

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19591662
 研究課題名 (和文) 悪性脳腫瘍に対する増殖型ヘルペスウイルスを用いた樹状細胞療法の基礎研究
 研究課題名 (英文) Dendritic cell therapy using propagative herpes simplex virus for malignant brain tumors
 研究代表者
 田中 実 (TANAKA MINORU)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号 50332581

研究成果の概要：

悪性脳腫瘍に対する新たな治療法としてウイルス治療が注目されている。共同研究者の藤堂らが開発した増殖型単純ヘルペスウイルスは、腫瘍細胞内で特異的なウイルス複製が得られるよう工夫されていて直接的な殺細胞効果を持つが、同時に抗腫瘍免疫も惹起させることが基礎研究などで確認されている。本研究では、この抗腫瘍免疫効果をより効率よく発揮させる方法の一つとして増殖型単純ヘルペスウイルスを用いた樹状細胞療法の開発を目的とした。方法としては、A/J マウス (5 週齢：雌) に同種同系の neuroblastoma 細胞株 N18 の皮下腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果を検討した。まず、A/J マウスの骨髄細胞から樹状細胞を誘導し、次に予め培養しておいた N18 腫瘍細胞に増殖型単純ヘルペスウイルスを感染させ、これを処理したものを樹状細胞にパルスして、8mm 大になった皮下腫瘍 (腫瘍接種後 5 日目) 近傍の皮下に接種することにより腫瘍体積の経時的な変化を比較検討した。その結果、増殖型単純ヘルペスウイルスを投与した群ではコントロール群より腫瘍を抑制する傾向があったが、N18 の腫瘍抽出蛋白をパルスしただけでも強い抗腫瘍効果が認められた。少量のウイルスを腫瘍細胞に感染させただけでも、樹状細胞にパルスする前に腫瘍関連抗原が破壊されていたためではないかと考えられた。今後は、腫瘍細胞の近傍に樹状細胞とウイルスを分けて投与する系で検討していく予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性脳腫瘍、免疫療法、ウイルス療法、樹状細胞、腫瘍関連抗原

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫などの悪性脳腫瘍では、手術、放射線治療、化学療法がおこなわれているが治療成績は満足できるものではない。樹状細胞療法を代表とする免疫療法が以前より検討されているが、樹状細胞療法では、腫瘍関連抗原を用いてT細胞を免疫することに主眼が置かれてきた。しかし、悪性脳腫瘍の腫瘍関連抗原はその抗原性が極めて微弱であり、その腫瘍関連抗原の発現量や発現状態が十分でないため、樹状細胞などのAPC(antigen presenting cell)が十分に抗原を提示できていない可能性が指摘されていた。また、単なる腫瘍関連抗原の刺激だけでは十分な抗腫瘍効果が成立せず、副刺激受容体CD28分子からのシグナルが乏しいため、かえって免疫寛容が誘導されてしまい、一時的に抗腫瘍効果が得られても、その効果が持続しなかったと考えられる。そのため現在では、腫瘍抗原と共に腫瘍細胞修飾抗原を樹状細胞に提示させる improved active tumor immunization の試みが行われている。

近年、新たな治療法として共同研究者の藤堂らが開発したウイルス療法に注目が集まっている。これまでもその抗原性を高めるため、多くの化学物質が腫瘍細胞修飾抗原として用いられてきたが、ウイルス治療では、ウイルス自体による殺腫瘍細胞効果のほか、腫瘍のアポトーシスを誘導して腫瘍細胞修飾抗原を誘導するため、抗腫瘍免疫を惹起することが期待されている。以上より、増殖型単純ヘルペスウイルスを用いた樹状細胞療法を開発することができれば、ウイルス治療による抗腫瘍免疫効作用を効果的に増強できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では脳腫瘍株を用いた皮下腫瘍モデルを作成し、増殖型単純ヘルペスウイルスを用いた樹状細胞療法の開発を目的とした。従来の腫瘍抗原をパルスする樹状細胞療法とも比較し、ウイルスによる抗腫瘍免疫作用の相乗効果の有無について検討した。

3. 研究の方法

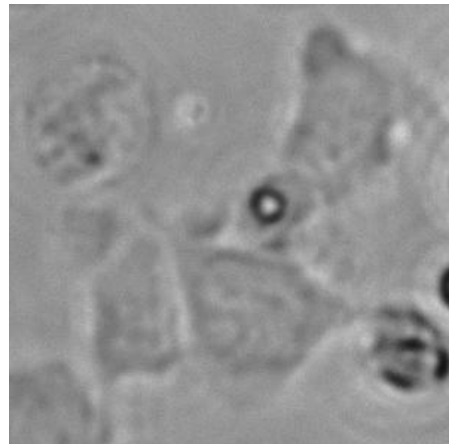
(1) N18 培養

A/J マウスの Neuroblastoma 細胞株である N18 の皮下腫瘍モデル作成のため、まず N18 を培養した。N18 細胞株は、A/J マウスの neuroblastoma C1300 に由来する細胞株である。

(2) 骨髄細胞の採取と樹状細胞の誘導

5 週齢の A/J マウス (雌) 大腿骨より骨髄細胞を採取し、G-CSF および IL-4 で 1 週間培養して、樹状細胞を誘導した (図 1)。

図 1 樹状細胞



(3) 皮下腫瘍モデルの作成

培養した N18 を A/J マウスの背部に皮下注射し皮下腫瘍モデルを作成した。

(4) 樹状細胞の確認

フローサイトメトリー (FACS) により CD11c および CD86 の陽性細胞を検討し、樹状細胞が誘導されていることを確認した。

(5) 比較実験

N18 皮下腫瘍がおおよそ 8mm 大に成長した時点 (皮下に腫瘍を接種後 5 日目) で、以下の 3 群に分けて腫瘍近傍の皮下にそれぞれ 4×10^5 DC cells/200 μ l を接種して、腫瘍体積の変化を比較した。

T-01 群 (n=8): N18 腫瘍細胞に予め増殖型単純ウイルス (T-01) を感染させ処理したものを樹状細胞にパルスした群。

N18 群 (n=8): N18 腫瘍細胞から Freeze and thawing method により腫瘍蛋白を抽出し、樹状細胞にパルスした群。

PBS 群 (コントロール群) (n=8): 樹状細胞に PBS (培養液) のみを加えたコントロール群。

(6) 統計解析

2 元配置の分散分析 (Two-way repeated measures ANOVA) を行った。交互作用を認められた場合は、Bonferroni による下位検定を追加し多重比較を行った。

4. 研究成果

図2 皮下腫瘍の体積変化

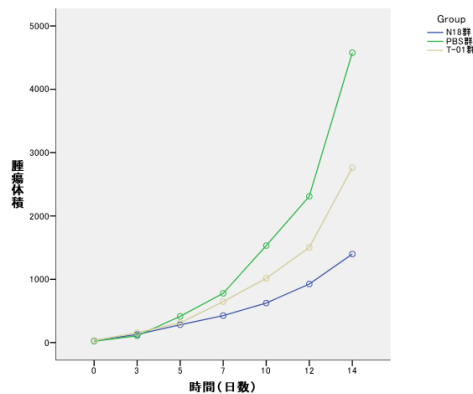


図2にA/Jマウスに同種同系のN18細胞株の皮下腫瘍モデルを作成し、N18群およびT-01群、PBS群の3群に分け、経時的な腫瘍体積の変化を比較検討した結果を示す。今回、2元配置の分散分析ではMauchlyの球面性の検定において、球面性の仮定が成り立たなかったため、Huynh-Feldtのepsilon 0.249を用いて被験者内効果の検定の有意確率を修正している。その結果、被験者内効果の検定で有意となり(p=0.001)、時間と治療群との間に交互作用が存在することが判明した。そのためBonferroniによる下位検定を行った。それによると、PBS群とN18群との間の腫瘍体積の平均差に有意な差が認められた(p=0.022, 平均の差: 95%CI, 104.7-1588.4)。一方、N18群とT-01群の腫瘍体積の平均差には有意な差は認められなかった(p=0.532 平均の差: 95%CI, -320.7-1067.2), partial $\eta^2=0.284$ 。

なお、本治療の経過においてマウスの体重変化はなく、重篤な有害事象も認めなかった。

今回、腫瘍関連抗原を含むN18の抽出蛋白を樹状細胞にパルスしただけでも強い抗腫瘍効果が惹起されることが確認されたが、増殖型単純ウイルスを感染させた後に樹状細胞にパルスしたT-01群ではPBS群より腫瘍の増大を抑制する傾向はあるものの、N18群ほどの抗腫瘍効果は認められなかった。

