

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

骨髄由来樹状細胞の腫瘍細胞死貪食を利用した
小児神経芽腫の新しい細胞治療の開発

研究代表者 井上 成一郎 (総合医療センター 肝胆膵外科・小児外科)

緒言

従来悪性腫瘍に対する抗がん化学療法は患者自体の免疫防御機構を抑制するため腫瘍免疫学的観点からは不利と考えられていた。しかし、ある種の腫瘍に対し特定の抗悪性腫瘍薬が作用すると免疫学的に有利な効果を誘導する現象が知られるようになった。近年その現象の効果やメカニズムの詳細が徐々に解明されつつありchemoimmunotherapyとして注目されている^{1,2)}。

抗がん化学療法により誘導される免疫修飾効果は、腫瘍細胞に対する効果と宿主の免疫機構への効果の2種に大別できる。まず腫瘍細胞に対する作用を介して機能するメカニズムとして、腫瘍細胞表面への腫瘍抗原発現の促進、Co-stimulatory moleculesの細胞表面での発現促進、免疫寛容を誘導する細胞表面分子(Immune checkpoint molecules; B7-H1/PD-L1やB7-H4等)の発現抑制、CD8陽性リンパ球による腫瘍細胞溶解効果に対する感受性の促進の報告がある。これらの効果は、悪性腫瘍の種類(病理組織学的差異や生物学的特異性)と使用する薬剤の種類に依存している。また宿主の免疫機構に対する作用のメカニズムとして、調節性リンパ球(Regulatory T cell)の誘導または機能抑制を介して腫瘍細胞の寛容機構を調節する経路、helper Tリンパ球による免疫反応の惹起、Myeloid-derived suppressor cells(MDSC)の誘導または抑制作用とこれを介したCD8⁺T cellのexpansionの促進、樹状細胞(Dendritic cell: DC)の機能の促進が報告されている(図1)。これらの効果は抗悪性腫瘍薬の量および投与のタイミングが重要で、特にワクチン療法との併用では重要な要因となると考えられている。これらの報告のほとんどが前立腺がん、乳がん、大腸がん、非小細胞性肺がんや悪性黒色腫などでの試みが多く進行神経芽腫に関する報告は非常に少ない¹⁾。

小児固形腫瘍は集学的治療の発達により短期生存

率は明らかに改善したものの、寛解後の再発や治療の部分的効果しか得られず最終的には死亡に至る例もいまだ後を絶たない。さらに、完治できる場合でも治療後の長い人生をおくる小児の場合、治療後遺症や新たな発癌の問題等克服すべき多くの問題が残存しており、より効果的で、より負担の軽度な質の高い治療法が開発が望まれる³⁾。自己の免疫機構の有効利用が重篤な副作用を軽減し、より高い効果を得ることに繋がる。従来の集学的治療を基礎に免疫学的知見を取り入れた新しい治療法が開発が期待される。

我々はこれまでにchemoimmunotherapyのconceptに着目し、各種抗がん剤特にdoxorubicinがマウス神経芽腫細胞にApoptosisを誘導することを確認した⁴⁾。さらに、この死細胞を抗原提示細胞が貪食するとCD8⁺リンパ球の分裂増殖反応がより誘導されるかを評価^{5,6)}した。さらにdoxorubicinのchemoimmunotherapyによる効果を応用し、自己の免疫細胞を用いたcell therapyと融合させることで低侵襲かつ効果の高い新しい治療法を開発を試みた。Immunogenic cell deathを誘導した神経芽腫細胞が樹状細胞を中心とした貪食細胞に貪食され免疫反応を誘導するメカニズムを解析し、神経芽腫細胞治療効果の高い貪食細胞の作製と、この細胞を用いた新しい治療プロトコルの開発を目指した。

材料と方法

・マウス神経芽腫細胞株

マウス由来神経芽細胞腫細胞株neuro-2a(ATCCTM/住商ファーマインターナショナル)を、10%FBS(ATCCTM)、1%Penicillin-Streptomycin(GIBCOTM)を添加したMinimum Essential Medium Eagle(ATCCTM)中で37.0℃・5%CO₂下で培養した。培養dishに接着したneuro-2a細胞はTrypsin(0.25%)・EDTA(1mmol)(和光純薬)を添加して遊離し細胞懸濁液とした。

