

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893169

研究課題名(和文) 進行神経芽腫モデルマウスを用いたSeV/DCによる新規免疫治療の開発

研究課題名(英文) DC-Dependent efficient prevention of spontaneous neuroblastoma in MYCN transgenic mice

研究代表者

川久保 尚徳 (Kawakubo, Naonori)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：90711185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：MYCNトランスジェニックマウスと同系統のマウスの骨髄から得られた造血幹細胞を元にして、サイトカインカクテルを用いた浮遊培養を行う事で高純度の樹状細胞を大量に培養することに成功した。MYCNトランスジェニックマウスのheterozygoteに対し、肉眼的に腫瘍が発生していない5週齢の段階で樹状細胞を投与することで、腫瘍発生を高率に抑制することに成功した。また、各エフェクター除去実験によりこの樹状細胞の効果はCD4陽性細胞に依存していることが示唆された。以上より、臨床においてDCワクチンの神経芽腫への抗腫瘍効果が期待される結果となった。

研究成果の概要(英文)：Cultivation of lineage-negative hematopoietic progenitors from bone marrow of the mice of the same strain of MYCN transgenic mice in an optimized cytokine cocktail led to production of a large amount and high-purity dendritic cells. Importantly, subcutaneous injection of the DCs pulsed with their tumor lysate almost completely prevents the tumor formation and much improved their survival in these mice. The depletion study of the effector cells suggested that the DC-therapy is dependent to CD4-positive cells. These results suggest that DC-based vaccine may possibly be a potential therapeutic to prevent neuroblastoma in clinical setting.

研究分野：小児外科学

キーワード：神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

(1)小児固形悪性腫瘍(神経芽腫、ウィルムス腫瘍、肝芽腫、軟部悪性腫瘍など)は、外科治療、大量化学療法と放射線療法を組み合わせた集学的治療により、近年の治療成績は次第に向上しつつあるものの、進行神経芽腫を中心とした難治症例の予後は未だに不良である。特に MYCN 遺伝子が増幅している神経芽腫の生存率は30%程度であり、新規治療法の開発が急務である。

樹状細胞(dendritic cell:DC)を用いた免疫療法は、1996年にB細胞リンパ腫に対して実施され(Hsu F.J. Benike C et al, Nat Med, 1996)、1998年にはメラノーマ患者に対して奏効率が30%と報告された(Nestle FO, Alijagic S et al. Nat Med, 1998)。それ以降、多くの報告がなされたが、2004年の米国 NCI(National Cancer Institute)における集計結果ではその臨床的有効性は7.1%程度と報告され(Rosenberg SA, Yang JC et al. Nat Med, 2004)、未だに標準治療としては確立されていない。米満らは国産新規遺伝子治療ベクターであるセンダイウイルスベクター (SeV) が DC を強力に活性化することを見だし、B6 マウスの悪性黒色腫での有効性(Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y et al, J Immunol, 2006)や、ラットを使用した肺転移モデルに対する肺転移抑制効果(Komaru A, Ueda Y, Yonemitsu Y et al, J Immunol, 2009)を報告している。神経芽腫に対しては、竜田らが、マウス神経芽細胞株であるc1300のマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討した。その結果、放射線局所前照射を伴う SeV 導入 DC(SeV/DC)の局所腫瘍注入による高い抗腫瘍効果を得ることができた。(図1)(Tatsuta K, Tajiri T, Taguchi T et al, Gene Ther,2009)

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 (>5 mm) でも著しい抗腫瘍効果を示す

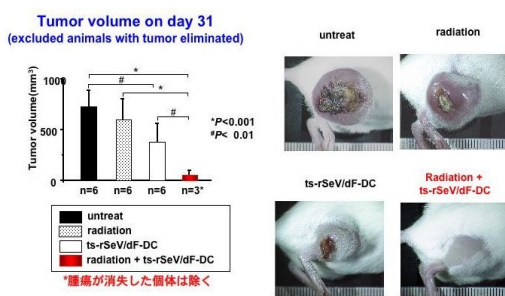


図1

(2)MYCN トランスジェニックマウス(MYCN TgM)は、マウスの神経堤由来の細胞で特異的発現する Tyrosine Hydroxylase のプロモーターの下流にヒトの MYCN cDNA が位置するベクターが導入されたもので、神経堤細胞において MYCN 蛋白が強発現することにより胸腹部交感神経節由来の神経芽腫が発生する(図2)(W.A.Weiss et al, The EMBO Journal, 1997)。また、このマウ

