

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20346

研究課題名(和文)小児神経芽腫自然退縮メカニズムの解明～治療への応用可能性の探究～

研究課題名(英文)Elucidation of spontaneous regression mechanisms of neuroblastoma

研究代表者

原田 結(Harada, Yui)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：00608507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫自然発生モデルマウス(ヒトMYCN Tgマウス)を用い、各種depletion抗体を用いて自然退縮率の検討を行った結果、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞の影響は無視できる程度であることが明らかになった。

一方で、腹腔内に存在するB細胞が産生する自然抗体、中でもIgMおよびIgG3の血中濃度と自然退縮との間には正の相関があり、CDC活性があることも確認が出来た。ところが、これら抗体は退縮時のバイオマーカーとしては有用であるものの、そのエフェクターとして働いてはいないことが示唆された。母体からの移行抗体の影響についてはさらなる精査が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：As a result of investigation of spontaneous regression rate using various depletion antibodies using neuroblastoma model mouse (human MYCN Tg mouse), the influence of CD4 positive T cell, CD8 positive T cell, NK cell is negligible. It became clear that it was.

On the other hand, there was a positive correlation between natural antibodies produced by B cells in the peritoneal cavity, especially IgM and IgG3 blood levels and spontaneous regression, and it was also confirmed that there had CDC activity. However, it was suggested that these antibodies are useful as biomarkers of regression but are not as effectors thereof. Further examination of the influence of the transitional antibody from the mother is thought to be necessary.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：神経芽腫 自然退縮 MYCN 自然抗体

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児に発生する固形腫瘍では脳腫瘍に次いで多く、日本では毎年 320 人前後が新しく診断されている。進行した神経芽腫の生存率は非常に辛い抗がん剤治療に耐えて尚 30%程度と低く、新規治療法の開発が急務である。一方で、神経芽腫は経過観察のみで自然に退縮するケースの見られる稀な悪性腫瘍である。そこで、未だ未解明である自然退縮メカニズムを明らかにすることで、それに基づく治療法を開発出来れば、患者、またその家族にとって大きな希望になると考えた。

神経芽腫の自然退縮メカニズムを詳細に解析するためには、実験ツールの豊富なマウスで疾患モデルを評価することが必要である。そこで、神経芽腫では MYCN 遺伝子のコピー数増加が予後不良因子として知られていることから、ヒト MYCN トランスジェニックマウス (MYCN-Tg マウス: 神経芽腫自然発症モデル) を用いてモデル評価を進めてきた。その結果、MYCN-Tg マウス (Hetero) は全例で神経芽腫を発生するものの、一定頻度で自然退縮を来し、無治療で生存する個体が約 50%程度であることが分かった。これは、当該マウスがヒトの臨床所見をよくミミックしており、組織学的・解剖学的にも神経芽腫の評価に最適であることを示唆している (論文投稿準備中)。また、MYCN-Tg マウス (Homo) は全例が神経芽腫を発生し、8~9 週齢で全個体が死亡することから、極めて悪性度の高いケースの解析にも有用と考えられる。

神経芽腫の自然退縮のメカニズムについては、現在のところ以下の 4 つの説が提唱されている (右図): ① Trk A 高発現神経芽腫の細胞死 (N Eng J Med, 1993)、② 腫瘍抗体/NK 細胞による抗腫瘍効果、③ テロメララーゼの低発現/欠損による細胞死 (Nat Med 1995)、④ DNA メチル化異常 (Cancer Res, 2014)。しかし、いずれの説も自然退縮との関連を示す明確なエビデンスには乏しいとされている。そこで MYCN-Tg マウス (Hetero) を用い、免疫細胞 (CD4/8、NK) depletion 実験を行ったところ、自然退縮には NK 細胞の関与が示唆される一方で、樹状細胞 (DC) による治療が奏功し、その生存率を 90% 以上に押し上げることが可能であった。さらに、驚くべきことに自然退縮個体についてはその血漿中に極めて CDC 活性の高い抗腫瘍 IgG を保持していることが明らかになり、抗神経芽腫抗体として IgG の存在が確認された初めての例であった。

2. 研究の目的

小児神経芽腫患者の一部にみられる特有の自然退縮メカニズムは難治性神経芽腫の新たな治療法開発に繋がる可能性を秘めており、その解析に必要な動物モデル (MYCN-Tg マウス) の基礎評価を行ってきた。本研究で

は、このモデルを用いて小児進行神経芽腫における、未だ明らかにされていない病態即ち悪性化と自然退縮の 2 極性に関わる分子・細胞メカニズムを明らかにすることを目的とする。特に、これまでの研究で一部明らかになりつつある免疫系の関与を中心に解析を進め、これまで治療法の無かった患者へ還元する。

3. 研究の方法

1. 神経芽腫自然退縮のメインエフェクター探索

DC の奏成功率が高いことから、免疫系の中にメインエフェクターがあると想定し、上述の通り NK 細胞と抗体 (B 細胞) の関与が考えられることから、この二つをターゲットに解析を進める。特に抗体についてはそのクラス (IgG1, IgG2a, ...) の特定までを確実に終了させる。

