

筑波大学

博士（医学）学位論文

末梢皮下腫瘍に対する局所的放射線照射
により脳内に誘導される
「アブスコパル効果」に関する研究

2017

筑波大学

善光純子

目次

I. 序論	1
II. 材料と方法	
1. 実験動物	5
2. 細胞株	5
3. GL261-mKO 細胞株の樹立	6
4. GL261-mKO 細胞株の増殖能	7
5. GL261-mKO 細胞株の放射線感受性	7
6. 移植用 GL261-mKO 細胞の調製	8
7. GL261-mKO マウス腫瘍モデルの作製	8
7-1 脳腫瘍モデル（ワクチン未処理群）	8
7-2 大腿皮下腫瘍モデル	9
8. In Vivo Imaging System (IVIS) による腫瘍の測定	10
9. マウス実験のプロトコル	10
9-1 <i>in situ</i> vaccination 実験	10
9-2 <i>ex vivo</i> vaccination 実験	11
9-3 同種または異種腫瘍細胞の再移植実験	12

10.マウス脳の免疫組織化学染色	12
10-1 マウス脳切片の作製	12
10-2 免疫組織化学染色	13
11.ELISPOT assay を用いた脾臓細胞からの インターフェロン- γ 放出の検討	13
11-1 マウス脾臓細胞の調製	13
11-2 ELISPOT assay	14
12.生存解析と統計処理	14
III. 結果	
1. GL261-mKO 細胞株の樹立	15
2. GL261-mKO 細胞株の増殖能	17
3. GL261-mKO 細胞株の放射線感受性	18
4. GL261-mKO 脳腫瘍モデル (コントロール群)	19
5. GL261-mKO 腫瘍モデルに対する <i>in situ</i> - および <i>ex vivo</i> -X 線照射ワクチンの効果	21
5-1 <i>in situ</i> vaccination の効果	21
5-2 <i>ex vivo</i> vaccination の効果	25

6. 長期生存例に対する腫瘍細胞の再移植	27
7. 頭蓋内への CD8 陽性細胞の浸潤	28
8. 脾臓細胞からの IFN- γ の放出	30
IV. 考察	
1. GL261-mKO マウス脳腫瘍モデル	32
2. 局所コントロール群におけるアブスコパル効果	33
3. <i>ex vivo</i> cell vaccine の効果	37
4. 長期生存例に対する腫瘍細胞の再移植	39
5. 頭蓋内への免疫担当細胞の浸潤と ELISPOT assay	40
V. 結論	42
参考文献	43
謝辞	47
参考論文	巻末

I. 序論

悪性脳腫瘍の予後は極めて悪く、特に膠芽腫患者の生存期間は短い。高線量（60 Gy）の放射線治療は延命には有効ではあるが、化学療法などを組み合わせた治療を行っても生存期間の中央値は最長でも 20.5 か月にとどまる (1)。新たな治療が模索される中、免疫療法も有力な候補として挙げられ、複数の臨床研究が進められているが (2, 3)、いずれの免疫療法でも単独での有効性は限られており、複数の免疫療法の組み合わせや、他の治療法との併用が望まれている。

一方、最近の研究で、がんに対する局所放射線治療が全身的な抗腫瘍免疫作用を活性化することが明らかとなってきた (4-6)。放射線照射によって誘導される腫瘍免疫の活性化により「アブスコパル効果（局所放射線照射が照射部位以外に影響を及ぼす反応）」を引き起こすことがあるが (7)、これは照射による「免疫原性細胞死」を介して発現すると考えられている (8, 9)。アブスコパル効果のメカニズムは、まず照射により損傷を受けて死にゆく細胞や死んだ直後の細胞から「eat me」または「find me」シグナルである DAMPs (Damage associated molecular patterns) が放出され、それが樹状細胞の成熟化を促すことにより、樹状細胞は腫瘍抗原を提示し、T 細胞の細胞障害性

T 細胞 (Cytotoxic T lymphocytes; CTLs) への成熟化を促進する (8, 10-12)。その結果、腫瘍特異的 CTLs は全身をめぐり、遠隔部位にある腫瘍細胞を認識し、それらを攻撃することによってアブスコパル効果が発現する。この効果は実験的には確立されているが、臨床症例においては非常に稀な現象であり、Reynders K によると、1960 年から 2014 年までに報告されたアブスコパル効果発現例は 23 例にとどまる (13, 14)。これまでにアブスコパル効果が器官に非特異的に起こる現象なのかは議論されているが (15, 16)、解明されておらず、特に頭蓋外の腫瘍に対する放射線治療の後に脳腫瘍が縮小または消失するというような効果については、臨床症例報告などを含む論文報告にも見られなかった (17, 18)。実際臨床的には、放射線治療により局所制御が得られている乳がんや肺がんの患者にも脳転移が生じることや、原発巣に対する放射線療法が奏功しているにもかかわらず、脳内の病変は逆に増大することがあることは、放射線治療のみでは脳内における特異的がん免疫賦活効果が十分に発揮されてはいない事を示唆している。

脳は正常な状態では血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) によりリンパ球の侵入を防いでおり、独自の免疫機能を持った「免疫特権

の器官」と考えられている (19, 20)。脳内の「内的な免疫監視機構」としては、ミクログリアが免疫担当細胞として機能しており、抗原提示や貪食能を持っている。脳腫瘍に対してもミクログリアがオートファジー様細胞死を誘導することを明らかにした報告がなされている (21)。一方、腫瘍の形成によって BBB が障害されると、その部分から循環血中のリンパ球は脳内へ侵入するようになる。しかし、このような脳内の「内的な免疫機能」とワクチンや細胞療法など頭蓋外からの「外的な免疫刺激」が脳腫瘍に対してどのように反応するのかは不明な点が多く、今後、悪性脳腫瘍や転移性脳腫瘍の予後を改善するためには、循環血中の腫瘍抗原特異的な CTLs とミクログリアが脳内の腫瘍にどう反応するかを明らかにすることは重要である。

頭蓋内の腫瘍に対する抗腫瘍免疫反応の研究に使われてきた主要な動物モデルのひとつに、マウス GL261 腫瘍細胞を同系のマウスの頭蓋内に移植するモデルがあり、この動物モデルは、*ex vivo* で放射線を照射した腫瘍細胞を腫瘍ワクチンとして用い、有効性を検討する研究に用いられている (22-24)。この作用は、照射によって細胞を不活化した腫瘍細胞ワクチンが、抗原提示細胞によって貪食され、

抗原提示されて、CTLs の分化促進・活性化をすることによって、細胞性免疫を賦活すると考えられている。しかし、*in situ* 放射線照射、つまり末梢に存在する腫瘍に治療的な照射をすることによって、脳内でも抗腫瘍免疫効果をもたらすことができるかどうかはいまだ検証されていない。

そこで本研究では、まず In Vivo Imaging System (IVIS) によって生きたまま腫瘍の増殖のモニターが可能なマウス腫瘍モデルを作成した。そしてその腫瘍モデルを用い、末梢の腫瘍への治療的な放射線照射によって、頭蓋内の腫瘍へ防護的な抗腫瘍免疫反応が誘導されるかどうか、そして腫瘍特異的な CTLs が頭蓋内に移植した腫瘍細胞に対してどのような働きをするかを検証することを目的とした。

II. 材料と方法

1. 実験動物

アルビノ C57BL/6 (B6(Cg)Tyr^{c-2J}/J) マウス (Jackson Laboratory , Sacramento, CA) を筑波大学生命科学動物資源センター内飼育施設で繁殖させ、実験には 8~14 週齢、雄性マウスを用いた。動物実験の実施は、筑波大学動物実験委員会の承認を受け、筑波大学動物実験取扱規程に従って実験を行った。観察期間は NIH の動物実験のエンドポイントに関するガイドライン (25) を参考に決定した。

2. 細胞株

C57BL/6 マウス由来悪性膠芽腫細胞株 GL261 は慶応大学脳神経外科、戸田正博先生から譲渡された。GL261 は 3-メチルコラントレンを C57BL/6 マウスの頭蓋内に投与することによって誘導された膠芽腫細胞である (22)。GL261 細胞は非働化した 10%ウシ胎児血清、100 µg/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリンを含む Minimum Essential Eagle's Medium (MEM) を用い、37°C、5% CO₂、湿度 95% の条件下で培養した。

3. GL261-mKO 細胞株の樹立

マウスに移植した腫瘍の増殖を IVIS (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) でモニターするために、Kusabira Orange 蛍光タンパク質遺伝子を導入し、恒常的に発現させた GL261 (GL261-mKO) 細胞を樹立した。

Kusabira Orange タンパク質発現用プラスミド (pCAG-hu2 mKO : 選択マーカー ネオマイシン耐性遺伝子) を Lipofectamine LTX Reagent with PLUS™ Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA) を用いて、GL261 細胞に導入し、800 µg/ml の G418 (ジェネティシン; Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を含む培地を用いて培養することにより、ポジティブ・クローンを得た。安定的に培養できたクローンについて、フローサイトメトリー法により、Kusabira Orange の発現を確認した。

GL261-mKO 細胞株は G418 不含培地にて 3 ヶ月間継続的に培養し、フローサイトメトリーにより蛍光強度を測定して、発現の安定性を確認した後に動物実験に使用した。

4. GL261-mKO 細胞株の増殖能

GL261-mKO 細胞株の増殖能を確認するために、倍加時間を求め GL261 細胞の倍加時間と比較した。実験は 24 well plate に細胞を 5000 個ずつ播種し、48 時間培養後から 10 日目まで 1 well あたりの細胞数を計測し、下記の計算式をもとに倍加時間を計算した。

$$D.T. = (t_2 - t_1) \log_2 / (\log N_2 - \log N_1)$$

t_1, t_2 : 培養開始からの時間、 N_1, N_2 : t_1, t_2 での細胞数

実験は独立した実験を各 3 回ずつ行い、結果は平均値と S.D. で表した。

5. GL261-mKO 細胞株の放射線感受性

GL261-mKO 細胞の放射線感受性をコロニー形成アッセイにて検討した。T25 フラスコに播種した細胞に 0, 1, 2, 4, 8 Gy の X 線照射 (130 kV, 5 mA, filter : 0.5 mm Al, RX-650; FAXITRON BIOPTICS, LLC, Arizona, USA) し、トリプシン処理にて細胞を回収後に線量ごとに適当な細胞数を 60 mm 径のシャーレに播種した。約 2 週間のインキュベーション後コロニーを形成したら、細胞をメチレンブルーにて染色し、コロニー数を計数した。コロニーの生存分析は統計用ソフト Prism (GraphPad Software, Inc., California, USA) を用いて直線

ー二次曲線 (L-Q) モデルによりフィッティングした。実験は独立した実験を各 3 回ずつ行い、結果は平均値と S.D. で表した。

6. 移植用 GL261-mKO 細胞の調製

GL261-mKO 細胞を培養し、トリプシン処理後適量の培地を添加して回収した。細胞数を計数した後、PBS (-) で 2 回洗浄し、FBS, 抗生物質を含まない MEM で 1 回洗浄して、頭蓋内への移植用は 6×10^5 cells/5 μ l、皮下への移植用は 1×10^7 cells/100 μ l の濃度になるように FBS, 抗生物質を含まない MEM に懸濁した。

7. GL261-mKO マウス腫瘍モデルの作製

7-1 脳腫瘍モデル (ワクチン未処理群)

