

## Exposure to low-dose radiation enhanced the antitumor effect of a dendritic cell vaccine

低線量放射線照射による樹状細胞ワクチンの抗腫瘍効果の増強

Sinian Wang<sup>1</sup>, Huijie Yu<sup>1</sup>, Rui He<sup>1</sup>, Xiujuan Song<sup>1</sup>, Shu Chen<sup>1,2</sup>,  
Nan Yu<sup>1</sup>, Wei Li<sup>1</sup>, Fengsheng Li<sup>1</sup> and Qisheng Jiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab of Radiation Damage Research, The General Hospital of the PLA Rocket  
Force, Beijing, China

<sup>2</sup>Huangsi Clinic of PLA Strategic Support Force, Beijing, China

Dose-Response. 2019; 1-9. DOI: 10.1177/1559325819832144.

翻訳者 東京理科大名誉教授 小島周二

### 要旨

従来の方法によって作製された樹状細胞 (DC) を用いたがんワクチンが臨床で十分に作用しない原因として、遊走能が不十分であることに起因する。私達のこれ迄の培養細胞を用いた研究では、DCを低線量放射線 (X線, 0.2Gy) で照射すると遊走能が上昇することを明らかにした。また、本研究ではマウス骨髄由来DCのワクチン調製過程でのLDR (0.2Gy) 照射が本ワクチンの抗腫瘍効果を高めるか否かを検討した。この結果、LDR照射後にDCの遊走能が有意に増加した。さらに、LDR照射DCはT細胞増殖能及細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) の細胞傷害作用も増強させた。腫瘍移植マウスモデルを用いたインビボ研究では、LDR照射DCワクチンの皮下投与により担がんマウスの生存率増加、及び血清インターフェロン $\gamma$ 及びインターロイキン-12のアップレグレーションを伴い、腫瘍組織へのCTLの遊走能、さらにはがん細胞のアポトーシスを増加させた。これらの結果は、DCワクチン調製過程でのLDR (0.2Gy) 照射が、DCワクチンの抗腫瘍作用を高めることを示唆する。

### Keywords

低線量放射線 (LDR)、樹状細胞、腫瘍治療ワクチン、遊走

## 序論

樹状細胞 (DCs) は“プロフェッショナル”で、且つ非常に効率的な細胞抗原提示機能を有する最も重要な抗原提示細胞である。非リンパ系細胞に存在するDCsは悪性腫瘍由来の抗原、感染、及び同種異系細胞を捕獲、その後これら抗原をペプチド-主要組織適合性に加工する。抗原付加DCsは排泄リンパ節 (LN) 等の二次リンパ系器官へ移行し、ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞に抗原を提示することで、細胞傷害性Tリンパ球 (CTLs) 及びナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞を刺激 (活性化) し、又B細胞の抗体分泌細胞への分化にも寄与する。<sup>1</sup> 宿主防御に於いて、エフェクターCTLは種々の機序を介した悪性/感染標的細胞殺傷で中心的役割を果たす。<sup>2</sup> しかしながら、感染細胞とは異なり、悪性細胞に対しては免疫反応抗原性が低い為DC活性化作用は弱く、又がん細胞から微小環境中へ分泌されるサイトカインの抑制効果により一般的に免疫応答は弱い、誘導されないこともある。<sup>3-5</sup>

がん抗原を用いてDCsを活性化する為のワクチンがインビトロの実験系で開発され、ナイーブT細胞を初回 (予備) 刺激ことで活性の低いT細胞を活性化することが出来る。昨今、DCベースワクチン腫瘍療法が開発され、インビトロの実験系で腫瘍抗原を用いることでDCsを活性化でき、微弱な抗腫瘍免疫反応を誘導される様になった。今日、エクスピボ治療用DCsは通常、インビトロでの刺激によって生成される；即ち、末梢血単核球 (PBMCs) を顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF) 及びインターロイキン (IL-4) を含むサイトカインカクテルとインビトロで刺激することで調製、その後腫瘍抗原が負荷され、DCsの成熟に必要なリポ多糖類又は腫瘍壊死因子TNF等の刺激が与えられる。<sup>6,7</sup> DCベースの腫瘍治療治験が数種のがんについて報告されている。<sup>8,9</sup> しかしながら、本ワクチンが有する腫瘍特異的T細胞反応性が低い為、治療効果がほとんど得られていない。<sup>10,11</sup> これ迄の治験結果によれば、成熟DCsワクチン皮下投与後にリンパ節 (LNs) に移行するものは5%以下である。<sup>12</sup> この結果は、Verdijk等<sup>13</sup> によって行われた別の研究によっても確認された。これらの結果は、LNへのDCsの非効率的な移行が本細胞の腫瘍特異的T細胞反応性の低下に関与することを示唆する。

動物やヒトで低線量放射線 (LDR) がT細胞やナチュラルキラー (NK) 細胞の活性増強を介して、免疫ネットワークにホルミシス効果を誘導することが報告されている。<sup>13-17</sup> さらに、私達のこれ迄の研究で、ヒトPBMC由来DCsの

