

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591955
 研究課題名(和文)小児固形悪性腫瘍に対する新規ベクターを用いた樹状細胞免疫遺伝子治療
 開発
 研究課題名(英文)Dendritic cell-based immunotherapy for pediatric solid malignant
 tumor using the novel vector
 研究代表者
 田尻 達郎 (TAJIRI TATSURO)
 九州大学・医学研究院・准教授
 研究者番号：80304806

研究成果の概要：神経芽腫に対する外科療法と併用した樹状細胞治療の開発を目的に、前臨床試験としてマウス皮下担癌モデルにおいて、センダイウイルスベクター導入樹状細胞(SeV/DC)は有意に腫瘍増殖を抑制し、さらに SeV に搭載する遺伝子として IFN- γ を用いること、また放射線療法の併用療法で抗腫瘍効果が増強することを確認した。さらに、新たな知見として、放射線前照射により SeV/DC が誘導する抗腫瘍免疫は、CTL 活性を増強し長期メモリーを成立させることが分かった。また、抗腫瘍効果を担う主な免疫細胞は、原発巣の縮小には CD4 陽性 T 細胞が、再移植時には CD8 陽性 T 細胞が重要であることが示唆された。現在、臨床研究のプロトコールを作成中である。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 2007年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2008年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 540,000 | 4,040,000 |

研究分野：医学

科研費の分科・細目：小児外科

キーワード：小児腫瘍、免疫療法、遺伝子治療、樹状細胞、センダイウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

2. 研究の目的

小児固形悪性腫瘍をターゲットとしたセンダイウイルスベクター導入樹状細胞(SeV/DC)を用いた免疫遺伝子治療法の臨床応用のための前段階として、小動物による効能試験と免疫学的解析、さらにサルを用いた大動物による安全性試験の実施と臨床応用レベルのベクターの生産、及び、臨床試験実

施のための種々の委員会の承認などのインフラ整備を目的とする。

3. 研究の方法

マウスはA/Jマウスを使用し、細胞株はA/Jより自然発生するC1300を使用した。A/Jマウスの大腿骨、腓骨の骨髓より骨髓前駆細胞を採取し、これをIL-4、GM-CSFのサイトカイン下に一週間培養して樹状細胞を採取した。

樹状細胞を活性化させるため、SeVと8時間共培養した。SeVの感染効率および樹状細胞の活性化マーカーの測定をFACS analysisを用いて検討した。ついで十分に生着した腫瘍に対する有用性を検討するため、マウスの腹部皮下にC1300を $1 \times 10^6/100\mu\text{l}$ を接種し、その10日後、17日後、24日後に樹状細胞を $1 \times 10^6/匹$ 投与し、その腫瘍体積を測定し、無治療群、DC群、SeV/DC群で比較した。またIFNのin-vitroにおける腫瘍細胞に対する直接作用の検討を、IFNを0-10000U/mlの各濃度下に腫瘍細胞を48時間培養した後、細胞数をカウントして細胞障害性の評価 FACS analysisを用いてMHC class の発現の評価を行った。さらに、マウス右大腿皮下に腫瘍を接種した後、7,8,9日目に4Gy/dayのX線照射を行い、その後10,17,24日目に樹状細胞を投与し、その腫瘍体積を計測した。また、抗腫瘍効果を担う免疫細胞を検討するために、抗体を用いてNK細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞を除去した状態で、抗腫瘍効果を確認した。