アルビノ C57BL/6 マウスにペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔した後、頭部を除毛し、脳定位固定装置 (Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) に固定した。頭部を 70%エタノールで消毒し、切開して頭蓋骨のブレグマから 3 mm 後方、正中線から 1.5 mm 左方に 26G 注射針 (TERUMO Corporation, Tokyo, Japan) で穴を開け、10 μ l Hamilton syringe (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を用いて、 6×10^5 個 (5 μ l) の GL261-mKO 細胞を頭蓋骨表面から深さ 2.5 mm に、

2 分間かけて注入した。注入後 1 分間針を静置し、1 mm/min の速度でゆっくり針を抜いた。針先が完全に頭蓋骨外に抜けた後、細胞懸濁液の逆流がないことを確認して頭部の皮膚を縫合した（図 1）。

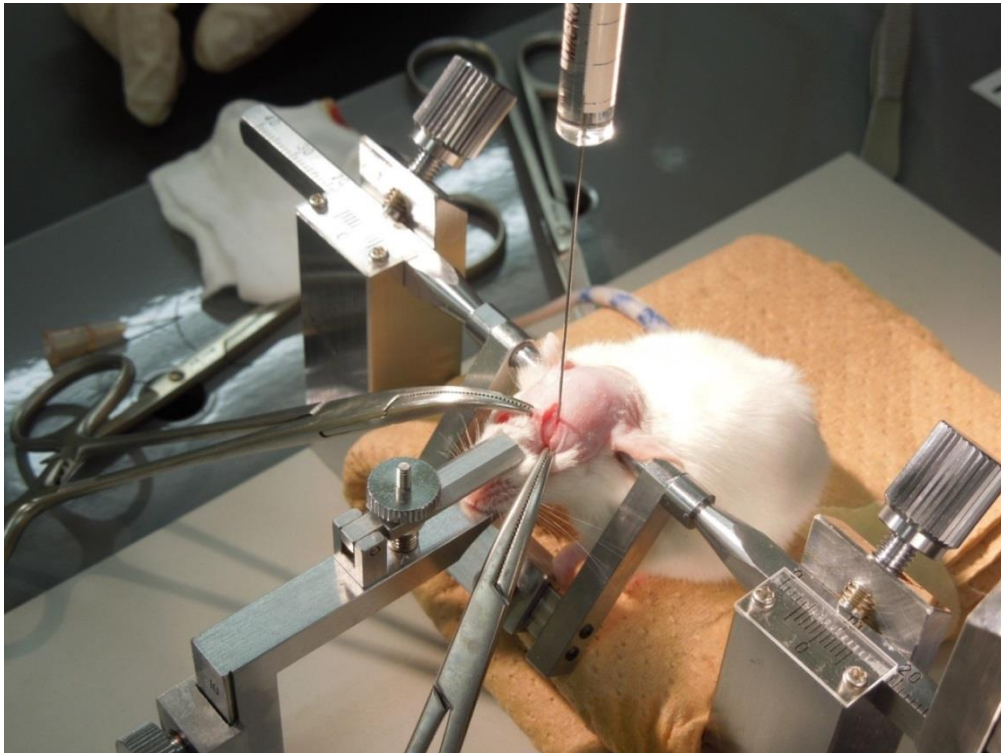


図 1 マウスの固定と頭蓋内への腫瘍移植

7-2 大腿皮下腫瘍モデル

アルビノ C57BL/6 マウスをイソフルラン吸入により麻酔した後、左大腿皮下に 1×10^7 個（100 μ l）の GL261-mKO 細胞を 27G 針（TERUMO）を付けた 1 ml 注射針（TERUMO）を用いて注入した。

8. In Vivo Imaging System (IVIS) による腫瘍の測定

頭蓋内および皮下腫瘍の増殖は、Kusabira Orange 蛍光タンパク質の蛍光強度を指標として、IVIS を用いて測定した。IVIS 測定時の励起波長は 570 nm、検出波長は 620 nm とした。すべてのマウス実験について、腫瘍の測定は腫瘍移植後 110 日経過するまで、3~7 日毎に行い、マウスに神経症状もしくは、20%以上の著しい体重減少が認められた場合は安楽死させた。

IVIS で測定した Kusabira Orange 蛍光強度は Living Image 4.3.1 software (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) を用いて解析した。

9. マウス実験のプロトコル

9-1 *in situ* vaccination 実験

左大腿皮下へ GL261-mKO 細胞を移植の 10 日後、腫瘍局所へ 20 Gy の X 線 (130 kV, 5 mA, filter : 0.5 mm Cu 0.1 mm Al, MBR-1520R; Hitachi Medical Co., Tokyo, Japan) を照射した。照射にはマウス照射用に作成した固定具にマウスを固定し、厚さ 10 mm の真鍮製コリメーターを用いて、腫瘍部位のみに X 線が照射されるようにした。X 線照射の 24 日後に頭蓋内へ GL261-mKO 細胞を移植し、IVIS にて腫瘍の測定を行った。

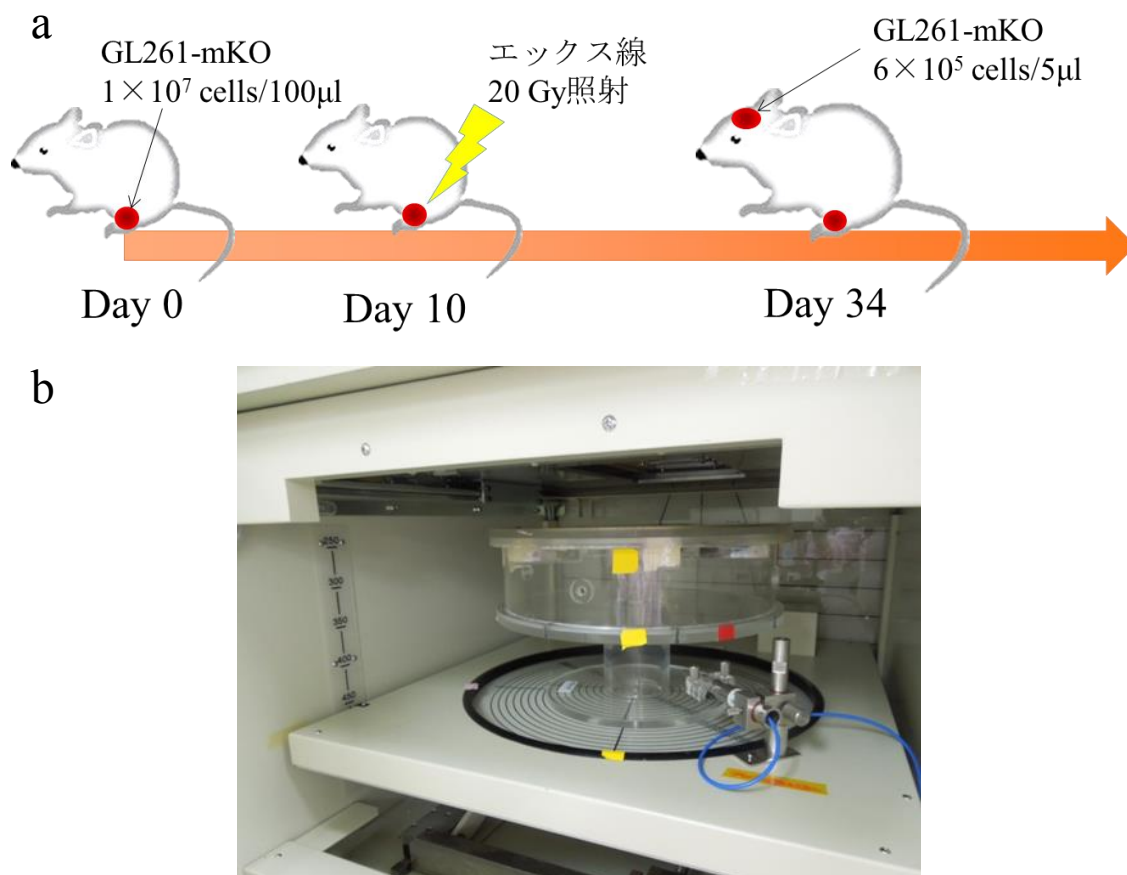


図2 *in situ* vaccination の a:プロトコルと b: マウスの X 線照射

9-2 *ex vivo* vaccination 実験

皮下移植用に調製した GL261-mKO 細胞 ($1 \times 10^7/100 \mu$ l) に 20 Gy の X 線を照射し、30 分以内に腫瘍細胞ワクチンとしてマウス左大腿皮下へ 27G 針を付けた 1 ml 注射針を用いて投与した。腫瘍細胞ワクチン投与の 24 日後に頭蓋内へ GL261-mKO 細胞を移植し、IVIS にて腫瘍の測定を行った。

9-3 同種または異種腫瘍細胞の再移植実験

腫瘍移植から 110 日の観察の後、*in situ* vaccination 実験にて腫瘍の増殖が認められなかったマウスに対し、 6×10^5 個 (5 μ l) の GL261-mKO 細胞または、 2.5×10^4 個 (5 μ l) の B16/BL6 細胞 (C57BL/6 マウス由来悪性黒色腫細胞) を頭蓋内に再移植した。マウスに神経症状もしくは、20%以上の著しい体重減少が認められた時点で安楽死させた。

10. マウス脳の免疫組織化学染色

10-1 マウス脳切片の作製

マウス脳の免疫組織化学染色のため、GL261-mKO 細胞を移植し、治療を施したマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、脳を摘出した。摘出後直ちに O.C.T™ compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて包埋し、 -20°C から -80°C へ徐々に凍結した。凍結組織は、クリオスタットで (CM1850; Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Germany) 6 μ m の厚さになるように薄切し、剥離防止コーティングが施されたスライドガラス上に固定し、染色するまでは -80°C で保存した。

10-2 免疫組織化学染色

マウス脳切片を室温で 10 分乾燥させた後、アセトン中で -20°C 、10 分間固定した。PBS (-) で 2 回洗浄後、1%過酸化水素を含む PBS 中に浸して内因性ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) を不活化した。PBS で洗浄後、1 次抗体の組織への非特異的吸着を防ぐために、切片を Universal Blocker™ in Tris-buffered saline (TBS) (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA) で覆い、湿度を保つために組織染色用箱内に静置して、室温で 30 分、ブロッキングを行った。PBS で洗浄後、Can Get Signal immunoreaction enhancer solution-A (Toyobo Ltd. Osaka, Japan) で 50 倍に希釈した抗マウス CD8 α ウサギモノクローナル抗体 (EP1150Y; Novus biologicals llc., Littleton, CO) で切片を覆い、湿度を保ち室温で 1 時間インキュベートした。さらに PBS 洗浄後、LSAB®2 system-HRP (DAKO Japan llc., Tokyo, Japan) を用いたビオチン-ストレプトアビジン反応により抗体結合部分の発色検出をした。

11. ELISPOT assay を用いた脾臓細胞からの interferon- γ (IFN- γ)

放出の検討

11-1 マウス脾臓細胞の調製

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓を摘出して滅菌したスライドガラスで脾臓組織をすりつぶし、70 nm ナイロンメンブレンフィルターを通し不要な組織片を取り除いた。1×RBC Lysis buffer (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA) 処理により赤血球を除去して脾臓細胞を 5×10^7 個 / ml の濃度になるように MEM に懸濁した。これらの操作の間、細胞を入れたチューブを氷冷しながら行った。

11-2 ELISPOT assay

purified anti-mouse IFN- γ 抗体でコーティングした ELISPOT 用 96-well プレートに 1well あたり 2.5×10^6 個の脾臓細胞を播種し、腫瘍抗原で刺激する well には GL261-mKO 細胞を凍結融解にて破碎し、遠心した上清を加えた。37°C、5% CO₂、湿度 95% の条件下で 24 時間培養した後、Mouse IFN- γ ELISPOT Set (Becton, Dickinson and Company Japan) の使用方法に従って、IFN- γ の産生によるスポットの検出を行った。スポットは目視にて数を計数した。実験は各条件について 3 well ずつ行い、結果は平均値と S.D. で表した。