LDR (0.2Gy) 単回照射がナイーブT細胞 (Th0) をTh1へ分化させ、<sup>18-20</sup> 又CD8<sup>+</sup>CTLの活性化T細胞への誘導に重要な役割を果たすIL-12の生産を促進し、T細胞の増殖を高めることを見出した。<sup>21</sup> さらに、DCsの遊走能がこのLDR照射後に有意に誘導されることを示した。<sup>22</sup> これらの結果は、LDR照射がDCsの遊走能と共にIL-12産生を高めることにより、DC機能を高め、又恐らくDCベースの腫瘍ワクチン効果を改善する有力な方法になることを示唆する。

本研究では、LDR (0.2Gy) 単回照射マウス骨髄由来DCsの遊走能に対する効果、さらにLDRがインビトロ及びインビボでのDCベース抗腫瘍効果を高めるか否かを検討した。

## 実験材料と方法

### 細胞株

ルイス肺がん (LLC1) 細胞は、Dr. Cheng Wu (The Second Artillery General Hospital) より供与され、10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) で培養維持した。

### 動物

8週齢の雄性C57BL/6 (B6) マウスはバイタルリバー研究所動物技術有限公司 (Beijing, China) より購入した。全てのマウスは公認施設で飼育し、実験のプロトコールは第二砲兵総合病院の動物取扱委員会によって承認された。

### 樹状細胞 (DCs) の調製、培養、及びLDR照射

DCs は、Inaba 等によるプロトコール<sup>23</sup> に若干の修正を加えた方法によりマウス骨髄細胞から調製した。即ち、マウスの大腿骨から骨髄細胞を洗い流し、赤血球 (RBC) 溶解緩衝液 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri) でインキュベートし、混入赤血球を除去した。得られたDCsは10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 mg/mLストレプトマイシン、8 ng/mL 組換マウス (rm) GM-CSF (Pepro-Tech, Rocky Hill)、及び 2 ng/mLのrmIL-4 (Pepro-Tech) を含むDMEMで培養した。培養1日目に非接着細胞を除去し、培地を添加した。培養3日目に、凍結・溶解5サイクルの肺がん細胞株LLC1から調製した細胞ライゼート (溶解物) を培地に添加し、Thumann等の報告にある最終蛋白質濃度5 mg/mLとした。<sup>24</sup> 培養5日目に成熟DCsを誘導する目的で、5 ng/mLのrmTNF- $\alpha$  (Pepro-Tech) を補足した。続けて翌日に、0.2GyのX線を照射した。

なお、X線照射には線量率442.89/minの直線加速器（Elekta, Stockholm, Sweden）を用いた。

#### DC 遊走能の測定

DCsはLDR (0.2Gy) 照射後、直ちに回収した。インビトロアッセイの為に、 $5 \times 10^4$  個のDCsを含む200  $\mu$  L無血清DMEMをBoyden chamber（Corning, New York）上部に入れた。次に、20%FBS、20 ng/mL rmCCL19（Pepro-Tech）、及び15ng/mLのrmCCL21（Pepro-Tech）を含む化学誘引物質培地をBoyden chamber下部に入れた。DCsの遊走能補正の為に、総数 $5 \times 10^4$  個のLDR照射/非照射DCsを別の下部Chamberに添加した。37°Cで6時間インキュベート後、下部ChamberのDC数をCell Counting キット-8（CCK-8, KeyGen Biotech, Nanjing, China）の取扱説明書操作法に従い、波長450nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー（Bio-Rad, Hercules, California）で測定した。なお、LDR照射/非照射DCsの遊走能は上部チャンバーから移動したDCsと下部Chamberに直接添加したDCs間の光度比として表示した。

インビボでの遊走能に関しては、DCsを5  $\mu$  M の5-又は6-（N-スクシンイミジルオキシカルボニル）フルオレセイン3, 6, 2ジアセテート（CFSE; Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan）で、37°Cで20分間染色、その後リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で3回洗浄した。次に、 $2 \times 10^6$  個のCFSE標識DCsを含む100  $\mu$  L PBSをC57BL/6（B6）マウスの後足肉球皮下に投与した。投与48時間後に、膝窩（しつか）リンパ節（LNs）を取り出し、単細胞懸濁液を得るために機械的に分散、1 mg/mLのコラゲナーゼA処理、その後フローサイトメトリで分析することでCFSE陽性細胞を同定した。

#### 混合リンパ球反応

Tリンパ球を刺激するDCsの活性を評価する目的で、混合リンパ球反応（MLR）を実施した。即ち、C57BL/6（B6）マウスから脾臓を摘出、74 mmセルストレーナーで機械的に分散することで単細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液をRBC溶解バッファーで処理後、ナイロンウールファイバーカラムで濾過し、T細胞を濃縮した。精製したT細胞を10 : 1（T細胞対DC比）のDCと48穴丸型マイクロタイタープレートで36時間共培養した。培養終了後、T細胞増殖を上述CCK-8 アッセイにより測定した。なお、T細胞増殖は未処理細胞に対する相対比率として表示した。

### 初回（予備）刺激DCsによる細胞傷害性（CTL）の測定

脾臓から単離したT細胞をDCsと共培養、DCs対T細胞比1：10での全LLC1細胞溶解物を添加し3日間培養、LLC1細胞特異的CTLを作製した。なお、本CTLsは非接着細胞として回収した。LLC1細胞（標的細胞）を0.5 mLの48穴プレートに播種し、1穴当たり細胞数  $2 \times 10^4$ 個とした。培養2時間後、 $4 \times 10^4$ 個のLLC1細胞特異的CTLs（キラー細胞）を添加し、その後24時間培養した。36時間後に細胞数を上記CCK-8アッセイによって測定した。CTLsの殺細胞率（KR）は、次の式で算出した： $KR (\%) = [1 - (OD_{(T+K)} - OD_K) / OD_T] \times 100\%$ ここで、 $OD_{(T+K)}$ はウェル中の標的細胞とキラー細胞による； $OD_K$ はウェル中のキラー細胞のみによる、そして $OD_T$ はウェル中の標的細胞のみによる吸光度である。