その理由としては、培養したN18腫瘍細胞にわずかなT-01ウイルスを感染させただけで腫瘍細胞が死滅し、腫瘍関連

抗原も消失してしまったことが考えられる。

皮下腫瘍モデルに増殖型単純ウイルスT-01を皮下腫瘍内に単独投与する系では、ウイルスの投与量の増加に応じて抗腫瘍効果が增大することが既に確認されている。しかし、今回の系ではT-01の殺細胞効果が強いために、in vitroでN18細胞とT-01が共存する状況を作ることが困難であった。今後は、皮下腫瘍の近傍にT-01と樹状細胞を同時に接種する系で、さらに検討していく予定である。

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12件)

①Okaji Y, Tsuno NH, Tanaka M, Yoneyama S, Matsushashi M, Kitayama J, Saito S, Nagura Y, Tsuchiya T, Yamada J, Tanaka J, Yoshikawa N, Nishikawa T, Shuno Y, Todo T, Saito N, Takahashi K, Nagawa H
Pilot study of anti-angiogenic vaccine using fixed whole endothelium in patients with progressive malignancy after failure of conventional therapy.
Eur J Cancer 44(3):383-390, 2008 査読あり

②Todo T
Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses.
Frontiers in Bioscience 13: 2060-2064, 2008 査読あり

③鎌田恭輔、太田貴裕、川合謙介、藤堂具紀、川原信隆、森田明夫、斎藤延人
機能MRI/MEGを用いた術前言語機能局在診断
脳神経外科ジャーナル 17(1): 4-12, 2008 査読あり

④高橋雅道、藤堂具紀
脳腫瘍のウイルス療法
分子細胞治療 7(2): 129-134, 2008 査読なし

⑤田中実、藤堂具紀
脳実質内脳腫瘍の化学治療-最近の薬物治療の動向-
画像診断 28(4): 430-437, 2008 査読なし

⑥Todo T
“Armed” oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy
Cell Adhesion & Migration 2(3):208-213,

2008 査読あり

⑦福原浩、藤堂具紀
ウイルスによる癌治療
ゲノム医学 8(3): 173-181, 2008 査読なし

⑧田中実、藤堂具紀
悪性脳腫瘍に対する樹状細胞療法
実験医学 26(20): 3347-3353, 2008 査読なし

⑨Koga T, Morita A, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Shibahara J, Louis DN, Reifenberger G, Itami J, Hara R, Saito N, Todo T
Long-term control of disseminated pleomorphic xanthoastrocytoma with anaplastic features by means of stereotactic irradiation.
Neuro Oncol 11(4): 446-451, 2009 査読あり

⑩Kamada K, Todo T, Ota T, Ino K, Masutani Y, Aoki S, Takeuchi F, Kawai K, Saito N
The motor-evoked potential threshold evaluated by tractography and electrical stimulation.
J Neurosurg 111: 785-795, 2009 査読あり

⑪田中実
グリオーマの化学療法
Cur insights in neurol sci 26(20):6, 2008 査読なし

⑫田中実、藤堂具紀
Low-grade glioma の治療オプションと放射線治療のタイミング
脳神経外科ジャーナル 18(6):442-446, 2009 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

① Todo T
Experimental brain tumor therapy using oncolytic HSV-1 armed with interleukin 12. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy
June 9 - 12, 2008, Hakodate, Japan

② 藤堂具紀
Clinical development of genetically-engineered oncolytic HSV-1
第 14 回日本遺伝子治療学会
2008 年 6 月 12-14 日 札幌

③ 藤堂具紀
がんのウイルス療法の臨床開発
2008 年度関東甲信越地区小児がん登録研究会 2008 年 6 月 28 日 東京

④ Todo T
Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes virus.
2008 Samsung International Brain Tumor Symposium September 27, 2008 Seoul, Korea

⑤ 藤堂具紀
脳腫瘍のヘルペスウイルス療法の進歩 (腫瘍別シンポジウム「脳腫瘍への新たな挑戦」)
第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28-30 日 名古屋

⑥ 田中実
術後放射線治療の功罪
第 28 回日本脳神経外科コンgres総会
2008 年 5 月 9 日 横浜

[図書] (計 0 件)
なし

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
田中実 (TANAKA MINORU)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50332581
- (2) 研究分担者
藤堂具紀 (TODO TOMOKI)
東京大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号: 80272566

稲生靖 (INO YASUSHI)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 50372371
- (3) 連携研究者
なし