4. 研究成果

樹状細胞へのSeVの感染効率は90%以上と高いものであった。十分に生着した腫瘍に対する樹状療法における腫瘍体積の比較では、SeV/DCではコントロールより有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。IFNによる腫瘍細胞への直接作用は、濃度依存性に細胞障害を認め、MHC class の発現の増強を認めた。放射線併用の実験においては、コントロール、放射線照射単独、SeV/DC単独治療と比較して、放射線照射とSeV/DCの併用療法において有意に腫瘍増殖を抑制することができ、8頭中5頭において腫瘍が完全に消失した(図1)。腫瘍が完全消失した個体の多くは150日以上長期生存に至り、これらの個体ではC1300特異的細胞障害性T細胞(CTL)の活性が上昇、さらに約6ヶ月後(184日後)における腫瘍再移植時に担がんが成立せず、腫瘍特異的免疫が成立していた。この系における細胞除去抗体によるエフェクター細胞の探索では、原発巣の縮小にはCD4陽性細胞が、再移植時にはCD8陽性細胞が重要であることが明らかになった。また、凍結保存小児がん患者末梢血単核球由来DCにSeVを感染させたところ、十分な遺伝子導入、IL-8, TNF-の誘導を得ることができた。現在、臨床研究のプロトコールの準備が終了し、学内のIRB審査の承認後に厚生労働審議会に提出し、承認後の早期の臨床応用を目指している。

放射線前照射により、SeV/DC療法は腫瘍が生着・発育した10日目治療開始群(>5mm)でも著しい抗腫瘍効果を示す

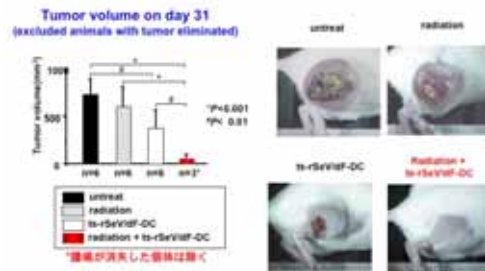


図1：放射線前照射併用SeV/DC療法

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

- Suita S, Tajiri T, Kaneko M, Hirai M, Mugishima H, Sugimoto T, Tsuchida Y: Implications of MYCN amplification in patients with stage 4 neuroblastoma who undergo intensive chemotherapy. *J Pediatr Surg*, 42, 489-493, 2007
- Suita S, Tajiri T, Higashi M, Tanaka S, Kinoshita Y, Takahashi Y, Tatsuta K: Insights into infant neuroblastomas based on an analysis of neuroblastomas detected by mass screening at 6 months of age in Japan, *Eur J Pediatr Surg*, 17, 23-28, 2007
- Tajiri T, Higashi M, Souzaki R, Tatsuta K, Kinoshita Y, Taguchi T: Classification of neuroblastomas based on an analysis of the expression of genes related to the prognosis, 42, 2046-2049, 2007
- Higashi M, Tajiri T, Kinoshita Y, Tatsuta K, Souzaki R, Maehara Y, Suita S, Taguchi T: High expressions of neuronatin isoforms in favorable neuroblastoma, *J Pediatr Hematol/Oncol*, 29, 551-556, 2007
- Hiyama E, Iehara T, Sugimoto T, Fukuzawa M, Hayashi Y, Sasaki F, Sugiyama M, Kondo S, Yoneda A, Yamaoka H, Tajiri T, Akazawa K, Ohtaki M.: Effectiveness of screening for

neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population-based cohort study. *Lancet*, 371, 1173-1180, 2008

6. Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Takahira T, Takahashi Y, Tajiri T, Taguchi T, Suita S, Tsuneyoshi M.: Alterations of RB1 gene in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma: special reference to utility of pRB immunoreactivity in differential diagnosis of rhabdomyosarcoma subtype. *J Cancer Res Clin Oncol*, 30, 447-450, 2008

7. Tajiri T, Ieiri S, Kinoshita Y, Masumoto K, Nishimoto Y, Taguchi T: Transumbilical approach for neonatal surgical diseases-woundless operation-. *Pediatr Surg Int*, 24, 1123-1126, 2008

8. Tatsuta K, Tanaka S, Tajiri T, Shibata S, Komaru A, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Suita S, Sueishi K, Taguchi T, and Yonemitsu Y: Complete Elimination of Established Neuroblastoma by Synergistic Action of g-Irradiation and DCs Treated with rSeV expressing Interferon- β Gene -. *Gene Ther*, 16, 240-251, 2009