### インビボ（動物）実験

この実験では、 $5 \times 10^6$ 個の肺がんLLC1細胞を含むPBS200  $\mu$ Lを雄性C57/6（B6）マウスの脇皮下（SC）に投与した。投与約2週間後にマウスを殺し、周囲の正常組織を含む腫瘍塊を外科的に切除し、20mgの腫瘍ブロックのみに分画した。腫瘍組織を8週齢の麻酔雄性マウス脇皮下に移植し、LLC1担がんマウスを作製した。腫瘍径（縦及び横）を1日おきに計測した。なお、各腫瘍の体積（ $\text{mm}^3$ ）は、次の式で算出した； $V = 0.5 \times D \times d^2$ （ここで、 $V$ 、体積； $D$ 、縦方向の直径； $d$ 、横方向の直径）。肺がん組織移植1週間後（腫瘍体積が約600  $\text{mm}^3$ に成長）、マウスを3群に分けた（10匹/各群）；対照群、DC、及びDC-LDR群に分けた。DCとLDR照射DCs（LDR-DC）群に対しては、何れも $1 \times 10^7$ 個のLLC1細胞（200mLのPBS）を鼠径部LNに1週間に2回の頻度で皮下投与した。対照群マウスにはPBSのみを鼠径部LNに同一プロトコールで皮下投与した。その後、各群の生存期間を記録した。

サイトカイン定量の為の血液及び免疫組織化学染色のがん組織の採取は、13群に（5匹/各群）に分け担がんマウスから、其々LLC1細胞投与後7日及び14日目に尾静脈から、及び14日目の安楽死マウスより実施した。

### 酵素免疫測定法

血清中のIL-12とインターフェロン（IFN- $\gamma$ ）の濃度はマウス用酵素免疫測定キット（Boster Biological Technology Co, Ltd, Wuhan, China）を用いて、添付取扱プロトコールに従い測定した。

### 免疫組織化学染色

腫瘍組織を10%ホルマリンで固定、パラフィンに包埋し、厚さ5mmの組織切片を作製した。この組織切片を100倍希釈抗CD8抗体 (Zhongshanjinqiao Co, Ltd, Beijing, China) と1時間、その後HRP標識二次抗体と室温で1時間インキュベートした。ジアミノベンジジン (DAB) を塗布し、組織切片を発色させた。次に、切片を顕微鏡を用いて撮影した。なお、暗褐色染色は陽性と判定し、これらをポジティブ細胞としてImage-Pro Plus 6.0 高倍率視野 (×400) で定量した。また、本観察では少なくとも異なる3腫瘍からの値を平均した。

### ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTPニックエンドラベリングアッセイ

腫瘍組織中のアポトーシス細胞は末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTPニックエンド標識 (TUNEL) 染色in situ細胞死検出キット (Roche, Shanghai, China) を用いて検出した。即ち、腫瘍組織の切片を脱パラフィン化及び再水和後に、既に記載したApopTag ペルオキシダーゼin situアポトーシス検出キット (Chemicon, Temecula, California) 用いたTUNEL法により染色した；各スライドを脱パラフィン化し、脱水した。室温で15分間プロテイナーゼK (20 mg/L) で処理した。その後スライドを3%過酸化水素で5分間処理、内因性ペルオキシダーゼを不活化し、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼとジゴキシゲニン-11-dUTP含有TUNEL反応混合物と共に37°Cで1時間インキュベートした。次に、3,3'-ジアミノベンジジン色原体を塗布した。対比染色としてメチルグリーンを使用した。陽性細胞をImage-Pro Plus 6.0を用いて高倍率視野 (×400) で定量した。まお、本定量では少なくとも異なる3組織からの値を平均した。

### 統計処理

複数の動物、そして繰り返して行われた実験から収集した実験データの平均値 (標準偏差) として表示した。異なるグループ間の比較は統計ソフトウェアSPSS19.0を使用した両側t検定により実施した。生存解析は、Kaplan-Meierの生存曲線を作成し、コックス比例ハザードモデルを用いて実施した。そして、グループ間のハザード比はWald  $\chi^2$  検定により求めた。 $P < .05$ で有意差有りとした。

## 結果

### X線 (0.2Gy) 照射DCs遊走能のインビトロ及びインビボでの促進

LDRのDCへの照射が本細胞が有する機能を高めるか否かを明らかにする目的で、まず初めにLDRの遊走能への効果を検討した。図1Aに示す様に、0.2GyのX線照射によりCCL19及びCCL21に対する遊走能が高められた。DCsのLNsへの遊走能は方法で記載したインビボモデルもさらに支持された；LDR照射DCsは非照射DCsと比較して、マウス膝窩LNへ有意に多く移動し、X線照射がDCのLNへの遊走能を増進することが示唆された。