・実験動物

8～12週齢雌A/J mouse (日本SLC) を埼玉医科大学総合医療センター研究部動物実験施設において固形飼料および水を自由に摂取できる状況下で飼育管理を行い実験に使用した。

・薬剤および各種抗腫瘍薬による細胞死誘導

Doxorubicin hydrochloride (Sigma-Aldrich), Cisplatin: CDDP (シスプラチン注) [マルコ]^R (ヤクルト) を用いて先に我々が報告した方法⁴⁾を用いて細胞死を誘導した。

・骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cell) の誘導

マウス骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cell) は先に報告した方法を用いて骨髄細胞から培養系で誘導した (癌と化学療法)。マウス両側大腿骨・腓骨を採取, RPMI1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で骨髄を洗浄した後赤血球溶血して骨髄細胞浮遊液を作成した。細胞浮遊液を20 ng/ml recombinant GM-CSF (R and D Systems, Inc. Minneapolis, MN) を添加したRPMI 1640で37℃, 5% CO₂下で培養した。培養開始後7日目にTrypsin (0.25%) -EDTA(1 mmol) を用いて接着性細胞を回収した。マウス細胞表面

抗原CD11c及びMHC class IIの発現をFACSVerse flow cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ) で確認した。

・リンパ球混合培養におけるCD8 α ⁺リンパ球増殖反応の誘導効果の確認

リンパ球混合培養におけるResponderとしてマウス脾臓及び腸間膜リンパ節からCD8 α 陽性リンパ球を分離した⁶⁾。マウス脾臓・腸間膜リンパ節を用いMACS running buffer (Miltenyi Biotec GmbH) で細胞浮遊液とした。得られた細胞はanti-mouse CD8 α ⁺ magnetic beads (Miltenyi Biotec) を加え4℃で15分間incubateし, Auto MACS Pro separator (Miltenyi Biotec) を用いてCD8 α ⁺細胞を単離し混合培養に使用した。

細胞死が誘導された腫瘍細胞がDM-DCに貪食され抗原提示される際に引き起こされる抗腫瘍免疫反応を, リンパ球の増殖反応及びIFN- γ 産生を指標に評価した。単離したCD8 α ⁺リンパ球を10 mMのCFSE (Enzo Life Science) で染色した後, RPMI 1620 medium (和光純薬) に懸濁した。hamster anti-mouse CD3/CD28 antibody (BD Pharmingen) でcoatingしたFlat bottom 24 well Plateにリンパ球, BM-DC, 細胞死を誘導したneuro-2a細胞を加え混合培養した。37℃, 5% CO₂下で培養し, リンパ球の分裂増殖による

