

学内グラント 終了時報告書

平成21年度 学内グラント報告書

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

研究代表者 井上 成一郎

(埼玉医科大学 総合医療センター 肝胆膵・小児外科)

緒言

悪性腫瘍は自己から発生するにもかかわらず、その異常に起因する種々の抗原を発現するため本来は免疫機構によって拒絶されると考えられている。しかし臨床症状を発症する悪性腫瘍は、自己の免疫による拒絶機構を“すり抜けて”増殖し続ける。また近年、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の効果により、神経芽腫を中心とした小児固形腫瘍領域で患者の生存期間が延長したが、いまだに治療中に腫瘍増殖が加速して治療の効果を上回り最終的に死亡に至る症例は後を絶たない。悪性腫瘍における免疫機構と腫瘍増殖の関係の詳細な解明は、悪性腫瘍に対する有効な根治法の開発に不可欠である。小児外科領域で頻度の高い固形腫瘍である進行神経芽腫においても、新たな治療の試みとして腫瘍細胞に対する宿主の免疫反応を誘導する免疫療法の確立が試みられている。中でも腫瘍抗原を用いて自己の樹状細胞(Dendritic cell: DC)の抗原提示を誘導するいわゆる腫瘍ワクチン療法は、臨床試験や動物を用いた実験でも報告されているが¹⁻³⁾、広く臨床に普及するまでの効果は得られていない。

腫瘍免疫における基礎的研究を中心に、悪性腫瘍に対する免疫応答にはDCやMacrophageなど自然免疫系の貪食細胞が深く関与していることが明らかにされるようになってきた。ある抗原に対して、免疫反応が抑制され拒絶されない状態を免疫寛容と呼ぶ。近年悪性腫瘍の増殖に関しても近年悪性腫瘍に対する免疫応答回避の機構のひとつとして悪性腫瘍組織に対する免疫寛容を誘導する機構の存在が提唱されている。DCは腫瘍抗原を取り込んで抗原提示することで腫瘍細胞に対する細胞障害性T細胞(Cytotoxic T Lymphocyte: CTL)を誘導するが、一方で免疫寛容を誘導するDCも存在する⁴⁾。さらに腫瘍組織に浸潤

したMacrophageである腫瘍関連Macrophage (TAM: Tumor Associated Macrophage) が悪性腫瘍の増殖に関与することが明らかになってきた⁵⁾。悪性腫瘍は一部細胞死をきたし排除処理されながら宿主の腫瘍排除機構を逸脱して増殖を繰り返すことから、DC、TAMなどの貪食細胞による死細胞処理と腫瘍に対する免疫反応誘導との関連が推定される。また貪食細胞が抗原細胞を貪食した結果起こる免疫事象は、貪食細胞に貪食される抗原を持つ細胞の状態(たとえば死細胞がapoptosisによるものか、necrosisによるものか)が大きく関与している可能性がある⁶⁾。G Kroemerらは各種抗癌化学療法剤を用いて細胞死を誘導した腫瘍細胞を用いてマウスにワクチンを行うと、抗癌剤の種類により抗腫瘍免疫反応が誘導される場合と反応が誘導できない場合があることを示した⁷⁾。抗癌剤の作用機序により誘導される細胞死に差異があり、結果として引き起こされる免疫反応に差異が生じることが示唆された⁷⁾。現在主流となっている集学的治療で 사용되는抗悪性腫瘍薬の中には腫瘍免疫反応上有利なものと不利なものがある可能性を強く示唆している。

小児進行神経芽腫において各種治療により細胞死が誘導された際に貪食細胞に腫瘍細胞が貪食され処理された結果起こる免疫反応は図1のような可能性(仮説)が考えられる。特に治療に使用される抗悪性腫瘍薬が引き起こす腫瘍細胞の細胞死が免疫反応を誘導するのか、免疫寛容を誘導するのかを検討することは、よりqualityの高い新しい集学的治療のプロトコールを作成することに大きく貢献できる。さらに抗癌剤、放射線治療などの腫瘍細胞死を誘導する治療においてその死細胞処理の結果起こる免疫反応のメカニズムを解析することで新しい抗癌免疫療法の開発に役立つと考えられる。