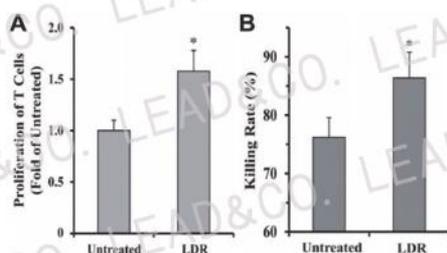


図1 LDRの照射によるDCs遊走能の増強

(A) CCK-8 assay による T 細胞の増殖。(B) LDR-DCs ワクチン刺激誘導CTLの殺細胞率 (%)。

### インビトロでのX線 (0.2 Gy) 照射DCs のT細胞刺激活性及び抗腫瘍能に対する増強作用

DCsはLNに移行後のT細胞刺激能は腫瘍特異的T細胞応答の誘導に重要である。従って、本研究ではMLR測定法を用いてLDR照射DCsのT細胞増殖刺激能を検討した。図2Aに示す様に、T細胞増殖能はDCsが0.2GyX線照射後に有意に増加した。標的細胞に対する殺細胞能をさらに評価するためにCTL活性を測定した。標的細胞抗原負荷X線照射/非照射DCsによって初回刺激されたれたCTLsの殺細胞活性を検討した。図2Bに示様に、LDR照射CTLs群の殺細胞率は非照射群と比較して、有意に増加した。

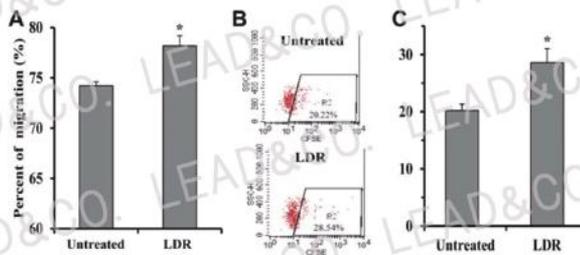


図2 LDR照射によるDC活性の増強

(A) CCK-8アッセイによるインビトロでのトランスウェル遊走アッセイ。  
 (B) 3回の独立した実験の代表的なデータ。(C) 結果 (B) の統計処理結果。  
 \* $P < 0.05$  vs 非照射群。LDR, 低線量X線照射; DC, 樹状細胞; CFSE, 5 or 6-(N-succinimidyl)oxycarbonyl fluorescein 3', 6'-diacetate; LN;リンパ節。

### X線 (0.2Gy) 照射DCワクチンによる担がんマウス生存期間の延長

LDR照射により誘導されたDCワクチンの遊走及びT細胞刺激能の増加が担がんマウスでの抗腫瘍効果に及ぼす作用を検討する為に肺がん組織切片を脇皮下に移植し移植し、担がんマウスを作製した。担がんマウスに1週間間隔でDCsを2回皮下投与した。図3に示す様に、DC (LDR非照射) 群は対照 (PBSのみ投与) 群と比較して、生存期間が延長した様である;しかしながら、有意差はない。一方、LDR-DC群の生存期間は対照群と比較して有意に延長され、LDR照射がDCワクチンの抗腫瘍効果を改善することを示した。

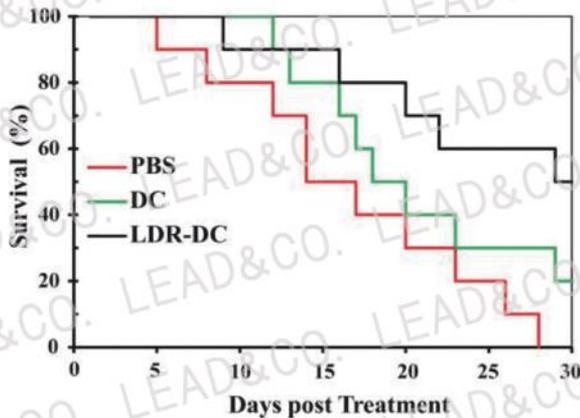


図3 LDR-DCワクチン投与による担がんマウス生存期間の延長

Kaplan-Meier 曲線をプロットした。LDR-DC群とPBS対照群は、Cox比例ハザードを用いたWald  $w_2$  検定で解析し、両者は統計的に有意であった ( $P < 0.009$ ) であったが、DC群、PBS群、及びLDR-DC群間には、有意差はなかった (各々 $P < 0.169$  及び  $0.149$ )。DC, 樹状細胞; LDR, 低線量放射線; PBS, リン酸緩衝生理食塩水。

X線 (0.2Gy) 照射DCワクチン投与によるマウス末梢血IL-12とIFN- $\gamma$ の増加  
 インビトロでのLDR-DC群はDC群と比較して、IL-12分泌量が高いという  
 私達の過去の知見に基づいて、<sup>21</sup> Ctl (PBS対照) 群、LDR-DC群、及びDC群  
 に於ける血中IL-12量を測定・比較した。図4 Aに示す様に、DC群のIL-12量は、  
 投与後7日及び14日目何れも、Ctl群と比較して有意に増加した。さらに、  
 LDR-DC群のIL-12量は、何れの日時でもDC群と比較して、さらに有意に増加  
 した。