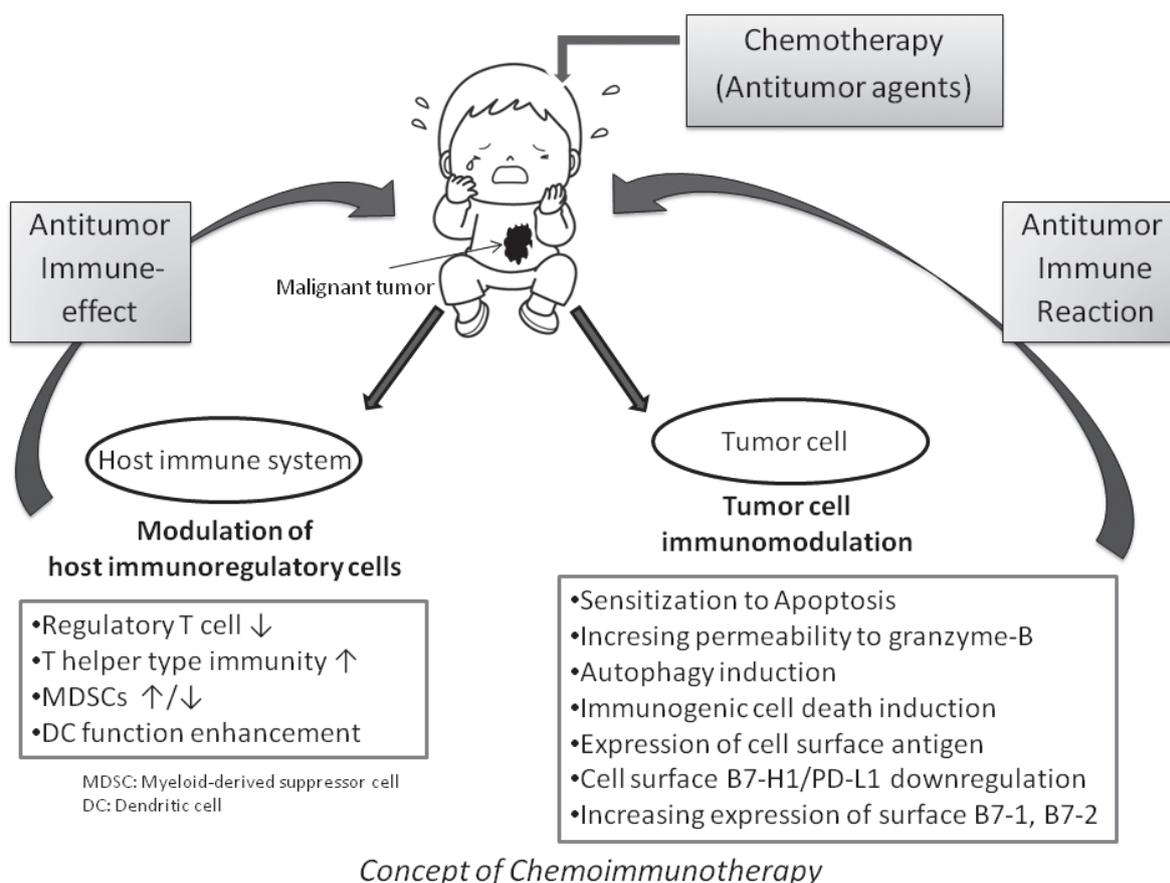


図1. 悪性腫瘍に対する免疫学的効果に着目した化学療法-Chemoimmunotherapyのconcept-

CFSE 輝度の減弱をFACSで確認した。さらに混合培養中のIFN- γ 濃度をmouse IFN- γ kit (BD Biosciences)を用いてELISA法で測定した。

・抗腫瘍効果を増幅させた骨髓由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cell) の誘導と抗原提示能の評価

上記方法にてマウス骨髓より誘導したBM-DC培養系に doxorubicin で細胞死を誘導した neuro-2a 細胞を添加した。AdjuvantとしてToll-like receptor (TLR) -4 agonistであるlipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml; Sigma-Aldrich) を添加した。得られた細胞におけるCD11c⁺ MHC class II⁺ double positive cellの誘導効率をFACSで評価した。さらにこの細胞を抗原提示細胞としてCD8 α ⁺リンパ球, UV照射したneuro-2a細胞とともにリンパ球混合培養を施行し, リンパ球増殖反応を確認しIFN- γ 産生を評価した(図3)。

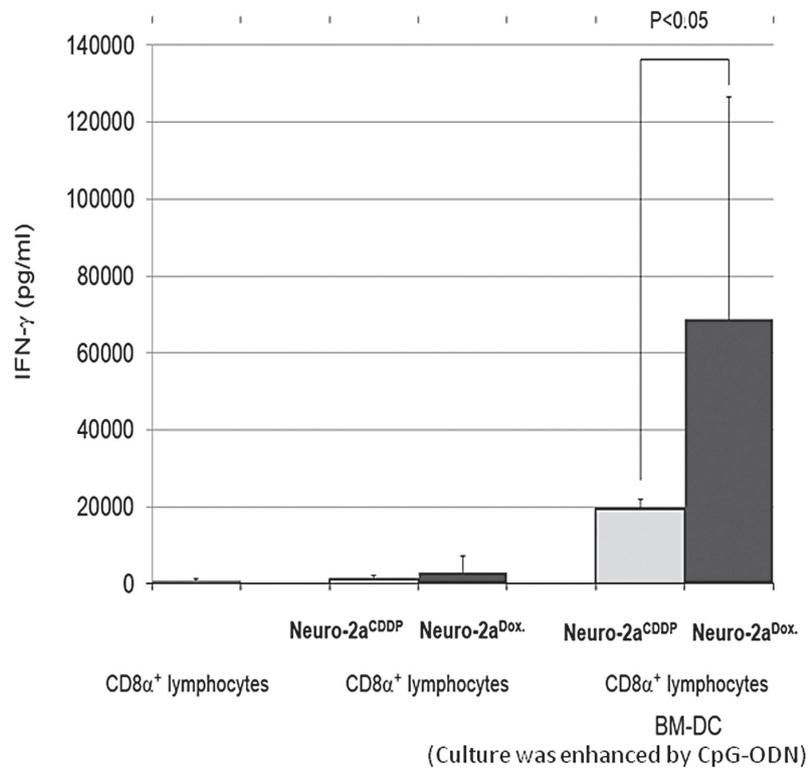
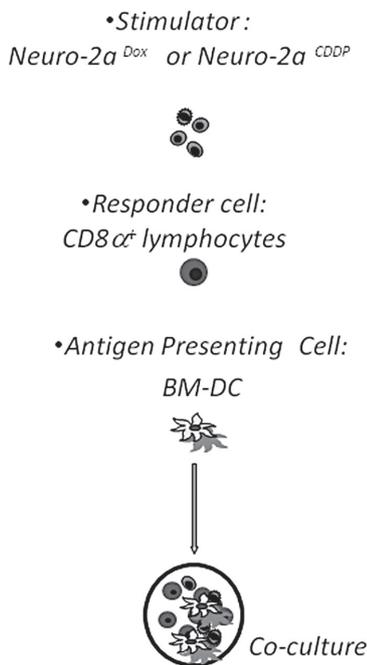
結果

