

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592134

研究課題名(和文) がん免疫回避に関わるマクロファージの機能解明とその制御法の確立

研究課題名(英文) Characterization and targeting Folate receptor-beta expressed tumor associated macrophages in glioblastoma

研究代表者

永井 拓 (Taku, Nagai)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：90363647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは局在する組織で多様化する特徴を持つ。腫瘍組織では増殖や転移、腫瘍免疫回避に働くと考えられている。これまでに葉酸受容体(FR)は、悪性度の高い脳腫瘍に局在するマクロファージで高発現する事を報告してきた。本研究では、抗がん免疫(ワクチン等)が生じ難い動物モデル(F98細胞移植ラットモデル)に抗FR抗体トキシンを投与し、FRマクロファージ除去によるワクチン増強効果を検討した。その結果、抗体トキシンによる免疫原性はワクチン効果の減弱化に関与する可能性が示唆された。この問題を解決するために新たに抗体トキシンを設計・作製し、動物モデルで有効性(免疫原性)の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Folate receptor-beta (FRb) is over expressed in tissue-activated macrophages in autoimmune diseases and some tumors (e.g. glioblastoma). We previously determined that FRb-macrophages in glioma may play a role to promote tumor growth. The present study evaluated the efficacy of targeting of FRb-macrophages by anti-FRb immunotoxin for treating immunotherapy of weakly immunogenic F98 glioma rat models. Fischer rats received an intracerebral implantation of F98 cells. After 3 days, subcutaneous administration of vaccination (freeze/thaw treated F98) were performed in presence/absence of immunotoxin (intraperitoneal administration). However, no significant differences in survival times were observed. When combined liveing cell F98 and immunotoxin administration enhanced survival times, but significance was not observed. We investigated the presence of anti-immunotoxin antibodies. We further developed newly immunotoxin which showed low immunogenicity and used for long-term administration.

研究分野：医歯薬学

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：マクロファージ 脳腫瘍 抗体医薬 イムノトキシン

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍(特に神経膠腫)は難治性の腫瘍である。さらに薬剤や放射線治療後に生じる再発が依然大きなハードルとなっている。がんワクチンは再発防止に有効なことが期待されるものの老化を背景としたがん免疫の減弱化や、がん組織におけるがん免疫からの回避機構が理由となり、治療効果が得られないことも考えられる。

がんの増殖やがん免疫の抑制には、がん細胞が有する能力に加え、周囲の間質との相互作用によっても引き起こされる。この相互作用には免疫担当細胞のひとつである、がん間質に局在するマクロファージ(腫瘍関連マクロファージ、TAMs)の関与が示唆されている。申請者はTAMsを特徴づけるマーカーのひとつが葉酸受容体(以下FR)であることを神経膠腫組織から見出した。さらに、このマクロファージを除去することにより、がん増殖が抑制されることをヌードマウスにラットC6グリオーマを移植したモデルにて確認した。脳腫瘍の腫瘍免疫モデルに用いられる細胞はC6をはじめ9L、T9、F98が用いられるが、特にF98細胞は他の細胞に比べて免疫原性が低い特徴をもつ。以上の先行結果からFR発現マクロファージは神経膠腫の増殖に関与する事が示唆されるものの、機能面(がん増殖やがん免疫の抑制、老化)に関する明確化が新たな課題として残された。

2. 研究の目的

本研究は、がんの増殖をするマクロファージ(腫瘍関連マクロファージ、TAMs)のマーカーである葉酸受容体(FR)に着目し、FR発現TAMsの機能面(特にがん免疫の抑制や増殖促進効果)、ラット神経膠腫のワクチンモデルおよびマウスメラノーマに抗FR抗体あるいは低分子高機能抗体(イムノトキシン)を投与して検討すると共に、その機序(がん免疫の抑制やがん増殖の抑制)を*in vitro*にて明らかにする。得られた結果をもとに、治療に即した抗体関連医薬の開発への応用を到達点とした。