12. 生存解析と統計処理

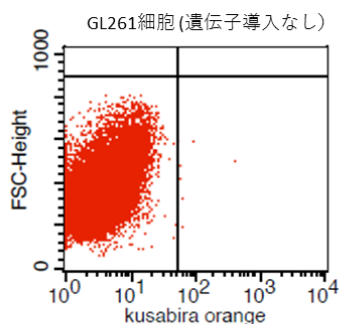
生存解析は Kaplan–Meier 法 (エクセル統計; 株式会社 社会情報サ

ービス, Tokyo, Japan) を用いて行い、統計学的有意差は log-rank test により解析した。 p 値が 0.05 以下を統計学的有意差があるとした。

III. 結果

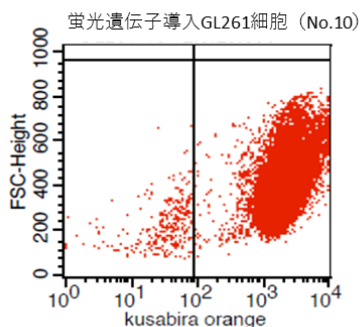
1. GL261-mKO 細胞の樹立

pCAG-hu2 mKO プラスミドを導入した GL261 細胞を G418 を添加した培地中で培養し、クローン化を行い、単クローンからなる細胞株を 10 株得た。その中から細胞の形状および、増殖能について遺伝子導入前の GL261 細胞株との差異が少ないと判断できた 5 クローンについて、フローサイトメトリー法により蛍光強度の測定を行った (図 3)。その結果、クローン No.10 の細胞株では Kusabira Orange 蛍光を発現する細胞の割合が 99.0%であり、また良好な蛍光強度が得られた。次にこの細胞株を選択のための抗生物質 G418 を含まない培地で約 3 ヶ月間継続して培養を行った後、再度フローサイトメトリーにより蛍光を発する細胞の割合と蛍光強度を測定した結果、いずれも減弱することなく、安定した Kusabira Orange 蛍光タンパク質の発現を示す細胞株であることが明らかとなった (表 1)。そこで、No.10 の細胞株を GL261-mKO 細胞として以下の実験に使用した。



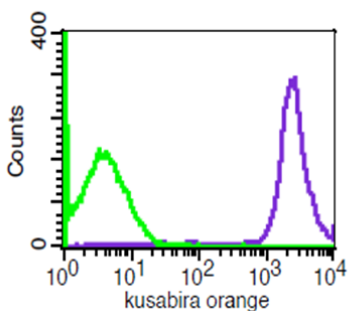
Sample ID: GL261 N 12.3.29
 Acquisition Date: 30-Mar-12
 Total Events: 30000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	0	0.00	0.00
LL	29240	99.98	97.47
LR	6	0.02	0.02



Sample ID: GL261-10 12.3.29
 Acquisition Date: 30-Mar-12
 Total Events: 30000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	0	0.00	0.00
LL	311	1.05	1.04
LR	29229	98.95	97.43



Kusabira Orange導入 GL261細胞 クローン No.	Kusabira Orange 蛍光タンパク質 発現細胞の割合 (%)
1	87.56
3	96.96
5	69.47
9	92.53
10	98.95

図3 フローサイトメトリー法による Kusabira Orange 蛍光の解析
 安定的に培養できた5クローンのうち、No.10のクローンがもっとも高い
 発現率を示した。

表1 G418 不含培地中での蛍光タンパク質発現の安定性

G418不含培地での 培養期間	Kusabira Orange 蛍光タンパク質 発現細胞の割合 (%)
2週間	98.95
1ヶ月	96.04
2ヶ月	97.26
3ヶ月	98.34

3ヶ月経過後も蛍光タンパク質発現率の低下は認められなかった。

2. GL261-mKO 細胞の増殖能

GL261 細胞、GL261-mKO 細胞をそれぞれ 24 well プレートで培養した実験を 1 回 3 well ずつ 3 回行った結果、得られた GL261 細胞と GL261-mKO 細胞の倍加時間はそれぞれ 19.9 時間、20.7 時間であった (図 4)。

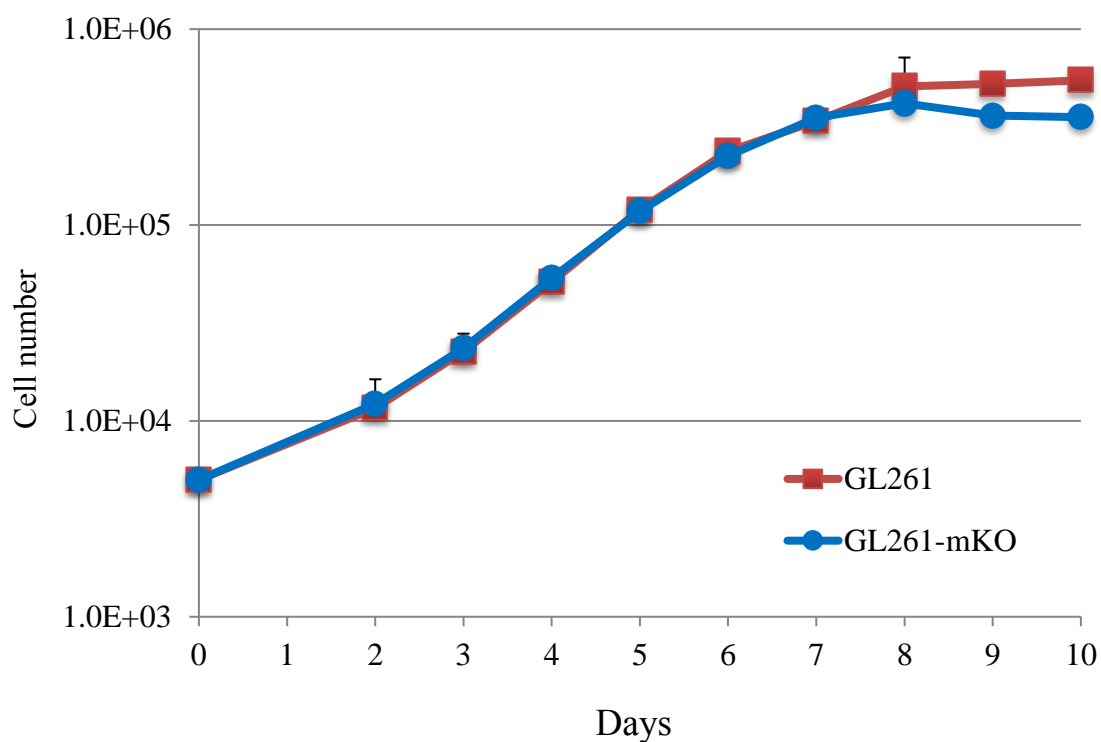


図 4 GL261 と GL261-mKO の増殖能の比較

GL261-mKO の増殖能は GL261 と同等であった。

3. GL261-mKO 細胞の放射線感受性

各線量点 (0, 1, 2, 4, 8 Gy) で得られた生存率を L-Q モデルにてフィッティングした。その結果、GL261-mKO 細胞は GL261 細胞よりも放射線に対する感受性が低い傾向は見られたが、各線量点 (1, 2, 4, 8 Gy) における値は、いずれの点でも有意差は認められなかった。

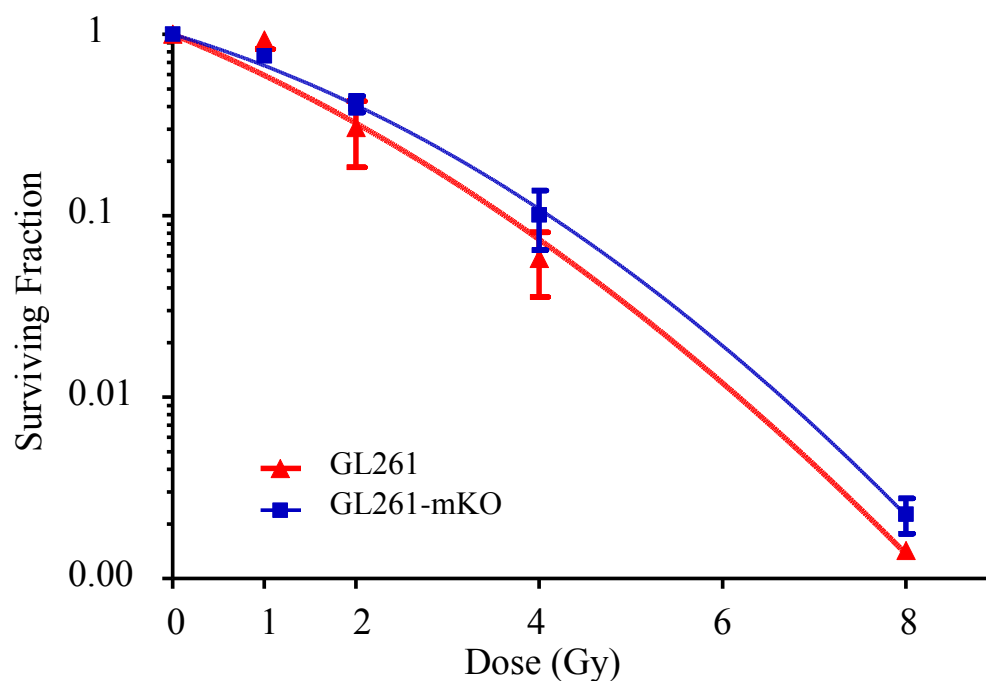


図5 GL261 と GL261-mKO の放射線感受性の比較

GL261-mKO は GL261 に比較し、放射線感受性が低い傾向が見られたが、有意な差はなかった。

4. マウス腫瘍モデル

4-1 GL261-mKO 脳腫瘍モデル (コントロール群)

図 6 に示すように、GL261-mKO 細胞をマウス頭蓋内へ移植後、約 40 日経過すると Kusabira Orange 蛍光が IVIS により観察されるようになり、GL261-mKO 細胞が脳内に生着し、細胞が増殖したことが確認された。今回 GL261-mKO 細胞を頭蓋内へ移植したすべてのマウスで腫瘍細胞の生着が確認され、腫瘍細胞の発する蛍光は一過性の減少を見せた後、増加することが明らかとなった。