細胞死を誘導したneuro-2aとともにBM-DC及びCD8 α ⁺リンパ球を混合培養すると, リンパ球増殖反応が誘導された。細胞死を誘導する薬剤として doxorubicinを用いると, CDDPを用いた場合に比べ

混合培養にてよりIFN- γ 産生が強く誘導された。従来から他の癌腫で報告されていた結果と同様マウス神経芽腫細胞においても doxorubicinはimmunogenic cell deathを誘導することが判明した(図3)⁵⁾。

細胞培養系で doxorubicin を作用させて immunogenic cell deathを誘導したneuro-2a細胞とともに, マウス骨髓細胞から誘導したBM-DCを適切な adjuvantとしてTLR agonistを添加することでBM-DC細胞表面にMHC class II moleculeを発現し, CD11c⁺ MHC class II⁺ double positive cellを誘導できることが判明した(図4)。

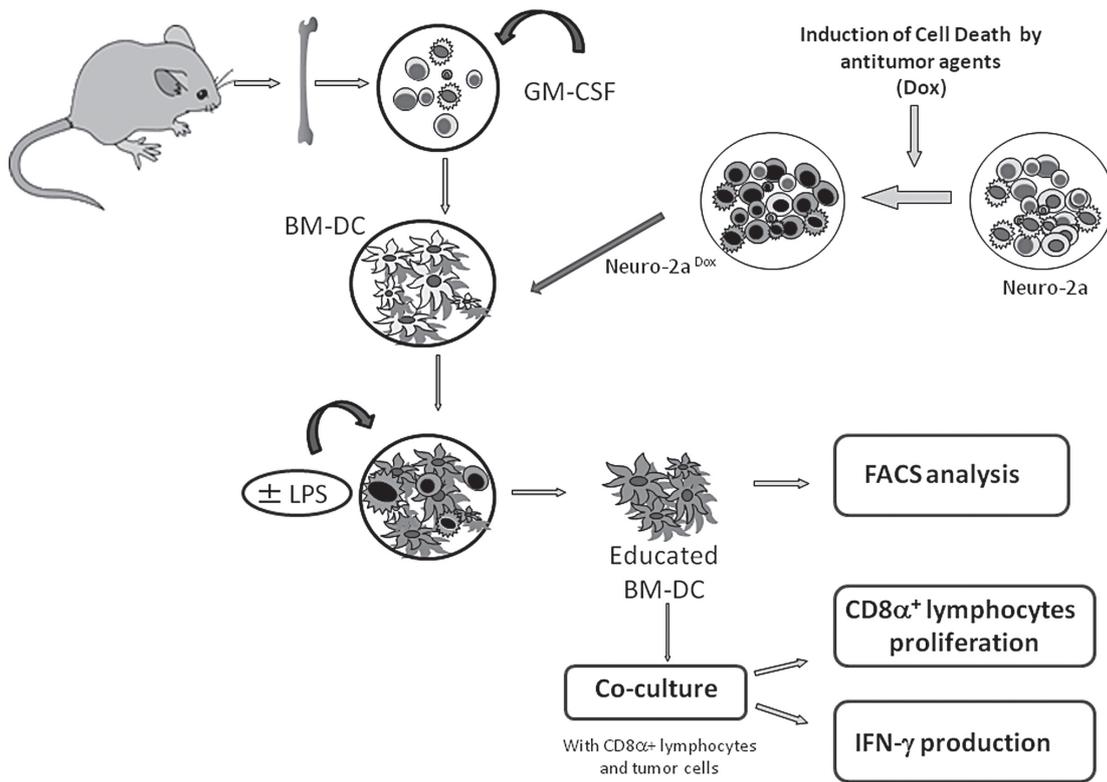
さらにこのCD11c⁺ MHC class II⁺ double positive cellを多数含むBM-DCをantigen presenting cellとし, UV照射で増殖能を抑えたneuro-2a細胞をstimulator, CD8 α ⁺リンパ球をresponderとして混合培養すると, このCD11c⁺ MHC class II⁺ double positive cellを多数含むBM-DCをantigen presenting cellとして培養した際に最も強くIFN- γ 産生を誘導することができた(図5)。Doxorubicinを培養系で貪食させ, より腫瘍細胞に対するリンパ球増殖を誘導するDCへの分化を“educate”した。本稿ではこの細胞を“Educated BM-DC”とした。



Evaluation of the ability to induce immunogenic cell death by doxorubicin treatment (compared with CDDP).

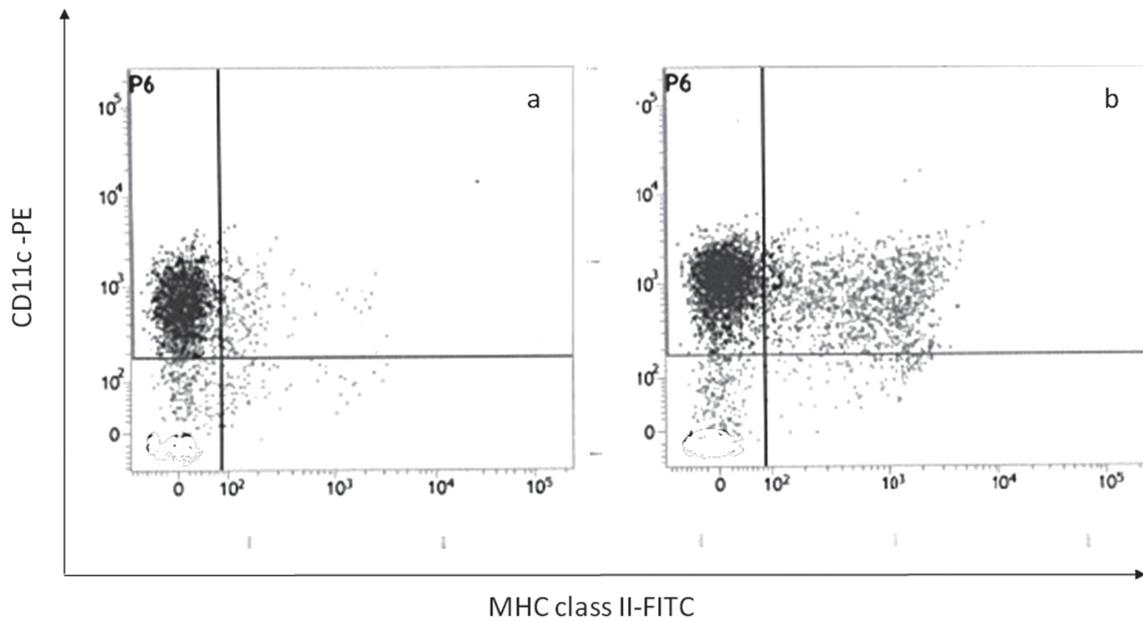
(Inoue et al. Exp Ther Med. 2014より 一部改)

図2. Immunogenic cell death 誘導効果：DoxorubicinとCDDPの比較 (Inoue, et al. Exp Ther Med. 2014 より. 一部改編し引用).



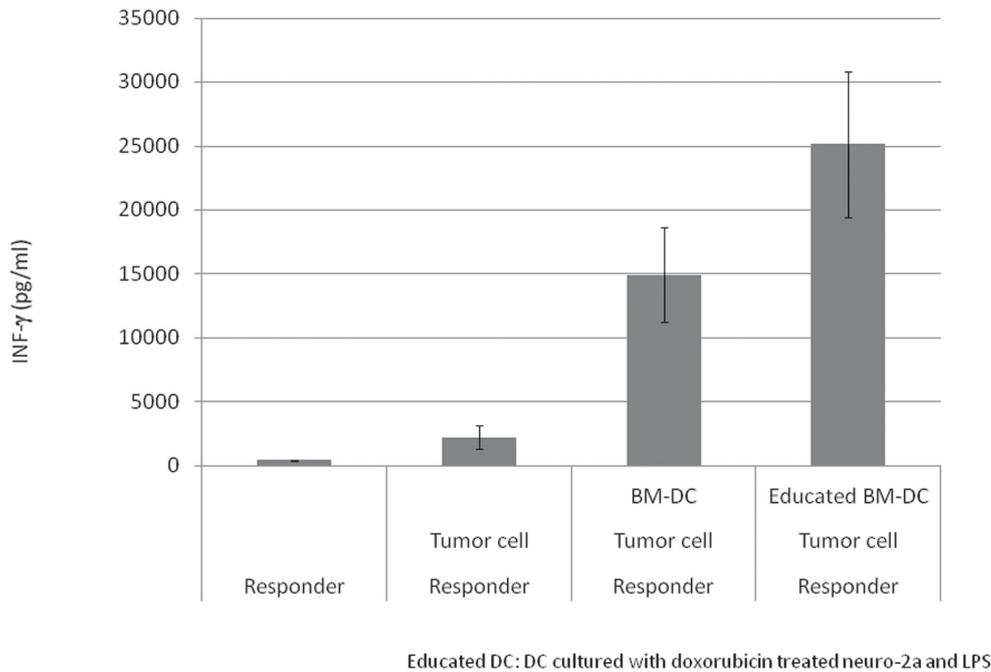
Establishment of Educated BM-DC from mouse Bone Marrow Cell

図 3. Educated DC 作成と効果判定 (Schema).



Typical pattern of MHC Class II molecule expression on the surface of CD11c⁺ BM-DC

図 4. Educated DC における MHC class II 分子の細胞表面発現.



IFN- γ production in co-culture using Educated BM-DC

図 5. Educated DCによる腫瘍免疫反応誘導効果 (in vitroでの検討).

考 察

小児神経芽腫において腫瘍抗原を用いて自己のDCによる抗原提示を誘導するいわゆる腫瘍ワクチン療法が臨床試験や動物を用いた実験の報告があるが⁷⁻⁹⁾ 広く臨床に普及するまでの効果は得られていない。一方、進行神経芽腫の遠隔転移や、寛解導入後原発巣における局所コントロールがなされているにも関わらず遠隔再発に苦しむ患児における腫瘍進展メカニズムにcirculation tumor cellの存在に注目が向けられており、その生物学的特性が原発巣と再発腫瘍で異なる可能性が指摘されている^{10,11)}。腫瘍の免疫学的特性も治療経過や投与薬剤に影響を受ける可能性がある。従来の2年生存率を改善させた外科手術、抗癌化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療をさらに改善し、QOL改善も含めた患児の長期治療成績向上には化学療法における神経芽腫の腫瘍免疫学的知見の解明とその知見に立脚した新しい治療法の開発が不可欠である。Chemoimmunotherapyの観点から神経芽腫治療を検討することは遠隔転移や再発などの進行神経芽腫の予後に大きな影響を与える病態に対する新しい治療の開発に寄与する可能性がある。

我々は他癌種で報告されていた通り、doxorubicinは神経芽腫細胞にimmunogenic cell deathを誘導することを報告し(図2)⁵⁾ 神経芽腫においても