3. 研究の方法

(1)FR発現TAMs選択的除去に用いるイムノトキシンの作製:

抗マウスFRおよび抗ラットFRイムノトキシンを大腸菌発現系から精製を行った。精製終了後、FR強制発現細胞を用いて増殖阻害活性をフローサイトメータにて検討した。

(2)FR発現TAMs選択的除去におけるがん増殖抑制効果の検討:

(ラット神経膠腫モデル)Fischerラット(成年:3ヶ月齢、老年:24ヶ月齢)の頭骨に穿孔処理を行い、 $10^3/10\mu\text{L}$ に調整したF98細胞を移植した。移植終了3日後に、凍結融解処理を行ったラットグリオーマF98細胞

(5×10^5 個)を皮下に免疫すると共に0.1mg/kgの濃度に調整したイムノトキシンあるいはコントロールタンパク質を腹腔内に投与した(3日間隔、計4回)。移植後の生存期間を計測した。

(マウスメラノーマモデル):C57BL6メスマウス(成年:2ヶ月齢、老年:12ヶ月齢)に $2\times 10^5/100\mu\text{L}$ に調整したB16F10細胞を尾静脈から移植した(肺転移モデル)。移植終了3日後に放射線処理したマウスメラノーマB16F10細胞(1×10^6 個)を皮下に免疫すると共に0.1mg/kgの濃度に調整したイムノトキシンあるいはコントロールタンパク質を尾静脈に投与した(3日間隔、計4回)。18日後にマウスを安楽死させて肺を切除してパラホルムアルデヒドで固定をした後、肺転移した腫瘍数を計測した。

(3)共培養モデルにおけるリンパ球とサイトカインの解析:

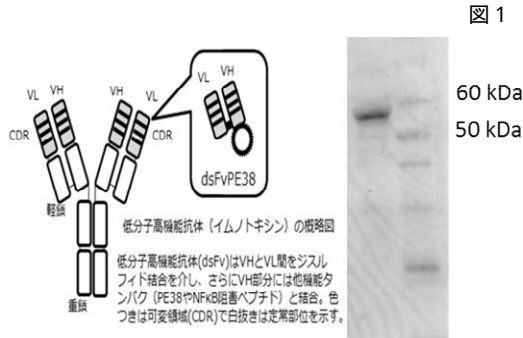
ラット神経膠腫移植モデル(成年:3ヶ月齢、老年:24ヶ月齢)の移植15日後にラットを深麻酔下にて血液の採取後、安楽死させた。次に脾臓からリンパ球を採取して10%FBS、IL-2(10U/mL)を含む培養液に懸濁し以後の解析を行った。尚、陰性対象は正常ラットの脾臓を用いた。リンパ球増殖の解析:24穴プレートに 1×10^6 に調整したリンパ球に凍結融解処理したF98(2×10^4)を加えて培養を行った。培養5日後における細胞増殖をCell Counting Kit-8(Dojin)にて450nmの吸収波長で測定し、正常ラットのリンパ球に対する増殖を算出した。リンパ球のF98細胞に対する細胞傷害能:96穴Vプレートに 1×10^4 - 5×10^5 の条件で調整したリンパ球に、0-1000ng/mLの終濃度となるようにイムノトキシン、コントロールタンパク(VH-PE38)を加え、2日間培養した。培養後 1×10^4 のF98を添加して4時間培養した。細胞傷害能はCytoTox96(Promega)キットを用い、490nmにおける吸光度を測定した。サイトカイン定量:24穴プレートに 1×10^6 に調整したリンパ球に凍結融解処理したF98(2×10^4)を加えて培養を行った。培養5日後に培養上清を採取し、IFN、IL-10の定量をDuoSet ELISA kit(R&D)にて測定した。