本研究ではマウス神経芽腫モデルを確立した。In vitroでの神経芽腫細胞死誘導法を確立し、in vivo, in

vitro 両面から神経芽腫モデルでの免疫応答を解明することを目指した。

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 (ATCC™/住商ファーマインターナショナル) を、10%FBS (ATCC™), 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO™) を添加した Minimum Essential Medium Eagle (ATCC™) 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 PBS で洗浄したのち Trypsin (0.25%) -EDTA (1 mmol) (和光純薬) を添加し 5 分後に 10%FCS を含む培地で反応を停止し、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

Doxiorubicin hydrochloride (Sigma-Aldrich) は蒸留水で溶解して 10 mg/ml 溶液として凍結保存した。Bafilomycin A1 (和光純薬) は DMSO (Sigma) で 100 μmol/l として保存した。Cisplatin (シスプラチン注) [マルコ]^R (ヤクルト) は遮光下に 4℃ 保存。Vincristine (オンコビン注射用^R) は滅菌蒸留水で 1 mg/ml に溶解し保存した。各薬剤とも凍結保存または 4℃ で保存の上、適宜 Neuro-2a 培養用培地を用いて適切な濃度に希釈し培養系培地に添加した。

・Cell surviving detection

Neuro-2a 培養系において、各種濃度の Doxorubicin, Bafilomycin A1, Cisplatin, Vincristine を添加し、1

～3 日間 37.0℃・5% CO₂ 下で培養した際の Neuro-2a 細胞の生存率を細胞毒性測定用試薬 Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて測定した。2X10⁵/ml の Neuro-2a 細胞懸濁液を 90 μl/well ずつ 96well plate に播種し、37.0℃・5% CO₂ 下で 24 時間培養後、各種薬剤を目的の最終濃度の 10 倍になるように細胞培地で希釈し 10 μl/well ずつ添加した。Doxiorubicin は 24 時間、Bafilomycin A1 は 48 時間、Cisplatin, Vincristine は 72 時間同条件で培養した後、Cell Counting Kit-8 溶液を 10 μl/well ずつ添加、37.0℃・5% CO₂ 下で約 1 時間の呈色反応を行い、450 nm の吸光度を測定した。各種薬剤を加えなかった well での細胞生存率を 100% として、各濃度での細胞生存率を測定した。

・FACS による Apoptosis 解析

24 時間 37.0℃・5% CO₂ 下で培養した Neuro-2a 細胞培養系に Doxorubicin (final conc.: 5 μM), Bafilomycin A1 (final conc.: 0.1 μM), Cisplatin (final conc.: 50 μg/ml), Vincristine (final conc.: 0.1 μg/ml), を添加した。さらに 37.0℃・5% CO₂ 下で培養 (Doxiorubicin (24 hr), Bafilomycin A1 (24 hr), Cisplatin (72 hr), Vincristine (72 hr)) した後、全細胞を回収した。BioVision Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit を用いて Annexin V, および PI で染色したのち FACS を用いて Annexin V 染色陽性細胞の有無を評価し、各種薬剤で Neuro-2a に Apoptosis が誘導されていることを確認した。

・神経芽腫死細胞を用いたワクチン効果

上記実験と同様に 24 時間 37.0℃・5% CO₂ 下で培養し Doxorubicin (final conc.: 5 μM) を添加し、さらに 24 時間培養を継続して Apoptosis を誘導した Neuro-2a 細胞を 1X10⁶ cells/100 μl の PBS 懸濁液と

