

行政院國家科學委員會補助專題計畫成果報告

計畫名稱： 利用樹突細胞為主對神經母細胞瘤之免疫療法

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC 90-2314-B-002-180

執行日期： 民國九十年八月一日至

民國九十一年七月三十一日

計劃主持人：盧孟佑醫師 台大醫學院小兒科

共同主持人：江伯倫教授 台大醫學院小兒科

一、中文摘要

在本年度的計畫中，先行利用小鼠的神經母細胞瘤來進行相關的研究，利用小鼠的動物模式來進一步了解樹突細胞在腫瘤免疫療法上的可能機轉。我們先培養小鼠的神經母細胞瘤細胞株(Neuro-2a)，成功的維持細胞株的繁衍。第二步是將小鼠的神經母細胞瘤細胞皮下注射入免疫不全小鼠(NOD-SCID mice)，確定此神經母細胞瘤細胞株的致腫瘤性及可能的致病劑量。然後將由與神經母細胞瘤細胞株同品系的年輕小鼠(A/J strain mouse)的骨髓中將樹突細胞利用GM-CSF及IL-4加以培養出，再將神經母細胞瘤細胞的溶解物加入，再經由皮下注射入小鼠體內，追蹤小鼠對此一腫瘤細胞的免疫反應，也同時追蹤腫瘤注射入小鼠體內後小鼠存活的情形。結果能夠有效地降低腫瘤的發生，並測試最佳的神經母細胞瘤細胞溶解物濃度。最後用adenovirus vector 將IL-12基因送入樹突細胞內表現，希望能增強抗腫瘤之免疫反應，有效地降低腫瘤的發生。

關鍵詞：神經母細胞瘤、樹突細胞

Abstract

It has been recently documented that *in vitro* cultured dendritic cells can be used as a powerful tool to induce immune response. The dendritic cells pulsed with tumor cell lysate can induce protective immune response. In this project, we will use a murine neuroblastoma model to investigate the effect of dendritic cells in inducing

tumor-specific immune response. We first succeeded to maintain the murine neuroblastoma cell line (Neuro-2a). Then we injected the neuroblastoma cells into the NOD-SCID mice subcutaneously. The experiment was to prove the tumorigenicity of the neuroblastoma cell line and the dosage of the tumorigenesis. Then we grew and cultured bone marrow-derived dendritic cells *in vitro* with the supplement of IL-4, GM-CSF. All the cultured dendritic cells were confirmed by phenotypic analysis. Injection of dendritic cells pulsed with murine Neuro-2a neuroblastoma cell lysate two weeks before the challenge of tumor cells can decrease the tumor size and prolong the survival time. In addition, the effect of dendritic cells seemed to be tumor antigen dependent. However, it was also observed that unpulsed dendritic cells could also inhibit the growth of tumor cells.

We will investigate the effect of dendritic cells, transferred GM-CSF or IL-12 gene via adenoviral vector. With successful experience, we will establish a human neuroblastoma model in SCID mouse and apply this potential approach for human dendritic cell and human neuroblastoma study in this model.

Keyword: Dendritic cells, neuroblastoma

二、計畫緣由與目的：

近幾年癌症一直是全世界及國內死亡原因的首位，而截至目前為止我們對癌症的治療仍是力有未逮。一但疾病的進行較為廣泛，則只有利用外科手術、化學療法及放射線療法來加以控制。但是這些傳統的治療方法仍然無法將腫瘤的治療達到非常令人滿意的效果，許多醫學研究者還是積極地想要研發出更有效的治療方法，其中便包括如單株抗體、腫瘤疫苗、基因療法及DNA疫苗等各種方法。最近一個受到相當多重視的研究便是利用樹突細胞來進行腫瘤細胞的抗原呈現與處理，達到更佳的免疫效果，這也是本研究計畫的主要目標。

