

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659644

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍に対する放射線・ERストレス負荷免疫療法の研究

研究課題名(英文) Radio-immune fusion therapy for cancer; ER stress loading with radiation and celecoxib

研究代表者

坪井 康次 (Tsuboi, Koji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90188615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、Celecoxibが、マウスglioma細胞株GL261に対する放射線の効果を増感することを示し、そのメカニズムがCelecoxibによるERストレスの負荷であることを明らかにした。次に、蛍光蛋白質を発現する細胞株GL261-mKOを同系アルビノC57BL/6マウスの大腿皮下へ移植したモデルにおいて、大腿皮下腫瘍へのX線照射とともにCelecoxib 5mg/kgを併用することで再発が有意に抑制されることを示した。さらに、大腿の腫瘍が制御されたマウスでは、その後脳内へ腫瘍を移植しても拒絶され、脾細胞のELISPOT assayの結果から抗腫瘍免疫効果が得られていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the anti-inflammatory drug celecoxib significantly enhanced the radiosensitivity of mouse glioblastoma cells GL261 by loading ER stress. Based on this, we established GL261 cells constitutively expressing monomeric Kusabira-Orange (GL261-mKO) that were used to generate a mouse thigh subcutaneous tumor model in syngenic albino C57BL/6 mice, in which tumor size can be monitored by an in vivo imaging system. In experiments with local X-ray irradiation (IR) to tumors in this system, the cure rate was significantly higher with the concomitant oral administration of 5mg/kg of celecoxib as compared to IR alone. Furthermore, the same tumor cells that were re-challenged to the brain in the cured mice were all rejected, while they grew rapidly in mice that showed tumor regrowth after IR. ELISPOT assay demonstrated that IFN-gamma level was significantly elevated in mice that rejected re-challenged tumor cells, indicating that anti-tumor cellular immunity was established.

研究分野：脳神経外科学・放射線生物学

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：悪性脳腫瘍 放射線 腫瘍免疫 ERストレス Celecoxib

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍は極めて難治性な腫瘍である。我々はこれまで、悪性脳腫瘍患者に対してキラーTリンパ球や高活性ナチュラルキラー細胞による細胞療法を行なうとともに、自己腫瘍組織を抗原として用いた「自家腫瘍ワクチン」の臨床的有用性を報告してきた。

一方、我々は、悪性脳腫瘍細胞に対する放射線照射後に腫瘍細胞表面の腫瘍関連抗原提示装置 (MHC-I) と、アポトーシスのスイッチ (Fas) の発現が亢進することを報告したが、臨床経験からも通常の放射線治療単独では全身的な腫瘍免疫を賦活するほど免疫原性を高めることは困難である。

一方極最近、細胞に「小胞体 (ER) ストレス」を与えることで、細胞は Calreticulin やリン脂質などのいわゆる「eat me signal」を発現し、マクロファージや樹状細胞に貪食され、腫瘍の抗原提示現象が亢進することが明らかにされている。すなわち、放射線照射に ER ストレスを追加することで腫瘍細胞死の誘導とともに特異的腫瘍免疫反応が亢進し、残存する腫瘍は細胞性免疫機構により排除される可能性が高くなることが示唆されている。

我々は、COX-2 の選択的阻害剤である「Celecoxib」が、低酸素状態にある脳腫瘍細胞に対する放射線増感作用を持つとともに小胞体ストレスを負荷する作用を持つことを発見した (Neuro-Oncol 2013)。そこで本研究では、悪性脳腫瘍に対する放射線治療に Celecoxib を投与することで抗腫瘍効果とともに腫瘍免疫反応を促進できるかどうかを検証する。

2. 研究の目的

本研究では、放射線照射の効果を COX-2 阻害剤で増強するとともに、小胞体 (ER) ストレスを高めて全身的な腫瘍特異的免疫反応を誘導することで、悪性脳腫瘍の治療を促進できるか否かを検証する。

まず局所的なエックス線照射前に COX-2 阻害剤である Celecoxib を投与しておき腫瘍細胞の細胞死を誘導し免疫抑制状態を解除する。その後再度 Celecoxib を投与して小胞体ストレスを与えることにより、腫瘍細胞からの「eat me signal」を引出し、腫瘍特異的免疫賦活効果が得られるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Celecoxib による放射線増感作用：培養下のマウス glioma 細胞 (GL261) を対象とし、Celecoxib の添加の有無により放射線感受性が異なるかどうかをコロニー形成アッ