9. Kinoshita Y, Souzaki R, Tajiri T, Ieiri S, Taguchi T: A preoperative evaluation for neo-infantile liver tumors using a three-dimensional reconstruction of multidetector row CT. *Oncol Rep*, in press, 2009

〔学会発表〕(計9件)

1. 田尻達郎, 米満吉和, 田中桜, 竜田恭介, 木下義晶, 上田泰次, 水田祥代, 田口智章: 難治性小児固形悪性腫瘍に対する樹状細胞を用いた免疫治療の開発, 第108回日本外科学会定期学術集会, 2008年5月15日, 長崎

2. 田中桜, 田尻達郎, 田口智章: Dendritic Cell-based Immunotherapy Using Sendai virus vector - a Preclinical Efficacy Study Against Neuroblastoma 13th Advances in Neuroblastoma Research -, 2008年5月23日, 幕張

2. Tatsuro Tajiri, Yoshiaki Kinoshita, Ryota Souzaki, Sakura Tanaka, Tomoaki Taguchi: The implications of surgical intervention in the treatment for neuroblastoma, 13th Advances in

Neuroblastoma Research, 2008年5月23日, 幕張

4. 田中桜, 田尻達郎, 田口智章: センダイウイルスによる活性化樹状細胞を用いたマウス神経芽腫に対する抗腫瘍効果の検討-臨床応用に向けて, 第45回日本小児外科学会, 2008年5月29日, つくば

5. 田尻達郎, 宗崎良太, 田中桜, 木下義晶, 古賀友紀, 住江愛子, 松崎彰信, 田口智章: マスクリーニング休止後に発症した神経芽腫症例の臨床的・生物学的特性解析, 第45回日本小児外科学会, 2008年5月29日, つくば

6. Tajiri T, Kinoshita Y, Souzaki R, Tanaka S, Taguchi T: The implications of surgical intervention in the treatment of neuroblastomas. 41st Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons (PAPS), 2008, 2008年6月30日, Wyoming, USA

7. 田尻達郎, 米満吉和, 田中桜, 田口智章: 神経芽腫に対する樹状細胞免疫遺伝子治療の開発, 第11回神経芽腫研究会, 2008年8月23日, 東京

8. 田尻達郎, 米満吉和, 田中桜, 木下義晶, 宗崎良太, 田口智章: 小児固形悪性腫瘍に対する樹状細胞免疫遺伝子治療の開発, 第8回九州がん懇話会, 2008年9月20日, 福岡

9. Tatsuro Tajiri, Sakura Tanaka, Kyousuke Tatsuta, Yoshikazu Yonemitsu, Yasuji Ueda, and Tomoaki Taguchi, Dendritic cell-based immunotherapy with local radiation using Sendai virus vector for neuroblastoma, 第67回日本癌学会, 2008年10月28日, 名古屋

〔図書〕(計3件)

1. 田尻達郎: 専門性ゆえの多種多様な留学; 149-157、小児医療にみる医学留学へのパスポート、はる書房、2006

2. 田尻達郎: 神経芽腫治療における外科治療の役割 第24回日本小児がん学会教育セッションテキスト: 90-95、2008

3. 田尻達郎: QOLを考えた小児外科疾患の治療 第19回地域医療研修センターテキスト: 26-59、2009

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/pedsurg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田尻 達郎 (TAJIRI TATSURO)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80304806

(2) 研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI TOMOAKI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：20197247

居石 克夫 (SUEISHI KATSUO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：70108710

米満 吉和 (YONEMITSU YOSHIKAZU)
千葉大学・医学研究院・客員教授
研究者番号：40315065

木下 義晶 (KINOSHITA YOSHIAKI)
九州大学・医学研究院・助教講師
研究者番号：80345529