

OK432及びIFN- γ 刺激による白血病性形質 細胞様樹状細胞株 (PMDC05) の直接細胞傷害活性の検出

大岩 恵理・成田美和子・岩谷 俊平・西澤 幹則・内山 孝由・高橋 益廣

Key words : leukemic plasmacytoid dendritic cell line; PMDC05, OK432, IFN- γ , 細胞傷害活性, 抗腫瘍免疫

要旨 抗原ペプチドが同定されていない腫瘍に対する細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導するために、当研究室で樹立した白血病性形質細胞様樹状細胞株(leukemic plasmacytoid dendritic cell line; PMDC05)の直接的な細胞傷害活性を検出することを目的とした。ペニシリン凍結乾燥処理した*Streptococcus pyogenes*の菌体成分(OK432)及びIFN- γ を用いてPMDC05の刺激培養を行った。OK432及びIFN- γ で刺激されたPMDC05は、刺激なしに比べてサイトカイン産生が増強し、標的細胞を有意に傷害した。

以上のことから、OK432及びIFN- γ で刺激されたPMDC05は、腫瘍細胞との共培養によって腫瘍抗原を提示し、腫瘍抗原特異的CTLを誘導するための有力な抗原提示細胞になり得ると考えられた。

緒言

樹状細胞(dendritic cells; DC)は、枝のような突起を持った細胞で、取り込んだ抗原を分解・断片化し、MHC分子上にその抗原を提示し、T細胞を活性化させる。また、リンパ器官への遊走や、種々のサイトカインを産生し、免疫応答を開始・制御している¹⁾。

DCを含め、単球やマクロファージ、B細胞といった抗原提示細胞(antigen-presenting cells; APC)のうち、DCのみがナイーブT細胞を活性化し、エフェクターT細胞へと誘導出来る²⁾。

現在、免疫細胞を用いた抗腫瘍免疫療法が臨床施行され、強い抗原提示能を持つDCを用いた抗腫瘍免疫療法の応用が期待されている^{3),4)}。

我々はpDC白血病症例より、白血病性形質細胞様樹状細胞株(leukemic plasmacytoid dendritic cell line; PMDC05)を樹立した⁵⁾。PMDC05は、ナイーブT細胞に対して強い抗原提示能を持ち、*in vitro*において末梢血単核球より抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導することが、これまでの検討で明らかになった^{6),7)}。

ペニシリン凍結乾燥処理した*Streptococcus pyogenes* Su株の菌体成分(OK432)及びIFN- γ 刺激により、ヒト単球由来樹状細胞(moDC)の遊走能・サイトカイン産

生能・CTL誘導能等が増強することが確認されている⁸⁾。

DCは、これまで直接腫瘍細胞を攻撃することは無いとされていたが、インターフェロン刺激により、moDCがナチュラルキラー(NK)細胞様の活性(細胞傷害活性)を持つことが報告されている⁹⁾。

本研究においては、OK432及びIFN- γ を用いてPMDC05を刺激培養し、その細胞機能解析を行った。

材料と方法

PMDC05及びT2A24細胞株の培養

PMDC05の培養には、10%ウシ胎児血清(FBS)(Nichirei Biosciences Inc, Tokyo, Japan), 100 U/ml penicillin 及び100 μ g/ml streptomycin(Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)加Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM)(Life Technologies Corporation)を用いた。T2A24細胞株の培養には、10%ウシ胎児血清(FBS), 100 U/ml penicillin及び100 μ g/ml streptomycin加Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640培地(Life Technologies Corporation)を用い、それぞれ37°C, 5%CO₂の湿潤状態で培養を行った。

刺激培養のために、PMDC05を 1.0×10^6 個/mlになるよう5mlの細胞浮遊液を $\phi 60\text{mm} \times 10\text{mm}$ 60mm dish

(TPP, Trasadingen, Switzerland)に播種した。刺激には, OK432(0.1 KE/ml)(Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan), IFN- γ (1000 U/ml)を用い, 24時間培養を行った。

