

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591621
 研究課題名（和文） グリオーマ幹細胞と樹状細胞の融合細胞を用いた活性型グリオーマワクチンの開発
 研究課題名（英文） Immunotherapy with fusions of dendritic and glioma stem cells against malignant glioma
 研究代表者
 赤崎 安晴（AKASAKI YASUHARU）
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00256322

研究成果の概要（和文）：悪性神経膠腫患者の手術検体から、CD133+ グリオーマ幹細胞（glioma stem cell; GSC）の誘導、濃縮および継代培養に成功した。GSCと自家樹状細胞との融合細胞を作成し、IL-10-siRNAおよびdouble-stranded RNA(dsRNA)にて刺激したのち自家リンパ球との混合培養を行ったところ、ELISPOTアッセイにおいてGSCに対する免疫反応の誘導が確認され、GSCと樹状細胞との融合細胞を用いた免疫療法の有用性の高さが示唆された。

研究成果の概要（英文）：CD133+ glioma stem cells (GSCs) established from surgical specimens of patients with malignant glioma were fused with autologous dendritic cells (DCs). Fusion cells (FCs) were stimulated with polyriboinosinic polyribocytidylic acid (dsRNA) and siRNA of IL-10 (IL-10-siRNA). CD4+ T cells stimulated with autologous FCs were subjected to the ELISPOT assay, which revealed that the FCs elicit an efficient Th1 response. The results of this study are suggesting that the immunotherapy with fusions of DCs and GSCs may be a promising strategy for targeting GSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 24 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

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：グリオーマ、樹状細胞、免疫治療、癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

Temozolomide (TMZ) は悪性グリオーマに対して有効性が高い化学療法剤であるため TMZ を基調とした治療が現在のスタンダードになっている。しかし、MGMT 陽性のグリオーマ細胞では TMZ に対して薬剤耐性を有することが知られているように、TMZ 単独ではグリオーマの再発は避けられず、新たな併用療法の開発が急務である。悪性グリオーマが、TMZ 療法を含めた集学的治療に抵抗して再発するメカニズムの一つには、腫瘍形成能と多分化能を有するグリオーマ幹細胞 (glioma stem cell: GSC) が深く関与していると考えられており、GSC をターゲットにした治療法の実用化が必要と考えられる。

我々が臨床試験で用いている樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞は、未知の抗原を含むあらゆる腫瘍関連抗原に対して細胞性免疫を誘導する理想的な腫瘍ワクチンであり、これと TMZ を併用した臨床試験においてその有効性を確認している。そして、この融合細胞療法を応用すれば GSC に対する免疫反応を誘導することが可能になると考え、本研究をデザインした。GSC が放射線や化学療法剤への耐性に関与する機能的腫瘍関連抗原を有していると仮定すれば、GSC と樹状細胞の融合細胞を用いた免疫療法は放射線や化学療法への感受性を高めることができ、TMZ や放射線治療と併用することによりグリオーマ患者の予後改善につながるものと期待される。

2. 研究の目的

手術で摘出したグリオーマ組織から GSC を誘導・継代培養し、この GSC を用いた新たなグリオーマワクチンの開発研究を目的とする。まず、CD133+ および CD133- GSC に分離し、それぞれにおいて自己複製能・腫瘍形成能・多分化能等を解析する。次に、GSC 自体やそこから分化させた種々の細胞と樹状細胞との融合細胞を作成し、腫瘍ワクチンとしての機能評価を行う。そして、現在当該施設の臨床試験で用いている一次培養腫瘍細胞と樹状細胞の融合細胞との比較によって、臨床応用への有効性を検討する。

3. 研究の方法

1) (研究 1) 悪性グリオーマ患者の手術で摘出された腫瘍組織や一次培養腫瘍細胞あるいは glioma cell line (U-87MG など) から、stem cell conditioned medium (DMEM/F12, heparin 2U/ml, EGF 50ng/ml, FGF 50ng/ml, B-27 supplement 2%, penicillin/streptomycin 2%) を用いて GSC を誘導し、磁気ビーズ細胞分離法により CD133+ 細胞と CD133- 細胞を分