セイで明らかにする。

(2) フローサイトメトリー法による Danger signal 誘導作用の解析：GL261 細胞を対象として、エックス線照射群、Celecoxib 添加群、エックス線照射 Celecoxib 併用群において照射後 48 時間後に細胞を回収・固定し、Calreticulin、HMGB1 の発現を FACSCalibur にて定量化する。

(3) マウス腫瘍モデルの作製：GL261 へ Kusabira-Orange 蛍光蛋白質発現用プラスミドを導入して安定して蛍光を発する細胞株 GL261-mKO を樹立し、それを同系アルビノ C57BL/6 マウスの大腿皮下あるいは脳内へ移植し、マウス腫瘍モデルを作製する。

(4) エックス線の抗腫瘍効果とアブスコバル効果の検討：このマウス腫瘍モデルにおいて、大腿皮下腫瘍へ局所的に 20Gy のエックス線照射を行い、その効果を in vivo イメージングシステム (IVIS) にて評価する。さらに、照射後一定の時間において、脳内へ同じ腫瘍を移植 (再チャレンジ) し、腫瘍が生着・増殖するかどうかを検討する。

(5) Celecoxib の増感効果の検討：同じモデルを対象とし、5mg/kg の Celecoxib を併用して経口投与した場合の腫瘍縮小効果と脳内への再チャレンジに対する反応を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Celecoxib による放射線増感作用：培養 GL261 細胞に対して Celecoxib を添加することにより線に対する増感効果が得られた (図 1)。また、そのメカニズムは Celecoxib による ER ストレスの負荷であることを明らかにした。

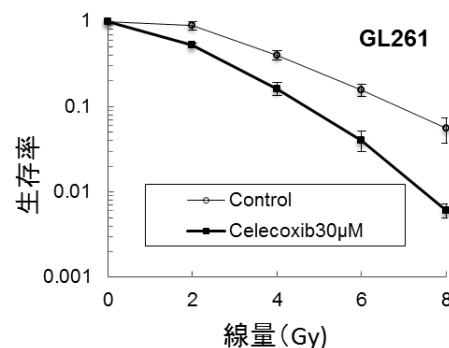


図 1 : Celecoxib 添加による放射線増感効果

(2) Danger signal 誘導作用：エックス線照射と Celecoxib の併用により、腫瘍細胞に Danger signal である、Calreticulin と HMGB1 の発現が上昇することをフローサイト

メトリー法で定量化した結果、エックス線照射と Celecoxib (10 μ M, 50 μ M) を併用することで Calreticulin と HMGB1 の発現が上昇することが示された (図 2)。

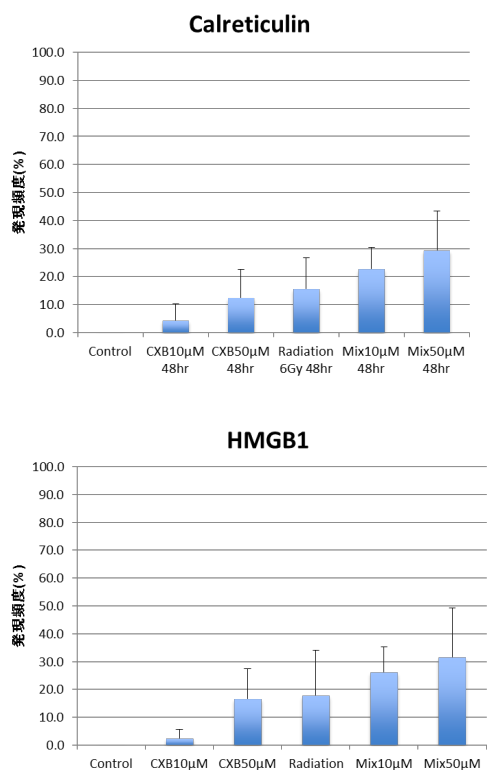


図 2 : Celecoxib 処理、エックス線照射後の GL261 細胞の Calreticulin, HMGB1 発現。(Mix とは 6Gy と Celecoxib の併用)

(3) マウス脳腫瘍及び皮下腫瘍モデル : マウス glioma 細胞 GL261 へ Kusabira-Orange 蛍光蛋白質発現用プラスミドを導入し、安定して蛍光を発する細胞株 GL261-mKO を独自に樹立し、同系アルビノ C57BL/6 マウスの大腿皮下と頭蓋内に移植した。移植腫瘍のサイズを蛍光イメージング装置 (IVIS) にてモニターした (図 3)。