腫瘤的免疫防禦機轉的主要成分涵蓋了相當多的免疫細胞，包括T輔助細胞、B細胞、細胞毒殺性T細胞、自然殺手細胞及巨噬細胞等。我們必須強調腫瘤細胞的基本免疫反應細胞還是延遲性過敏反應性T細胞，而此類的細胞主要屬於第一型T輔助細胞。所以最早的免疫反應便是巨噬細胞將腫瘤相關性抗原處理及呈獻給T輔助細胞，而T輔助細胞經活化後會釋放出淋巴介質，這些介質再引起序列的反應。其中影響最大的是細胞毒殺性T細胞及自然殺手細胞，經過活化後便會進一步來攻擊腫瘤細胞。而B細胞也會製造一些腫瘤抗原特異性抗體，這些抗體可以進行補體固定作用，而將腫瘤細胞破壞；也可以結合在腫瘤細胞表面，再由殺手細胞或巨噬細胞進行抗體決定性細胞毒殺作用。而這些T細胞分泌出的淋巴介質如IL-2及 γ -IFN也可以進一步活化巨噬細胞，而巨噬細胞分泌的

TNF- α 及NO也都可以進行腫瘤細胞毒殺的作用。由這些機制來看，大家可以了解整個免疫防禦系統是密不可分的。

隨著分子生物學技術的進步，學者們一直想要嘗試利用基因療法來治療一些遺傳性的疾病，也有研究者想到將此種基因療法應用到癌症的患者，最近幾年在腫瘤基因療法的研究上可說是如火如荼，而且有相當多令人振奮的結果。腫瘤的基因療法主要是由病人身上將腫瘤細胞分離出後，在試管中利用已建立的帶有特定基因的載體將基因帶入腫瘤細胞內。這些帶有特定基因的腫瘤細胞培養後，進一步確定這些基因的表現，再將這些腫瘤細胞注射回人體內，以得到較佳的免疫反應。在腫瘤的基因療法中應用得最多的是淋巴介質的基因，利用IL-2或其他淋巴介質將淋巴球活化，再進一步利用這些活化的免疫細胞進行毒殺腫瘤細胞的工作。

樹突細胞在免疫反應中參與抗原的處理及呈現一直扮演著一個最重要的角色，這些年來研究者也利用外加一些生長因子如GM-CSF、IL-4及TNF- α 等淋巴介質，可以成功地在試管終將樹突細胞加以培養出。有些最近的研究報告也指出的確可以利用這些樹突細胞來誘發體內的免疫反應，尤其是應用在腫瘤方面更是許多研究者非常感到興趣的。根據去年度本人國科會研究計畫的初步結果顯示樹突細胞確有預防tumor cell seeding的效果。由於樹突細胞的應用還正在起步、再加上我們可以再加上一些淋巴介質的使用便能夠更有效地誘發一些腫瘤特異性的免疫反應，所以深深覺得在本地應該還有進行研究的空間。

神經母細胞瘤在兒童為第三常

見之腫瘤，且對單獨化學治療反應不佳，目前治療趨勢為合併外科手術、放射線治療和高劑量化學治療。但是病童往往在完全緩解數年後又復發，顯示病童在完全緩解時可能仍有微量殘存腫瘤存在，如何清除這些微量殘存腫瘤變成現階段神經母細胞瘤治療的重要課題，而免疫治療為一可能的治療方式。而且神經母細胞瘤在小鼠已有腫瘤細胞株可取得，故我們選擇神經母細胞瘤為樹突細胞免疫治療的研究對象。

本研究的主要目的是第一步要建立一個小鼠神經母細胞瘤的動物模式，再由小鼠體內培養出骨髓-衍生的樹突細胞，利用這些樹突細胞進行腫瘤免疫的實驗。如果在小鼠身上初步得到一些令人滿意的結果，我們將合併細胞介質基因轉殖如 GM-CSF、IL-12 來增強其作用。並將其應用於人類神經母細胞瘤在 SCID 小鼠之動物模式的研究，嘗試能否得到同樣增強腫瘤免疫反應的效果。如果有顯著效果，希望能進一步應用在以樹突細胞為主之神經母細胞瘤免疫治療。

三、結果與討論

在本年度的計畫中，先行利用小鼠的神經母細胞瘤來進行相關的研究，利用小鼠的動物模式來進一步了解樹突細胞在腫瘤免疫療法上的可能機轉。

- 1、建立神經母細胞瘤細胞株：我們從 ATCC 購買小鼠的神經母細胞瘤細胞株(Neuro-2a cell line)進行培養，成功的維持細胞株的繁衍。
- 2、確定此神經母細胞瘤細胞株的致腫瘤性及尋找可能的致病劑量：將小鼠的神經母細胞瘤細胞皮下注射入 NOD - scid mice，分別為 5×10^4 、 5×10^5 、 5

