

平成30年 5月31日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861170

研究課題名(和文) グリオーマに対する5-アミノレブリン酸併用放射線照射における免疫機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of immuno-responsive mechanism by 5-ALA and irradiation therapy

研究代表者

中野 良昭 (NAKANO, Yoshiteru)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：10435125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：C3H/HeNマウスにグリオーマ細胞株(RSV-M)を使用した皮下腫瘍モデルを作成し5-aminolevulinic acid(5-ALA)の経口投与、放射線照射を施行し腫瘍増殖抑制を認めた。in vitroで5-ALAによるマクロファージからの免疫抑制因子であるプロスタグランジンE2(PGE2)産生抑制を認め、PGE2合成酵素であるCOX-2とmPGES-1の発現が抑制された。5-ALAを処理したマクロファージとRSV-Mを共培養すると、5-ALA濃度依存的に細胞傷害活性を認めた。5-ALAはPGE2によるマクロファージの免疫逃避機構を解除し抗グリオーマ効果をもたらすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：A subcutaneous tumor model using a glioma cell line (RSV-M) was prepared for C3H / HeN mice and oral administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) was performed, and tumor growth suppression was confirmed. 5-ALA inhibited the prostaglandin E2 (PGE2) production, which was an immunosuppressive factor in macrophages, and the expression of PGE2 synthetases COX-2 and mPGES-1 was suppressed. When macrophages treated with 5-ALA were co-cultured with RSV-M, the cytotoxic activity was confirmed in a 5-ALA concentration-dependent manner. 5-ALA released the immune escape mechanism of macrophages by PGE2, resulting in anti-glioma effect.

研究分野：脳腫瘍、腫瘍免疫

キーワード：悪性脳腫瘍 グリオーマ 5-ALA PGE2 マクロファージ 免疫逃避機構

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍(グリオーマ)に対して、手術・化学療法・放射線療法・免疫療法などの集学的治療が行われているが、依然致命率が高く、これら治療成績は約30年間変わっていないのが現状である。光感受性物質を使用した光線力学療法は、光感受性物質に、特定の波長のレーザー光を照射することで、それ自体が励起され、基底状態に戻る際に、別の波長の光を発する(蛍光)。また、別の性質として、その過程で、活性酸素(一重項酸素)を発生し、細胞傷害活性を生じる。前者は光線力学診断として、後者は光線力学療法として、さまざまな癌患者に幅広く使用されている。脳神経外科領域においては、5-ALAを使用した光線力学診断が臨床の現場で行われている。光線力学療法は、皮膚癌や胃癌などでは臨床応用されているが、脳腫瘍に対してはほとんど利用されていない。5-ALAは、ヘムの前駆体であるアミノ酸であり、生体外より投与された5-ALAは、ミトコンドリア内へ取り込まれいくつかの代謝経路を経てプロトポルフィリンIX(PpIX)となる。このPpIXが光感受性物質の性質を有する。光感受性物質であるポルフィリン化合物は、放射線感受性作用を持つことが知られており、われわれは、5-ALAには、放射線感受性増強効果があり、さらに5-ALAと放射線照射併用により活性酸素種が誘導されることをグリオーマ細胞株を用いて証明してきた(Yamamoto J: Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in glioma cells in vitro. *Oncology Reports* 27:1748-52, 2012)。また、近交系ラットにグリオーマ9L細胞を移植した皮下腫瘍モデルにおいて、5-ALAと放射線照射により腫瘍増殖抑制効果を認めた。この結果より、レーザー光の代わりに放射線照射を使用した“5-ALA併用放射線照射療法”が実現する可能性がある。さらに、腫瘍周囲には免疫細胞の浸潤を認めることから、腫瘍増殖抑制には活性酸素種以外の機序が考えられ、免疫応答が関与していると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、5-ALA併用放射線照射療法を施行し、腫瘍細胞傷害活性に関与する免疫細胞であるマクロファージやミクログリアのはたらきを解析する。今までに光線力学療法によりマウス腹腔マクロファージからのTNF産生量が増強されたと報告がある(Evans S: Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Natl Cancer Inst* 82:34-9, 1990)。これらの報告から腫瘍細胞傷害機序にはTNFが関与していると推測される。また、われわれはグリオーマ宿主の免疫抑制機構に腫瘍会合性マクロファージが産生するプロスタグランジンE₂(PGE₂)が関与すること

を見いだしている(Nakano Y: Induction of macrophagic prostaglandin E₂ synthesis by glioma cells. *J Neurosurg* 104:574-82, 2006, Nakano Y: Induction of prostaglandin E₂ synthesis and microsomal prostaglandin synthase-1 expression in murine microglia by glioma-derived soluble factors. *Laboratory investigation. J Neurosurg* 108:311-9, 2008)。そこで、5-ALA併用放射線照射療法での免疫抑制機構への関わりを解明し、脳腫瘍増殖の抑制あるいは進行に影響している因子やサイトカインの関与を解析する。

3. 研究の方法

(1) マウスを使用した脳腫瘍モデルを作製し、5-ALA併用放射線照射の評価 C3H/HeNマウスにRSV-Mグリオーマの皮下腫瘍モデルを作成する。マウスに5-ALA(100mg/kg)を投与し、放射線照射を行い、腫瘍増殖サイズの変化を経時的に評価する。その時の生存期間、体重変化、食事摂取量や運動量の推移を評価する。

また、腫瘍組織をホモゲナイズし、リアルタイムPCRを用いてPGE₂や各種サイトカインのmRNA発現差を測定する。5-ALAから代謝されるPpIXの産生量が多いと、より高い放射線感受性を示すことや、放射線の分割照射で、細胞傷害活性が増強されていることから、照射量や照射回数を変更し、効果的な放射線照射条件を検討する。

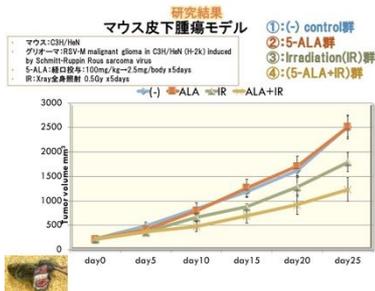
(2) 5-ALAによるマクロファージからのサイトカイン産生量やmRNA発現差の解析 チオグリコレートで誘導したマウス腹腔渗出細胞からマクロファージを採取培養し、光感受性物質である5-ALA(100μM~1mM)で処置し、数時間培養後(6h~18h)にマクロファージから産生されるサイトカインの産生量をELISA法で測定、あるいはリアルタイムPCRを用いてmRNAの発現差を測定する。

(3) 5-ALAによる免疫抑制因子であるPGE₂産生の解析 PGE₂は代表的な免疫抑制因子であり、TNFやIL-12のサイトカイン産生を抑制しTh1タイプ免疫応答を抑制し、細胞傷害活性を抑制させる。PGE₂をEIA法にて測定し、産生量の増強があれば合成酵素であるPLA₂、COX、PGESのmRNAの発現差をリアルタイムPCRで測定する。

(4) 5-ALA処理後マクロファージによる腫瘍細胞傷害活性の解析 5-ALAを処理したマクロファージとグリオーマ細胞株を共培養させ、MTTやWST-1を使用した細胞傷害性アッセイを使用し細胞傷害活性を評価する。

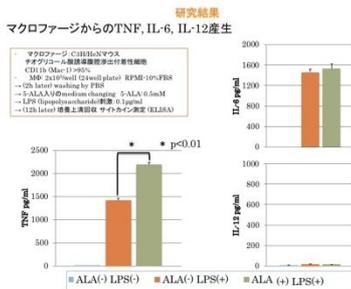
4. 研究成果

(1) 放射線照射群(Xray: 0.5Gy 5日間)で腫瘍増殖が抑制され、さらに5-ALA(100mg/kg経口投与)を加えた5-ALA+放射線照射群で腫瘍増殖抑制が著明であった(図1)。経過中に明らかな体重減少があるマウスは放射線照射による有害事象と判断し、研究対象からは除外することとした。脳腫瘍皮下腫瘍モデルによるin vivo実験にて5-ALAを投与することによる腫瘍増殖抑制傾向のあることを確認できた。

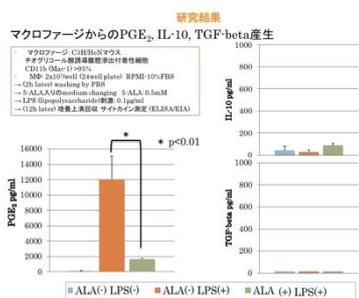


(図1)

(2) チオグリコレートで誘導したC3H/HeNマウスの腹腔マクロファージを培養し、5-ALA(0.5mM)で処置し、数時間培養後にマクロファージから産生されるTNF, IL-6, IL-10, IL-12, TGF-beta, PGE₂の産生量を測定した。マクロファージを活性化させるため、LPS(0.1 μg/ml)での刺激を行った。5-ALAにより、抗腫瘍性サイトカインであるTNFの産生が増強し(図2) さらに免疫抑制因子であるPGE₂は抑制される結果であった(図3)。



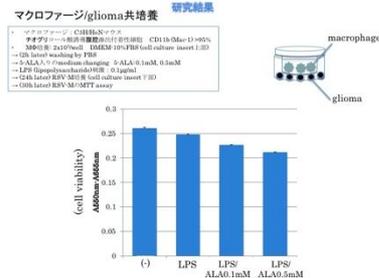
(図2)



(図3)