フローサイトメトリーによる解析

培養細胞にFc γ レセプターブロック試薬を加え4°C, 10分間反応させ, 各染色抗体で4°C, 20分間染色した。その後, phosphate buffered saline (PBS)で500 \times g, 5分間遠心し, デカントにより上清を除去し(洗浄), PBS 100 μ lに再浮遊させ, FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)で測定し, CellQuest Pro (BD Biosciences)で解析した。CCR7及びTRAILのmean fluorescence intensity; MFIを, アイソタイプコントロールのMFIで除した値を平均蛍光強度比(MFI ratio)とした。

使用した抗体は, 以下の通りである。

phycoerythrin (PE)標識抗体: IgG1, HLA-DR, CD253 (TRAIL)(BD Biosciences), CD261(DR4), CD262(DR5) (Biolegend, San Diego, CA, USA), allophycocyanin (APC)標識抗体: IgG2a, CD197(CCR7) (Biolegend)

CBA法によるサイトカイン測定

刺激培養後の細胞を14mlポリスチレンチューブ(BD Biosciences)に回収し, 500 \times g, 5分間遠心した。遠心後の上清500 μ lをEPPENDORF TUBES®(Eppendorf, Hamburg, Germany)に回収し, 2000 \times g, 10分間遠心した。遠心後の上清200 μ lを培養上清としてサンプリングチューブ(SARSTEDT, Numbrecht, Germany)に回収し, 凍結保存した。サイトカイン測定には, Cytometric beads array(CBA法: BD Biosciences)を用いた。方法は, 製造元提供のプロトコルに従って行った。Cytokine Standard溶液又は室温解凍した培養上清にCapture Beadsを加え, 室温, 暗所で1時間インキュベーションを行った。さらに, PE標識抗サイトカイン抗体 (PE Detection Reagent)を加え, 室温, 暗所で2時間インキュベーションを行った。その後, Wash Bufferを1 mlずつ加え200 \times g, 5分間遠心し, 上清を吸引除去しWash Buffer 300 μ lに再懸濁した。BD FACSComp Software及びBD CaliBRITE Beads(BD Biosciences)を用いてFACSの機器設定をした後, Standard溶液及びサンプルを測定した。解析には, FCAP Array™ v3.0(BD Biosciences)を用いた。

細胞傷害性試験

PMDC05は, 効果細胞として 1.0×10^6 /mlの濃度に調整され, 刺激なし, OK432(0.1 KE/ml)刺激, IFN- γ (1000 U/ml)刺激, OK432(0.1 KE/ml)+IFN- γ (1000 U/ml)刺激

の4つの系を作成した。標的細胞にはレンチウイルスベクターを用いてGFPを導入した, T2A24を用いた。標的細胞は, フェノールレッド非添加RPMI1640培地で2回洗浄を行い, 1.0×10^5 /mlに調整した。効果細胞はフェノールレッド非添加RPMI1640培地を用いて1回洗浄を行った。効果細胞:標的細胞=15:1となるよう, 効果細胞を 1.5×10^6 /mlに調整した。効果細胞及び標的細胞を調整する際には, 10%FBS加フェノールレッド非添加RPMI1640培地を用いた。5mlポリスチレンチューブ(BD Biosciences)に効果細胞と標的細胞をそれぞれ100 μ lずつ加え, 37°C, 5%CO₂, 湿潤状態で4時間共培養した。20 μ g/ml 7AAD (7-amino-actinomycin.D; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)で, 15分間暗所で染色し, FACSで測定した。120秒/チューブで測定し, 実験はtriplicateで行った。

細胞傷害活性は以下のように算出した。

細胞傷害活性(% cytotoxicity)=[(標的細胞のみのチューブ中の標的生細胞数-効果細胞と標的細胞の共培養チューブ中の標的生細胞数)]/(標的細胞のみのチューブ中の標的生細胞数) \times 100

統計解析

統計処理はGraphPad Prism(GraphPad, CA, USA)を用いて行い $P < 0.05$ を統計的に有意とした。

結果

OK432及びIFN- γ 刺激によるPMDC05の細胞表面抗原の変化(図1)

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)発現の解析を行った。各サンプルのMFI ratioを比較した所, 無刺激のPMDC05のMFI ratioは1.15, IFN- γ で刺激したPMDC05は1.21であった。しかし, OK432で刺激したPMDC05は3.94, OK432+IFN- γ で刺激したPMDC05は3.68と, OK432を加えることで, 刺激なし又はIFN- γ 刺激に比べてTRAILの発現が増強した。

