

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592631

研究課題名(和文)トランスジェニックマウスを用いた小児がんに対する新規免疫遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文)The establishment of the novel immunotherapy for neuroblastoma using transgenic mouse

研究代表者

田尻 達郎(TAJIRI, TATSURO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80304806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫に対する新規治療法の確立を目指して、神経芽腫の臨床患者に最も近い動物モデルであるMYCN TgMを用いて新規治療法であるSeV/DCによる放射線併用免疫遺伝子治療の抗腫瘍効果の検討とメカニズム解析を行い、抗腫瘍効果を認め、初期のエフェクター細胞は、NK細胞とCD4陽性T細胞が有力であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To establish the novel treatment for neuroblastoma, we assessed the anti tumor effect and the analysis of mechanism of the immunotherapy with local radiation by Sendai Virus/Dendritic cell for neuroblastoma using MYCN transgenic mouse. The anti tumor effect for neuroblastoma of the immunotherapy with local radiation by SeV/DC was demonstrated. The possibility was suggested that the NK cell and CD4 positive T-cell was the primitive effector cells for this immunotherapy.

研究分野：小児外科

キーワード：小児がん 神経芽腫 免疫治療 センダイウイルス 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

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不良である。樹状細胞（dendritic cell: DC）を用いた免疫療法は、進行悪性腫瘍に対する次世代治療として期待され、主に成人における種々の進行悪性腫瘍症例への臨床試験が行われているものの、現時点で十分に満足する結果は得られていない。我々は、最近、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出し、マウス神経芽腫細胞株であるC1300のマウス皮下腫瘍モデルを用いた前臨床試験を施行した。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。

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（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。

2. 研究の目的

神経芽腫に対する新規治療法の確立を目指して、神経芽腫の臨床患者に最も近い動物モデルであるMYCN TgMを用いて新規治療法であるSeV/DCによる放射線併用免疫遺伝子治療の抗腫瘍効果の検討とメカニズム解析を行う。さらに既存の化学療法や他の試験的治療薬との併用治療の効果を検討して神経芽腫に対するSeV/DCを含む新規の標準的治療を考案することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究の具体的な研究計画・方法の要旨としては、まず、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、C1300のマウス皮下腫瘍モデルを用いた前臨床試験と同様の手法を用いるが、最も異なる点としては、1回目のSeV/DCの投与は、ヒトにおいて予定している臨床試験と同じく、開腹手術を行い、腹腔内腫瘍内に直接注入することである。この前臨床試験データを踏まえて、MYCN TgMに対するSeV/DCと既知の化学療法、及び新規分子標的治療薬併用による抗腫瘍効果の検討を引き続き行い、神経芽腫に対するSeV/DCを含む新規の標準的治療を考案するために、これら全ての前臨床試験データを総合的に解析する。

4. 研究成果

1. 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た。
2. 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。
3. 樹状細胞を分注し、凍結保存した。

4. 凍結保存した樹状細胞の一部を解凍し培養系にうつし、翌日センダイウイルスベクターをMOI100にて感染させ、遺伝子導効率および樹状細胞の細胞特性をFACSにて確認した。

5. マウスは「放射線前照射併用SeV/DC治療群」「SeV/DC治療群」「放射線照射のみの群」「非治療群」の4群に分け、各群n=5とした。

6. 放射線前照射

生後3週目のホモのMYCNトランスジェニックマウスを、MRI撮影にて腹腔内に神経芽腫が発生していることを確認した後、鉛遮蔽板の裏側に鎮静をかけたマウスを固定し、エックス線照射装置を用いて、体外より腫瘍局所的にエックス線を1日4Gy、合計3日間照射した。

7. SeV/DCによる治療

SeVを感染させて48時間後の樹状細胞(SeV/DC)を 1×10^6 個/100 μ Lに調整し、MYCNトランスジェニックマウスを開腹し直視下にSeV/DCを腫瘍内投与する。SeV/DCによる治療は、1週間に1回、合計3回施行した。

8. MRIあるいはCTにて治療効果の確認
1週間に1回MRI撮影にて腫瘍サイズを確認し、生存率も同時に検討した。

その結果として、「放射線前照射併用SeV/DC治療群」にて腹腔内に発生する神経芽腫の体積が、非治療群に対して有意に抑制されたが、マウスの生存日数には、影響を与えなかった。

9. 抗腫瘍効果の免疫メカニズム解析

抗腫瘍効果を担うエフェクター細胞を同定するために、治療開始後のNK細胞活性およびCTL活性を測定し、また抗体を用いてNK細胞およびCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞を除去し、抗腫瘍効果にどのよ

