

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861159

研究課題名(和文) 超免疫不全マウスを用いた膠芽腫に対する免疫細胞化学療法の開発

研究課題名(英文) New approach for glioblastoma with immuno-chemotherapy using severe immunodeficiency mouse

研究代表者

松田 良介 (MATSUDA, RYOSUKE)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60453164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既存の治療方法では根治が難しい膠芽腫に対する新規治療の確立を目指して行っている。免疫細胞である T細胞とbisphosphonateとの併用療法により、マウスに対する膠芽腫細胞株移植実験において、抗腫瘍効果を認めた。また、NK細胞と抗癌剤temozolomideの併用実験では、TMZ感受性株では相加効果が、TMZ耐性株ではNK細胞のみ抗腫瘍効果が得られた。NK細胞、T細胞ともに新規治療の有望な治療となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our aim to investigate is to establish the new approach for glioblastoma. We demonstrated that combination therapy with gamma delta T cell and bisphosphonate had a significant strong anti-tumor effect for transplanted glioblastoma cells into NOG mouse. In second experiment, we demonstrated that NK cells had a strong anti-tumor effect for temozolomide-resistant glioblastoma cells in vitro. In conclusion, gamma delta T cell and NK cells are promising cell source for glioblastoma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍 膠芽腫 NK細胞 T細胞 temozolomide 免疫療法 bisphosphonate

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は現在の標準治療である手術、放射線療法、化学療法をもってしても5年生存率が10%を超えず予後不良の腫瘍であり、既存の治療にとらわれない新たな治療法が切望されている。一方で膠芽腫に対する免疫療法として細胞傷害性細胞(キラー細胞)、とりわけ

T細胞やNK細胞と呼ばれるMHC非拘束性キラー細胞を用いた治療法が現在注目されている。これらのキラー細胞を用いた免疫細胞療法と既存の化学療法を融合させた免疫細胞化学療法はこれまでに報告は少なく、膠芽腫に対する治療効果を改善させる可能性がある。

2. 研究の目的

我々はこれまでにヒト末梢血由来 T細胞の増幅培養法を確立している。本細胞の膠芽腫由来細胞株に対するキラー活性は骨粗鬆症薬であるBisphosphonateによって強力に誘導され、その認識機構に T細胞が発現するT細胞受容体とDNAM-1が関与することを報告している。(J neuro-oncology Sep 24:2013)また従来よりLymphokine-activated killer (LAK)と呼ばれる古典的なNK細胞輸注療法が膠芽腫に対して実施されているが、我々はこれまでにLAK療法に採用されていた培養法よりもNK細胞の純度と増幅倍率が高い培養法を確立している。本細胞は膠芽腫細胞株に対するキラー活性がLAKの1.6倍高いことを確認している。これら2つのキラー細胞を用いた免疫療法と既存の化学療法を併用した免疫細胞化学療法の効果をよりの確に評価するためにはin vitro実験系では不十分であり、マウス等の動物を用いたin vivo実験系が不可欠である。またヒトとマウスの免疫系には相違点が存在するため、よりの確に免疫細胞化学療法の効果を評価するためには、ヒト由来の膠芽腫細胞ならびに免疫細胞を用いてよりヒトに近い条件下で評価することが求められる。NOGマウスはNOD/Shi-scidのIL-2受容体鎖をロックアウトした重度免疫不全マウスで、ヒト由来細胞の生着率が高く、免

疫細胞化学療法 of 膠芽腫退縮効果の判定に適したマウスである(J Immunol.

191:1993-2000:2013)。本研究の目的は in vivo かつヒトに近い条件下でMHC非拘束性キラー細胞を用いた免疫細胞化学療法 of 膠芽腫退縮効果ならびに安全性を評価することである。

3. 研究の方法

本研究では2種類の実験系を作成して検討を行った。T細胞とbisphosphonateであるminodrate(MDA)を併用したNOGマウスへの膠芽腫細胞株U87MGの移植実験 NK細胞とtemozlomide(TMZ)を併用したTMZ感受性細胞株(U87MG)とTMZ耐性株(U138MG)に対する増殖抑制試験である。

実験

1) T細胞調整: 健常人末梢血よりLymphoprep®を用いた比重遠心分離法によって単核細胞を分離し、5%自己血漿ならびに高濃度のIL-2を含むAIM-V培地に終濃度1µMのゾメタ®を培養初発時のみ加えて培養を行う。以後、細胞の増幅培養に際してはIL-2含有AIM-V培地にて増幅培養を行う。14日間の増幅培養後、MACSを用いてT細胞を除去し、T細胞の純度を高める。

2) 膠芽腫細胞株: ヒト膠芽腫由来細胞株であるU87MGを用いる。TMZをはじめとするアルキル化剤はDNA修復酵素であるO6-methylguanine methyltransferase(MGMT)によって効果が減弱されることが知られている。U87MGはMGMT非発現でTMZに感受性である。

3) NOGマウスへの移植実験: 10⁶個のU87MG細胞株を皮下に移植し、対照群、MDA群、T細胞群、MDA/T細胞群に分けて抗腫瘍効果を検討した。

実験

1) NK細胞の調整: 健常人末梢血よりLymphoprep®を用いた比重遠心分離法によって単核細胞を分離する。MACS等を用いて特定の細胞集団を除去し、高濃度IL-2を含む含有AIM-V培地にて培養を開始する。以降、細胞