(4)イムノトキシン免疫原性の測定と新規イムノトキシンの作製:ラット神経膠腫モデル(移植15日後)から得られた血清中における抗イムノトキシン抗体の定量を抗緑膿菌毒素ウサギ抗体(シグマ)およびHRP標識抗ラットIgG(Fab')₂(Abcam)を用いたELISAにて測定した。新規イムノトキシンの作製は、Onda Mらの報告(Proc Natl Acad Sci USA 108:5742-7)とwebベースのエピトープ領域予測プログラム、IEDB, Discotopeを用いてデザインした。免疫原性の評価はFischerラットに投与し、血清中のイムノトキシンに対する抗体価を測定した。

4. 研究成果

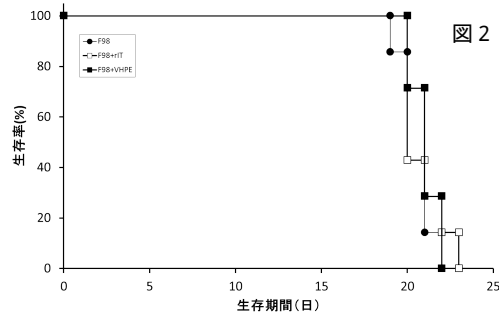
(1) FR イムノトキシンの作製:

FR に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域(重鎖、軽鎖)と遺伝子改変型の緑膿菌外毒素(PE38)を融合させたイムノトキシン(抗マウス、抗ラット)を作製した。図1より、イムノトキシンの分子量は約60kDa程度で、FR 発現細胞に対する細胞増殖阻害濃度は50 - 100ng/mLであった。

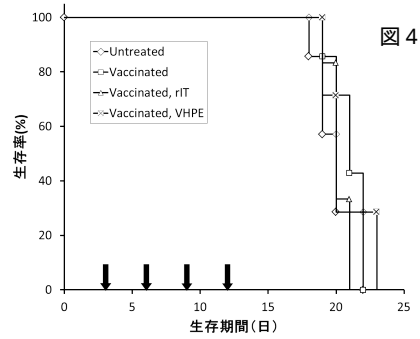
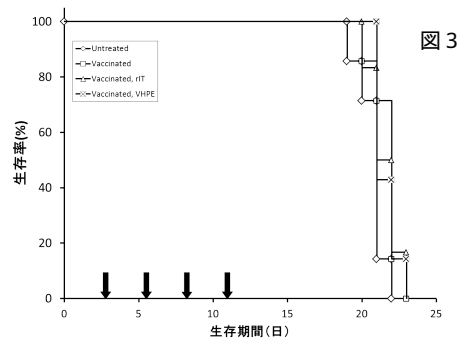


(2) FR 発現 TAMs 選択的除去におけるがん増殖抑制効果の検討

ラット神経腫モデル: 1×10^3 個の F98 を脳に移植し、イムノトキシン(以下 rIT)或いはコントロールタンパク質(以下 VHPE)の全身投与を行った。その結果 rIT による生存期間の延長は認められなかった(図2)。

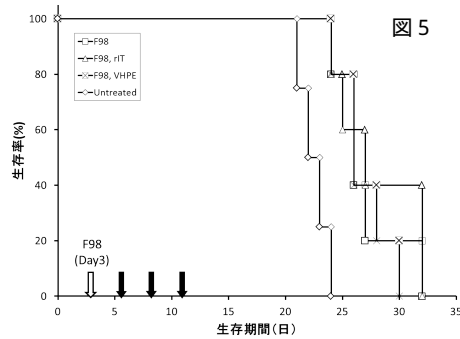


次に、F98 を脳に移植後、凍結融解処理した F98 細胞を免疫すると共に rIT 或いは VHPE による併用効果を検討した。その結果、各処理における生存期間の延長は、成年群(図3)および老年群(図4)で見られなかった。