ケモカインレセプターであるCCR7の発現解析を行った。無刺激のPMDC05のMFI ratioは6.17, IFN- γ で刺激したPMDC05は5.04であった。一方, OK432で刺激したPMDC05は11.8, OK432+IFN- γ で刺激したPMDC05は12.5と, OK432を加えることでCCR7発現が増強した。(図1)

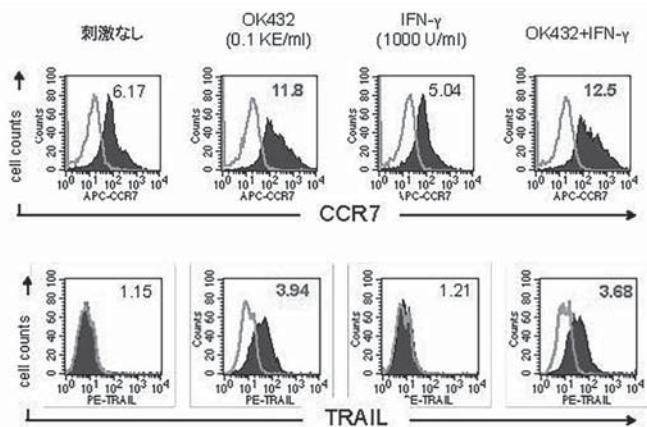


図 1. OK432/IFN- γ で刺激したPMDC05 の CCR7 および TRAIL の発現

CCR7, TRAIL の発現を FACS で解析した。ヒストグラム内の数値は、MFI 比を示している。PMDC05 を OK432 で刺激、又は OK432+IFN- γ で刺激した際に、CCR7 及び TRAIL 発現が増強した。

T2A24細胞上のDR4, DR5発現解析 (図 2)

T2A24細胞を用いて、TRAIL受容体であるdeath receptor 4 (DR4)及びdeath receptor 5 (DR5)の発現を解析した。DR4のMFI ratioは5.15, DR5のMFI ratioは11.9であり、発現を確認出来た。(図 2)

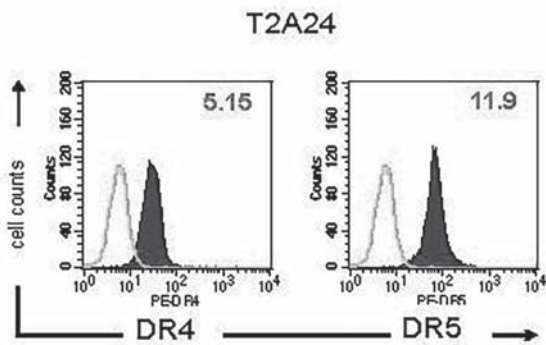


図 2. T2A24 細胞における DR4, DR5 の発現

T2A24 細胞を用いて、TRAIL 受容体である DR4 及び DR5 の発現を FACS で解析した。T2A24 細胞は、DR4 及び DR5 が陽性であった。

OK432/IFN- γ で刺激したPMDC05による各種サイトカイン産生 (図 3)

OK432又はOK432+IFN- γ で刺激したPMDC05において、IL-6とTNF- α の産生が見られた。IL-10は、どの条件においても産生は認められなかった。OK432+IFN- γ で刺激したPMDC05は、IL-12及びIFN- α をわずかに産生した。(図 3)

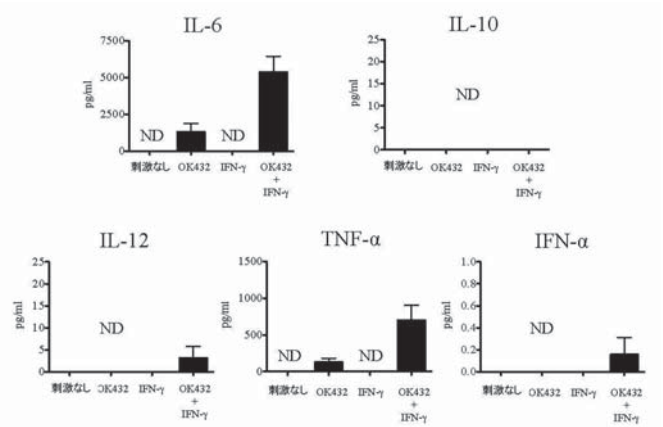


図 3. OK432/IFN- γ で刺激したPMDC05 培養上清の各種サイトカイン測定

OK432 又は OK432+IFN- γ で 24 時間刺激した PMDC05 の培養上清を用いて、サイトカインの測定を行った。サイトカインの測定には、Cytometric beads array(CBA 法: BD Biosciences)を用い、FACS で解析した。OK432 及び OK432+IFN- γ による刺激において、IL-6 と TNF- α の産生が見られた。

