の肺転移個数を比較した。同報告では、皮下、およびリンパ節のいずれの経路で投与しても 2.5×10^5 個投与群に比し、 10×10^5 個投与群で肺転移個数は減少した。さらに、 2.5×10^5 個投与

群、および 10×10^5 個投与群のいずれもリンパ節投与群は皮下投与群に比し、肺転移個数は減少した。Bedrosianら²⁾、およびVerdijkら⁵⁾はメラノーマ患者に対するDCワクチンの効果を検討し、リンパ節投与の有効性、特に投与DC個数の少ない場合に有利であると報告した²⁾⁵⁾。これらの報告の結果は、局所投与による抗原特異性CTLの誘導は投与DCの個数が多いこと、およびDCの個数が十分でない場合でもリンパ節投与が最も有効であることを示している¹⁾²⁾⁵⁾。メラノーマ同様に癌もそのほとんどがその周囲のリンパ節に転移する。そのため、癌の切除は周囲リンパ節の郭清を必要とする。一方、リンパ節は癌の転移の範囲がそれ以上に広範にならないようにブロックしていると同時に、局所の免疫を担っている。そのため、癌の標準手術では郭清するリンパ節の範囲はガイドライン等で決まっており、転移の可能性の少ない遠隔のリンパ節は温存される。我々は、ワクチン療法を手術の補助療法として行う臨床研究の基礎実験の位置付けで行っている。原発巣は切除されているので、原発巣へのワクチンの投与は行うことはできない。そこで残存する遠隔リンパ節へのDC投与による局所周囲への免疫誘導が、外科的切除範囲に入らなかった部位のmicro-

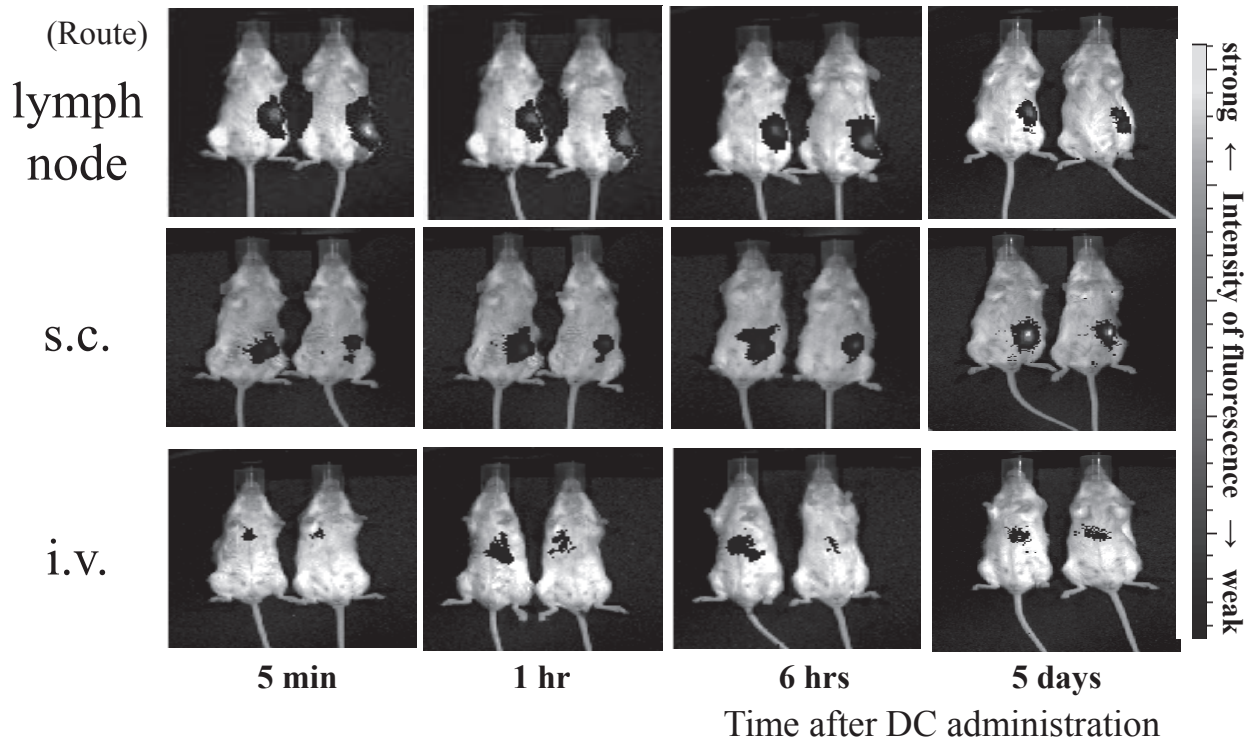


Fig. 1B Location and intensity of DCs in mice in vivo imaging system. Mice given DCs in lymph nodes (top row), mice given DCs by subcutaneous injection (s.c., middle row) and mice given DCs via intravenous injection (i.v., bottom row).