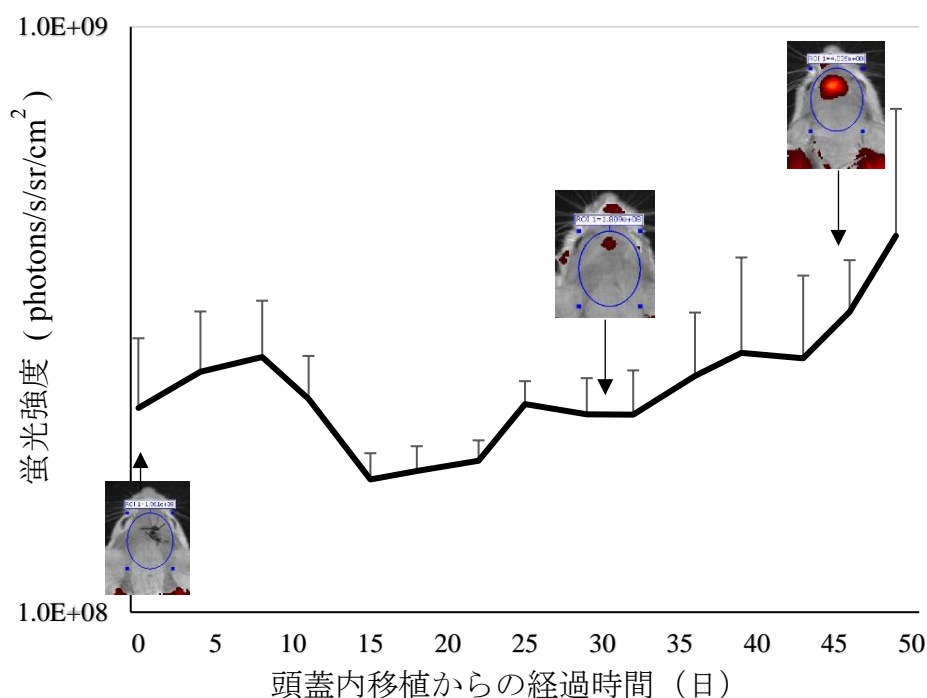


図 6 頭蓋内へ移植した GL261-mKO の増殖

GL261-mKO を頭蓋内へ移植した後 IVIS にて蛍光強度を測定した。時間経過とともに蛍光強度は増加し、腫瘍の生着と増殖が確認された。

腫瘍の増大に伴い、マウスの体重は著しく減少した（図 7）。また、腫瘍移植から 46 日後に摘出した脳のホルマリン固定パラフィン包埋切片のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色像から、増大した脳腫瘍細胞が確認された（図 8）。12 匹の脳腫瘍モデルマウスの生存解析から、生存期間の中央値は 49 日であった（図 9）。

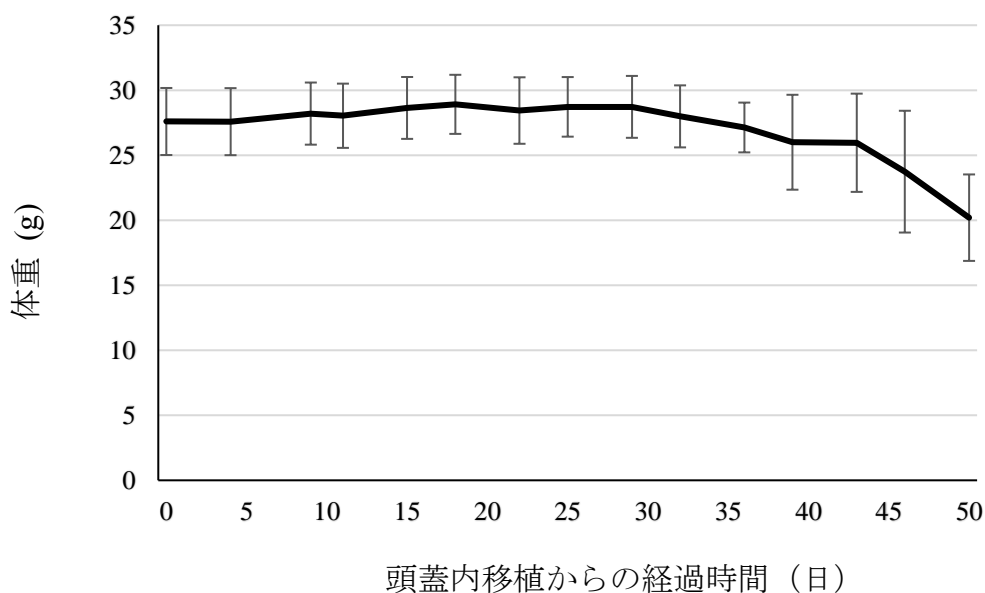


図 7 脳腫瘍モデルマウスの体重変化

腫瘍の増殖とともにマウスの体重は著しく減少した。

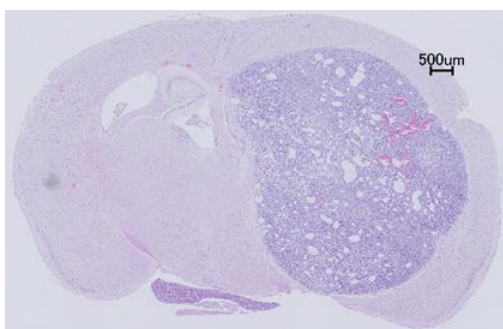


図 8 HE 染色像

腫瘍移植から 46 日後、摘出した脳の HE 染色から腫瘍細胞の生着と増殖が認められた。

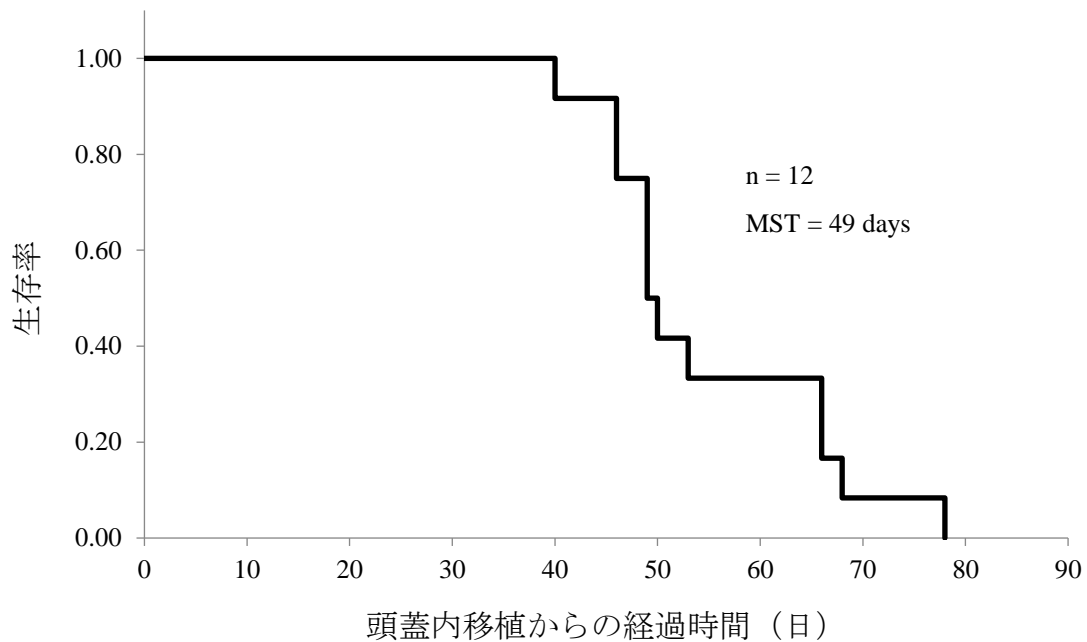


図9 脳腫瘍モデルマウスの生存率

脳腫瘍モデル 12 匹では移植した腫瘍細胞はすべて生着し、生存期間の中央値は 49 日であった。

5. GL261-mKO 腫瘍モデルに対する *in situ*- および *ex vivo*- X 線照射ワクチンの効果

5-1 *in situ* vaccination の効果

左大腿皮下へ GL261-mKO 細胞を移植した 16 匹のマウスに対し、移植 10 日後、腫瘍局所に 20 Gy の X 線を照射した (*in situ* vaccination 群)。20 Gy の線量は先行研究によりマウスの皮膚への障害が軽微であり、約半数のマウスの皮下腫瘍が治癒する線量であることから決定した。X 線を照射した 16 匹のうち、8 匹のマウスでは照射後に皮

下腫瘍の増殖が抑制され、IVIS による蛍光強度の測定値は徐々に低下し、10 日後には移植前の値まで低下し、その後腫瘍の再増殖は認められなかった。残りの 8 匹では、照射後腫瘍の増殖は一時的に遅延傾向を示したものの、IVIS 測定値が低下することはなく、一定を保ち照射約 40~50 日後から腫瘍の急激な再増殖が認められた (図 10)。

照射の 24 日後に頭蓋内へ GL261-mKO 細胞を移植したところ、X 線照射により皮下腫瘍が治癒した 8 匹 (局所コントロール群) では、頭蓋内へ移植した腫瘍細胞は完全に拒絶され、全例が長期生存を示した。照射後に皮下腫瘍の再増殖が認められた 8 匹 (局所再発群) では全例で頭蓋内に移植した GL261-mKO 細胞は生着し、さらに急速な増殖が見られ、エンドポイントに達した (図 10)。Kaplan-Meier 法による *in situ* vaccination 群 16 匹の生存解析の結果、生存期間の中央値は 63 日で脳腫瘍モデルマウス (中央値 49 日) に比較して、頭蓋内への移植後、より早期にエンドポイントに達するマウスが見られたものの、log-rank test による p 値は 0.047 で有意な生存期間の延長が認められた (図 11)。*in situ* vaccination 群 16 匹を、局所コントロール群 8 匹と再発群 8 匹に分けて両者を比較解析すると、 p 値は 0.0001 以下となり局所コントロール群は局所再発群に比較して、有

意な生存期間の延長が認められた。また、局所再発群の 8 匹では、生存期間の中央値は 38 日となり、ワクチン未処理の脳腫瘍モデル 12 匹と比較して p 値が 0.034 と生存期間は有意に短縮された (図 10)。

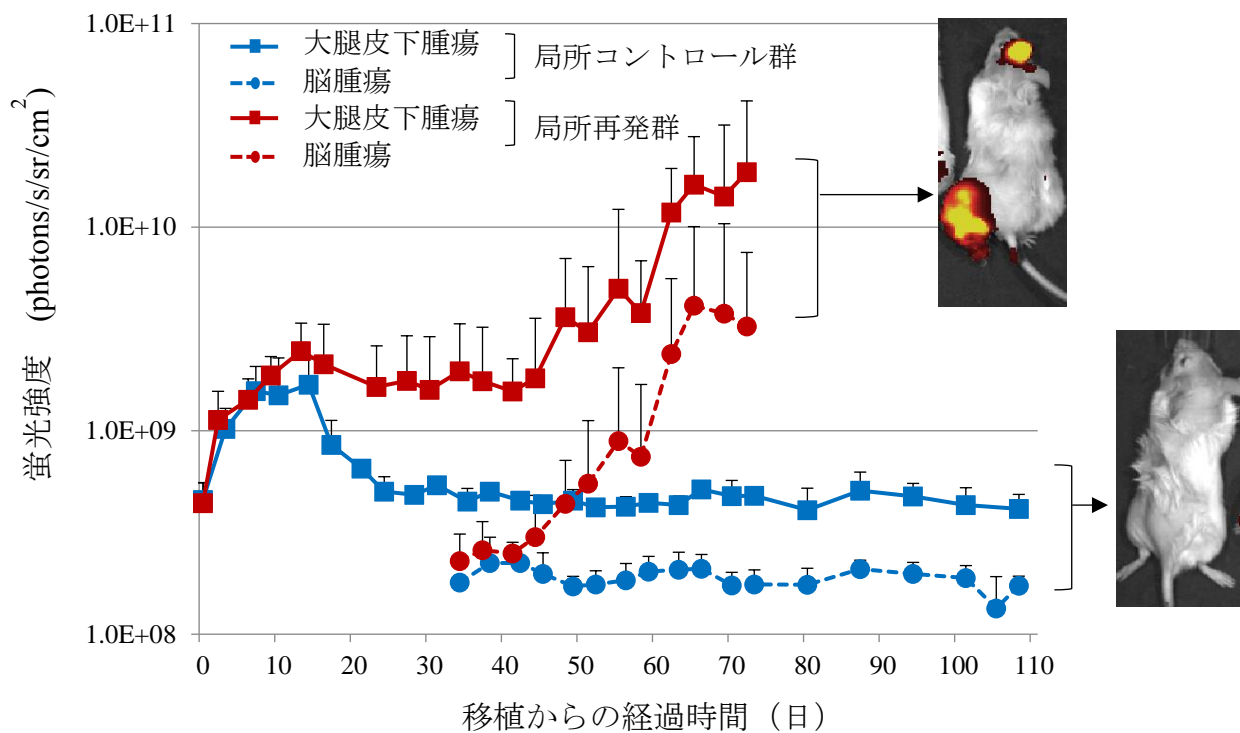


図 10 *in situ* vaccination の大腿皮下局所コントロール群と再発群の腫瘍増殖の違い

局所コントロール群 (青) の 8 例では頭蓋内へ移植した GL261-mKO 細胞は拒絶され、全例長期生存した。対照的に局所再発群 (赤) の 8 例では、頭蓋内の腫瘍はすべて生着し著しい増殖が認められた。

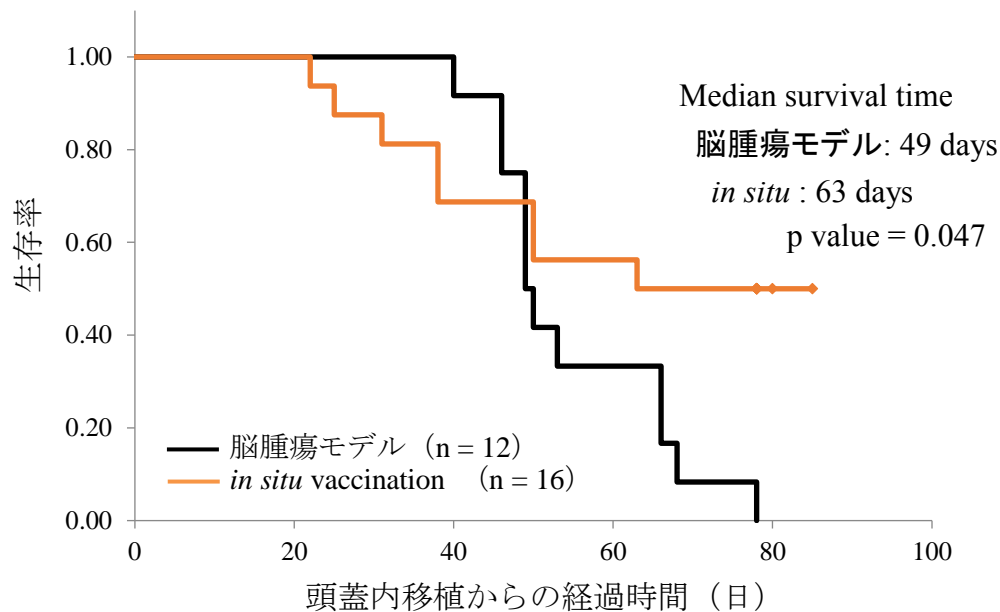


図 11 *in situ* vaccination 群と脳腫瘍群の生存解析
in situ vaccination 群では早期の死亡例があるものの、脳腫瘍モデルに比較し生存期間の有意な延長が認められた。

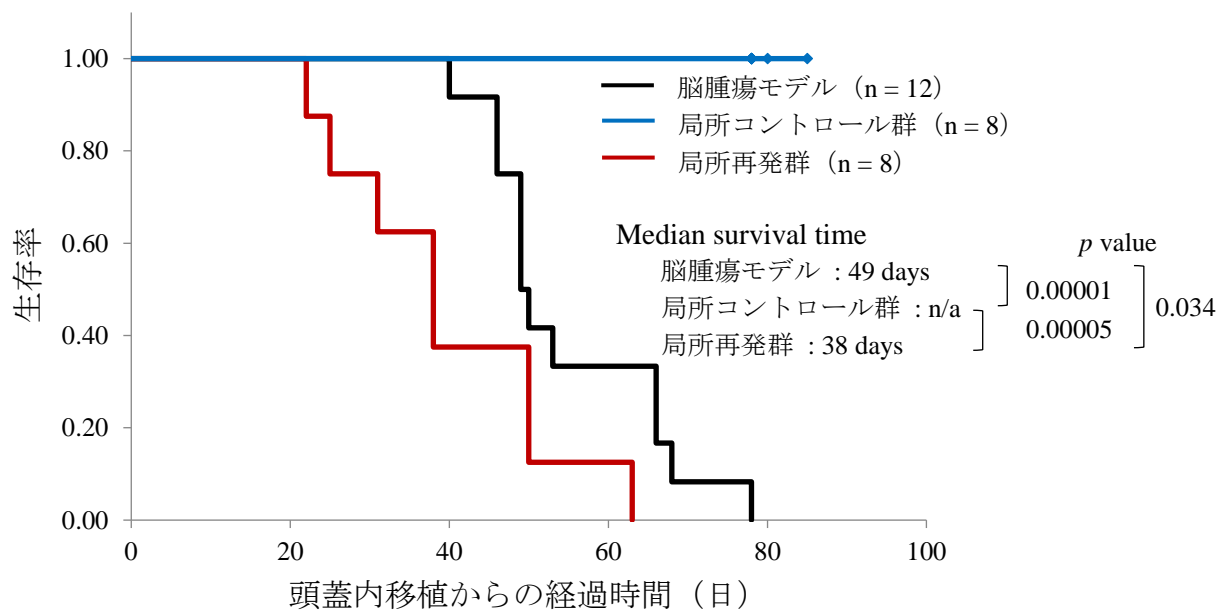


図 12 *in situ* vaccination 群と脳腫瘍群の生存解析 2
in situ vaccination 群を局所コントロール群 (青) と局所再発群 (赤) に分けると、局所再発群では脳腫瘍モデルに比較し生存期間は有意に短縮した。

5-2 *ex vivo* vaccination の効果

移植用と同様に調製し、サンプルチューブ内で 20 Gy の X 線を照射した GL261-mKO 細胞を、大腿皮下へ接種したマウス (*ex vivo* vaccination 群) では、大腿皮下の移植部位に腫瘍の形成は認められなかった。大腿皮下への接種から 24 日後に頭蓋内に同じ腫瘍細胞を移植すると、7 匹中 3 匹で頭蓋内の腫瘍細胞は拒絶された。しかし、4 匹のマウスでは頭蓋内に腫瘍細胞が生着し、頭蓋内への移植後 8~29 日で IVIS により腫瘍が確認された。生存解析の結果、*ex vivo* vaccination 群 7 匹の生存期間の中央値は 66 日で、脳腫瘍モデル 12 匹と比較すると、 p 値は 0.038 となり有意な生存期間の延長が認められた (図 13)。*in situ* vaccination 群と *ex vivo* vaccination 群を比較すると、*in situ* vaccination 群でより早期にエンドポイントに達するマウスが見られたが、最終的な生存率には差は認められなかった ($p = 0.927$) (図 14)。

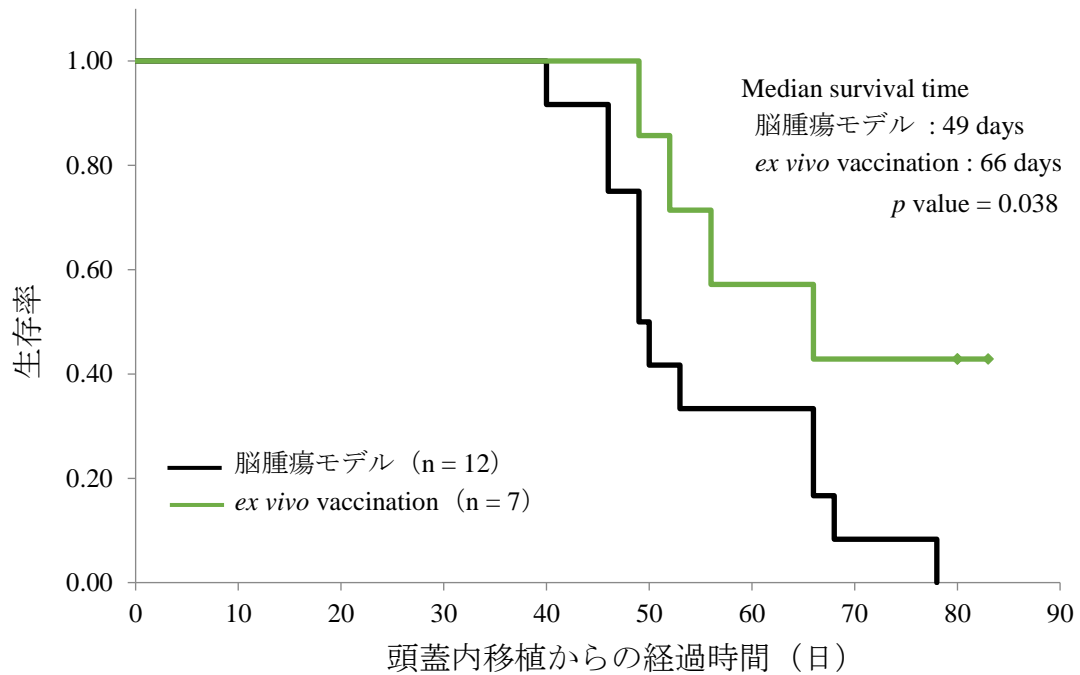


図 13 *ex vivo* vaccination 群と脳腫瘍群の生存解析

ex vivo vaccination 群ではコントロールの脳腫瘍モデルに比較して有意な生存期間の延長が認められた。

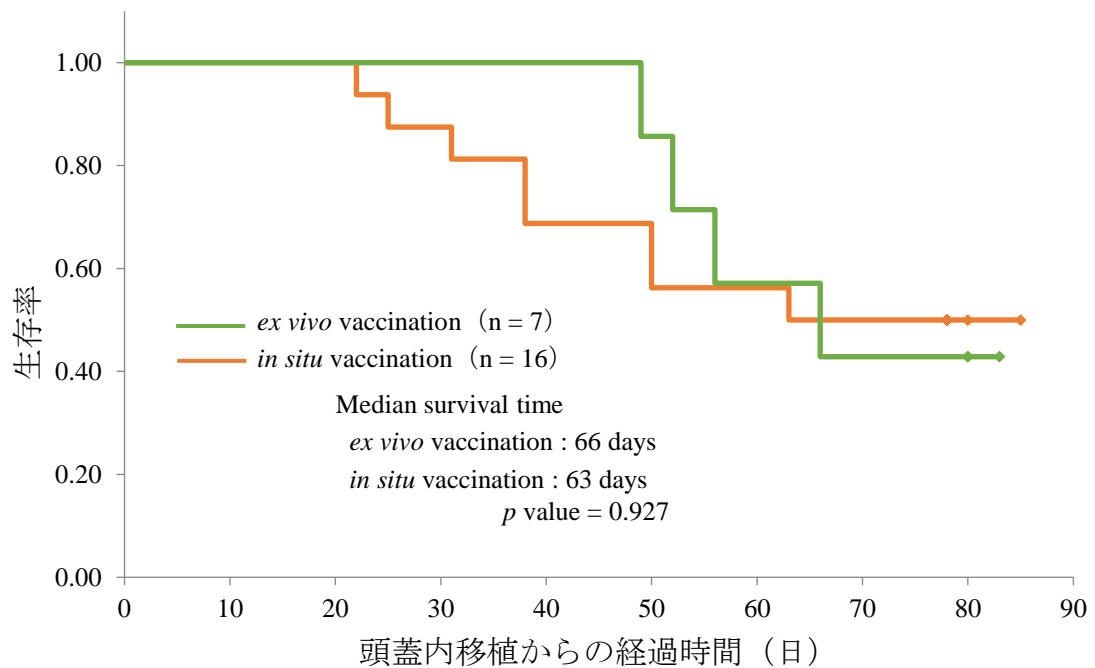


図 14 *in situ* vaccination 群と *ex vivo* vaccination 群の生存解析

ex vivo vaccination と *in situ* vaccination の効果に有意な差はなかった。

6. 長期生存例に対する腫瘍細胞の再移植

in situ vaccination 群の長期生存(最初の頭蓋内への腫瘍移植から 91~175 日生存) マウスについて、腫瘍特異的な免疫記憶獲得の有無を確認するために、GL261-mKO 細胞または B16/BL6 細胞を頭蓋内に再移植した。結果は、GL261-mKO 細胞を再移植した 6 匹のマウスでは腫瘍の生着は認められず、再移植後 200 日以上生存した。一方、B16/BL6 細胞を移植した 6 匹のマウスは移植後 2 週間前後で体重減少が現れ、引き続き神経症状が認められたため、実験を終了した。Kaplan–Meier 解析を行った結果、B16/BL6 細胞を移植したマウスでは生存期間の中央値は 15 日となり、 p 値は 0.0005 で、両群間に有意な差が認められた (図 15)。

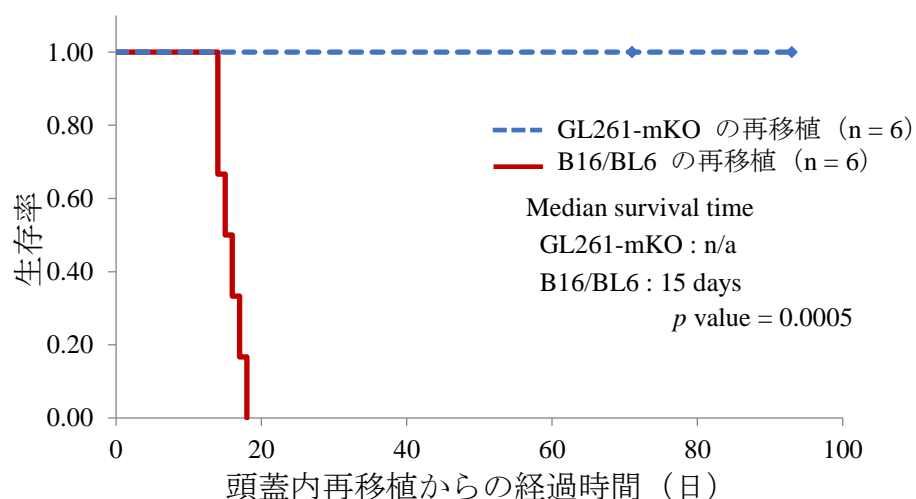


図 15 *in situ* vaccination 群長期生存マウス頭蓋内への腫瘍の再移植
頭蓋内へ再移植した GL261-mKO は再び完全に拒絶され、B16/BL6 を移植したマウスではすべて生着した。

7. 頭蓋内への CD8 陽性細胞の浸潤

大腿皮下の腫瘍に対し、X 線照射を施し、局所コントロールが認められたマウスについて、頭蓋内に腫瘍細胞を移植し 7~14 日後に脳を摘出し、免疫組織化学染色を行った。比較対象として、大腿皮下腫瘍の再発を認めたマウス 2 匹の頭蓋内に同様に腫瘍を移植し摘出した脳および、3 匹の脳腫瘍モデルマウスから摘出した脳を用いた。摘出した脳は凍結切片とした後、抗マウス CD8 抗体で染色した。局所コントロール群のマウスの脳では、腫瘍を移植した際の針跡に沿うように、また残った腫瘍細胞の周囲に CD8 陽性細胞の浸潤が認められた (図 16)。対照的に、局所再発群および脳腫瘍モデルマウスの脳では CD8 陽性細胞は殆ど認められなかった (図 16)。

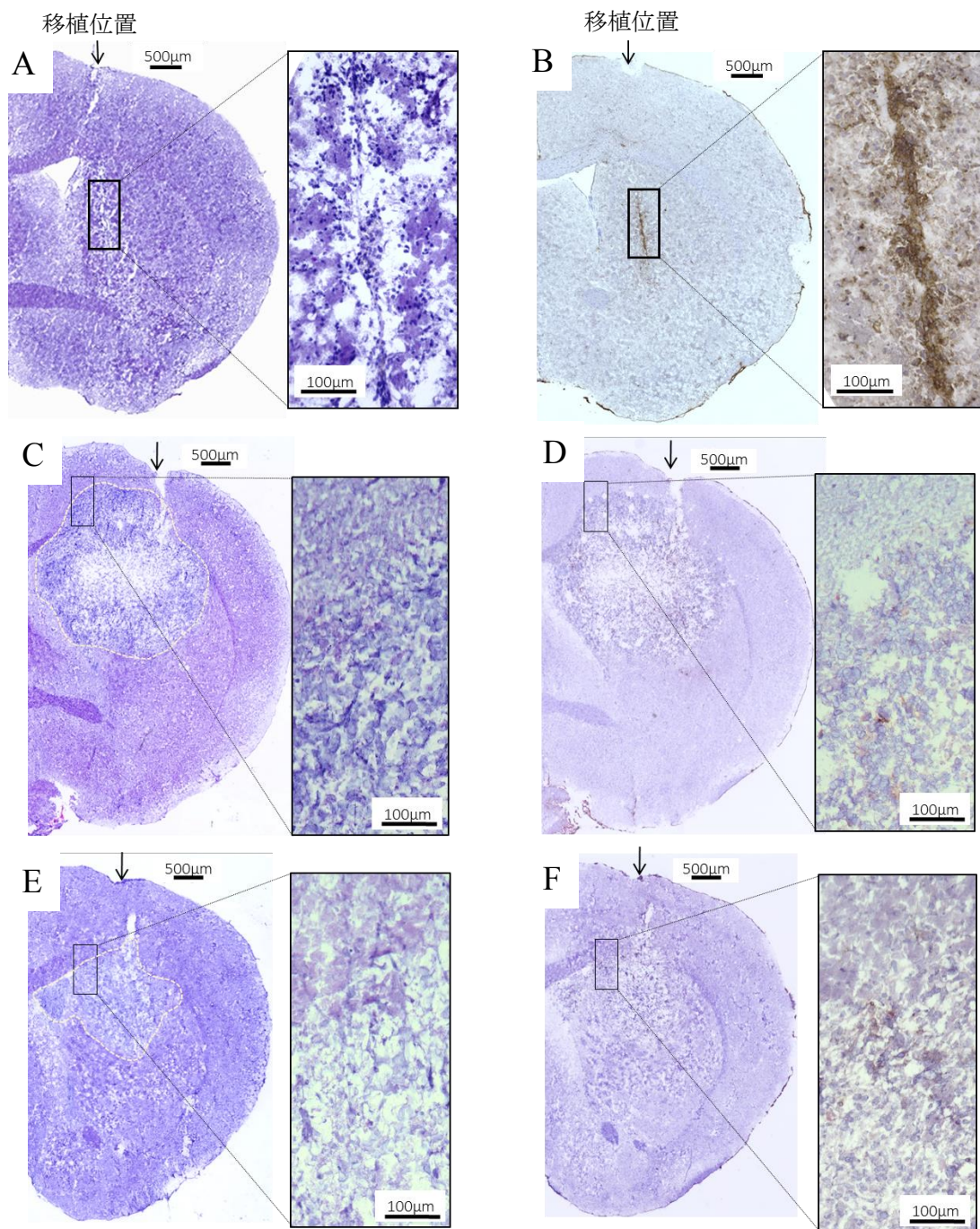


図 16 マウス脳の免疫組織化学染色。

A : 局所コントロール群の HE 染色、B : 局所コントロール群の抗 CD8 抗体染色。C : 局所再発群の HE 染色、D : 局所再発群の抗 CD8 抗体染色。E : 脳腫瘍モデルの HE 染色、F : 脳腫瘍モデルの抗 CD8 抗体染色。点線で囲んだ箇所は腫瘍を示している。局所コントロール群では腫瘍移植部に CD8 陽性細胞の集積が認められるが、局所再発群、脳腫瘍モデルではほとんど認められない。

8. 脾臓細胞からの IFN- γ の放出

in situ vaccination 群のうち、局所コントロールを認めたマウス 4 匹、局所再発を認めたマウス 2 匹、さらに脳腫瘍モデルマウス 3 匹について、脾臓細胞からの IFN- γ の放出を ELISPOT assay により解析した。結果は、局所コントロール群は、全例で抗原刺激により IFN- γ 産生によるスポット数が有意に増加し、局所再発を認めたマウスから得た脾臓細胞を抗原刺激した場合および、脳腫瘍モデルマウスからの脾臓細胞を抗原刺激した場合に比較して、有意なスポット数の増加が認められた ($p = 0.0002, 0.002$) (図 17)。特に局所再発を認めた 2 匹のマウスの脾臓細胞からの IFN- γ 放出は著しく低く、抗原刺激によってもその放出は増加しなかった。このことは、局所再発群で抗腫瘍免疫がほぼ完全に抑制されていることを示している。

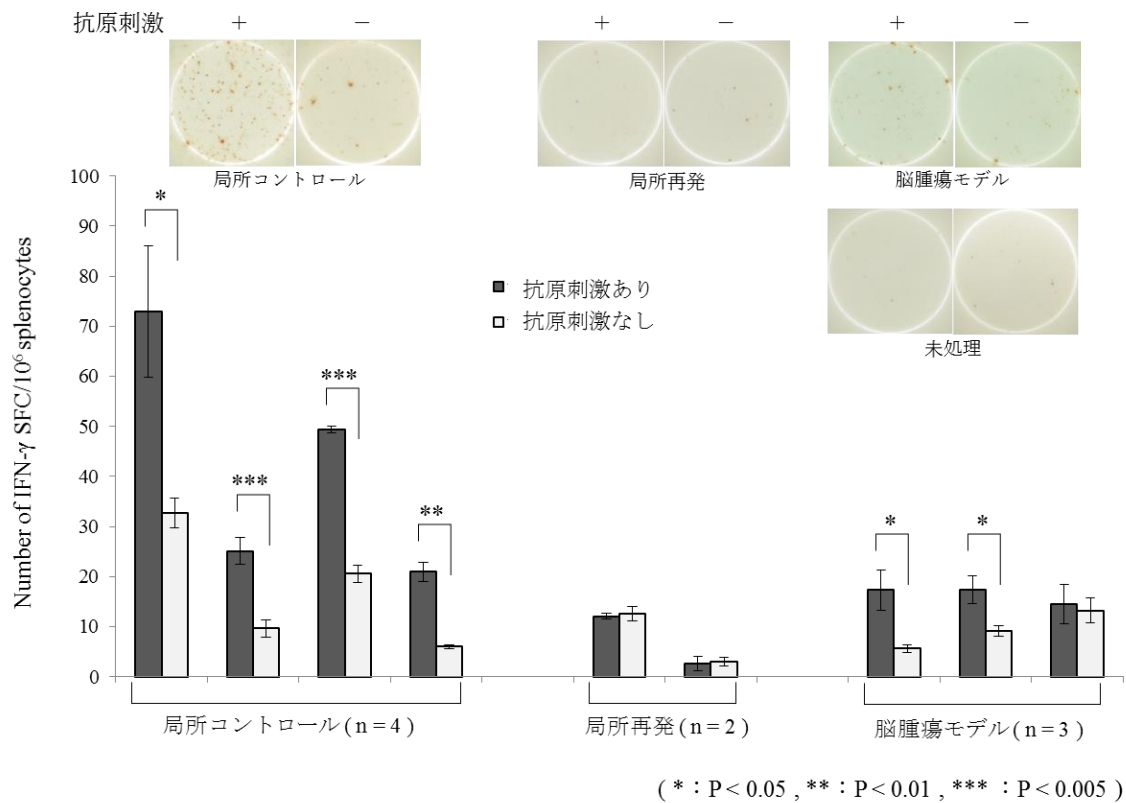


図 17 ELISPOT 法によるマウス脾細胞からの IFN- γ の放出の検討

in situ vaccination の局所コントロール群では、抗原刺激により脾臓細胞からの IFN- γ 産生が有意に増加し、局所再発群・脳腫瘍モデルマウスの脾臓細胞からの IFN- γ 産生に比較して高い値を示した。

IV. 考察

1. GL261-mKO マウス脳腫瘍モデル

GL261 細胞は、C57BL/6 マウス由来の悪性膠芽腫細胞株で、GL261 脳腫瘍モデルは、スタンダードな同系マウス脳腫瘍モデルとして広く免疫療法の研究に使われている。GL261 細胞の性質として、*p53* や *K-ras* 癌遺伝子の変異、また主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) クラス I の発現レベルが低いという報告がなされており、適度な免疫原性を示すとされている。しかしこれらの報告と対照的に、我々の研究室で維持されている GL261 細胞では、90%以上で MHC クラス I の発現が認められている。Szatmári らの総説によると 1×10^2 から 1×10^5 個の GL261 細胞を頭蓋内に移植した時のマウスの生存期間は 25~55 日間で、本実験のプロトコルに比べ移植細胞数が少ないにも関わらず、マウスの生存期間はより短くなっている (22)。そもそも GL261 細胞は樹立後、マウスからマウスへ移植することにより維持されてきた。1980 年代に *in vitro* での継代が成功したのだが、その維持には研究室ごとに違いがあると考えられ、継代方法の違いや長期に渡る *in vitro* での継代により、GL261 細胞の免疫原性に差異が生じたことが、研究グループ間の実験結果

の違いの原因になっていると考えられる。本研究では、腫瘍の増殖を IVIS で検出するために、Kusabira Orange 蛍光タンパク質遺伝子を GL261 細胞に導入した。そして、樹立した GL261-mKO 細胞株の増殖能と放射線感受性が、親株の GL261 の性質と変化していないかどうかの確認を行った。結果からは倍加時間、放射線感受性ともに両細胞株に有意な違いはなく、クローン化の際に特異な変異クローンを選択していないことが示唆された。また放射線感受性の検討で、GL261-mKO 細胞の 2 Gy での生存率は約 45%であり、これは Szatmári らの報告と同等の結果であった。

2. 局所コントロール群におけるアブスコパル効果

大腿皮下へ GL261-mKO 細胞を移植し、腫瘍局所へ X 線を照射した、*in situ* vaccination 群の 16 匹のマウスのうち、大腿皮下腫瘍が X 線照射により治癒した 8 匹のマウスでは、いずれも頭蓋内に移植した同じ腫瘍細胞は拒絶された。対照的に、局所再発が認められた 8 匹では例外なく頭蓋内に移植した腫瘍細胞は生着し、しかも著しい速さで増殖を見せたことから、これらのマウスは免疫不応答状態に陥ったと考えられる (図 10)。*in situ* vaccination 群の生存解析における早期死亡例はこれら免疫不応答状態のマウスによるもので、グラ

フの長期生存例はすべて局所コントロール群のマウスである (図 11)。さらに、局所再発群の 8 例のマウスでは、その生存期間は 12 匹の脳腫瘍モデルマウス群の結果に比較して、有意に短縮されている (図 12)。脳腫瘍モデルマウスでは、頭蓋内に移植した腫瘍細胞は、移植後早期には内因性の免疫機構により一過性の減少を見せ、その後生き残った腫瘍細胞が指数関数的に増殖したと考えられる。対照的に、*in situ* vaccination 群において局所再発が見られたマウスでは、再発した腫瘍および腫瘍微小環境から放出される免疫抑制物質により、腫瘍抗原特異的な免疫機能ばかりでなく、全身的な免疫機能が同時に抑制されることにより、皮下および頭蓋内腫瘍の著しい増殖が起こることが予想された (図 19)。この現象は放射線照射後に生き残った腫瘍が予期せぬ著しい再増殖を見せる “Phoenix rising” と呼ばれる現象に似ている (26, 27)。この現象は照射後の腫瘍細胞から産生される PGE2 によって誘導され、腫瘍の急激な再増殖が引き起こされると報告されている (26)。

本研究の結果から、局所コントロールと局所再発のバランスが、コントロール側に傾けば、その個体ではうまく全身性の抗腫瘍免疫が獲得できることが明らかとなった (図 17)。対照的に、その balan

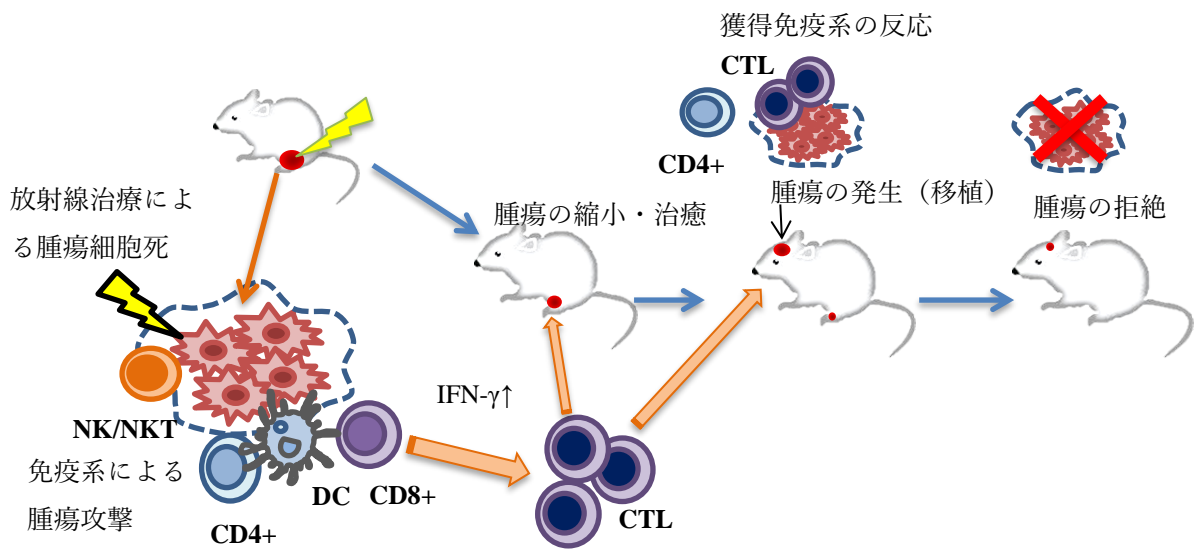


図 18 局所の腫瘍がコントロールされたときの抗腫瘍免疫反応

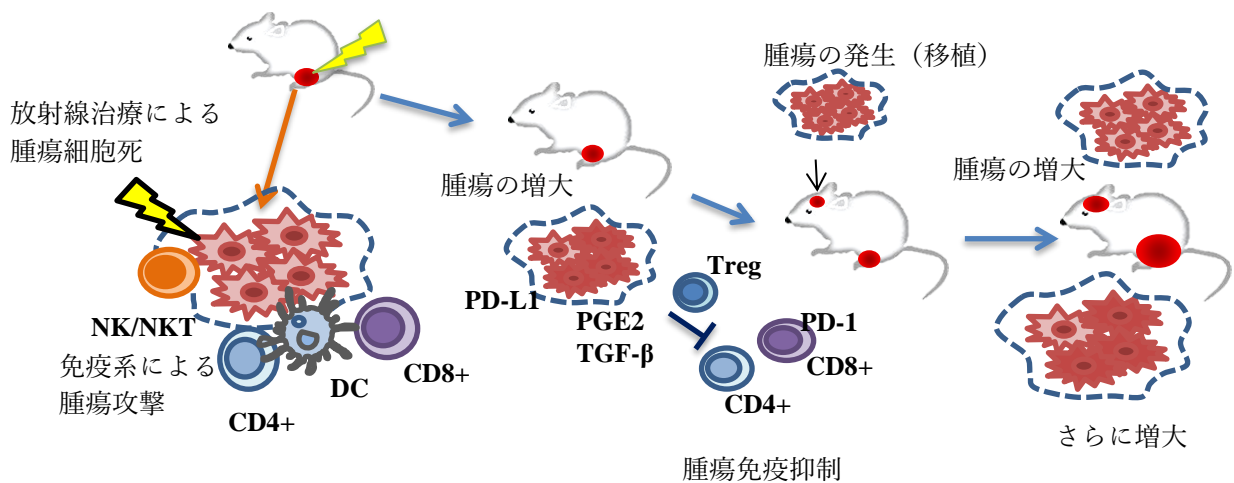


図 19 局所再発のときの免疫不応答状態

スが再発側へ傾くと、免疫不応答となり、抗腫瘍免疫反応は抑制されることが示唆された。そのバランスを分けている特定の因子を解明することは非常に困難であるが、多くは個体の持つ自然免疫の状

態に依存していると考えられる。我々の研究から、末梢の腫瘍の治療率を高めることが、全身におよぶ抗腫瘍免疫能の獲得率の上昇に深く関与していることが示唆されたが、今後さらに局所コントロール率を高めて全身へのアブスコパル効果を増強するには、放射線照射と免疫賦活剤（アジュバントやサイトカイン等）の併用や、安全な範囲内での照射線量の増加などを検討する必要があると考えられる。

がんに対する免疫治療の解析では、予防的な実験モデルよりも治療的な実験モデルの検討がより臨床的な意味を持つと考えられる。我々はこれまでに、頭蓋内と大腿皮下へ同時に、もしくは頭蓋内への移植 3 日後に大腿皮下へ腫瘍細胞を移植し、大腿皮下腫瘍のみに放射線照射を施す実験を行ってきたが、同時移植群では 4 匹中 1 匹のみで頭蓋内へのアブスコパル効果が観察され、また頭蓋内への移植 3 日後に大腿皮下へ腫瘍細胞を移植した群では 5 匹全例でアブスコパル効果は観察されなかった。この検討からは局所照射によって誘導されるアブスコパル効果のみで、すでに存在する頭蓋内の腫瘍を縮小させることは大変難しいと考えられる。これは GL261 の免疫原性が不十分であることが一因としてあるのかもしれない。またア

ブスコパル効果をより効率的に発現させるためには、放射線照射と他の免疫治療を組み合わせた治療が効果的であろうと考えられる。近年、局所放射線照射と抗 CTLA-4 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の併用療法により、同時に移植した反対側の大腿皮下腫瘍に対しても良好な結果が得られたという報告がなされた (28, 29)。また GL261 細胞の免疫原性を補う目的で、アジュバントとして NKT 細胞を活性化する α -GalCer を用いたり、GL261 にサイトカインを産生する遺伝子を導入することによって、良好な結果が得られている (30, 31)。

3. *ex vivo* cell vaccine の効果

本研究からも、サンプルチューブ内で X 線を照射した細胞は、効果的な腫瘍ワクチンとして作用することが明らかとなった。Szatmári らの報告にある放射線照射した GL261 細胞ワクチン投与の実験では、頭蓋内に腫瘍細胞を移植する 3 日または 7 日前にワクチン投与を行った場合に効果が見られた。しかし頭蓋内への GL261 細胞の移植と同日、または移植 3 日後にワクチンを投与したときは、有意な効果は得られなかった (22)。これは我々の結果と一致している。