OK432及びIFN- γ 刺激によるPMDC05の細胞傷害性試験 (図4a, 4b)

標的細胞にT2A24細胞を用いて細胞傷害性試験を行った。PMDC05による傷害でアポトーシスを起こした標的細胞は、GFP 蛍光強度が低下し、7AADにより核が染色される。刺激なしに比べて、刺激したPMDC05を効果細胞として用いた際、ゲート中の標的

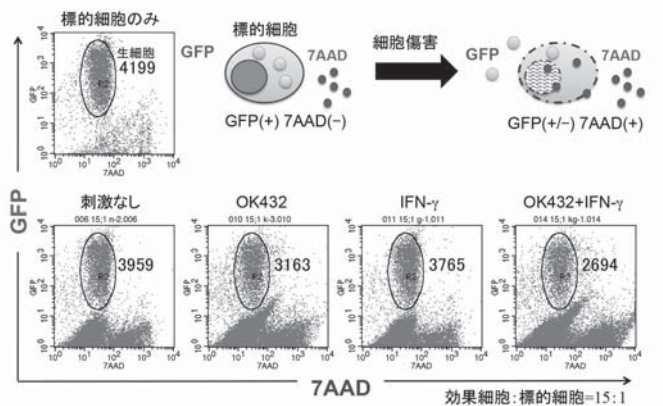


図 4a. OK432/IFN- γ で刺激したPMDC05 による細胞傷害性試験

OK432 又は OK432+IFN- γ 刺激したPMDC05を効果細胞、T2A24細胞を標的細胞として細胞傷害性試験を行った。ドットプロット上の数値は生細胞数を示している。効果細胞と共培養することで、生細胞数が減少した。測定は全てtriplicateで行った。

生細胞数(GFP陽性7AAD陰性のT2A24細胞)が減少した。(図4a) 細胞傷害活性を算出したところ, OK432又はOK432+IFN- γ で刺激したPMDC05を効果細胞として用いた際, 刺激なしに比べて標的細胞を有意に傷害した。さらに, OK432+IFN- γ で刺激したPMDC05を効果細胞として用いた際, OK432刺激のみに比べて, 細胞傷害活性が有意に増加した。(図4b)

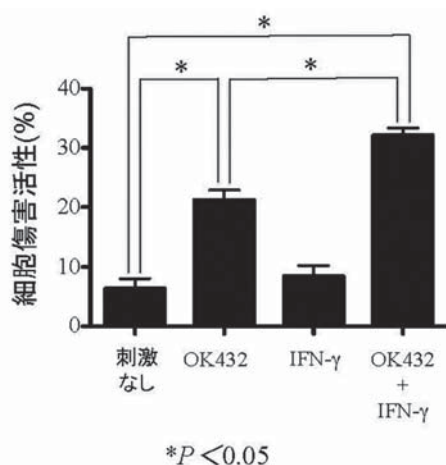


図4b. OK432/IFN- γ で刺激したPMDC05の細胞傷害活性

細胞傷害活性を算出したところ, OK432又はOK432+IFN- γ で刺激したPMDC05を効果細胞として用いた際に, 細胞傷害活性が増加した。さらに, OK432刺激のみに比べて, OK432+IFN- γ 刺激において細胞傷害活性が有意に増加した。

考察と結論

OK432は, 腫瘍に対する免疫療法剤として, 1975年に日本で認可され, 抗悪性腫瘍剤として臨床で広く用いられてきた¹⁰。免疫細胞療法において, 未熟な樹状細胞を成熟・活性化させるためにOK432を用いることで, 抗腫瘍効果を高めるという報告がある^{11,12}。

本検討において, OK432又はOK432+IFN- γ でPMDC05を刺激することで, TRAIL発現及びCCR7発現の増強と, 腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害活性の増強を検出した。