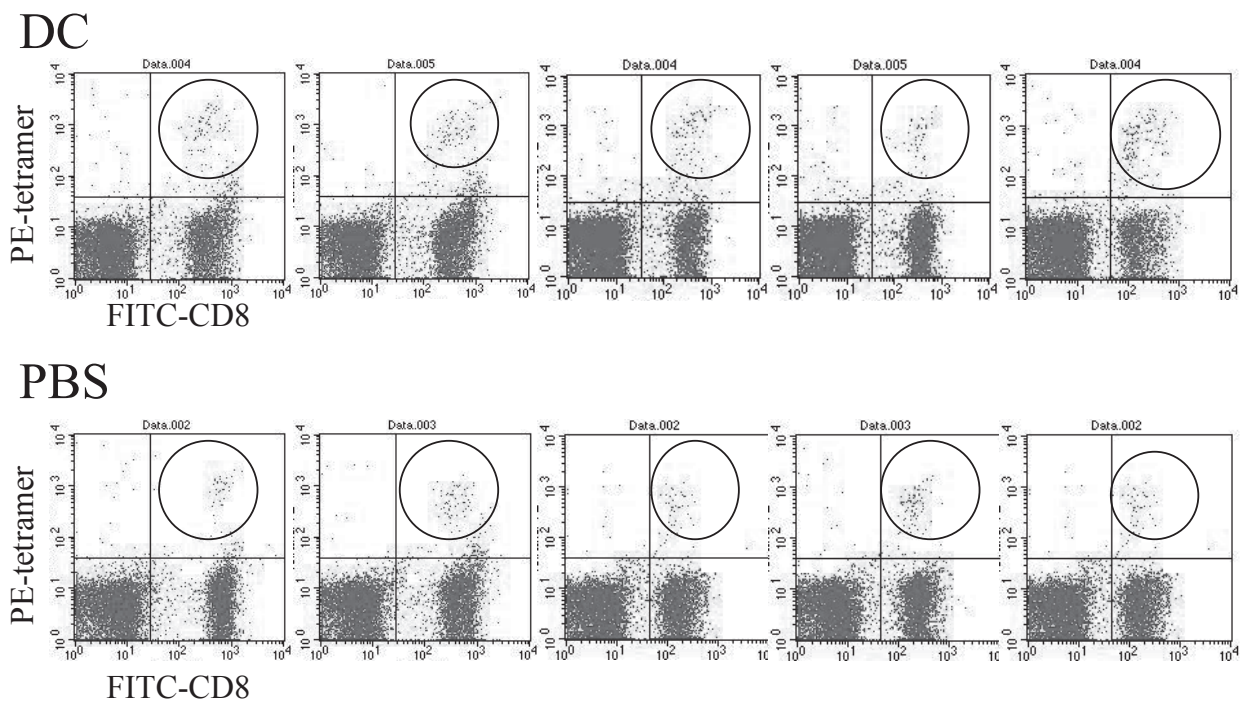


Fig. 2A Characteristics of CTLs in inguinal lymph node of mice given DCs according to fluorescence-activated cell analysis. X-axis, FITC-CD8. Y-axis, PE-tetramer. CTLs which showed double positive staining of FITC-CD8 and PE-tetramer, were judged optically (in each circle).

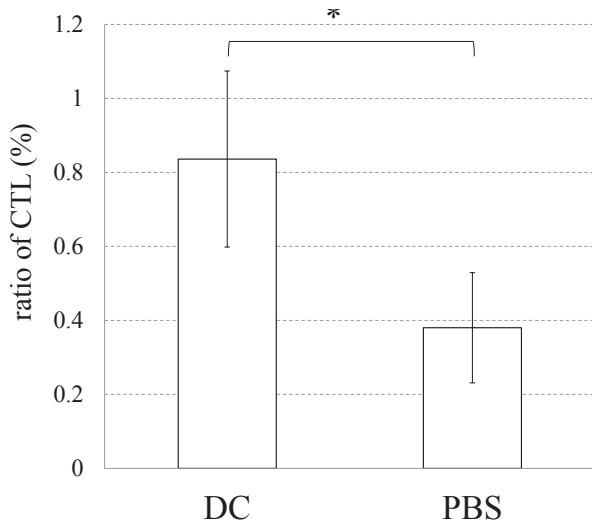


Fig. 2B The ratio of CTL (%). The ratio of CTL showed significant differences between the group receiving DCs in lymph nodes (left bar) and the group receiving PBS (right bar).
* $p < 0.05$