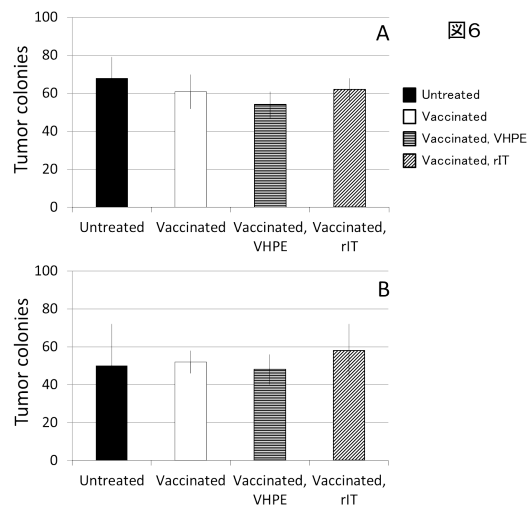


Volovitz らは 5×10^3 の F98 細胞を脳に移植 7-10 日後に、無処理の F98 生細胞 (2×10^5) を皮下免疫することにより、生存期間が延長する事を報告している (J. Immunol, 198:5452, 2011)。

そこで Volovitz らの手法を用いて移植 3 日後に F98 生細胞の皮下免疫を行い、さらに 3 日間隔で rIT 或いは VHPE の投与を 3 回行った(図5)。図5より、成年ラット(7週齢)において F98 生細胞の皮下移植は、未処理群に比べて生存期間を延長した。rIT の投与はワクチン処理を増幅させる傾向を示したが有意差は見られなかった。



(マウスメラノーマモデル): C57BL6 マウス(成年: 2ヶ月齢、老年: 12ヶ月齢)に B16F10 細胞を尾静脈から移植し、放射線処理した同細胞の免疫と rIT 投与の効果を検討した。その結果、老年群(図6A)および成年群(図6B)において肺の腫瘍数の減少には無効であった。



(3) 共培養モデルにおけるリンパ球の増殖とサイトカイン (IFN 分泌) の解析：
 神経腫瘍移植モデル(ワクチン処理、ワクチン処理と rIT 或いは VHPE の併用)より、移植 15 日後に採取した脾臓のリンパ球を用いて F98 細胞と共培養を行った。

リンパ球の増殖：ワクチン処理ならびに rIT は、成年群 (A) 老年群 (B) 共に有意なリンパ球増殖を示さなかった。また、Volovitz らの手法由来のリンパ球は有意に増殖したが rIT 併用による増幅効果は見られなかった (図 7)。

