

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10927

研究課題名(和文) Chemoimmunotherapyを応用した神経芽腫の新しい細胞治療の開発

研究課題名(英文) Application and analysis the effect of chemoimmunotherapy by doxorubicin in mouse neuroblastoma model

研究代表者

井上 成一郎 (Seiichiro, Inoue)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70431690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：代表的小児固形腫瘍である神経芽腫に対して、従来からの集学的治療に chemoimmunotherapy の概念を応用し、doxorubicin が神経芽腫細胞に効果を及ぼす際に抗腫瘍免疫反応が誘導されるかをマウス神経芽腫モデルで評価した。さらにその効果を応用して、あたらしい抗腫瘍免疫反応を誘導する細胞を骨髄細胞から誘導し、新しい細胞治療の開発を目指した。この細胞治療が抗腫瘍免疫反応を誘導することを確認し、従来の化学療法と新しい細胞治療を融合させて、新規の集学的治療開発の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Combination immunotherapy with conventional intensive therapy for advanced neuroblastoma is the hopeful new therapy. To establish new intensive multimodal therapeutic regimen, we applied the concept of chemoimmunotherapy. Firstly, we demonstrated that doxorubicin induces immunogenic cell death in vitro. Using died neuroblastoma cell which induced immunogenicity, we successfully generate antigen presenting cell (APC) which can induce antitumor immune reaction, by co-culturing died neuroblastoma cell treated and doxorubicin and bone marrow cell with GM-CSF, IL-4 and CpG-ODN. This APC can promote IFN-g production by CD8a+ lymphocytes in co-culture with doxorubicin treated neuroblastoma cell, and can suppress the progression of intravenously injected neuroblastoma by the induction of antitumor immune reaction in vivo. We analyzed the cell surface antigen expression on this APC and showed that the pattern of cell surface antigen expression is compatible with activated dendritic cells.

研究分野：小児外科学

キーワード：神経芽腫 小児外科 腫瘍免疫 Chemoimmunotherapy

1. 研究開始当初の背景

従来抗がん剤治療は患児の免疫能抑制を抑制するため免疫学的には治療上不利とされてきたが、化学療法剤の中には様々な形で免疫学的に有利な効果を及ぼす場合があることが知られるようになり、chemoimmunotherapy として注目されている。特に doxorubicin は各種腫瘍細胞に作用すると腫瘍細胞に immunogenic cell death を誘導することが判明した。

一方神経芽腫の治療では、細胞表面に発現する disialoganglioside GD2 を標的とした anti-GD2 monoclonal 抗体を用いた免疫抗体治療が難治性進行神経芽腫の患児の生存期間を延長することが示され、神経芽腫に対する免疫療法の有効性が示されるようになった。

更に悪性腫瘍に対し DC (dendritic cell) や Macrophage 等自然免疫細胞が各種悪性腫瘍細胞に対する作用として、抗腫瘍効果や、免疫寛容を介した腫瘍進展に大きく関与することが解明されてきている。加えて免疫細胞表面に発現する Toll like receptor を介した免疫反応が生体内で抗腫瘍免疫反応を示し治療効果を呈するという報告もなされ、悪性腫瘍に対する免疫治療に対する期待が高まっている。

2. 研究の目的

Chemoimmunotherapy の concept を応用し、化学療法剤を利用して難治性神経芽腫に対し強い抗腫瘍効果を獲得した免疫細胞から誘導し、新規細胞治療への応用を目指す。この免疫細胞の特性と、抗腫瘍効果をもたらすメカニズムの解析を目指し神経芽腫に対する腫瘍免疫機構の解析を目指す。免疫細胞を用いた細胞治療と従来からの化学療法を組み合わせ、抗腫瘍効果を高め同時に副作用を最小限にとどめることで、より安全な治療プロトコールを開発するための基礎的研究を

行う。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄由来免疫細胞の作製と免疫反応誘導の評価、免疫細胞の細胞表面抗原発現の解析: マウス骨髄細胞を GM-CSF を含む培地で培養する。接着性細胞の増殖を確認し、培養に doxorubicin 等各種抗がん剤で処理したマウス神経芽腫細胞(neuro-2a)を添加し、混合培養を行う。培養系に TLR 9 agonist である CpG-ODN、IL-4 を adjuvant として添加し、得られた細胞をフローサイトメトリーで解析した。

(2) マウス骨髄由来免疫細胞の in vivo 抗腫瘍効果の検討(神経芽腫血行性転移モデルを用いて):(1)で得られた免疫細胞をマウス CD8 α +リンパ球、細胞死を誘導した neuro-2a と混合培養し、INF- γ 産生を指標にリンパ球反応を評価した。尾静脈から neur-2a 細胞を投与し、2週間後に同様に尾静脈から作成した免疫細胞を投与した。その後マウスを犠牲死させ開腹し、腹腔内臓器に生着した腫瘍結節のサイズ、結節個数を非細胞投与群と比較して、作成した免疫細胞の抗腫瘍効果を評価した。

(3) 化学療法と細胞治療の組み合わせによる in vivo 抗腫瘍効果の検討と免疫メカニズムの解析:(2)で施行した実験に、さらに doxorubicin の少量投与を追加して抗腫瘍効果を比較した。作成した免疫細胞と CD8 α +リンパ球、各種抗がん剤で処理した neuro-2a 死細胞を混合培養し、IFN-g 産生を指標に抗腫瘍効果のメカニズムを解析した。