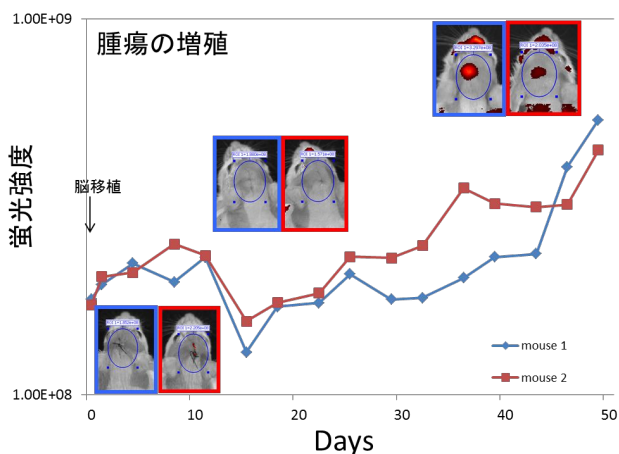


図 3 : 脳腫瘍を移植したマウスの in vivo

imaging

(4) 同マウス皮下腫瘍モデルにおいて皮下への局所照射後に脳に同じ腫瘍を移植したところ、皮下腫瘍が照射後に治癒せず増大したマウスでは、脳腫瘍モデルマウスより生存期間が短縮された。一方、皮下腫瘍が照射により治癒したマウスでは、その後に脳内へ腫瘍を移植しても拒絶され、生着しなかった。(図 4) これらのマウスの脾細胞を用いた ELISPOT assay では IFN- γ の生成が認められたことから、アプスコパル効果が得られていることが示唆された。

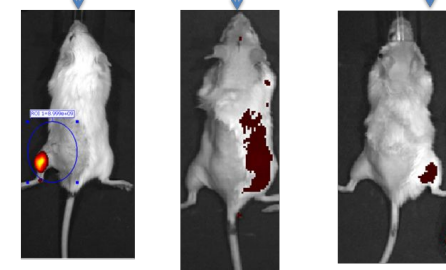
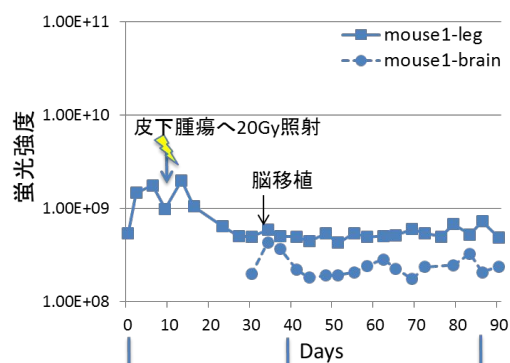
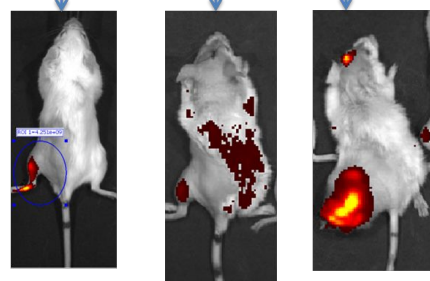
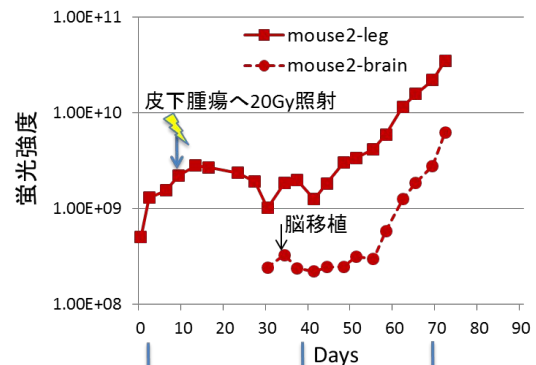


図 4 : X 線照射後、皮下腫瘍が増悪したマウス (上) と治癒したマウス (下)、治癒したマウスでは脳へ移植した腫瘍が拒絶された

(5)さらに上記のマウスモデルを用いた in vivo の検討では Celecoxib 5mg/kg、indomethacin 1mg/kg を経口投与することでエックス線照射後の大腿皮下腫瘍の再発が有意に抑制された。