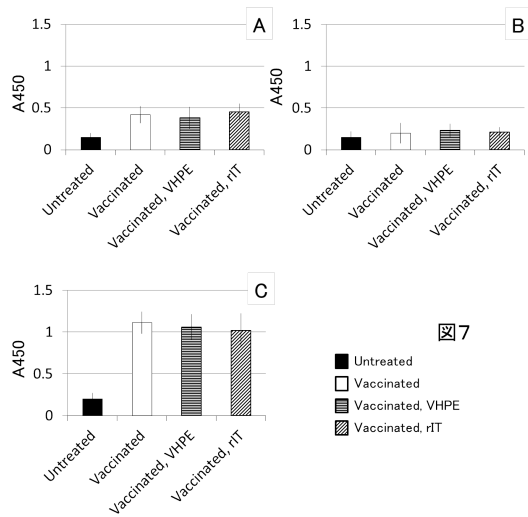


図 7

ワクチン処理ならびに rIT は、成年群において有意なリンパ球による F98 の細胞傷害を増幅させなかった (図 8)。

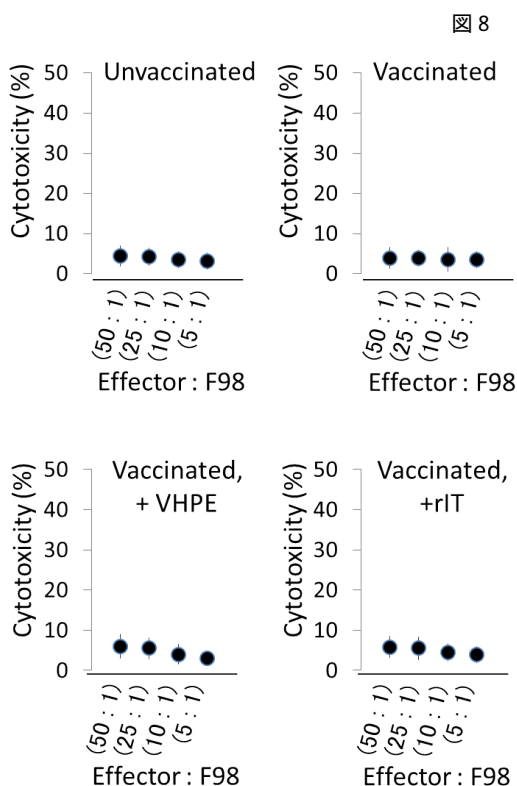


図 8

Volovitz らの手法由来のリンパ球は IFN の増殖が確認されたが、rIT の併用による増強効果は見られなかった (図 9)。

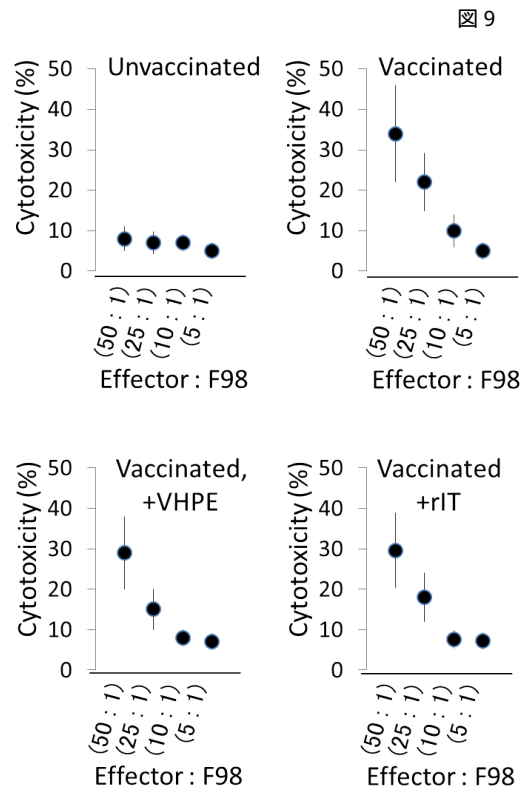


図 9

次に脾臓細胞と F98 細胞の共培養を行い、リンパ球由来の IFN 分泌を測定したところ、ワクチン処理によって IFN 分泌の増加が確認された。その効果は成年群の方が老年群よりも高い傾向を示した。しかしながらその程度は Volovitz らの手法に比して低い傾向であった (図 10)。

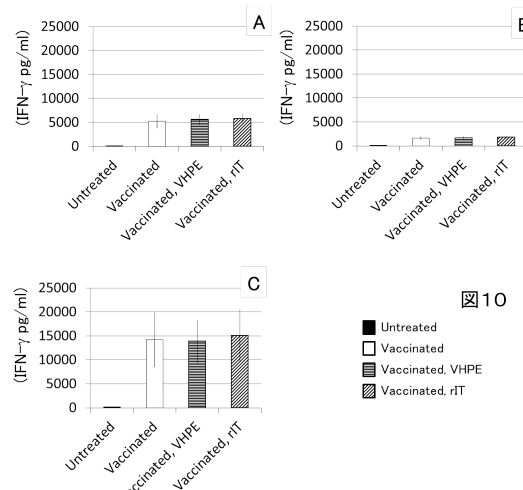
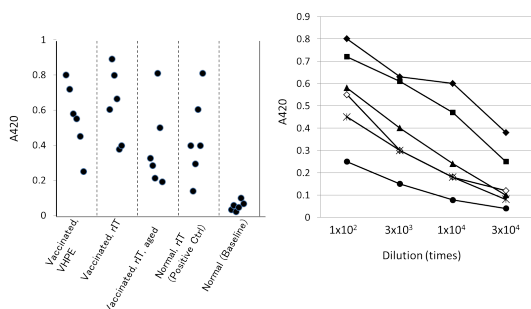


図 10

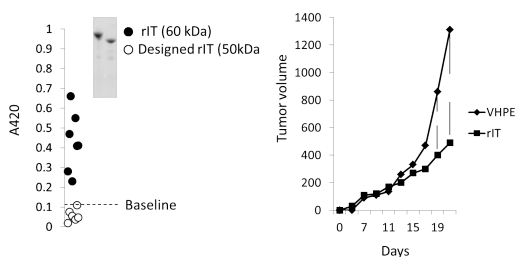
(4) イムノトキシン免疫原性(抗イムノトキシン抗体の出現)の測定と新規イムノトキシンの作製:これまでの結果を総括し改善点を明確化する目的でイムノトキシンそのものによる免疫原性について検討した。成年および老年ラットの血清を100倍に希釈し、イムノトキシンの毒素部分であるPE38に対する反応性を検討したところ、rITを投与したすべての群において陽性反応が確認され、成年および老年間における力価についても有意差は見られなかった(図11)。

図11



免疫原性を低減させたイムノトキシンは、Onda Mらが報告している(Proc Natl Acad Sci USA 108:5742-7)。上記報告に加えてwebベースのエピトープ領域予測プログラム(IEDB, Discotope)を用いて新たに抗原となり得る領域の予測を行い、新たにイムノトキシンを4種類デザインした。図12に作製したイムノトキシンの一つを示す。

図12



新たに作製したイムノトキシンは従前のタイプに比べて分子量が1万低く、マウス・ラットに対する免疫原性についても低い値を示した。次に、腫瘍に対する増殖抑制効果を調べる目的で、ラット C6 グリオーマ細胞ヌードマウス移植モデルにて増殖抑制を検討したところ、新たに作製したイムノトキシンは従前と同様に移植した腫瘍細胞の増殖を抑制した。

【考察】本研究では、がん増殖に関する腫瘍関連マクロファージを除去する目的でイムノトキシンを用い、抗腫瘍免疫が成立し難いラット F98 細胞移植モデルと共に、加齢に伴う免疫の減弱化を考慮に入れたモデルを

用いたが、イムノトキシンはワクチン効果の増強に無効であった。F98 生細胞の皮下移植(J. Immunol, 198:5452, 2011)による効果は、皮下移植した腫瘍の間質細胞の存在によって移植脳腫瘍の治療を阻害する。

抗 FR イムノトキシンはラット C6 グリオーマには直接作用せず(in vitro)、皮下移植において増殖を抑制する事を鑑みると(報告済み)新規作成したイムノトキシンは、がんワクチン効果を増強させることが期待できる。今後はさらに皮下や局所免疫におけるFR 発現マクロファージの機能面について精査を行うと共に、がん治療への応用に貢献したい。

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11件)

Hua Li, Taku Nagai (他3名、2番目) Depletion of folate receptor-expressing macrophages alleviates bleomycin-induced experimental skin fibrosis Med. Rheumatol (査読有り) doi:10.3109/14397595.2013.879415 2014 Feb 5

Hirano H (他13名、筆頭) Immunoreactivity of Wnt5a, Fzd2, Fzd6, and Ryk in glioblastoma: evaluative methodology for DAB chromogenic immunostaining. Brain Tumor Pathol. (査読あり) 31(2):85-93. 2014 Apr
Awa R, Hirano H. (他12名、責任著者) Neuroimaging diagnosis of pineal region tumors-quest for pathognomonic finding of germinoma. Neuroradiology (査読あり) DOI10.1007/s00234-014-1369-4 2014 Apr 29.

Hirano H (他8名、筆頭) MRI T2 hypointensity of metastatic brain tumors from gastric and colonic cancers. Int J Clin Oncol. (査読あり) DOI10.1007/s10147-013-0596-8 2013 Jul 17.