スに発生する神経芽腫において、ヒトの神経芽腫において生じる染色体変化と多くの同じ変化が対応するマウス染色体に生じており(W.A.Weiss et al, Cancer Res, 2000)、ヒトの神経芽腫の発生、進展のメカニズムの解明、及び、治療開発モデルとして非常に有用なツールである。

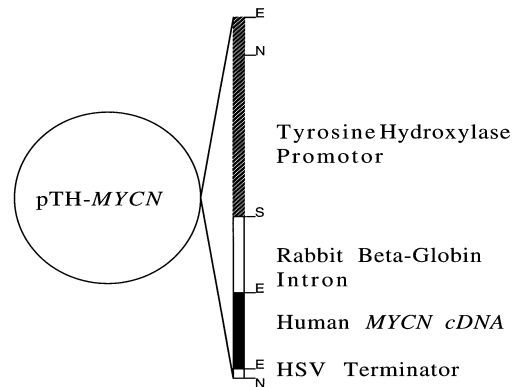


図2

2. 研究の目的

これらの背景から、本研究では、神経芽腫に対する新規治療法の開発を目指す。神経芽腫の臨床患者に最も近い動物モデルである MYCN TgM に対して樹状細胞療法を行い、生存期間の延長や腫瘍縮小効果を検討する。

3. 研究の方法

MYCN TgM と同系統のマウスから得られた樹状細胞を増幅、活性化する。

MYCN TgM と同系統のマウス骨髄から樹状細胞前駆細胞を採取し、各種サイトカインを添加した培養液で培養することで樹状細胞前駆細胞を増殖する。その後、得られた細胞を樹状細胞に分化させた後にセンダイウイルスを感染させて樹状細胞を活性化させた樹状細胞(SeV/DC)を MYCN TgM に投与し、その抗腫瘍効果を判定する。

MYCN TgM に対するSeV/DCの抗腫瘍効果の確認(放射線療法併用)として、1回目のSeV/DCの投与は、開腹手術を行い、腹腔内腫瘍に直接注入することで行う。2、3回目のSeV/DC投与は経静脈投与で行う。この前臨床試験データを踏まえて、MYCN TgM に対するSeV/DC療法の効果を判定し、最終的に、神経芽腫に対する放射線前照射 SeV/DC 療法を含む新規の臨床治療プロトコルを立案する。

4. 研究成果

(1)MYCN Tg Mと同系統のマウスからの増幅DC培養法の確立

まず、MYCN TgMと同系統マウスより得られた骨髄細胞より樹状細胞を増幅培養した。方法は以下の通りである。

MYCN TgMと同系統の129X1/SvJマウスの骨髄より樹状細胞前駆細胞を採取し、Flt3-L、

SCF,IL-3, IL-6 を添加した細胞培養液で3週間培養し、樹状細胞前駆細胞を増殖させる。GM-CSF および IL-4 存在下の培養液にて 1 週間培養し、樹状細胞に分化させた。マウスから得られた腫瘍細胞のライセートを樹状細胞に投与し抗原として提示、アジュバンドとしてOK-432を0.1KE/mlで共培養して治療に用いた。得られた細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、CD11c陽性MHC Class 陽性 CD86陽性の樹状細胞を90%以上の高純度に培養することに成功した。

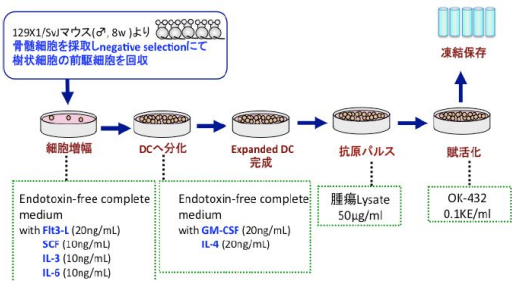


図1 樹状細胞培養法の概略

(2) MYCN Tg Mに対する樹状細胞療法の効果の検討

次に、培養した樹状細胞をMYCN Tg Mの heterozygoteの皮下に週1回 1.0×10^6 個を3週間投与した。その結果、Control群(生存率50%)と比較し樹状細胞投与群(生存率90%以上)で有意に生存率が改善し、樹状細胞療法がMYCN Tg Mの heterozygoteに有用であることが示唆された。