うな影響を及ぼすかを確認する。また、MRIによる解析で腫瘍が縮小した状態で長期生存例に関して腫瘍を摘出し、分化傾向などの組織学的検討、及び、免疫染色により、エフェクター細胞(NK細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞など)の組織浸潤の検討を行った。

その結果として、エフェクター細胞としてNK細胞、CD4陽性T細胞が初期の抗腫瘍効果に重要であることが示唆された。

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9件)

1. Janette M, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K :Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma, BioMed Cancer、査読有、2014 DOI : 10.1186/1471-2407-13-608.
2. 米倉竹夫、田尻達郎、伊勢一哉、小野滋、大植孝治、佐藤智行、杉藤公信、菱木知郎、平井みさ子、文野誠久、本多昌平、風間理郎、杉山正彦、中田光政、仲谷健吾、脇坂宗親、近藤知史、上原秀一郎、鬼武美幸、木下義晶、日本小児外科学会悪性腫瘍委員会、小児の外科的悪性腫瘍、2012年登録症例の全国集計結果の報告、日小外会誌、査読無、50巻、2014、114-150

3. Hirakawa M, Nishie A, Asayama Y, Fujita N, Ishigami K, Tajiri T, Taguchi T, Honda H, Efficacy of preoperative transcatheter arterial chemoembolization combined with systemic chemotherapy for treatment of unresectable hepatoblastoma in children, *Jpn J Radiol*, 査読有、32 巻、2014、529-536
 4. Sakai K, Kimura O, Furukawa T, Fumino S, Higuchi K, Wakao J, Kimura K, Aoi S, Masumoto K, Tajiri T, Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in a rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 査読有、49 巻、2014、1749-1752
 5. 竹内雄毅、樋口恒司、坂井宏平、文野誠久、青井重善、古川泰三、木村修、田尻達郎 腹部腫瘍により発見された Herlyn-Werner-Wunderlich 症候群の 1 例、*日本小児外科学雑誌* 査読有、第 50 巻 第 1 号、2014、76-80、DOI : 10.11164/jjsps.50.1_76
 6. 樋口恒司、木村修、古川泰三、文野誠久、青井重善、坂井宏平、土屋邦彦、家原知子、細井創、田尻達郎 胸壁悪性軟部肉腫に対する肋骨合併切除・胸郭再建術、*小児外科*、査読無、46 巻、2014、120-124
 7. 文野誠久、金聖和、坂井宏平、樋口恒司、青井重善、古川泰三、木村修、田尻達郎 腸間膜リンパ管腫切除術、*周小児外科*、査読無、46 巻、2014、143-147
 8. 文野誠久、加藤久尚、樋口恒司、出口英一、田尻達郎 胆汁うっ滞 先天性胆道拡張症、*周産期医学*、査読無、2014、1343-1346
 9. 文野誠久、坂井宏平、東真弓、青井重善、古川泰三、田尻達郎 膵・胆管合流異常の診断の最前線、膵・胆管合流異常における DIC-CT の診断意義 胆と膵、35 巻、査読無、2014、897-900
- [学会発表](計 5 件)
1. Fumino S, Furukawa T, Aoi S, Higuchi K, Sakai K, Iehara T, Hosoi H, Tajiri T. Surgical strategy for mediastinal neuroblastic tumors in children: a single institution experience. *Advances in Neuroblastoma Research*. 2014 May 13-16; Köln, Germany.
 2. Sakai K, Kimura O, Furukawa T, Higuchi K, Wakao J, Kimura K, Fumino S, Aoi S, Masumoto K, Tajiri T. Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in rat models of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. 47th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2014 May 24-29; Banff Canada.
 3. Fumino S, Kimura K, Iehara T, Nishimura M, Nakamura S, Souzaki R, Nishie A, Taguchi T, Hosoi H, Tajiri T. Validity and reliability of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from 2 territorial centers in Japan. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology. 2014 Oct

21-26; Tronto, Canada.

4. 田尻達郎 . 小児外科医療の進歩-QOL 向上を目指してー【特別講演】. 京都小児科医会総会 2014 年 6 月 7 日 ; 京都
5. 田尻達郎 . QOL を重視した小児外科医療の進歩【特別講演】. 相楽小児科医会学術講演会 2014 年 9 月 20 日 ; 京都 .

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

該当なし

取得状況 (計 件)

該当なし

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田尻達郎 (TAJIRI TATSUROU) 京都府立医科大学・小児外科・教授
研究者番号 : 80304806

(2)研究分担者

田口智章 (TGUCHI TOMOAKI)・九州大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号 : 20197247

米満吉和 (YONEMITSU YOSIKAZU)・九州大学・薬学研究科・教授
研究者番号 : 40315065

門松健治 (KADOMATSU KENJI)・名古屋大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号 : 80204519

(3)連携研究者

該当なし