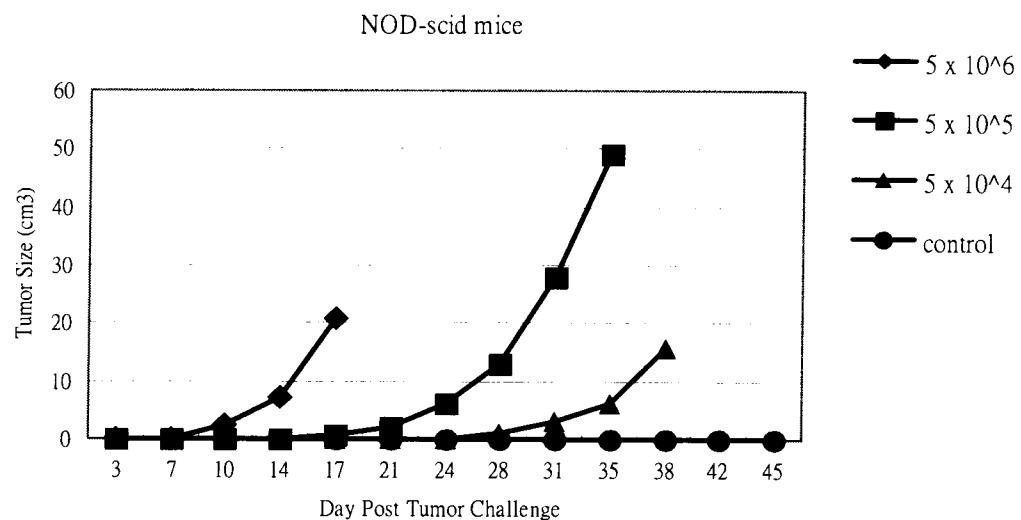
$\times 10^6$ cells /隻，然後觀察 NOD- scid mice 的皮下腫瘤大小生長情況和小鼠存活曲線。結果列於圖一、二，可發現腫瘤生長情況和小鼠存活時間與注射神經母細胞瘤細胞量呈劑量-反應相關。

3、樹突細胞的培養，並進行樹突細胞的表面抗原分析，確定培養出來的細胞為樹突細胞：由於需避免異種間的免疫反應之干擾，我們選擇與神經母細胞瘤細胞株同品系的年輕小鼠(A/J strain mouse)做為樹突細胞的來源和腫瘤細胞的宿主，也就是實驗動物。我們將小鼠的腿骨骨髓中細胞沖出，利用 GM-CSF 及 IL-4 將樹突細胞加以培養出來，培養出來的樹突細胞進行表面抗原分析，確定培養出來的細胞為樹突細胞(見圖三)。