Hirano H (他14名、筆頭) TLR4, IL-6, IL-18, MyD88 and HMGB1 are highly expressed in intracranial inflammatory lesions and the IgG4/IgG ratio correlates with TLR4 and IL-6. Neuropathology. (査読あり) 32(6):628-37. 2012 Dec

Hasui K, Nagai T, (他8名、2番目) Immunohistochemistry of programmed cell death in archival human pathology specimens. Cells (査読あり), 2012 Dec; 1(2):74-88 (2012).

Furusho Y, Nagai T, (他7名、4番目) Novel Therapy for Atherosclerosis Using Recombinant Immunotoxin Against Folate Receptor-Expressing

Macrophages. J Am Heart Assoc. (査読あり) 1(4):e003079. 2012 Aug;
Kurahara H, Nagai T, (他 8 名、4 番目) Clinical significance of folate receptor β -expressing tumor-associated macrophages in pancreatic cancer. S. Ann Surg Oncol. (査読あり) 19(7):2264-71. 2012 Jul;
Nagai T, Kyo A, Hasui K (他 2 名、筆頭) Efficacy of an immunotoxin to folate receptor beta in the intra-articular treatment of antigen-induced arthritis. Arthritis Res Ther. (査読あり) 14(3):R106. 2012 May 2
Tanaka M, Nagai T, (他 4 名、2 番目) Phenotypic and functional profiles of CR1g (Z39Ig)-expressing macrophages in the large intestine. J Innate Immun. (査読有り) 18(2):258-67 2012 Apr
Tsuneyoshi Y, Nagai T, (他 6 名、3 番目) Functional folate receptor β -expressing macrophages in osteoarthritis synovium and their M1/M2 expression profiles. Scand J Rheumatol. (査読あり) 41(2):132-40. 2012 Mar

〔学会発表〕(計 6 件)

Taku Nagai (筆頭、他 6 名) Efficacy of an antibody reactive with human folate receptors β and α in targeting cancer cells and TAMs 2013 年 10 月 3 日 第 72 回日本癌学会 パシフィコ横浜
Hasui Kazuhisa, Nagai Taku (他 4 名、2 番目) Neoplastic features of florid pseudoepitheliomatous hyperplasia (FPH) in nasal NK/T-cell lymphoma (nNKTCL) 2013 年 10 月 3 日 第 72 回日本癌学会 パシフィコ横浜
Qiang Ding, Taku Nagai (他 10 名、3 番目) New insight into pancreatic cancer progression associated with cancer stem cells and tumor-associated macrophages in cancer microenvironment, Cell Symposia: Hallmarks of Cancer, 2012 年 10 月 (San Francisco, USA).
Sonshin Takao, Taku Nagai (他 10 名、3 番目) Clinical significance of folate receptor β -expressing macrophages in pancreatic cancer., The fourth international symposium on folate receptors and transporters., 2012 年 10 月 (Cozumel, Mexico).
Takao S, Nagai T (他 10 名、4 番目) Distribution and significance of folate receptor β -expressing macrophages in pancreatic cancer.,

Pancreatic Cancer: Progress and Challenges, 2012 年 6 月 (Lake Tahoe, USA).
Takao S, Nagai T (他 10 名、3 番目) Clinical significance of folate receptor β -expressing tumor-associated macrophage (TAM) in pancreatic cancer., 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 (名古屋市).

〔図書〕(計 1 件)

免疫原性の低減化 永井拓 (P74-82)
次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線 (熊谷泉 監修) シーエムシー出版 (総 283 頁) ISBN978-4-7813-0673-5

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 強皮症治療剤
発明者: 李花、松山隆美、永井拓
権利者: 鹿児島大学
種類: 特許
番号: 2013-54090
出願年月日: 平成 25 年 3 月 15 日
国内外の別: 国内

名称: 葉酸リセプター および を認識する抗体
発明者: 永井拓、松山隆美、古庄優子
権利者: 鹿児島大学
種類: 特許
番号: 2012-281525
出願年月日: 平成 24 年 12 月 25 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井拓 (NAGAI, Taku)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 90363647

(2) 研究分担者

平野宏文 (HIRANO, Hirofumi)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 00264416