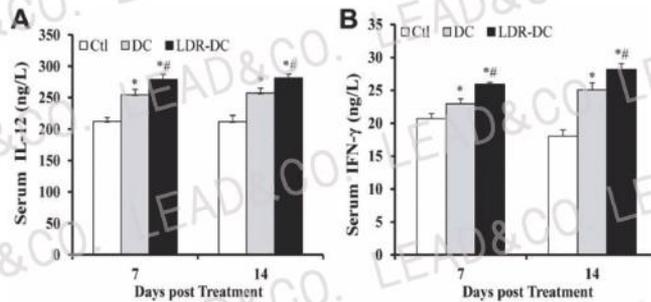


図4 担がんマウスでのLDR照射DCsワクチン投与の末梢血中IL-12及びIFN- $\gamma$ 量への作用

各群マウスの血液をPBS又はDCsワクチン投与後7日及び14日後に採取し、血清を調製した。血清中のIL-12及びIFN- $\gamma$  IL-12 (B) 量をELISA法により定量した。\*P<0.05 vs PBS 対照 (Ctl) 群。#P<0.05 vs DC群。Ctl, PBS対照群; DC, 樹状細胞群; LDR-DC, LDR照射群; IL-12, インターロイキン-12; IFN- $\gamma$ , インターフェロン- $\gamma$ ; ELISA, 酵素結合免疫吸着アッセイ。

IL-12に加えて、DCワクチンにより増加したCTLによって産生されるサイトカインであり、がんに対する防護に重要な働きをするIFN- $\gamma$ を測定した。図4Bに示す様に、DC群の血中IFN- $\gamma$ 量は、投与後7日及び14日目何れも、Ctl群と比較して有意に増加し、これらの変化は血中IL-12と良く一致していた。さらにLDR-DC群に関しても、IFN- $\gamma$ 量は何れの日時でもDC群と比較して、さらに有意に増加し、IL-12と同様の変動パターンを示した。

#### X線照射 (0.2Gy) DCワクチンの腫瘍組織へのCTLの浸潤能と腫瘍細胞アポトーシス促進

理論上、CTLsはDCワクチン投与後には抗腫瘍免疫反応を引出す為に重要なステップである標的腫瘍組織に到達するはずである。そこで、免疫組織化学による腫瘍組織へのCTLsの浸潤能を抗CD8抗体により検討した。図5 A (上部パネル) 及び図5 Bに示す様に、LDR-DC群及びDC群ではCtl群と比較して、

何れも腫瘍組織への高いCTLs浸潤がみられた。取分け、LDR-DC群はDC群と比較して、より高いCTLs浸潤能がみられた。

IFN- $\gamma$ の分泌及び腫瘍組織への CTLs 浸潤能の何れもが種々の機序を介して腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し得る。そこで、アポトーシス細胞を TUNEL 染色法により検討した。その結果、CtI 群と比較して DC 群の腫瘍組織ではより多くのアポトーシス細胞が観察された。さらに重要なことに、LDR-DC 群の腫瘍組織では DC 群と比較して、より有意なアポトーシス細胞がみられ (図 5 A & C の下パネル)、この変化は血清 IFN- $\gamma$  及び CTLs の腫瘍浸潤能の変動パターンと類似していた。

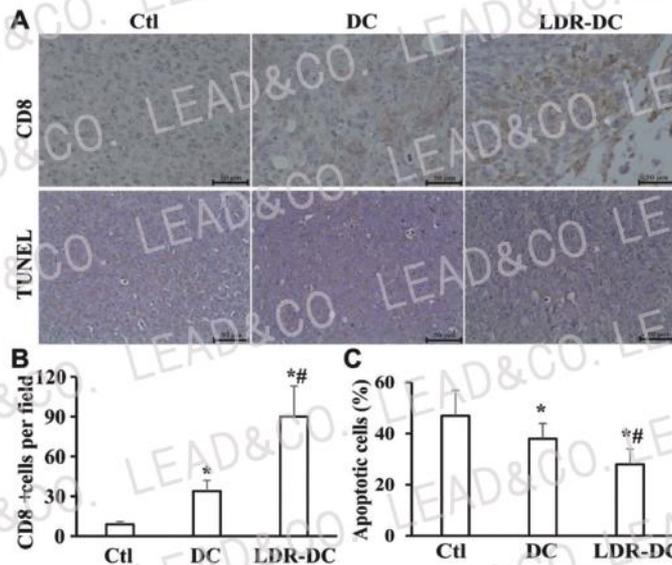


図 5 担がんマウスでのLDR照射DCsワクチン投与の腫瘍組織へのCTLs浸潤とアポトーシスへの作用

PBS群又はDCワクチン投与14日後に腫瘍組織をマウスから採取した。その後、抗CD8抗体を用いた免疫組織化学染色及びTUNELアッセイを行い、CTLsの浸潤を観察した(上部パネル、 $\times 400$ ) & 腫瘍組織中のアポトーシス細胞(下部パネル、 $\times 400$ )。(A) TUNEL法によるアポトーシス細胞の検出。(B) 各実験群のCD8<sup>+</sup>細胞数。(C) 各実験群のアポトーシス細胞の割合。

\* $P < .05$  vs PBS (Ctl群)。\*\* $P < .05$  vs LDR非照射DC群DC。LDR, 低線量放射線; CTL, 細胞傷害性Tリンパ球; TUNEL, 末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTPニックエンド標識; PBS, リン酸緩衝生理食塩水。