2. DC を用いた治療のメインエフェクター探索

DC 治療が奏功するために必要な免疫細胞を depletion 実験で絞り込む。Th1 誘導型 DC の奏功は B 細胞 (Th2 制御) 以外のエフェクターの存在を強く示唆しており、DC 活性化方法の最適化に必要な情報である。

3. MYCN コピー数の差が腫瘍細胞にもたらす影響の解析

MYCN-Tg マウスは複数コピーのヒト MYCN を hetero に持つものと homo に持つものとで病態が異なり、後者がより悪性度が高い (死亡率 100%) ことから、腫瘍細胞自体の解析は必須である。そのために、ex vivo で培養可能な系 (増殖速度、apoptosis 耐性など) で評価する。

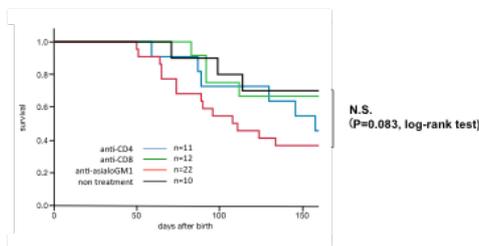
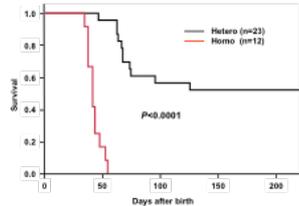
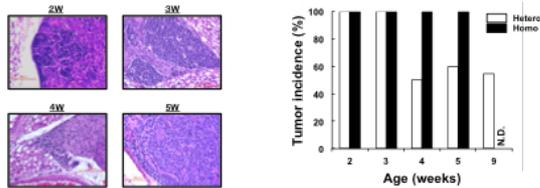
4. 抗神経芽腫抗体の実態解明から認識エピトープの特定へ

項目 1 に付随して、抗体医薬品の開発に繋がる場合を想定し、エピトープ探索へ繋げる予定である。CDC 活性と ADCC 活性の評価に加え、自然抗体の場合には腸内細菌叢との関連を明らかにする。

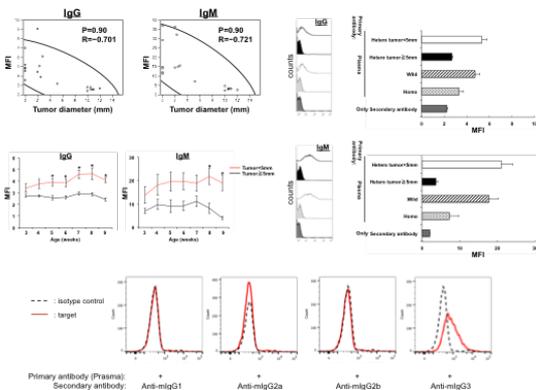
4. 研究成果

神経芽腫自然発症モデルマウス (ヒト MYCN Tg マウス, hetero) の個体は 100% の確率で神経芽腫が発生し、およそ 50% の確率で自然退縮をきたす) での基礎検討において、マウス DC の投与による腫瘍消失率が 80% を超えることから、自然退縮に関しては免疫系の中にメインエフェクターがあると想定した。退縮時期や既報などから NK 細胞と抗体 (B 細胞) の関与が考えられることから、この二つをターゲットとして解析を進めた。各種 depletion 抗体を用いて検討を行った結果、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞の自然退縮ならびに生存期間に与える影響は無視出来る程度であることが明らかになり、一方で抗体による影響が強く疑われたためさらに詳細な解析を行った。驚くべきことに、当該抗

体は腹腔内に存在するB細胞が産生する自然抗体、中でもIgM及びIgG3が主であることが明らかになった。



この抗体の血中濃度と自然退縮の間には正の相関があり、CDC活性があることも確認ができた。ところが、この抗体を産生する腹腔内B細胞を除去すること、或いは抗体価の高い個体の血漿を投与することは、自然退縮率に影響を与えないことが明らかになった。神経芽腫の自然退縮に対し、自然抗体は退縮時のバイオマーカーとしては有用であるものの、そのエフェクターとして働くのではないことが示唆された。ただし、退縮を来さない場合には腹腔内のB細胞数そのものが大幅に減少することと、母体からの移行抗体の影響についてはさらなる精査が必要であると考えられる。



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0件)

[学会発表] (計2件)

- Advances in Neuroblastoma Research Association (ANRA) 2016, Cairns, Australia, 「Natural antibody against neuroblastoma of the TH-MYCN transgenic mice has CDC activity」 Naonori Kawakubo, Yui Harada, Minori Ishii, Ryota Souzaki, Yoshiaki Kinoshita, Yoshikazu Yonemitsu and Tomoaki Taguchi
- 第53回日本小児外科学会学術集会 福岡 「Functional analysis of nti-neuroblastoma natural antibody in MYCN transgenic mice」 川久保尚徳 原田結 石井生 宗崎良太 木下義晶 米満吉和 田口智章

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://lits-tr.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 結 (HARADA, Yui)

九州大学大学院薬学研究院・助教

研究者番号：00608507

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

川久保尚徳 (KAWAKUBO, Naonori)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90711185

(4)研究協力者