の増幅培養に際してはIL-2 含有AIM-V 培地にて増幅培養を行う。14～21 日間の増幅培養を実施する。

2) 膠芽腫細胞株: TMZ感受性株U87MGおよび耐性株であるU138MGを用いる。

3) 膠芽腫細胞株に対するNK細胞とTMZ併用下での増殖抑制試験: TMZは50 μ M、NK細胞と膠芽腫細胞数を、0:1、1:1、1:2で調整する。

4 . 研究成果

実験 : U87MG を 10^6 個移植し、day0 に MDA および T 細胞を移植し、抗腫瘍効果を検討した。結果、移植後 7 週間目で MDA/ T 細胞共移植群において、有意に腫瘍退縮効果が得られた。

実験 : TMZ 感受性株 U87MG では、NK 細胞比が高い群で有意に増殖抑制効果が示された。TMZ に加えて NK 細胞を加えることにより、増殖抑制効果はさらに向上した。一方、TMZ 耐性株 U138MG では、TMZ の抗腫瘍効果はみられず、NK 細胞比が高い群で有意に増殖抑制効果が得られ、TMZ 耐性でも強力な抗腫瘍効果を発揮する可能性が示された。

我々の実験結果から、T 細胞や NK 細胞と呼ばれる MHC 非拘束性キラー細胞は、膠芽腫細胞株に対してそれぞれ抗腫瘍効果を発揮していることが証明された。T 細胞については、in vivo では単独での抗腫瘍効果は認められないものの、bisphosphonate を併用することにより強力な抗腫瘍効果が確認された。また NK 細胞は、TMZ 感受性・耐性にかかわらず、強力な抗腫瘍効果を発揮しており、TMZ 感受性株では TMZ に対する上乗せ効果、TMZ 耐性株では NK 細胞自身の抗腫瘍効果が期待される。実験期間内では、NK 細胞および TMZ を併用した NOG マウスへの移植実験が終了しておらず、今後実験系を継続して、in vivo における抗腫瘍効果を検証する必要がある。

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 2 件)

1) Nakazawa T, Nakamura M, Matsuda R, et al.

The third generation nitrogen-containing bisphosphonate Minodronate exerts antitumor effects against human glioblastoma in cooperation with T cells *in vitro* and *in vivo* in submission

2) Nakase K, Matsuda R, Nishimura F, Nakamura M, et al. A Case of Symptomatic Cyst Formation after BCNU Wafer Implantation for Glioblastoma.

No Shinkei Geka.43(8):747-52. 2015

3) Matsuda R, et al. Glioblastoma Multiforme in the Pineal Region With Leptomeningeal Dissemination and Lumbar Metastasis. J Korean Neurosurg Soc 58(5):479-482:2015

[学会発表](計 5 件)

1) 中澤務, 中村光利, 松田良介, 朴永銖, 本山靖, 新靖史, 弘中康雄, 中川一郎, 西村文彦, 丸谷明子, 王寺典子, 辻村貴弘, 王寺幸輝, 吉川正英, 中瀬裕之: ヒト末梢血由来細胞傷害性

T細胞は膠芽腫細胞株を殺傷する.日本がん免疫学会学術集会(2014/7/30-8/1)

2) 松田良介, 中村光利, 中澤務, 西村文彦, 辻村貴弘, 中瀬裕之: 膠芽腫細胞株におけるミノドロン酸の抗腫瘍効果の検討. 日本免疫治療学研究会学術集会(2015/2/28)

1) Nakazawa T, Nakamura M, Matsuda R, Park SY, Motoyama Y, Hironaka Y, Nishimura F, Nakagawa I, Tamura K, Takeshima Y, Marutani A, Omoto K, Tanaka Y, Oujii Y, Yoshikawa M, Tsujimura T, Nakase H. Minodronate exerts antitumor effects against human glioblastoma in cooperation with peripheral blood-derived T cells. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages2015 (2015/7/9-11)

2) 丸谷明子, 中村光利, 松田良介, 西村文彦, 朴永銖, 本山靖, 弘中康雄, 中川一郎, 田村

健太郎, 竹島靖浩, 尾本幸治, 田中祥貴, 中瀬裕之: 膠芽腫細胞株におけるミノロン酸の抗腫瘍効果の検討, 第74回日本脳神経外科学会学術総会(2015/10/14)

3) **中村光利, 中澤務, 松田良介**, 朴永銖, 本山靖, 弘中康雄, 中川一郎, 西村文彦, 丸谷明子, 尾本幸治, 田中祥貴, 中瀬裕之
膠芽腫細胞株におけるミノロン酸の抗腫瘍効果の検討. 第33回日本脳腫瘍学会学術総会(2015/12/7)

〔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
松田 良介 (RYOSUKE MATSUDA)
公立大学法人奈良県立医科大学
脳神経外科・助教
研究者番号: 60453164

(2) 研究分担者
()

研究者番号:
(3) 連携研究者
()

研究者番号: