

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

2013年5月24日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591984

研究課題名（和文） 体外細胞死誘導法を用いた新しい小児神経芽腫ワクチン療法の開発

研究課題名（英文） A new approach for immunotherapy in neuroblastoma using immunogenic dead cell induced by doxorubicin.

研究代表者

井上 成一郎（INOUE SEIICHIRO）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：70431690

研究成果の概要（和文）：

マウス神経芽腫細胞培養系で抗がん剤 Doxorubicin を添加し細胞死を誘導し、骨髄由来樹状細胞が死細胞を貪食すると、IFN- $\gamma$ 産生を介した細胞障害性リンパ球増殖反応を誘導できることが示された。この反応を応用し抗がん剤を直接患児に投与せず培養系で添加して免疫応答を惹起する腫瘍死細胞を作成し投与することで神経芽腫に対する新しいワクチン療法を開発できる可能性が示された。効果を確実にするためさらなる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：

Doxorubicin can induce immunogenic apoptotic cell death in the neuroblastoma cells, and thus has an immunological advantage in chemotherapy of neuroblastoma. BM-DC is considered to be the key antigen presenting cell in the immune reaction after immunogenic apoptotic neuroblastoma cell phagocytosis. These mechanisms could be able to apply for developing new vaccine therapy for advanced neuroblastoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：小児腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

特定の抗悪性腫瘍薬は作用すると、腫瘍免疫

反応を惹起することが知られ Chemoimmunotherapy が注目されている。さらに近年、自然免疫系貪食細胞がひきおこす死細胞貪食後の抗原提示を介した免疫反応誘

導のメカニズムが腫瘍免疫学的に注目を浴びている。一方進行神経芽細胞腫は依然として長期治療経過中に腫瘍が既存の抗悪性腫瘍薬に対する抵抗性を獲得し多くの患児が再燃や再発により最終的に命を失っている。我々は小児神経芽腫に対する、より効果的かつ安全なあたらしい細胞治療法の開発を目指した。抗悪性腫瘍薬により Apoptosis を誘導された神経芽種細胞が抗原提示細胞に貪食され、引き続き免疫反応を誘導するメカニズムを解析し、新しい免疫療法も開発を目指した。

## 2. 研究の目的

マウス神経芽腫モデルにおいて、*Ex vivo* (細胞培養系) で各種抗癌剤により細胞死を誘導した神経芽腫細胞を Host マウスに投与して抗腫瘍効果を検討し新しい抗癌ワクチン療法を開発する。新しいワクチン療法と抗癌集学的治療の併用による相乗効果を検討しより安全で効果の高い新しい集学的治療法を提案する。新しい抗癌ワクチン療法において、腫瘍死細胞が Macrophage や DC などの自然免疫系貪食細胞に処理された結果、宿主の所属リンパ節に存在する自然免疫細胞がどのように関与して免疫反応を賦活・または抑制しているか、そのメカニズムを解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

8～12週齢雌 A/J mouse (日本 S L C) を使

用した。神経芽腫細胞株は、マウス由来 Neuro-2a (ATCC™) を使用した。

### (1) Cell surviving detection

Neuro-2a 培養系において、各種濃度の抗がん剤を添加し培養した際の Neuro-2a 細胞の生存率を細胞毒性測定用試薬 Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用い測定した。

### (2) FACS による Apoptosis 解析

Neuro-2a 細胞培養系に各種抗がん剤を添加して培養したのち 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た。

### (3) 自然免疫系抗原提示細胞による Apoptosis 腫瘍細胞貪食と免疫反応誘導の解析

マウス脾臓由来 CD11b+細胞と BM-DC が各種抗がん剤で処理された Neuro-2a を貪食し、引き続き抗腫瘍免疫反応を誘導できるか検討した。CFSE で染色した Neuro-2a 細胞とこれら貪食細胞を混合培養し、CFSE 陽性 Neuro-2a 細胞を積極的に貪食するかを評価した。また、これら貪食細胞を Neuro-2a 細胞および CD8 $\alpha$ +リンパ球と混合培養し、IFN- $\gamma$ 産生の亢進を介して細胞害性 CD8 $\alpha$ +リンパ球の増殖反応が誘導されるかを評価した。