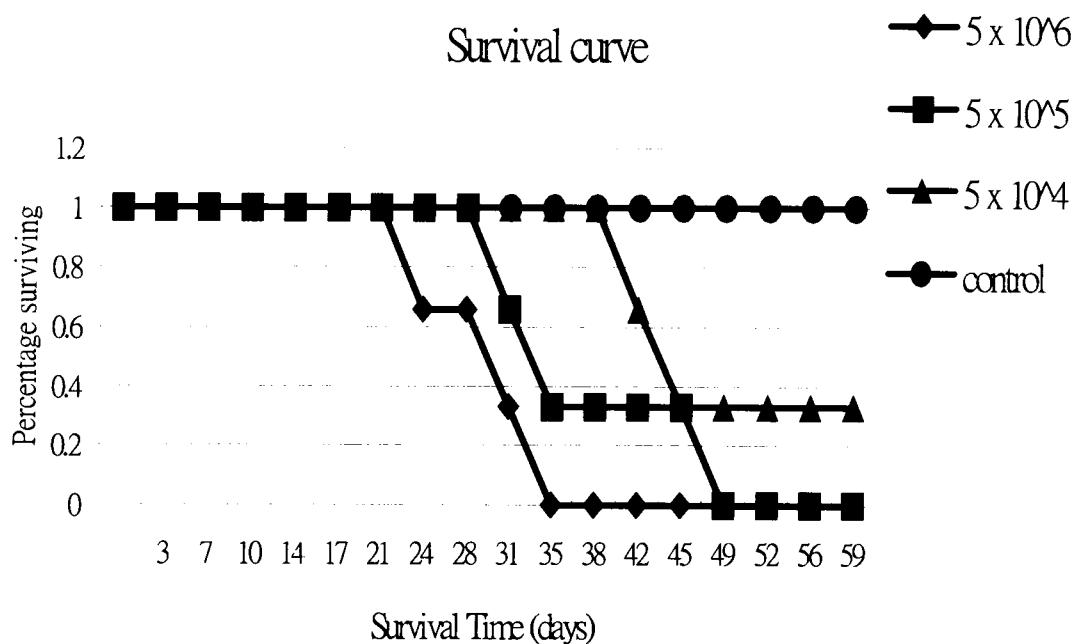
4、進行樹突細胞的腫瘤免疫療法：我們將小鼠骨髓中利用 GM-CSF 及 IL-4 培養出來的樹突細胞，加入神經母細胞瘤細胞的溶解物一起培養，再經由皮下注射入小鼠體內，隔周再注射一次樹突細胞，之後一周再注射神經母細胞瘤細胞(圖四)。每週兩次追蹤腫瘤生長情況和小鼠存活率。初步結果顯示經由注射這些與腫瘤溶解物培養過的樹突細胞的確能夠有效地降低腫瘤的大小(圖五)，同時小鼠的存活率也會增加(圖六)。

5、IL-12 基因轉殖樹突細胞：在培養樹突細胞時，加入神經母細胞瘤細胞的溶解物一起培養後，利用 adenovirus vector 將 IL-12 基因轉殖入樹突細胞(圖七)。第六天時，收集樹突細胞進行動物實驗，而培養液則進行 IL-12 濃度分析，實驗出最佳 adenovirus vector 轉殖濃度(圖八)，並證實不同的樹突細胞培養處理方式有不同的 IL-12 細胞激素表現量(圖九)。

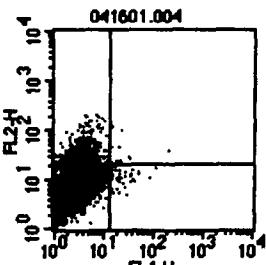
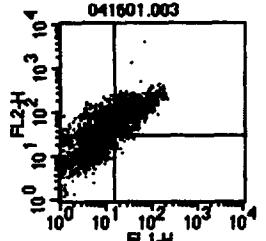
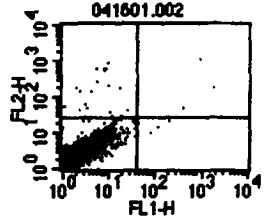
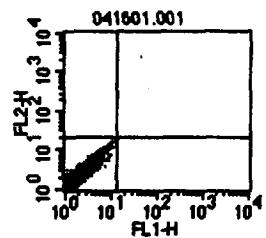
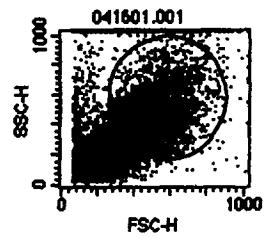
圖一：



圖二：



圖三：



negative control

Gated Events: 2809

Quad	Events	% Gated
UL	0	0.00
UR	0	0.00
LL	2807	99.93
LR	2	0.07

isotype control

Gated Events: 2986

Quad	Events	% Gated
UL	21	0.70
UR	3	0.10
LL	2958	99.06
LR	4	0.13

B7.2 vs B7.1

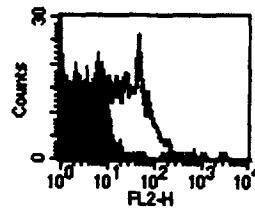
Gated Events: 2736

Quad	Events	% Gated
UL	558	20.39
UR	991	36.22
LL	1163	42.51
LR	24	0.88

CD40 vs CD40-L

Gated Events: 2633

Quad	Events	% Gated
UL	421	15.99
UR	14	0.53
LL	2157	81.92
LR	41	1.56

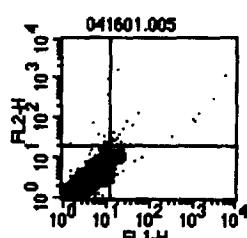


green: CD11c

CD95 vs CD95-L

Gated Events: 3153

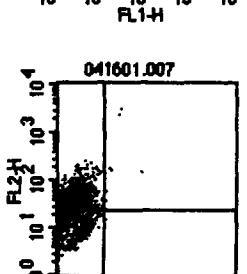
Quad	Events	% Gated
UL	11	0.35
UR	27	0.86
LL	2937	93.15
LR	178	5.65



CD3 vs B220

Gated Events: 3083

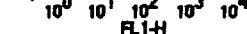
Quad	Events	% Gated
UL	26	0.84
UR	13	0.42
LL	3006	97.19
LR	48	1.55



CD11-c

Gated Events: 3020

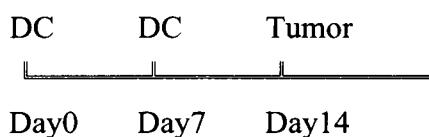
Quad	Events	% Gated
UL	1483	49.11
UR	15	0.50
LL	1518	50.26
LR	4	0.13



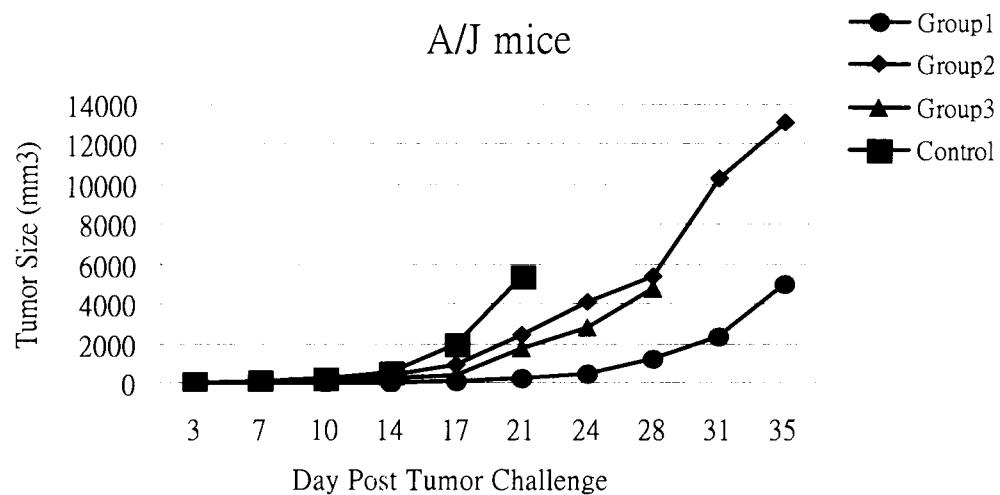
圖四：分組 -

	Dendritic cell Dosage	Tumor antigen Pulsed dosage	Tumor cell Injected dosage
Group 1	1×10^5 DC cells / 隻	200 μg / well	1×10^6 tumor cells / 隻
Group 2	1×10^5 DC cells / 隻	100 μg / well	1×10^6 tumor cells / 隻
Group 3	1×10^5 DC cells / 隻	-	1×10^6 tumor cells / 隻
Control	HBSS solution	-	1×10^6 tumor cells / 隻

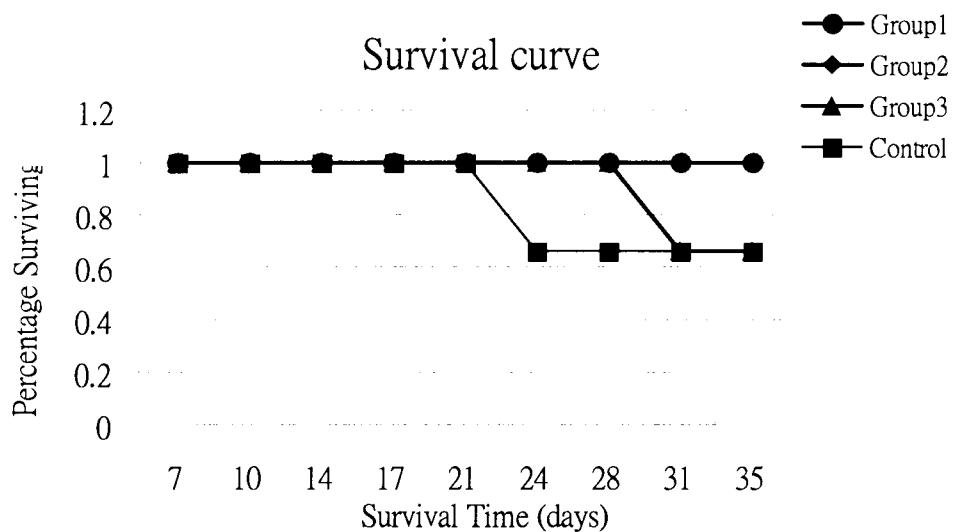
療程計畫 -



圖五：

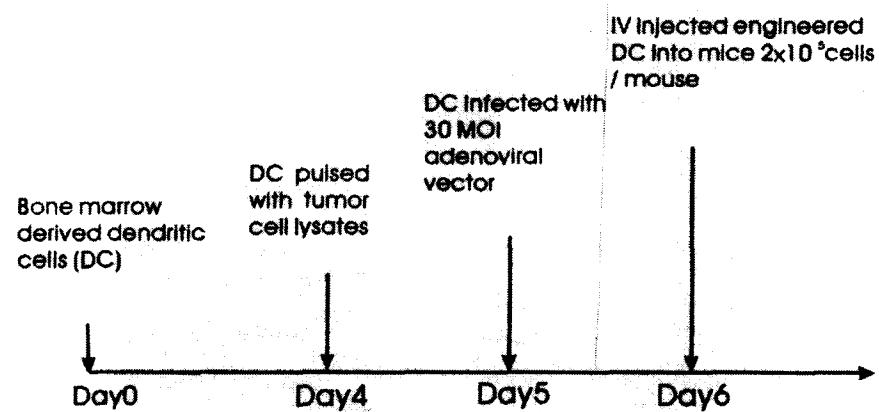


圖六：



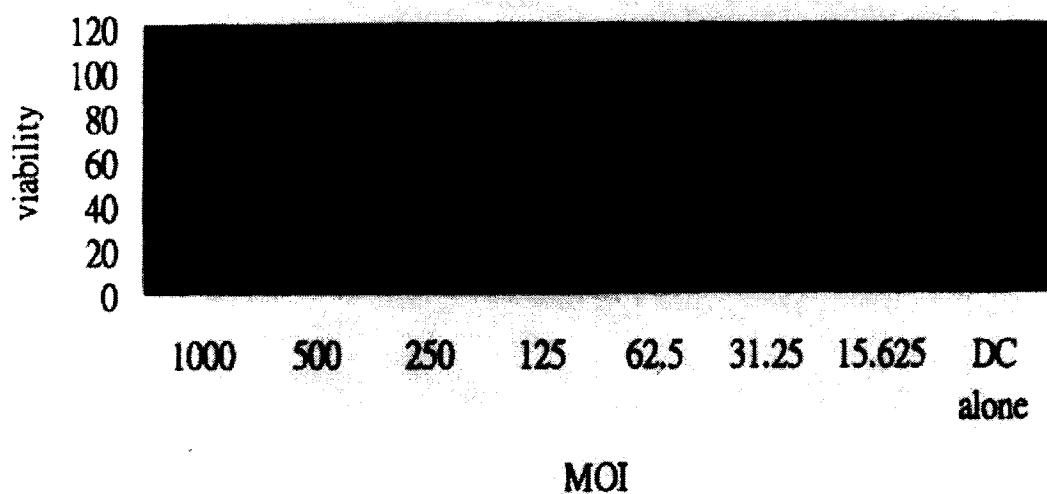
圖七：

Engineered dendritic cells

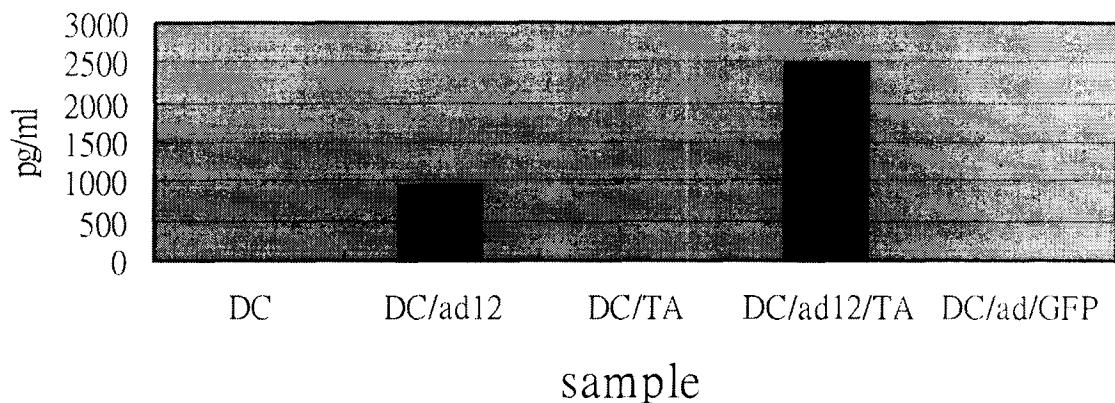


圖八：

Viability of DCs infected with adenoviral IL-12



圖九：



四、計畫成果自評：

目前實驗已進行一組免疫療法的實驗，初步結果顯示樹突細胞對神經母細胞瘤的免疫療法是可能有效的，能夠降低腫瘤的大小，同時小鼠的存活率也會增加。但也發現未加入神經母細胞瘤細胞的溶解物一起培養的樹突細胞也能引起抗腫瘤的免疫反應，且結果與低劑量神經母細胞瘤細胞抗原培養的樹突細胞效果差不多。

實驗也成功的利用 adenovirus vector 將 IL-12 基因轉殖入樹突細胞內，而且證實有 IL-12 的表現。

未來我們將重複此免疫療法的實驗，設計不同的抗原、樹突細胞、腫瘤細胞劑量，不同的療程設計，分析比較其結果。並進一步分析這些小鼠

體內的免疫反應，包括腫瘤特異性的增殖反應、腫瘤的毒殺作用，以及細胞激素製造的情形。

五、參考文獻

1. Amato I: Hope for a magic bullet that moves at the speed of light. Science 262:32, 1993.
2. Boon T: Teaching the immune system to fight cancer. Scientific Am. March: 32, 1993.
3. Browning MJ et al: MHC antigens and cancer: implication for T-cell surveillance. Current Opin Immunol 4:613, 1992.
4. Fearon ER et al: Interleukin-2 production by tumor cells bypasses

- T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 60:397, 1990.
5. Fields RC et al: Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9482; 1998.
 6. Gong J et al: Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nature Medicine* 3:558, 1997.
 7. Guo Y et al: Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science* 263:518, 1994.
 8. Klein E et al: Action of natural killer cells and macrophages in cancer. *Current Opin Immunol* 5:714, 1993.