## 考察

腫瘍に対する免疫応答を誘導するDCの強力な作用は、DCワクチンの開発に重要である。幾つかのDCベースの腫瘍ワクチンが臨床試験に入っているが、十分でないLN<sub>s</sub>への遊走やIL-12産生等の問題から、その奏効率は未だ不明確である。これらは、少なくとも部分的には、エクスピボでのDCワクチンの調製の為の戦略と関連する。本研究に於いて、私達はDCワクチンの調製中でのLDR (0.2Gy) のX線照射がインビトロ及びインビボ、何れの場合も遊走能及びT細胞増殖を刺激し、インビトロでの抗腫瘍反応を増強することを示した。腫瘍組織を皮下移植した担がんマウスに0.2GyのX線を照射したDCワクチンを投与すると、生存期間が有意に延長された。この際、DCワクチン投与担がんマウスでの血清IL-12及びIFN- $\gamma$ の増加、腫瘍組織へのCTLs浸潤とアポトーシス細胞死の増加がみられた。

X線照射 (0.05、0.1、0.2、又は0.5Gy) PBMC由来DCsを用いた過去の研究では、DCワクチン投与後2日目に0.2又は0.5GyのX線を照射した場合にはインビトロでのDCsのT細胞刺激活性、抗腫瘍効果、及びDCsからのIL-12分泌が促進された。しかしながら、0.05と0.1GyのX線照射では有意な変化はみられなかった。<sup>21</sup> 0.2及び0.5Gy照射間の増強効果に有意な差がみられないことを考慮すると、0.5Gyより安全であると予想される0.2Gyを6日目の照射線量として選択した。また、私達のこれまでのインビトロ実験に近似するマウス肺腺がん細胞株LLC1を本実験に用いた。<sup>21</sup> 腫瘍に対する強い免疫反応を初回刺激する為には、ワクチンに充分量のDCsを必要とし、投与部位から排泄領域LN<sub>s</sub>へ浸潤することで免疫細胞が活性化される。しかしながら、臨床試験では、CDs 皮下投与後LNに移行するものは5%未満であり、<sup>12,13,26</sup> 有効なDCワクチン療法の限界の一要因になっている。<sup>27</sup> 従って、DCワクチンの調製過程を改善することによってその遊走能を高めるための多くの努力がなされている。例えば、Rizzo等<sup>28</sup>は前処理中に低分子ヒアルロナンを前処理することでC-C motif chemokine receptor (CCR7) 発現が増加、その結果DCの遊走能が高められることを報告した。Zhu等<sup>29</sup>は成熟DCsカクテルへCpG ODNとPoly (I : C) を加えることで、高遊走能DCワクチンを作製することができることを示した。本研究では、DCワクチンを調製過程でLDR照射することで、遊走能が高められたことを示した。また、私達の別の研究で、0.2GyのX線照射が不死化マウスDC系JAWSIIでのATM/NF $\kappa$ B経路を活性化することによりCCR7発現を増加することを明らかにしている。<sup>30</sup>

DCsがLNsに遊走後、T細胞を刺激する作用は腫瘍免疫応答を開始するために不可欠である。最近の研究により、LDR照射がT細胞を刺激するDCの能力を増強することが示されている。同様に、Shigematsu等<sup>31</sup>はLDR照射後のDCが効率良くT細胞増殖を刺激することを示した。対照的に、Jahns等<sup>32</sup>は、DCの放射線の前照射はT細胞増殖を刺激するDC機能に何らに影響を与えなかったことを報告している。これらの矛盾した結果は、DCの異なる成熟過程でのLDR照射タイミングの違いによって引き起こされるのかも知れない。T細胞増殖刺激能の上昇に伴い、LDR-DCワクチンによって誘導されるインビトロでの細胞毒性は、DCワクチンと比較して、有意に上方制御された。更に重要なことに、インビボ実験（動物実験）により、DCワクチンの抗腫瘍活性がLDR照射後に有意に増加した（担癌マウスの生存期間が延長された）；しかしながら、非照射DCワクチンでは担癌マウスの生存期間の延長はみられなかった。

DCワクチンの最終目的はCTLを活性化することであり、その後腫瘍部組織に浸潤することで、アポトーシス誘導<sup>33</sup>等の様々なメカニズムを介して腫瘍細胞死に繋がる。これ迄の臨床研究により、DCワクチンを接種した結果、腫瘍への強いCTL浸潤が生じた事が報告されている。<sup>34</sup> 本研究では、LDR非照射DCワクチン投与でも、PBS対照群と比較して、腫瘍組織中へのCTLs浸潤は増加するが、LDR照射DCワクチンではこの浸潤が更に増加することが明らかになった。

アポトーシス性腫瘍細胞死がDCワクチン投与後のCD8<sup>+</sup>T細胞浸潤部位に観察される事が報告されており、これは、アポトーシス惹起により死滅した腫瘍細胞部位へのCD8<sup>+</sup>Tの浸潤を示唆している。昨今の研究では、LDR照射DCワクチン投与によりアポトーシス腫瘍細胞死が、LDR非照射DCワクチン投与の場合と比較して、増加することがTUNELアッセイにより示されており、この結果はCD8<sup>+</sup>T細胞浸潤の結果と一致していた。

DCによって産生されるIL-12は腫瘍拒絶に重要な役割をはたす未分化T細胞（Th0）のTh1分化とCTLs活性化の何れにも重要な働きをする。<sup>18,35</sup> 様々な臨床試験により、DCワクチンによる投与後に血清IL-12のレベルが顕著に上昇することが明らかになっているが、<sup>36,37</sup> これらの結果は我々の研究結果と一致する。しかしながら、従来の方で産生されたDCワクチン産生量は依然として十分でなく、少なくとも部分的には、臨床でのDCワクチンを用いた治療で満足に行くものではなかった。<sup>29,38</sup> 高IL-12産生能を有するDCワクチンはインビトロで初回刺激することができ、インビボで強力なCTL抗腫瘍作用を示す。<sup>38,39</sup>

しかしながら、私達はこれ迄の方法で調製されたDCワクチンの投与により血清IL-12をさらに増加すると言う結果は得ていない。私達の以前の研究では、ヒトDCワクチンの調製過程での0.2GyのLDR照射がIL-12の産生を顕著に増加させることを明らかにした。<sup>21</sup> さらに、JAWSII細胞を使用したメカニズムに関する研究により、ATM/NF- $\kappa$ B経路を介したCTLsの遊走能の増加と同様にIL-12産生量の増加を明らかにした。<sup>30</sup> また、LDR照射によるNF- $\kappa$ Bの活性化がその後90分間継続し、且つIL-12とCCR7の増加が照射24時間後まで持続したが、この刺激作用が一過性であることが明らかとなった。本研究において私達は、さらに以下のことを確認した。担がんマウスにDCワクチンを投与すると、LDR非照射ワクチン投与の場合と比較して、血清中のIL-12レベルはさらに増加した。LDR照射DCワクチン投与後の全身性IL-12の増加レベルは抗腫瘍免疫応答を刺激誘導するに有益である。この結果はIL-12を皮下投与した臨床試験によっても支持されている；転移性皮膚がん患者にIL-12を投与すると、末梢血中の抗腫瘍CTL前駆細胞が増加、CTLsの腫瘍組織への浸潤が促進され、その結果腫瘍細胞の破壊と線維化が増加した。<sup>40</sup> IL-12と同様に、患者血清中のIFN- $\gamma$ レベルがLDR非照射DCワクチン投与後に増加した。<sup>37</sup> この発見と共に、本研究ではLDR照射DCワクチン投与の場合には、血清中IFN- $\gamma$ がさらに増加することが明らかになった。活性化T細胞から分泌されるIFN- $\gamma$ はCTLs及びNK細胞を活性化し、又は腫瘍細胞の生存に直接に作用して、腫瘍に対する免疫的防護に重要な働きをすることが良く知られている。<sup>41-43</sup> そこで私達はLDR照射DCワクチン投与後の血清IL-12及びIL-12の増加が腫瘍組織へのCTL浸潤の増加と関連していると考えた。しかし、LDR照射DCワクチンのインビボでの作用（担がんマウスの生存期間、IL-12及びIFN- $\gamma$ の増加、腫瘍組織へのCTLs浸潤等）がATM/NF- $\kappa$ B阻害剤により解除されるか否かに関しては、残念ながら今回の研究では検討しなかった。

これらの実験データは、DCワクチン調製過程でのLDR (0.2Gy) 照射は優れた抗腫瘍作用を有するDCsワクチンを生産する新規アプローチであるかも知れないと言う結論を支持する。DCワクチン作製のこの新しいアプローチが他種の固形腫瘍、特にDCベース免疫治療法がフェーズII<sup>44</sup>に入っている腎がんにも有効否かに関しては、今後さらなる検討が必要であろう。

## 引用文献

1. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(4):265-277.
2. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(4):251-262.
3. Efferson CL, Schickli J, Ko BK, et al. Activation of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by human dendritic cells infected with an attenuated influenza A virus expressing a CTL epitope derived from the HER-2/neu proto-oncogene. *J Virol*. 2003; 77(13): 7411-7424.
4. Oyama T, Ran S, Ishida T, et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 1998; 160(3):1224-1232.
5. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colonystimulating factor. *Blood*. 1998; 92(12):4778-4791.
6. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1998; 4(3):328-332.
7. Han TH, Jin P, Ren J, Slezak S, Marincola FM, Stronck DF. Evaluation of 3 clinical dendritic cell maturation protocols containing lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Immunother*. 2009; 32(4):399-407.
8. Thurner B, Haendle I, Roder C, et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med*. 1999; 190(11): 1669-1678.
9. Reyes D, Salazar L, Espinoza E, et al. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 2013; 109(6):1488-1497.
10. Yi DH, Appel S. Current status and future perspectives of dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Scand J Immunol*. 2013; 78(2):167-171.
11. Jung ID, Shin SJ, Lee MG, et al. Enhancement of tumor-specific T cell-mediated immunity in dendritic cell-based vaccines by Mycobacterium tuberculosis heat shock protein X. *J Immunol*. 2014; 193(3):1233-1245.
12. De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state.