また, OK432刺激, OK432+IFN- γ 刺激により, PMDC05のIL-6, TNF- α の産生が明らかに高まった。IL-6は, TGF- β 或いはIL-1 β と共にTh17細胞への分化を促進し, 制御性T細胞への分化を抑制することがわかっている^{13,14}。TNF- α は腫瘍のアポトーシスを誘導することが明らかにされている^{15,16}。CCR7は, 樹

状細胞のリンパ節への遊走に関わるレセプターである。CCR7を発現した樹状細胞は, CCL19やCCL21といったケモカインという分子に惹起され, 所属リンパ節へ遊走する。その後, 樹状細胞がT細胞に抗原を提示することで免疫応答を引き起こす¹⁷。トランスウェルを用いて遊走能試験を行ったところ, OK432刺激により細胞凝集が強まったため, 遊走能の有意な増強は確認出来なかった(data not shown)。今後は, 異なるアッセイを検討する必要があると考える。一方TRAILは, 1995年に発見されたTNFファミリーの一つであり, 腫瘍細胞にアポトーシスを誘導させる分子である¹⁸。このアポトーシスは, TRAILがTRAILレセプターであるDR4, DR5と結合することで細胞内ではアダプター分子であるFas-associated protein with death domain; FADDと下流のカパーゼが活性化されることで誘導される¹⁹。OK432又はOK432+IFN- γ 刺激によりTRAIL発現が増強したPMDC05は, DR4及びDR5を発現しているT2A24細胞を有意に傷害した。

*In vitro*の実験において, OK-432により成熟したDCは, サイトカイン産生能が増加し, 抗原提示関連マーカーの発現が増強することが報告された²⁰。OK432治療を行った担がんマウスより得られたDC(OK-DC)を, 腫瘍内に注射したところ, 腫瘍の成長が抑制され, 全生存期間が延長したという報告がある。さらに, OK-DCはCTLを活性化させ, Th1性のサイトカインを産生した²¹。OK432とDCを用いた膵臓癌患者に対するPhase I trialによると, 重篤な副作用は見られず, 9人中2人の患者が再発なしに5年以上生存した²²ことからOK432を用いたDC療法は, 安全で効果的であると考えられる。又, アポトーシスを起こした腫瘍細胞と共培養されたDCを投与されたマウスでは, 腫瘍の拒絶が一部であったのに対し, 生きた腫瘍細胞と共培養されたDCを投与されたマウスは完全に腫瘍を拒絶したという報告がある。DCのクロスプレゼンテーションにより, CD8⁺T細胞にも抗原が提示され, 腫瘍の縮小が見られたと考えられる²⁴。生細胞が抗原になり得ることは, 抗腫瘍免疫療法において有用であると考えられる。しかし, DCを調整するには採血を行い分離・培養する必要があるため, 患者への負担が大きい。そのため, DC株であるPMDC05が標的細胞に対する傷害活性を獲得することは, 腫瘍抗原が同定されていない腫瘍細胞をPMDC05が取り込んで抗原提示するために, 重要な知見である。