局所的なエックス線照射により腫瘍細胞からは Danger signal が発せられ、腫瘍の微小環境における免疫応答の引き金となると考えられる。蛍光蛋白質を発現する細胞株 GL261-mKO を同系アルビノ C57BL/6 マウスの大腿皮下へ移植したモデルを用いた本研究で、皮下腫瘍がエックス線照射によっても制御されず増大する場合には腫瘍免疫応答は抑制されてしまうが、照射により治癒した場合には抗腫瘍免疫応答は賦活され、脳内へ再チャレンジした腫瘍は拒絶されることが明らかとなった。また、脾細胞を用いた ELISPOT assay の結果からも、治癒した場合には抗腫瘍免疫賦活効果が得られていることが示された。さらに、エックス線照射と Celecoxib を併用することで腫瘍制御率と抗腫瘍免疫賦活効果が高くな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5件)

Gerelchuluun A, Zhu J, Su F, Asaithamby A, Chen DJ, Tsuboi K. Homologous recombination pathway may play a major role in high-LET radiation-induced DNA double-strand break repair. J Radiat Res. 2014 Mar 1;55 Suppl 1:i83-i84. doi:10.1093/jrr/rrt181 査読有

Abei M, Okumura T, Fukuda K, Hashimoto T, Araki M, Ishige K, Hyodo I, Kanemoto A, Numajiri H, Mizumoto M, Sakae T, Sakurai H, Zenkoh J, Ariungerel G, Sogo Y, Ito A, Ohno T, Tsuboi K. A phase I study on combined therapy with proton-beam radiotherapy and in situ tumor vaccination for locally advanced recurrent hepatocellular carcinoma. Radiat Oncol. 2013 Oct 16;8(1):239. doi: 10.1186/1748-717X-8-239. 査読有

Suzuki K, Gerelchuluun A, Hong Z, Sun L, Zenkoh J, Moritake T, Tsuboi K. Celecoxib enhances radiosensitivity of hypoxic glioblastoma cells through endoplasmic reticulum stress. Neuro Oncol. 2013 Sep;15(9):1186-99. doi: 10.1093/neuonc/not062. 査読有

Mizumoto M, Okumura T, Ishikawa E,

Yamamoto T, Takano S, Matsumura A, Oshiro Y, Ishikawa H, Sakurai H, Tsuboi K. Reirradiation for recurrent malignant brain tumor with radiotherapy or proton beam therapy: Technical considerations based on experience at a single institution. Strahlenther Onkol. 2013 Aug;189(8):656-663. doi: 10.1007/s00066-013-0390-6. 査読有

Mizumoto M, Oshiro Y, Tsuboi K. Proton beam therapy for intracranial and skull base tumors. Transl Cancer Res 2013;2(2):87-96. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.08 査読有

[学会発表](計5件)

善光純子、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、洪正善、鈴木健之、孫略、伊東一也、三輪佳宏、坪井康次、エックス線照射による腫瘍免疫応答の細胞死が脳内へ及ぼす影響、第4回国際放射線神経生物学会大会、2014年1月17日、高崎シティーギャラリー、高崎、群馬

石川隆昭、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、洪正善、孫略、鈴木健之、善光純子、盛武敬、Aroumougame Asaithamby, David J. Chen、坪井康次、治療用陽子線とエックス線による clustered DNA damage の形成、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日-5日、パシフィコ横浜、横浜、神奈川

ゲレルチュルン・アリウンゲレル、石川隆昭、鈴木健之、洪正善、孫略、伊東一也、真鍋絵梨、善光純子、榮武二、盛武敬、Asaithamby A, David JC、坪井康次、治療用陽子線とガンマ線による DNA 損傷修復メカニズムにおける NHEJ と HR の役割、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日-5日、パシフィコ横浜、横浜、神奈川

Zhengshan Hong, Yuki Kase, Takashi Moritake, Ariungerel Gerelchuluun, Lue Sun, Kenshi Suzuki, Kazunori Anzai, Takeji Sakae, Koji Tsuboi, Lineal energy-based evaluation of oxidative DNA damage induced by proton beams and X-rays. 52nd Annual Conference of the Particle Therapy Co-Operative Group (PTCOG 52) 2013.6.3-8. エッセン ドイツ

鈴木健之、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、洪正善、孫略、盛武敬、坪井康次、セレコキシブは、小胞体ストレスを負荷

して低酸素下の膠芽腫細胞の放射線感受性を上げる、第 19 回癌治療増感研究会、2013年6月8日、東京医科歯科大学、文京区、東京

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 康次 (TSUBOI, KOJI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90188615

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

大野 忠夫 (OHNO, TADAO)
早稲田大学・理工学術院・客員教授
研究者番号：90160580