4. 研究成果

マウス骨髄細胞を GM-CFS を含む培地で培養し、各種抗がん剤で細胞死を誘導した neuro-2a細胞とともに培養開始後7日目に混合培養する。さらにこの培養系に Toll like receptor 9 agonist である CpG-ODN,LPS,お

よび IL-4 を添加し約 12 時間後に接着性細胞を得た。

この *ex vivo* で誘導した免疫細胞の機能を評価する目的で、マウスリンパ節、脾臓から得られた CD8 α 陽性リンパ球、UV で細胞死を誘導した neuro-2a 細胞とともにリンパ球混合培養を行うと、リンパ球増殖反応が引き起こされ、培地上層内に IFN- γ が産生されることが判明し、骨髄から得られた細胞が抗原提示能を持つ樹状細胞であると考えられた。

FACS で解析するとこの細胞は CD11c MHC II ともに陽性の免疫細胞であった。さらに解析するとこの細胞は樹状細胞表面に DEC205 分子を発現しており、この細胞の重要な表面マーカーになると考えられた。また CD8 α は陰性であり、myeloid 系または非リンパ球系樹状細胞の可能性が予測された。

更にこの免疫細胞を得る培養過程で使用する neuro-2a の細胞死を誘導する抗がん剤において、他癌腫で immunogenic cell death を誘導することが知られている doxorubicin と誘導しない CDDP を比較することで、神経芽腫細胞にも doxorubicin の chemioimmunotherapy 効果が得られるかを検討した。

リンパ球増殖反応において、培地上清内の IFN- γ 濃度はリンパ球増殖反応の強さの指標となり、その結果は抗腫瘍免疫反応の強さの指標となる。そこで、リンパ球混合培養において使用する抗原提示細胞に、doxorubicin を用いた neuro-2a 死細胞を使用した場合と CDDP を使用した場合で比較した。その結果 doxorubicin で neuro-2a 細胞に細胞死を誘導し、この細胞を用いて免疫細胞を誘導した場合、CDDP を使用した場合より、よりリンパ球混合培養上清中の IFN- γ 濃度が高値をしめし、doxorubicin は神経芽腫細胞にも chemioimmunotherapy の効果を示すことが予測された。さらにこの細胞を、tail vein から生きた neuro-2a 細胞を静脈内投与した担

癌マウスに経静脈投与すると、CDDP を使用して得られた細胞を投与したときと比較して明らかに腹腔内臓器に形成される腫瘍結節の数、サイズを抑制することが判明し、*in vivo* においても doxorubicin を用いて誘導した本樹状細胞が明らかに抗腫瘍効果を示すことが明らかになり、新たな細胞治療による神経芽腫免疫治療の開発が可能であることが示された。

この細胞をさらに詳細に解析すると CD11c MHC II double positive であり、さらに CD8 α 陰性で CD14, CD40, CD80, CD86, DEC 205 陽性の活性化した樹状細胞であることが判明した。

さらにこの細胞を用いて新たな集学的治療の可能性を検討した。担癌マウスにまず少量の doxorubicin または CDDP を投与し、その後それぞれを用いて誘導した骨髄由来の免疫細胞を投与すると、doxorubicin を用いた場合、CDDP を用いた場合と比較してより強い抗腫瘍効果があることが判明した。この併用療法に関しては、投与する抗がん剤と樹状細胞を誘導する際に使用する抗がん剤が同一であれば、強い抗腫瘍効果が得られる可能性があることを確認した。

これらの得られた知見から、chemioimmunotherapy の効果がある抗がん剤を直接投与し、さらに同一の抗がん剤を用いて誘導した骨髄由来免疫細胞を投与することでより強力な抗腫瘍効果を得る新しい抗腫瘍免疫集学的治療が開発できる可能性を示唆していると思われる。

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2件)

1. Inoue S, Setoyama Y, Odaka A, Kitagawa D, Bech Y: Chemoimmunotherapeutic effect of combined treatment with *ex vivo*

generated antigen-presenting immune cells and conventional antitumor agents in a mouse neuroblastoma model, J Pediatr Surg 2017 Oct;52(10): 1642-1650 (査読あり)

2. Inoue S, Setoyama Y, Bech Y, Kitagawa D, Odaka A, *Ex vivo* induction of antitumor DEC-205+ CD11c+ cells in a murine neuroblastoma model by co-stimulation with doxorubicin, and interleukin-4, Biomed Rep. 2016 Jan; 4(1):27-32 (査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

1. 井上成一郎、瀬戸山由美子、小高明雄、北川大輝、別宮好文、Flt-3 ligand による抗腫瘍免疫細胞誘導とマウス神経芽腫細胞に対する免疫応答の基礎研究 第54回日本小児外科学会学術集会, 仙台, 2017
2. 井上成一郎、小高明雄、瀬戸山由美子、北川大輝、別宮好文、Immunogenic cell death 誘導神経芽腫細胞を介した抗腫瘍反応誘導を司る自然免疫細胞の解析とTLR刺激の効果の検討 第116回日本外科学会, 大阪, 2016
3. 井上成一郎、小高明雄、瀬戸山由美子、別宮好文: TLR-4 刺激とIL-4によるDEC205陽性樹状細胞誘導と神経芽腫に対する抗腫瘍効果 第52回日本小児外科学会学術集会, 神戸, 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
井上成一郎 (Seiichiro Inoue)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70431690

- (2) 研究分担者
なし ()
研究者番号:

- (3) 連携研究者
なし ()
研究者番号:

- (4) 研究協力者
なし ()