## 4. 研究成果

(1) マウス神経芽腫細胞 Neuro-2a は、Doxorubicin, Bafilomycin-A1, CDDP,

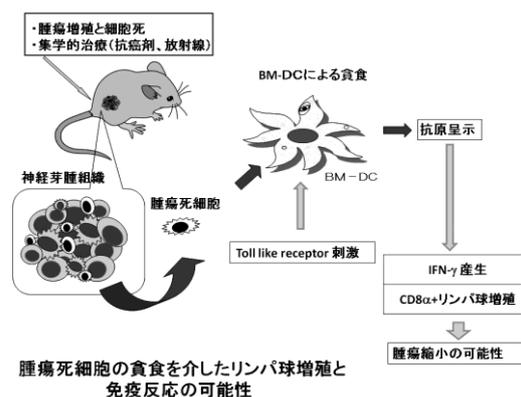
Vincristine 等各種抗悪性腫瘍薬により、濃度依存性に細胞死が誘導された。各種薬剤を培養系に添加し培養後、Annexin V 染色を行い FACS で解析すると、Neuro-2a 細胞の細胞死誘導過程で Apoptosis が誘導されていることが確認された。

(2) Doxorubicin で処理した Neuro-2a 細胞を貪食細胞及び CD8<sup>+</sup> リンパ球と混合培養を行うと最も IFN- $\gamma$  産生を介したリンパ球増殖反応を惹起することが判明した。

さらに、混合培養の過程で使用する貪食細胞に関して比較すると、脾臓由来 CD11b<sup>+</sup>細胞と比べ BM-DC がより IFN- $\gamma$  産生を介したリンパ球増殖反応を強く惹起することが判明した。

(3) 骨髄由来 DC を Doxorubicin で処理した Neuro-2a 細胞とともに培養しても、BM-DC の Apoptosis 細胞貪食能を促進することができなかつた。しかし培養系に LPS を添加した BM-DC は、Neuro-2a および CD8<sup>+</sup> リンパ球と混合培養すると、より CD8<sup>+</sup> リンパ球による IFN- $\gamma$  産生を促進することが判明した。

(4) 自然免疫細胞表面に存在する Toll like receptor の agonist で培養系を刺激すると、CD8<sup>+</sup> リンパ球増殖とそれによる IFN- $\gamma$  産生は促進されるが、その効果は細胞死を誘導した抗悪性腫瘍薬剤の種類、agonist を作用させるタイミングにより反応の強さに差が生じる可能性が示唆された。



以上の結果から、抗悪性腫瘍薬で細胞死を誘導した神経芽腫細胞はリンパ球増殖を介した免疫反応を惹起させることができることが判明した。その結果、免疫学的観点から有利または不利な抗悪性腫瘍薬が判別できる可能性が示唆され、今後の集学的治療の改良に役立てられると思われた。また死細胞と Toll like receptor agonist を組み合わせ有効な新規免疫治療を開発できる可能性があるかと判断した。さらなる研究の継続が必要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① 井上成一郎: 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 埼玉医科大雑誌 37(1): 46-50, 2010 査読 無

[学会発表] (計2件)

- ① 井上成一郎、小高明雄、瀬戸山由美子 マウス神経芽細胞腫における vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor による抗腫瘍効果と免疫応答メカニズムの検討 第49回日本小児外科学会学術集会、2012年5月14日、横浜

② 井上成一郎、小高明雄、橋本大定、平岡  
優 Apoptosis を誘導したマウス神経芽腫  
細胞による抗腫瘍効果の検討 第48回小児  
外科学会学術集会、2011年7月20日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 成一郎 (INOUE SEIICHIRO )

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：70431690