 9. Livingston PO: Construction of cancer vaccines with carbohydrate and protein (peptide) tumor antigens. *Current Opin Immunol* 4:624, 1992.
 10. Matthews DC et al: Monoclonal antibodies in the study and therapy of hematopoietic cancers. *Current Opin Immunol* 4:641, 1992.
 11. Pardoll DM: Cancer vaccines. *Immunol Today* 14:310, 1993.
 12. Pardoll DM: New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Current Opin Immunol* 5:719, 1993.
 13. Riethmuller G et al: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Current Opin Immunol* 5:732, 1993.
 14. Travis J: Do tumor-altered T cells depress immune responses? *Science* 258:1732, 1992.
 15. Travis J: A stimulatory new approach to cancer treatment. *Science* 259: 310, 1993.
 16. Urban JL et al: Tumor antigens. *Annu Rev Immunol* 10:617, 1992.
 17. van der Bruggen P et al: Molecular definition of tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Current Opin Immunol* 4: 608, 1992.
 18. Vitetta ES et al: Immunotoxins: magic bullets or missguided missiles? *Immunol Today* 14:252, 1993.
 19. Zitvogel L et al: Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 183:87, 1996.
 20. Lane PJL, Brocker T: Developmental regulation of dendritic cell function. *Curr Opin Immunol* 11:308, 1999
 21. Heath WR, Carcone F: Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr Opin Immunol* 11: 314, 1999
 22. Tarte K, Klein B: Dendritic cell-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* 13: 653, 1999