以上のことからPMDC05は, 腫瘍抗原が同定されていない腫瘍に対する抗腫瘍免疫療法において, 抗原提

示細胞として有用であると考えられた。

引用文献

- 1) Banchereau JI, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-52.
- 2) Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-96.
- 3) Edgar G, Engleman. Dendritic cells: Potential role in cancer therapy *Cytotechnology*. 1997;25:1-8
- 4) Banchereau JI, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol*. 2005;4:296-306.
- 5) Narita M, Kuroha T, Takahashi M. Plasmacytoid dendritic cell leukemia with potent antigen-presenting ability. *Acta Haematol*. 2008;120(2):91-9
- 6) Narita M, Watanabe N, Takahashi M. A leukemic plasmacytoid dendritic cell line, PMDC05, with the ability to secrete IFN-alpha by stimulation via Toll-like receptors and present antigens to naïve T cells. *Leukemia Research*. 2010;33:1224-1232
- 7) Yamahira A, Narita M, Takahashi M. Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using a leukemic plasmacytoid dendritic cell line as antigen presenting cells. *Leukemia Research*. 2011;35:793-799
- 8) Pan K, Lv L, Xia J. OK-432 synergizes with IFN- γ to confer dendritic cells with enhanced antitumor immunity *Immunology and Cell Biology*. 2014;92:263-274
- 9) Mark K et al. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *Journal of Translational Medicine*. 2007;5:46
- 10) Yong-Qian S, Yanhong C et al. The effect of dendritic cells activated by OK-432 and pulsed with antigens on cytokine induced killers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2006;60:156-160
- 11) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kaneko S, et al. Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010;163:165-177
- 12) Bettelli E, Carrier Y, Kuchroo VK, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-238.
- 13) Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Sallusto F et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology*. 2007;8(9):942-949.
- 14) Gao W, Thompson L, Zhou Q, Putheti P, Fahmy TM, Strom TB, Metcalfe SM. Treg versus Th17 lymphocyte lineages are cross-regulated by LIF versus IL-6. *Cell Cycle*. 2009;9:1444-1450
- 15) Reinartz JI, Bechtel MJ, Kramer MD. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is counteracted by transforming growth factor-alpha. *Experimental cell research*. 1996;22:334-340.
- 16) Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Seminars in Immunology*. 2001;13:267-74.
- 17) Holoch PA, Griffith TS. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*. 2009;625:63-72.
- 18) Schneider P, Thome, Tschopp J. et al. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity*. 1997;6:831-836.
- 19) Ryoma Y, Moriya Y, Sato M, et al. Biological effect of OK-432 (picibanil) and possible application to dendritic cell therapy. *Anticancer Research*. 2004;24:3295-3301.
- 20) Mashino K, Sadanaga N, Mori M, et al. Effective strategy of dendritic cell-based immunotherapy for advanced tumor-bearing hosts: the critical role of Th1-dominant immunity. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2002;10:785-794.
- 21) Endo H, Saito T, Gotoh M, et al. Phase I trial of preoperative intratumoral injection of immature dendritic cells and OK-432 for resectable pancreatic cancer patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2012;19:465-475.
- 22) Matheoud D, Perié L, Hosmalin A, et al. Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo. *Blood*. 2010;115(22):4412-4420.

Direct cytotoxicity of leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC05) stimulated with OK432 and IFN- γ .

Eri OIWA, Miwako NARITA, Shunpei IWAYA, Yoshinori NISHIZAWA
Takayoshi UCHIYAMA, Masuhiro TAKAHASHI

Laboratory of Hematology and Oncology, Graduate School of Health Sciences, Niigata University, Niigata Japan

Key words : leukemic plasmacytoid dendritic cell line; PMDC05, OK432, IFN- γ cytotoxicity, anti-tumor immunity

Abstract A leukemic plasmacytoid dendritic cell line, PMDC05, which was previously established in our laboratory, showed the ability of inducing antigen specific cytotoxic T lymphocytes. For tumors that antigenic peptides are not identified, it would be necessary for PMDC05 to have direct cytotoxicity against tumor cells to uptake tumor antigens for presenting them to T cells. Therefore, we aimed to investigate the effects of OK432, penicillin-inactivated and lyophilized preparation of *Streptococcus pyogenes* which has been clinically used in Japan for more than 30 years, to activate PMDC05 cells.

Stimulation of PMDC05 cells with OK432 and IFN- γ enhanced the expression of CCR7 and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Also, we detected a higher cytokine production such as IL-6 and TNF- α compared with unstimulated PMDC05 cells. Furthermore, PMDC05 cells stimulated with OK432 and IFN- γ showed direct cytotoxicity against the tumor cell targets (T2A24 cells) expressing death-inducing receptors (DR4 and DR5). This might have occurred due to binding of TRAIL expressed on PMDC 05 cells with DR4/5 on T2A24 cells.

These data suggest that by stimulation with OK432 and IFN- γ PMDC05 cells could acquire direct antitumor cytotoxicity, which may be beneficial for PMDC05 cells to uptake tumor cell components for antigen presentation in case of PMDC05 cells are co-cultured with tumor cells.

OK432/IFN- γ -stimulated PMDC05 cells, which are loaded with tumor antigen by co-culturing with tumor cells, could be used as potent antigen presenting cells for generating antigen specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in anti-tumor cellular immunotherapy.

Accepted : 2015.7.30