- Cancer Res. 2003; 63(1):12-17.
13. Verdijk P, Aarntzen EH, Lesterhuis WJ, et al. 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. 2009; 15(7):2531-2540.
  14. Gridley DS, Pecaut MJ, Rizvi A, et al. Low-dose, low-dose-rate proton radiation modulates CD4(+) T cell gene expression. Int J Radiat Biol. 2009; 85(3):250-261.
  15. Pandey R, Shankar BS, Sharma D, Sainis KB. Low dose radiation induced immune-modulation: effect on macrophages and CD8. T cells. Int J Radiat Biol. 2005; 81(11): 801-812.
  16. Ren H, Shen J, Tomiyama-Miyaji C, et al. Augmentation of innate immunity by low-dose irradiation. Cell Immunol. 2006; 244(1):50-56.
  17. Liu SZ. Cancer control related to stimulation of immunity by lowdose radiation. Dose-Response. 2007; 5(1):39-47.
  18. Schmidt CS, Mescher MF. Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. J Immunol. 2002;168(11):5521-5529.
  19. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O' Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4. T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science. 1993; 260(5107):547-549.
  20. Pedersen AE, Thorn M, Gad M, et al. Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells generated from patients with advanced breast cancer for therapeutic vaccination. Scand J Immunol. 2005; 61(2):147-156.
  21. Yan P, Jiang QS, Li FS, He R, Wang CL, Li X. Effects of low dose X-ray irradiation on antigen presentation and IL-12 secretion in human dendritic cells in vitro. Chin J Radiol Med Prot. 2012; 32(3):225-229.
  22. Li X, Jiang Q, Li F, et al. Effect of low dose X-ray irradiation on migration of human dendrite cells and underlying mechanism. Chin J Radiol Med Prot. 2013; 33(5):476-479.
  23. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med. 1992; 176(6):1693-1702.
  24. Thumann P, Moc I, Humrich J, et al. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. J Immunol Methods. 2003; 277(1-2):1-16.
  25. Nestle FO, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. Curr Opin Immunol. 2005; 17(2):163-169.

26. Dekaban GA, Hamilton AM, Fink CA, et al. Tracking and evaluation of dendritic cell migration by cellular magnetic resonance imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2013; 5(5):469-483.
27. Seyfizadeh N, Muthuswamy R, Mitchell DA, Nierkens S, Seyfizadeh N. Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016; 107:100-110.
28. Rizzo M, Bayo J, Piccioni F, et al. Low molecular weight hyaluronan-pulsed human dendritic cells showed increased migration capacity and induced resistance to tumor chemoattraction. *PLoS one.* 2014; 9(9):e107944.
29. Zhu M, Xu W, Su H, Huang Q, Wang B. Addition of CpG ODN and Poly (I: C) to a standard maturation cocktail generates monocyte-derived dendritic cells and induces a potent Th1 polarization with migratory capacity. *Hum Vaccin Immunother.* 2015; 11(7): 1596-1605.
30. Yu N, Wang S, Song X, et al. Low-dose radiation promotes dendritic cell migration and IL-12 production via the ATM/NFkappaB pathway. *Radiat Res.* 2018;189(4):409-417.
31. Shigematsu A, Adachi Y, Koike-Kiryama N, et al. Effects of low-dose irradiation on enhancement of immunity by dendritic cells. *J Radiat Res.* 2007; 48(1):51-55.
32. Jahns J, Anderegg U, Saalbach A, et al. Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells. *Mutat Res.* 2011; 709-710:32-39.
33. Riddell SR. Cytotoxic T-cell cytokines put cancer under arrest. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3(1):23-25.
34. Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res.* 2001; 61(3):842-847.
35. Frankenberger B, Schendel DJ. Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(1):53-58.
36. Jie X, Hua L, Jiang W, Feng F, Feng G, Hua Z. Clinical application of a dendritic cell vaccine raised against heat-shocked glioblastoma. *Cell Biochem Biophys.* 2012; 62(1): 91-99.
37. Sun TY, Yan W, Yang CM, et al. Clinical research on dendritic cell vaccines to prevent postoperative recurrence and metastasis of liver cancer. *Genet Mol Res.* 2015; 14(4): 16222-16232.
38. Pan K, Lv L, Zheng HX, et al. OK-432 synergizes with IFN-gamma to confer dendritic cells

- with enhanced antitumor immunity. *Immunol Cell Biol.* 2014; 92(3):263-274.
39. Pfeiffer IA, Hoyer S, Gerer KF, et al. Triggering of NF-kappaB in cytokine-matured human DCs generates superior DCs for T-cell priming in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2014; 44(11):3413-3428.
  40. Mortarini R, Borri A, Tragni G, et al. Peripheral burst of tumorspecific cytotoxic T lymphocytes and infiltration of metastatic lesions by memory CD8. T cells in melanoma patients receiving interleukin 12. *Cancer Res.* 2000; 60(13):3559-3568.
  41. Yuan CH, Yang XQ, Zhu CL, Liu SP, Wang BC, Wang FB. Interleukin-7 enhances the in vivo anti-tumor activity of tumorreactive CD8. T cells with induction of IFN-gamma in a murine breast cancer model. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(1):265-271.
  42. Gong C, Yao C, Xu Z, et al. Enhancement of NK cell-mediated lysis of non-small lung cancer cells by nPKC activator, ingenol 3,20 dibenzoate. *Mol Immunol.* 2017; 83:23-32.
  43. Brown TJ, Lioubin MN, Marquardt H. Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells. *J Immunol.* 1987; 139(9):2977-2983.
  44. Amin A, Dudek AZ, Logan TF, et al. Survival with AGS-003, an autologous dendritic cell-based immunotherapy, in combination with sunitinib in unfavorable risk patients with advanced renal cell carcinoma (RCC): phase 2 study results. *J Immunother Cancer.* 2015; 3:14.