metastasis を制御する可能性があると考え、腹部の癌にとって予後を決定する重要な遠隔リンパ節である大動脈周囲リンパ節への DC 投与を思案している。胃癌、大腸癌や膵癌などの腹部の癌での大動脈周囲のリンパ節は、この遠隔のリンパ節に相当し切除の対象にはならない。また同リンパ節への転移例は極めて予後不良であることも知られている。このように腹部の癌にとって大動脈周囲のリンパ節はきわめて重要な意味があり、同リンパ節のように局所の免疫を担っている遠隔リンパ節を DC 投与の対象とすれば、局所の抗腫瘍効果を高める可能性がある。しかし、リンパ節には多数の血管とリンパ管の流入出があるため、同部に DC を投与した場合には早期に流出路に乗って拡散する可能性もある。本研究では、標識した DC を用い、経時的に DC の局在を評価した。その結果、少なくとも 5 日間はリンパ節に DC は停留し、かつ CTL を誘導した。これらの結果から、大動脈周囲リンパ節を含む腹腔内の遠隔リンパ節は DC の投与経路の候補となり得ると考

えた。

結 論

抗原提示された DC のリンパ節内滞留性、CTL 誘導性を検討した。その結果、DC は少なくとも 5 日間は同部に滞留し、CTL を誘導し得た。

謝 辞

本研究に当たり、研究計画およびワクチン療法全般に多くの助言を頂いた慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門の岡本正人先生に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Lambert LA, Gibson GR, Maloney M, Durell B, Noelle RJ, Barth RJ Jr: Intranodal immunization with tumor lysate-pulsed dendritic cells enhances protective antitumor immunity. *Cancer Res* **61**: 641-646, 2001
- 2) Bedrosian I, Mick R, Xu S, Nisenbaum H, Faries M, Zhang P, Cohen PA, Koski G, Czerniecki BJ: Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* **21**: 3826-3835, 2003
- 3) 辻本広紀、小野 聡、望月英隆: 菌体成分によるマウス樹状細胞の成熟過程に着目した Gram 陽性・陰性菌感染症の生体反応に関する検討。日腹部救急医学会誌 **27**: 557-562, 2007
- 4) Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, Schuler G: An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**: 77-92, 1999
- 5) Verdijk P, Aarntzen EH, Lesterhuis WJ, Boullart AC, Kok E, van Rossum MM, Strijk S, Eijkelker F, Bonenkamp JJ, Jacobs JF, Blokx W, Vankrieken JH, Joosten I, Boerman OC, Oyen WJ, Adema G, Punt CJ, Figdor CG, de Vries IJ: Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin Cancer Res* **15**: 2531-2540, 2009

Retention ability and CTL inducibility of DC vaccine administrated into lymph nodes

Yuji OTA¹⁾, Mingli XU²⁾, Izuru MIZOGUCHI²⁾, Masakatsu TAKANASHI³⁾,
Katsuko SUDO⁴⁾, Masahiko KURODA³⁾, Takayuki YOSHIMOTO²⁾, Kazuhiko KASUYA⁵⁾,
Akihiko TSUCHIDA⁵⁾, Sakae UNEZAKI¹⁾

¹⁾Department of Clinical Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

²⁾Department of Immunoregulation, Institute of Medical Science, Tokyo Medical University

³⁾Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University

⁴⁾Animal Research Center, Tokyo Medical University

⁵⁾3rd Department of Surgery, Tokyo Medical University

Abstract

Background : To test the efficacy of the intra-lymph node administration of a dendritic cell (DC) vaccine for intra-abdominal tumors, we evaluated the retention of DCs and their cytotoxic T lymphocytes (CTL)-inducing capacity after administration. **Materials and Methods :** Using an IVIS imaging system®, the retention of DCs in lymph nodes was analyzed by administering fluorescence-labeled DCs of one BALB/c mouse by Xenolight DIR spectrum® and into the left inguinal lymph node of another BALB/c mouse, followed by sequential in vivo imaging of the fluorescence intensity. Ovalbumin (OVA)-pulsed bone marrow DCs of one BALB/c mouse were administered into the left inguinal lymph node of another BALB/c mouse, and, one week later, the lymph node was removed and stained with OVA tetramer-phycoerythrin and fluorescein isothiocyanate conjugated anti-CD8 antibody to analyze the ability of DCs to induce antigen-specific CTLs. **Results :** DCs began to disperse in the lymph node 1 hour after administration, but were retained there for 5 days. The CTL-inducing ability was significantly higher in the DC-administered group than in the PBS-administered group. **Conclusion :** Intra-lymph node administration can be a possible route of administration in DC vaccine therapy.

〈**Key words**〉 : Dendritic cell, Immune-vaccine therapy, Cytotoxic T lymphocytes