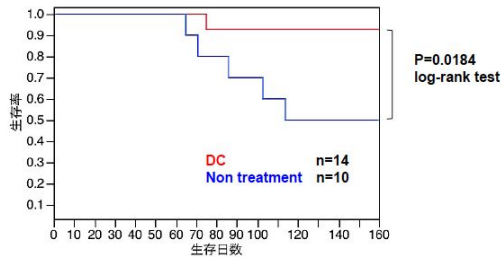


図2 樹状細胞投与の効果

(3) 樹状細胞療法のエフェクターの探索
次に樹状細胞療法のエフェクターを検討する目的で、樹状細胞投与前後でCD4陽性細胞、CD8陽性細胞、NK細胞を抗体によってdepletionすることで生存率に影響が出るか検討した。その結果、樹状細胞療法の効果はCD4陽性細胞除去群で有意にキャンセルされ、樹状細胞の効果はCD4陽性細胞に依存していることが判明した。

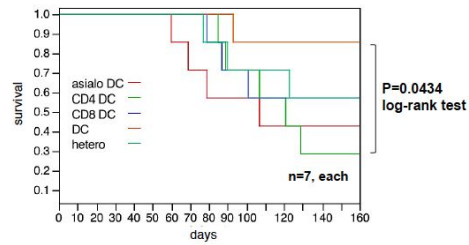
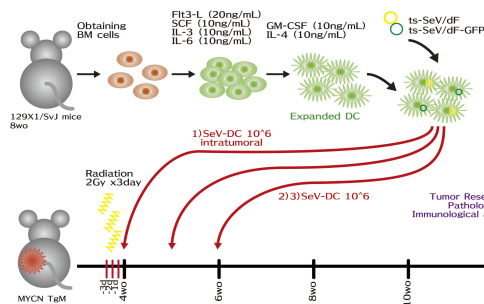


図3 樹状細胞療法のエフェクターの検討

今後は当初の予定どおり、センダイウイルスで活性化した樹状細胞での効果を検討することとしている(下図)



【参考文献】

- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-58.
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-332.
- Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y, Onimaru M, Sata S, Nagata-Takeshita H *et al.* Induction of efficient antitumor immunity using dendritic cells activated by Sendai virus and its modulation of exogenous interferon- β gene. *J Immunol* 2006; 177: 3564-3576.
- Komaru A, Ueda Y, Furuya A, Tanaka S, Yoshida K, Kato T, Kinoh H, Harada Y, Suzuki H, Inoue M, *et al.* Sustained and NK/CD4⁺ T-cell-dependent efficient prevention of lung metastasis induced by dendritic cells harboring recombinant Sendai virus. *J Immunol* 2009; 183: 4211-4219.
- Tatuta K, Tanaka S, Tajiri T, Taguchi T, Yonemitsu Y *et al.* Complete elimination of established

- neuroblastoma by synergistic action of γ -irradiation and DCs treated with rSeV expressing interferon- β gene. *Gene Therapy* 2009; 16, 240–251
6. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J.* 1997;16:2985–2995.
 7. Weiss WA, Godfrey T, Francisco C, Bishop JM. Genome-wide screen for allelic imbalance in a mouse model for neuroblastoma. *Cancer Res.* 2000;60:2483–2487.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

Kawakubo N, Harada Y, Souzaki R, Kinoshita Y, Taguchi T, Yonemitsu Y
DC-dependent efficient prevention of spontaneous neuroblastoma in MYCN transgenic mice, 2015 Keystone Symposia Conference C4: Dendritic cells and Macrophages Reunited. Fairmont The Queen Elizabeth, Montreal, QC, Canada, March 10, 2015

川久保 尚徳, 原田 結, 宗崎 良太, 木下 義晶, 米満 吉和, 田口 智章
樹状細胞療法による MYCN トランスジェニックマウスにおける神経芽腫発症抑制効果の検討. 第52回日本小児外科学会学術集会、平成25年5月28日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川久保 尚徳 (KAWAKUBO, Naonori)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号: 90711185