本研究に使用した GL261-mKO 腫瘍細胞の免疫原性に対しては、

遺伝子導入した Kusabira Orange タンパク質の影響について考慮する必要がある。Rosenzweig らはアカゲザルの実験系で細胞に導入された enhanced green fluorescent protein (EGFP) が抗原として働き、MHC により抗原提示されることで、EGFP を認識する CD8 陽性リンパ球由来の CTLs が EGFP を発現する自己の CD34 陽性細胞を攻撃し溶解することを報告している (32)。Kusabira Orange の免疫原性については明らかにされておらず考慮の必要はあるが、本研究の免疫反応は主に GL261 細胞由来の腫瘍抗原によると考えている。その理由は腫瘍特異的免疫を獲得したマウスの脾臓細胞を用いた ELISPOT assay で、GL261 細胞と GL261-mKO 細胞のいずれを抗原として用いても、同等の IFN- γ の放出が認められたからである。

GL261-mKO 細胞をマウス大腿皮下へ移植してから X 線照射した時 (*in situ* vaccination) と、サンプルチューブ内で X 線照射してからマウスへ接種した時 (*ex vivo* vaccination) を比較すると、*in situ* vaccination では腫瘍細胞だけでなく、周辺組織の一部も同時に照射されある程度の炎症反応が惹起される。また照射によって腫瘍細胞では DAMPs 等の danger signal の放出を伴う免疫原性細胞死が誘導され、これが全身性の免疫反応の引き金になると考えられる。一方、*ex vivo*

vaccination では、局所での炎症はより少ないために、免疫反応や danger signal の放出レベルもより低くなり、それゆえに全身的な腫瘍特異的な免疫効果も低くなると考えられる。さらに臨床的な観点からは、*ex vivo* vaccination のための腫瘍ワクチンを調製するためには、手術による腫瘍摘出が必要となる。対照的に、*in situ* vaccination では、腫瘍の摘出は必要とならない。このことから *in situ* vaccination はより広い癌種に利用できることが示唆される。

4. 長期生存例に対する腫瘍細胞の再移植

本研究において、大腿皮下腫瘍が治癒し、頭蓋内へ移植した腫瘍が拒絶されて長期生存したマウスにおいて、「免疫記憶」が樹立されたかどうかを確認した。その結果、GL261-mKO 細胞を頭蓋内に再移植したマウスでは、腫瘍は完全に拒絶されたが、B16/BL6 悪性黒色腫細胞を移植したマウスでは、腫瘍は急激に増殖し、著しい体重減少と神経症状を認めた。それらのマウスの生存期間の中央値は 15 日であったが、未処理のマウスの頭蓋内に同じ B16/BL6 細胞を移植した時の生存期間の中央値は 12 日であり、*in situ* vaccination の長期生存マウスはこれに比べると、有意な生存期間の延長が認められている。この理由は、gp100 や trp2 のように melanoma と glioma に共通な

腫瘍抗原が存在することで (33)、これらの共通抗原に対する CTLs によって、*in situ vaccination* の長期生存マウスでは B16/BL6 細胞の増殖遅延が起これると考えられる。しかし、両細胞間には多くの共通でない腫瘍抗原が存在しており、このため移植された B16/BL6 細胞の全てが CTLs に攻撃されるわけではなく、結局は生き残り、急激に増殖すると考えられる。

5. 頭蓋内への免疫担当細胞の浸潤と ELISPOT assay

本研究では、*in situ vaccination* により治癒したマウスにおいて、頭蓋内の腫瘍移植部分周辺への CD8 陽性細胞の浸潤が認められた (図 16)。Biollaz らは、マウス腫瘍モデルを用いて、頭蓋内および末梢へ glioma 細胞を移植したとき、移植した部位によって、免疫担当細胞の浸潤パターンに違いがあることを報告している (34)。彼らの報告では、頭蓋内への glioma 細胞の移植後 9 日目になって CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞が確認されている。このことから、腫瘍細胞移植直後に一過性の腫瘍細胞の減少が認められるのは、非特異的な免疫細胞 (例えば脳ではミクログリアなど) による腫瘍への攻撃の可能性を示唆している (35)。また Mariani らは、脳への腫瘍移植の 7 日後に移植した腫瘍周辺にミクログリアが集まっていることを報告

している (36)。これは腫瘍細胞が移植されると、最初に脳内の内因性免疫機構としてミクログリアが腫瘍を異物として認識し、集まってきて排除しようと働き、次に腫瘍抗原を認識する CD8 陽性 CTLs が腫瘍を攻撃して排除する可能性を示唆している。今後は、この内因性（先天性）免疫と獲得免疫の 2 種類の機構の相互作用や役割を明らかにすることが脳内における腫瘍免疫機構の理解に必須であると考えられる。

また脾臓細胞を用いた ELISPOT assay により、局所腫瘍が治癒したマウスでは局所再発を示したマウスに比較し、抗原特異的な IFN- γ の放出が有意に高いことが明らかとなった (図 17)。この結果は、局所腫瘍が治癒したマウスでは、腫瘍抗原特異的な免疫の獲得がなされたことを裏付けたものである。

V. 結論

本研究の GL261-mKO を移植したマウス腫瘍モデルを用いた予防的な実験プロトコルにおいて、*in situ* vaccination が有効であることが明らかとなった。特に、大腿皮下腫瘍が X 線照射によって治癒した場合は、頭蓋内にもアブスコパル効果が及ぶことが明らかにされたことから、放射線照射により局所の腫瘍が制御されるか否かが、全身的な腫瘍免疫反応のバランスに大きく影響することが示唆された。これらの結果から、悪性脳腫瘍や転移性脳腫瘍に対しても腫瘍免疫療法の有効性が期待できることが示され、今後は局所照射による免疫賦活効果をさらに高めるために、新たな免疫アジュバントや免疫チェックポイント阻害剤などとの併用効果の検討が期待される。

参考文献

1. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015 Dec 15; 314(23): 2535-43.
2. Ishikawa E, Muragaki Y, Yamamoto T, et al. Phase I/IIa trial of fractionated radiotherapy, temozolomide, and autologous formalin-fixed tumor vaccine for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg*. 2014 Sep; 121(3): 543-53.
3. Muragaki Y, Maruyama T, Iseki H, et al. Phase I/IIa trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine concomitant with fractionated radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma. *Clinical article. J Neurosurg*. 2011 Aug; 115(2): 248-55.
4. Formenti SC, Demaria S. Radiation therapy to convert the tumor into an in situ vaccine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 84: 879-80.
5. Demaria S, Bhardwaj N, McBride WH, et al. Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005; 63: 655-66.
6. Frey B, Rubner Y, Kulzer L, et al. Antitumor immune responses induced by ionizing irradiation and further immune stimulation. *Cancer Immunol Immunother*. 2014; 63: 29-36.
7. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N Engl J Med*. 2012; 366: 925-31.
8. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 860-75.
9. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J*. 2012; 31: 1062-79.
10. McBride WH, Chiang CS, Olson JL, et al. A sense of danger from radiation. *Radiat Res*. 2004; 162: 1-19.

11. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007; 13: 54-61.
12. Krysko O, Løve Aaes T, Bachert C, et al. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis*. 2013; 16;4: e631.
13. Reynders K, Illidge T, Siva S, et al. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev*. 2015; 41: 503-10.
14. Abuodeh Y, Venkat P, Kim S. Systematic review of case reports on the abscopal effect. *Curr Probl Cancer*. 2016; 40: 25-37.
15. Ishiyama H, Teh BS, Ren H, et al. Spontaneous regression of thoracic metastases while progression of brain metastases after stereotactic radiosurgery and stereotactic body radiotherapy for metastatic renal cell carcinoma: abscopal effect prevented by the blood-brain barrier? *Clin Genitourin Cancer*. 2012 Sep; 10(3): 196-8.
16. Stamell EF, Wolchok JD, Gnjatic S, et al. The abscopal effect associated with a systemic anti-melanoma immune response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013 Feb 1; 85(2): 293-5.
17. Abuodeh Y, Venkat P, Kim S. Systematic review of case reports on the abscopal effect. *Curr Probl Cancer*. 2016 Jan-Feb; 40(1): 25-37.
18. Reynders K, Illidge T, Siva S, et al. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev*. 2015 Jun; 41(6): 503-10.
19. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012; 122: 1164-71.
20. Yang I, Han SJ, Kaur G, et al. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci*. 2010; 17: 6-10.
21. Mora R, Abschuetz A, Kees T, Dokic I, Joschko N, Kleber S, Geibig R, Mosconi E, Zentgraf H, Martin-Villalba A, Régnier-Vigouroux A. TNF-alpha- and TRAIL-resistant glioma cells undergo

- autophagy-dependent cell death induced by activated microglia. *Glia*. 2009 Apr 1; 57(5): 561-81.
22. Szatmári T, Lumnitzky K, Désaknai S, et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci*. 2006; 97: 546-53.
 23. Maes W, Van Gool SW. Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. *Cancer Immunol Immunother*. 2011; 60: 153-60.
 24. Hunn MK, Farrand KJ, Broadley KW, et al. Vaccination with irradiated tumor cells pulsed with an adjuvant that stimulates NKT cells is an effective treatment for glioma. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 6446-59.
 25. National Institutes of Health, Animal Research Advisory Committee. NIH Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals. Available from
URLs:https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/asp_endpoints.pdf
 26. Li F, Huang Q, Chen J, et al. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal*. 2010; 3: ra13.
 27. Ng WL, Huang Q, Liu X, et al. Molecular mechanisms involved in tumor repopulation after radiotherapy. *Transl Cancer Res*. 2013; 2: 442-448.
 28. Yoshimoto Y, Suzuki Y, Mimura K, et al. Radiotherapy-induced anti-tumor immunity contributes to the therapeutic efficacy of irradiation and can be augmented by CTLA-4 blockade in a mouse model. *PLoS One*. 2014; 31;9: e92572.
 29. Belcaid Z, Phallen JA, Zeng J, et al. Focal radiation therapy combined with 4-1BB activation and CTLA-4 blockade yields long-term survival and a protective antigen-specific memory response in a murine glioma model. *PLoS One*. 2014; 9: e101764.
 30. Lumnitzky K, Desaknai S, Mangel L, et al. Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing autologous cancer

- cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther.* 2002; 9: 44-52.
31. Newcomb EW, Demaria S, Lukyanov Y, et al. The combination of ionizing radiation and peripheral vaccination produces long-term survival of mice bearing established invasive GL261 gliomas. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 4730-7.
 32. Rosenzweig M, Connole M, Glickman R, et al. Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood.* 2001; 97: 1951-9.
 33. Prins RM, Odesa SK, Li au LM. Immunotherapeutic targeting of shared melanoma-associated antigens in a murine glioma model. *Cancer Res.* 2003; 63: 8487-91.
 34. Biollaz G, Bernasconi L, Cretton C, et al. Site-specific anti-tumor immunity: differences in DC function, TGF-beta production and numbers of intratumoral Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 1323-33.
 35. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005; 308: 1314-8.
 36. Mariani CL, Kouri JG, Streit WJ. Rejection of RG-2 gliomas is mediated by microglia and T lymphocytes. *J Neurooncol.* 2006; 79: 243-53.

謝辞

本研究実施の機会を与えてくださり、厳しくも温かいご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学医学医療系 生命システム医学専攻 坪井康次教授に深く感謝申し上げます。実験に際しご助言くださいましたゲレルチュルン・アリウンゲレル先生、三輪佳宏先生、実験の実施をお手伝いいただきました森容子さん、そして博士課程の Wang Yuzi さんに深く感謝いたします。

また、研究生活におきまして大変お世話になりました放射線生物学研究室の皆様、陽子線医学利用研究センターの皆様にお礼を申し上げます。