離・濃縮した。CD133+ GSC の継代培養を行い、neuro-sphere 形成を観察した。また、血清添加培地を用いて GSC から腫瘍様細胞や血管内皮様細胞に分化させ、その形態を観察した。

2) (研究 2) 研究 1 で誘導された GSC およびそこから分化させた腫瘍様細胞を回収し、real time PCR や Western blot により抗原性の変化を観察した。

3) (研究 3) 研究 1 で誘導した細胞と健常者末梢血単核球から誘導した樹状細胞との融合細胞を作成した。細胞融合にはポリエチレングリコールを用いた。細胞融合時に、lipofectamine を用いて IL-10-siRNA および dsRNA を同時に細胞内導入し、24 時間後の培養上清を回収した。そして ELISA により、融合細胞の IL-10 および IL-12 分泌能を確認した。

4) (研究 4) 研究 3 で単離された融合細胞を検体として、HLA-DR, CD80, CD83 および CD86 などの発現をフローサイトメトリー法により確認し、コントロール細胞と比較検討し、RNA 導入後の融合細胞における成熟度を確認した。手技・手法が確立された段階で、患者本人の末梢血単核球から誘導した樹状細胞を検体として使用し、研究 2-4 と同様の研究を行った。

5) (研究 5) CD133+ GSC と自家樹状細胞との融合細胞を作製し、IL-10-siRNA および dsRNA にて刺激した。その後、この融合細胞と自家リンパ球とを 5 日間、更に CD133+ GSC と 2 日間混合培養し、この混合培養細胞から磁気ビーズ細胞分離法により CD4+ T 細胞のみを回収した。こうして得られた CD4+ T 細胞を ELISPOT assay にて解析し、Th1 (IFN- γ 分泌細胞) 反応と Treg (IL-10 分泌細胞) 反応の優位性を比較した。

6) (研究 6) CD133+ GSC と自家樹状細胞との融合細胞を作製し、IL-10-siRNA および dsRNA にて刺激した。その後、融合細胞と自家リンパ球とを 5 日間、更に CD133+ GSC、CD133- GSC あるいは一次培養腫瘍細胞と 2 日間混合培養した。そして、混合培養細胞から磁気ビーズ細胞分離法により CD4+ T 細胞のみを回収し、ELISPOT assay にて Th1 (IFN- γ 分泌細胞) 反応と Treg (IL-10 分泌細胞) 反応を解析した。

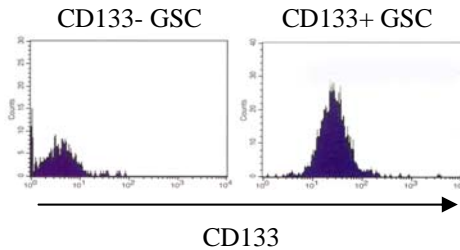
4. 研究成果

- 1) (研究 1) 摘出腫瘍組織を stem cell conditioned medium で培養し、GSC neuro-sphere (写真 1) を誘導した。GSC neuro-sphere の周囲には浮遊した単一細胞も多く観察された。Acutase を用いて GSC neuro-sphere を単一細胞化し、周囲の浮遊した単一細胞と共に磁気ビーズ細胞分離法により CD133+ GSC と CD133- GSC を分離・濃縮し、FACS にて確認した (図 1)。更に、CD133+ GSC と CD133- GSC それぞれを個々に継代培養したところ、CD133+ GSC は neuro-sphere の再形成が顕著に確認されたが、CD133- GSC では再形成が少なかった。CD133+ GSC および CD133- GSC は、これまでに 8 症例でその誘導が確認できた。

(写真 1)