chemoimmunotherapyに立脚した新しい治療法の開発が可能であることを確認した。さらにimmunogenic cell deathを誘導した神経芽腫細胞を貪食し抗原提示する際に、CD11b⁺脾細胞(macrophageを主体とする)と想定)と比較し骨髓細胞をGM-CSFを添加して培養することで得られたCD11c⁺細胞(BM-DC主体とする)がよりCD8 α ⁺リンパ球増殖とIFN- γ 産生を誘導することを確認した。BM-DCを死細胞と混合培養し適切なToll Like Receptor刺激を添加することでこのBM-DCがより免疫反応を誘導する細胞へと分化できるかを評価した(図3)。DCには抗原細胞を貪食すると抗原提示を介して免疫応答を誘導するものと、免疫寛容を誘導するものがあり、特に未熟なDCほど免疫寛容を誘導しやすく、分化が進むほど拒絶を誘導することが知られている。図5に示したようにdoxorubicin処理したneuro-2a細胞とLPSを用いて“educate”したBM-DCはその後の混合培養でCD8 α ⁺リンパ球によるIFN- γ 産生を促進する効果を示した。このeducated BM-DCをFACS解析するとよりMHC class II分子が細胞表面に発現しており(図4)より分化した状態にあると考えられた。この点も今後腫瘍免疫を誘導するメカニズムの解析の一環として分析を進める方針である。さらに、これらの結果をもとに、より免疫反応を誘導しやすいBM-DCをex-vivoで作成し、最終的にこの細胞を用いたcell therapyの開発と、化学療法と

cell therapyを組み合わせた新しい治療プロトコールの確立を目指して今後も研究を展開していきたいと考えている。

最後に本実験を遂行するにあたり平成25年度埼玉医科大学学内グラントが多大な援助となったことをここにご報告し、採択頂いたことを感謝申し上げます。

謝 辞

本研究施行にあたり細胞培養・維持並びに培養細胞実験、FACS解析実験の技術的協力を頂きました総合医療センター研究部共同利用研究施設担当瀬戸山由美子様に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Emens LA. Chemoimmunotherapy. *Cancer J* 2010;16(4):295-303.
- 2) Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer immunol immunother* CII 2013;62(2):203-16.
- 3) Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369(9579):2106-20.
- 4) 井上成一朗. 神経芽腫マウスモデルを用いた自然免疫細胞による腫瘍死細胞除去と免疫応答の検討. *埼玉医科大学雑誌* 2010;37(1):46-50.
- 5) Inoue S, Setoyama Y, Odaka A. Doxorubicin treatment induces tumor cell death followed by immunomodulation in a murine neuroblastoma model. *Exp Ther Med* 2014;7(3):703-8.
- 6) 井上成一朗, 瀬戸山由美子, 小高昭雄. Chemoimmunotherapyに立脚した各種抗悪性腫瘍薬の神経芽腫細胞に対する効果. *癌と化学療法* 2014 (in press).
- 7) Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, et al. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001;61(23):8513-9.

- 8) Ohashi K, Kobayashi G, Fang S, et al. Surgical excision combined with autologous whole tumor cell vaccination is an effective therapy for murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2006;41(8):1361-8.
- 9) Shilyansky J, Jacobs P, Doffek K, Sugg SL. Induction of cytolytic T lymphocytes against pediatric solid tumors in vitro using autologous dendritic cells pulsed with necrotic primary tumor. *J Pediatr Surg* 2007;42(1):54-61.
- 10) Kuroda T, Honna T, Morikawa N, et al. Tumor cell dynamics and metastasis in advanced neuroblastoma. *Pediatr Surg Int* 2005;21(11):859-63.
- 11) Kuroda T. Cellular kinetics of neuroblastoma and the role of surgery. *Pediatr Surg Int* 2011;27(9):913-7.

研究成果

研究論文

- 1) Inoue S, Setoyama Y, Odaka A. Doxorubicin treatment induces tumor cell death followed by immunomodulation in a murine neuroblastoma model. *Exp Ther Med* 2014 Mar;7(3):703-8.
- 2) Inoue S, Setoyama Y, Odaka A. Phagocytosis of bafilomycin A1 treated apoptotic neuroblastoma cells by bone marrow-derived dendritic cells initiates a CD8 α^+ lymphocyte response to neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014 July;36(5):e290-5.
- 3) 井上成一朗, 瀬戸山由美子, 小高昭雄. Chemoimmunotherapyに立脚した各種抗悪性腫瘍薬の神経芽腫細胞に対する効果. *癌と化学療法* 2014 May;41(5):617-21.

学会発表

- 1) 井上成一朗, 小高昭雄, 瀬戸山由美子, 別宮好文. マウス神経芽腫に対するChemoimmunotherapyの可能性-DoxorubicinとCDDPによる比較-, 第114回日本外科学会学術総会, 2014年4月5日, 京都