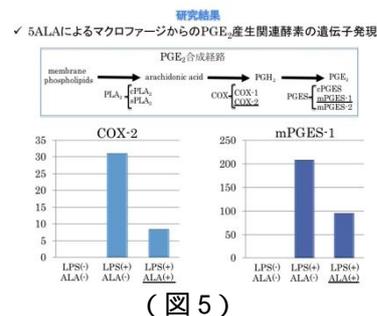
(3) 5-ALA(0.1mM, 0.5mM)を処理したC3H/HeNマウス腹腔マクロファージとグリオーマ細胞株(RSV-M)をセルカルチャーインサートを使用し共培養を行い、MTTアッセイにてグリオーマ細胞傷害活性を評価すると、5-ALA濃度依存的にグリオーマ細胞傷害活性

を認めた(図4)。これらの細胞傷害活性には5-ALAによるマクロファージからの抗腫瘍性サイトカインであるTNFの産生増強と免疫抑制因子であるPGE₂産生抑制が関与していると考えられた。



(図4)

(4) 5-ALAによりマクロファージ内でPGE₂の合成酵素であるCOX-2とmPGES-1の発現が抑制されることが分かり、その結果PGE₂の産生を抑制すると考えられた(図5)。



(図5)

本研究によって、グリオーマに対する5-ALAと放射線照射併用療法による腫瘍抑制機序として免疫担当細胞であるマクロファージの関与が証明された。5-ALAはマクロファージへ取り込まれ、細胞質内でプロトポルフィリンIXを産生し、TNFの産生を増強させ、PGE₂の産生を抑制させた。PGE₂産生抑制には合成酵素であるCOX-2とmPGES-1の発現が関与していた。さらに、5-ALA処理後のマクロファージはグリオーマ細胞に対する細胞傷害活性を増強させた。これらの結果より、5-ALAはマクロファージの免疫逃避機構を解除し抗グリオーマ効果をもたらすと考えられた。

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3件)

Nakano Y, Yamamoto J, Takahashi M, Soejima Y, Akiba D, Kitagawa T, Ueta K, Miyaoka R, Umemura T, Nishizawa S. Pilocytic Astrocytoma Presenting with Atypical Features on Magnetic Resonance Imaging. Journal of Neuroradiology 2015 Oct;42(5):278-82 査読有 DOI:10.1016/j.neurad.2014.09.001

Yamamoto J, Ogura SI, Shimajiri S, Nakano Y, Akiba D, Kitagawa T, Ueta K, Tanaka T, Nishizawa S. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma in vivo. *Molecular medicine reports* 2015 Mar; 11(3):1813-1819. 査読有 DOI: 10.3892/mmr.2014.2991
Kitagawa T, Yamamoto J, Tanaka T, Nakano Y, Akiba D, Ueta K, Nishizawa S. 5-Aminolevulinic acid strongly enhances delayed intracellular production of reactive oxygen species (ROS) generated by ionizing irradiation: Quantitative analyses and visualization of intracellular ROS production in glioma cells in vitro. *Oncology Reports*. 2015 Feb; 33(2): 583-590. 査読有 DOI:10.3892/or.2014.3618

[学会発表](計 6 件)

中野良昭、山本淳考、高橋麻由、齋藤健、高松聖史郎、近藤弘久、長坂昌平、西澤茂：5-ALA によるマクロファージからのプロスタグランジン E₂ 産生を介する免疫抑制機構の解明 76 回日本脳神経外科学会総会、201710.12-14、名古屋

中野良昭、山本淳考、高橋麻由、秋葉大輔、植田邦裕、梅村武部、鈴木恒平、宮地裕士、長坂昌平、西澤茂：5-ALA と放射線照射によるグリオーマ治療-マクロファージによる腫瘍細胞傷害活性 75 回日本脳神経外科学会総会、201609.29-10.1、福岡

中野良昭、山本淳考、高橋麻由、秋葉大輔、北川雄大、植田邦裕、梅村武部、鈴木恒平、宮地裕士、長坂昌平、西澤茂：5-ALA と放射線照射によるグリオーマ治療におけるマクロファージを介した免疫機序の解析 12 回日本脳神経外科光線力学学会、201606.25-26、横浜

中野良昭、山本淳考、高橋麻由、出井勝、副島慶輝、秋葉大輔、植田邦裕、梅村武部、西澤茂：5-ALA と放射線照射によるグリオーマ治療-マクロファージの免疫抑制機構の解析 74 回日本脳神経外科学会総会、20151014-16、札幌

Yoshiteru Nakano, Junkoh Yamamoto, Mayu Takahashi, Yoshiteru Soejima, Daisuke Akiba, Takehiro Kitagawa, Kunihiro Ueta, Ryo Miyaoka, Takeru Uemura, and Shigeru Nishizawa, : Analysis of anti-glioma effects by subtype of microglia 11th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncolog, Istanbul, September 11-14, 2014.

中野良昭、山本淳考、高橋麻由、副島慶輝、秋葉大輔、北川雄大、植田邦裕、宮岡亮、梅村武部、西澤茂：5-ALA と放射線照射によるグリオーマ治療 マクロファージからのサイトカイン産生の解析 73 回日本脳神経外科学会総会、201410.9-11、東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中野 良昭 (NAKANO, Yoshiteru)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：10435125