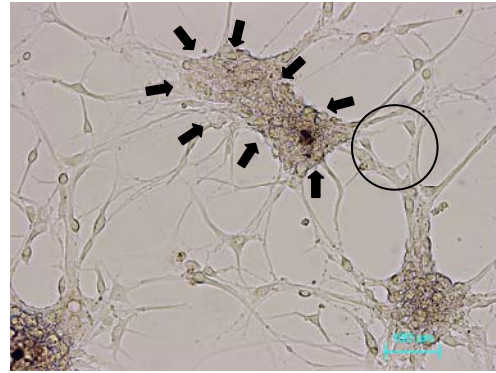


(図 1)



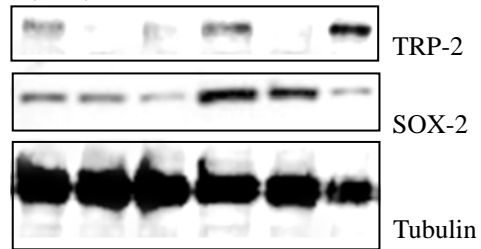
血清添加培地を用いた CD133+ GSC からの分化誘導実験では、写真 2 のごとく腫瘍様細胞による腫瘍塊形成 (➡) や血管内皮様細胞による管腔形成 (○) が観察された。血清添加培地+血管内皮細胞増殖因子 VEGF による CD133+ GSC の分化誘導実験では、血管内皮様細胞への分化がより顕著になった。

(写真 2)



- 2) (研究 2) real time PCR にて WT1 の発現を確認したが、今回用いた細胞ではごくわずかな発現しか確認できなかった。次に、Western blot にて TRP-2 および SOX-2 のタンパク発現を 3 症例 (case No. 1-3) の一次培養腫瘍細胞 (primary culture) と CD133+ GSC を用いて確認したところ、primary culture の細胞に比べて GSC でこれらの発現が高い傾向にあることが確認され (図 2)、GSC における腫瘍特異抗原としての可能性が示唆された。

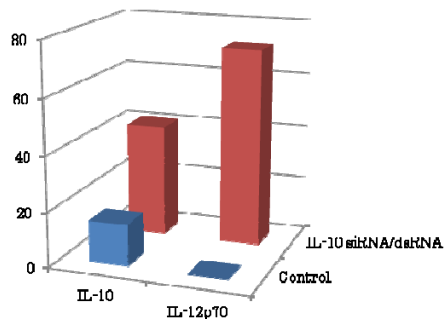
(図 2)



1			2			3			Case No.
1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Primary culture			CD133+ GSC						

- 3) (研究 3) 研究 1 で誘導した CD133+ GSC および CD133- GSC それぞれと健常者末梢血単核球もしくは自家末梢血単核球から誘導した樹状細胞との融合細胞を作成した。L-10-siRNA および dsRNA を細胞内導入し、24 時間後の培養上清を用いた ELISA では高 IL-12p70 分泌性活性型融合細胞の誘導が確認された。図 3 には、Case No.1 における CD133+ GSC と自家樹状細胞との融合細胞のデータを示す (縦軸の単位は pg/ml)。

(図 3)



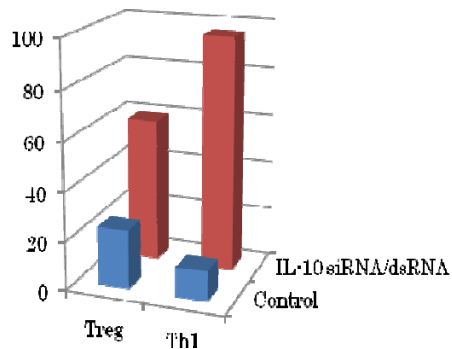
- 4) (研究 4) 研究 3 で単離された CD133+ GSC と健常者樹状細胞もしくは自家樹状細胞との融合細胞を検体として、HLA-DR, CD80, CD83 および CD86 などの発現をフローサイトメトリー法により確認した。樹状細胞の成熟度を示すと言われているこれら表面抗原の発現はいずれも高度であり、融合細胞の成熟が確認された。Case No.1-3 における CD133+ GSC と自家樹状細胞との融合細胞を検体としたそれぞれの表面抗原陽性率を表 1 に示す。

(表 1)

Case	HLA-DR	CD80	CD83	CD86
1	71%	78%	27%	82%
2	75%	84%	33%	83%
3	79%	81%	30%	83%

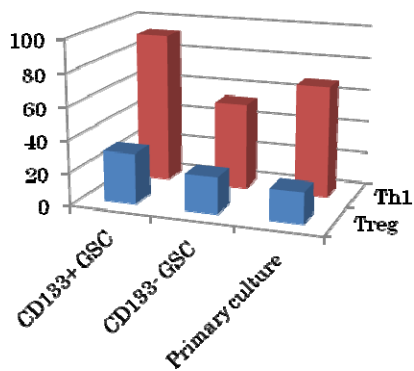
- 5) (研究 5) 患者末梢血リンパ球を自家融合細胞と CD133+ GSC で刺激し、CD4+ T 細胞のみを回収後、ELISPOT assay にて解析した。Case No. 1 における結果を図 4 に示す(縦軸は spot の個数を示している)。IL-10-siRNA および dsRNA にて刺激した融合細胞はコントロールと比較して、Th1 反応の誘導が顕著であった。また、IL-10-siRNA / dsRNA 融合細胞は、コントロールと比較して Treg 反応の誘導も上回っていたが、Th1 と Treg の優位性で比較すると、コントロールの融合細胞は Treg の誘導が優位であるのに対して、IL-10-siRNA / dsRNA 融合細胞は Th1 優位の反応が誘導されており、IL-10-siRNA / dsRNA 融合細胞が CD133+ GSC に対して抗腫瘍免疫を誘導したことを示している。また、同様の結果は、Case No.2 および 3 でも確認された。

(図 4)



- 6) (研究 6) IL-10-siRNA および dsRNA にて刺激した CD133+ GSC と自家樹状細胞との融合細胞と自家リンパ球とを混合培養し、更に CD133+ GSC、CD133- GSC あるいは一次培養腫瘍細胞で second stimulation を行った後、CD4+ T 細胞のみを回収し、ELISPOT assay にて Th1 (IFN- γ 分泌細胞) 反応と Treg (IL-10 分泌細胞) 反応を解析した。Case No. 1 における結果を図 5 に示す(縦軸は spot の個数を示している)。融合細胞は、CD133+ GSC、CD133- GSC および一次培養腫瘍細胞 (primary culture) それぞれに対して、Th1 優位の免疫反応を誘導していた。そして、その Th1 反応は、CD133+ GSC に対して最も顕著で、免疫反応の特異性が確認された。また、同様の結果は、Case No.2 および 3 でも確認された。

(図 5)



5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 樹状細胞とグリオーマ幹細胞の融合細胞を用いた免疫療法に関する研究 赤崎安晴、菊池哲郎、山本洋平、荒井隆雄、田

中俊英、常喜達裕、阿部俊昭 第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会 2010 年 11 月 28 日～30 日 長野県軽井沢町

- 2) 樹状細胞とグリオーマ幹細胞の融合細胞を用いた免疫療法による抗 WT1 免疫反応の誘導 赤崎安晴、菊池哲郎、本間定、山本洋平、荒井隆雄、田中俊英、常喜達裕、阿部俊昭 第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会 2011 年 11 月 27 日～29 日 岐阜県下呂温泉
- 3) 悪性神経膠腫に対する樹状細胞とグリオーマ幹細胞の融合細胞を用いた免疫療法 赤崎安晴、菊池哲郎、山本洋平、荒井隆雄、田中俊英、常喜達裕、阿部俊昭 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会 2012 年 11 月 25 日～27 日 広島県広島市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://jikei-dna.jp/clstudy/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤崎 安晴 (AKASAKI YASUHARU)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 00256322

(2) 研究協力者

久原 映子 (KUHARA AKIKO)
東京慈恵会医科大学・研究助手

小林 由紀子 (KOBAYASHI YUKIKO)
東京慈恵会医科大学・研究助手

入江 正紀 (IRIE MASAKI)
東京慈恵会医科大学・訪問研究員