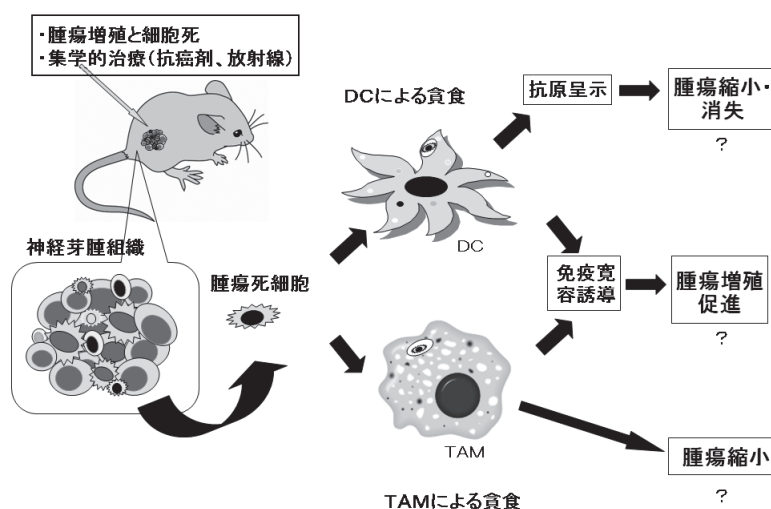


図 1. 腫瘍死細胞の貪食を介した免疫反応(仮説).

し、全身麻酔下のマウスの両下肢 foot pad に接種した。対照群は細胞を含まないPBS 溶液 100 μ l をマウスの両下肢 foot pad に接種した。1 回目の接種から7 日目に同様に Apoptosis 誘導した細胞を接種した。さらに7 日後に薬剤処理を行っていないNeuro-2a 細胞を 1×10^6 cells マウス背部皮下に接種し (図2) マウスの生存期間を対照群と比較した。

結果

マウス神経芽腫細胞 Neuro-2a は、各種抗癌性腫瘍薬により、濃度依存性に細胞死が誘導された (図3)。

Doxorubicin で24 時間、Bafilomycin で48 時間、CDDP およびVincristine では72 時間の細胞培養下での薬剤作用により腫瘍細胞死が誘導された。この結果をもとに培養細胞に投与するそれぞれの薬剤濃度および培養時間を決定した。

各種薬剤を培養系に添加し培養を継続し、Annexin V 染色を行ってFACS を用いて解析すると、Neuro-2a 細胞の細胞死誘導過程で Annexin V 陽性 PI 陽性細胞の出現が確認され、本法による Neuro-2a 細胞の細胞死において Apoptosis が誘導されていることが確認された (図4)。

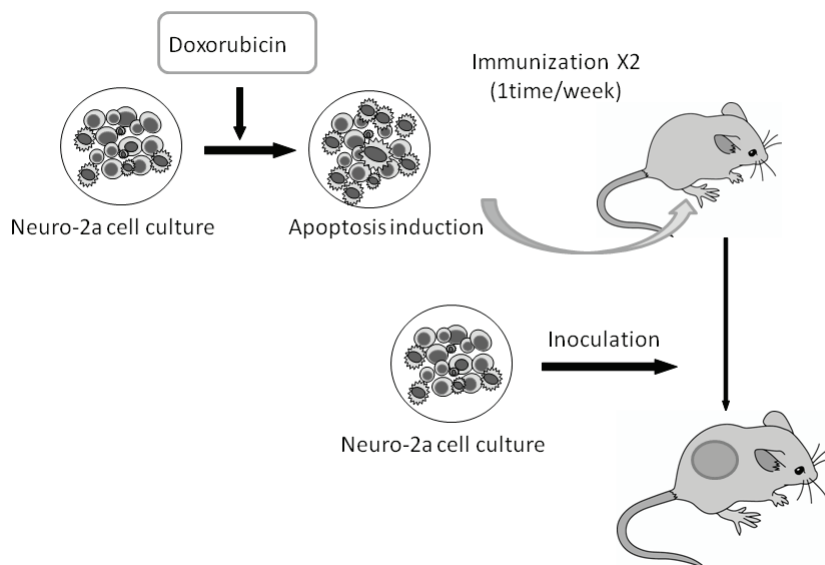


図2. Immunization実験プロトコール。

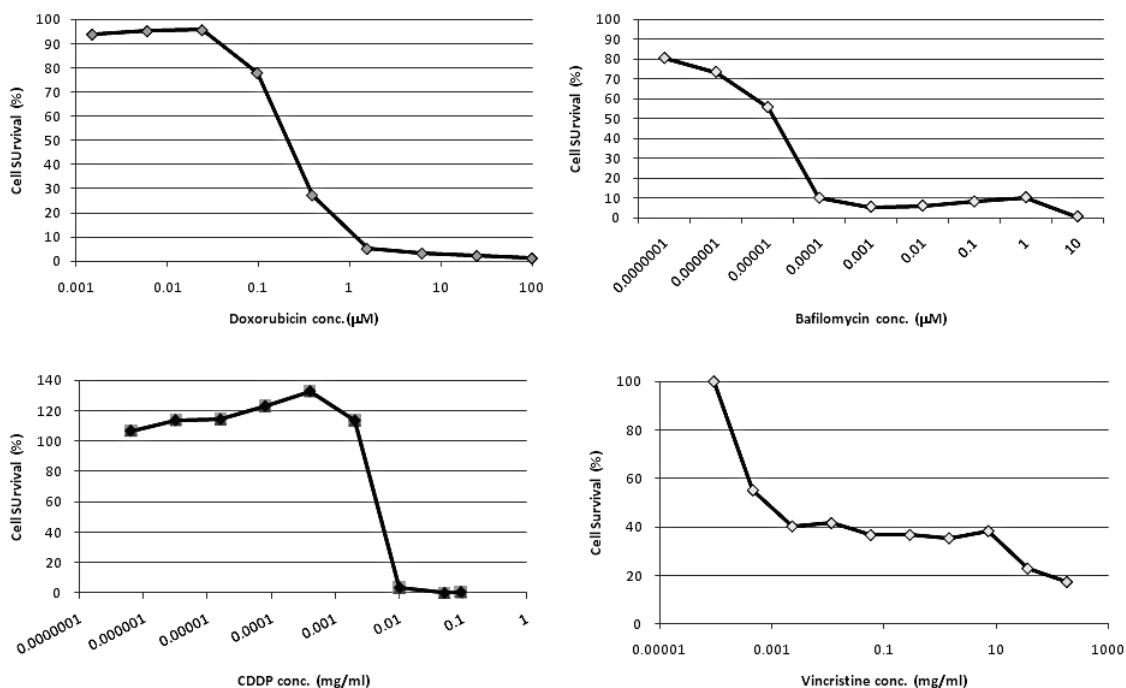


図3. 各種薬剤添加後のNeuro-2a培養細胞生存率。

Doxiorubicinを用いて*Ex. vivo*でApoptosisを誘導したNeuro-2a細胞を用いてマウスに免疫した後、マウス背部に 1×10^6 cellsの薬剤処理していないNeuro-2a細胞を接種すると、表1に示したように、対照群としてPBSを投与したマウス群と比較してマウスの生存期間が延長する傾向が認められた。

考察および研究成果

小児進行神経芽腫は高度な集学的治療の発達により生存期間延長が得られるようになったものの、現在も長期にわたる治療の後に再発・進展を繰り返し結果的に幼い命を奪われるケースは今も後を絶たない。加えて集学的治療の発達の結果として問題となる治療後後遺症や二次発がんの問題など、解決に向けて努力すべき問題は山積している。患児の免疫反応を惹起して抗がん効果を得る免疫治療はより安全で患児の負担を軽減し得る新しい治療法として期待されるが、即臨床に応用するに値する確実な効果に関しては、まだまだ十分とは言えない。現状を考慮すると、がんに対する免疫療法の開発は、従来の集学的治療にとって代わる新しい治療法としての開発を目指すことはもちろんのこ

と、従来の集学的治療との相乗効果を期待して、より安全で高い効果が得られる併用治療としての位置づけのもと研究開発を進めることも重要と考え、本研究を立案した。

マウス実験系を用いて、神経芽腫に対する免疫反応を評価し、抗がん免疫療法を開発するための実験系を確立した。さらに担がん宿主にではなく、培養がん細胞に*Ex. vivo*で薬剤を投与することでApoptosisを誘導することに成功した。さらにこの確立した実験系のもと、免疫反応を惹起する細胞死を誘導する可能性が示されているDoxorubicinを用いてApoptosisを誘導した細胞を用いたワクチン療法が何らかの免疫系の機序を介して、担がんマウスの生命予後を改善する可能性が示された。さらに今後はマウスの生存期間延長をもたらす免疫機序をDendritic cellとMacrophageという自然免疫の中核を担う2種の細胞に注目して解明していく。また、担がんマウスの生存延長のみならず、*in vivo*で形成した腫瘍の縮小・消失が得られるあたらしい治療法としてのApoptosis細胞投与法の開発を目指して行く予定である。

2009年7月本学着任直後に本グラントに応募し、採用して頂いたことにより早期に本学での研究を開始することが可能となった。単年度研究としての採用となったため、今回はスタートアップとしての現時点までの研究成果報告ではあり、現時点で論文、学会発表、特許出願等の研究成果はないが、今後も研究を継続しさらに発展させていく予定である。幼くして重大な疾患に罹患してしまった患児達のために少しでも貢献できる様、そして臨床治療に貢献できる様、さらなる研究の継続を目指していきたい。

謝辞

本研究開始および施行にあたり多大なご協力を頂きました総合医療センター研究部の皆様に感謝いたします。特に、細胞培養・維持並びに培養細胞実験、FACS解析実験の施行における技術的協力を頂きました共同利用研究施設担当 瀬戸山由美子様、研究施設における細胞培養を中心とした実験開始の環境整備にご協力いただきましたRI研究施設 潮田陽一様、松岡菊美様、実験動物の管理・飼育並びに動物実験に際して

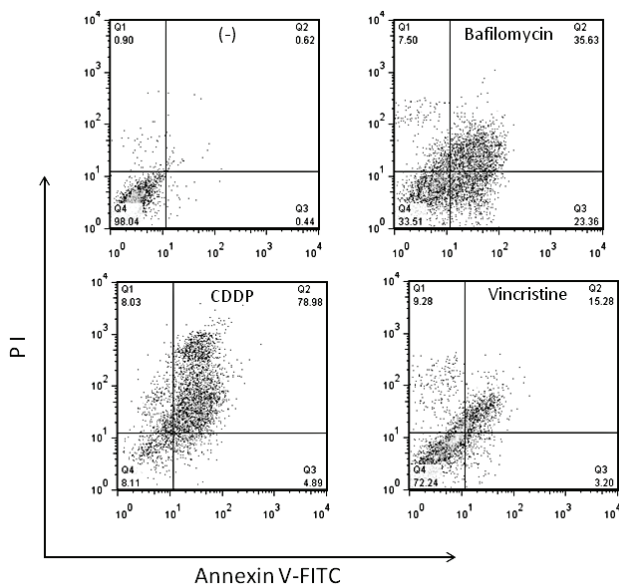


図4. 各種抗腫瘍薬によるNeuro-2a cellのApoptosis誘導。

表1. Dox.処理した細胞を用いた免疫効果(マウス生存期間)

Group	N	Survival (days)					Mean±S.D. (days)
Immunized with Doxorubicin Treated Cells	4	15	33	34	35		29.3±9.54
Control (PBS)	4	19	21	23	40		25.8±9.64

動物の麻酔管理において御協力頂いた動物実験施設
小山直基様，龍前真也様に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685.
- 5) Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007;117(5):1155.
- 6) Miyake Y, Asano K, Kaise H, Uemura M, Nakayama M, Tanaka M. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest* 2007;117(8):2268.
- 7) Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13(1):54.