

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09650

研究課題名(和文)ポリオウイルスを用いた神経芽腫の新しい治療法の研究

研究課題名(英文) Novel treatment for neuroblastoma by using live-attenuated poliovirus

研究代表者

豊田 秀実 (TOYODA, HIDEKI)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60525327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はポリオウイルスが神経芽腫細胞に対して抗腫瘍活性を持つ事を報告してきた。研究で用いた細胞は、マウス神経芽腫細胞(N2a)にCD155を導入した細胞であるため、強制発現させたCD155が抗腫瘍免疫の標的になっている可能性がある。CD155tgA/JマウスにN2aを移植すると腫瘍形成を認めしたが、抗腫瘍免疫を獲得したマウスにN2aを移植すると腫瘍形成しなかったため、CD155は抗腫瘍免疫の標的になっていない。

抗腫瘍免疫を獲得したマウスの脾細胞と神経芽腫細胞と混合培養すると、抗腫瘍効果を認めた。CD8T細胞を除去すると抗腫瘍効果が消失したため、CD8T細胞が抗腫瘍免疫に重要である。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that neuroblastoma (NB) subcutaneously implanted in immuno-competent mice is eliminated by intratumoral administration of poliovirus (PV). Our results also suggested that the in vivo destruction of NB cells by virotherapy lead to a robust antitumor immune response. Since we used CD155-transfected NB for experiments, CD155 might be a target for antitumor immune response. Although NB can grow in naïve mice, no tumor growth was observed in mice cured of NB that were reinnoculated with NB cells.

Splenocytes harvested from NB-bearing mice treated with PV exhibited higher lytic activity against NB cells than did those from splenocytes derived from naïve mice. In vitro T-cell depletion experiments indicated that CD8+ T cells were essential for the cytotoxic antitumor activity of splenocytes.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：神経芽腫 ポリオウイルス

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍で最も多く、1歳以降に発症する場合は外科的治療・化学療法・放射線療法を使用した集学的治療を行っても予後は非常に不良であり、新しい治療法の開発が強く望まれている。一方、poliovirus (以下 PV) は小児麻痺の原因ウイルスで、poliovirus receptor (以下 CD155) を介して脊髄の前角細胞に感染し、アポトーシスを誘導することにより運動神経麻痺を発症する。こうした PV の神経細胞に対する親和性に着目し、神経芽腫治療への応用を試みてきた。これまで我々は、マウスを用いた研究で PV は神経芽腫細胞に対して強い抗腫瘍活性を持ち、マウスに移植した腫瘍が消失する事を報告してきた (H.Toyoda et. al. International Journal of Oncology 2004) (H.Toyoda et. al. Cancer Research 2007)。さらに驚いたことに神経芽腫を PV で治療することで抗腫瘍免疫が誘導されることが示唆された (H.Toyoda et. al. International Journal of Oncology 2010)。

神経芽腫の治療のために PV を患児に投与した場合、PV による運動神経麻痺が発症する可能性があるため弱毒化した安全な PV を使用する必要がある。我々は、PV ゲノムの 5' 末端にある clover leaf と Internal Ribosomal Entry Site (IRES) との間に存在する spacer region に約 50 base pairs (bp) の塩基を挿入することで PV を劇的に弱毒化させることに成功した (Cello et al. Science 2002, H.Toyoda et. al. Cancer Research 2007, H.Toyoda et al. Journal of Virology 2007)。また、マウスは CD155 を持たないため PV の感染が成立せず、PV の神経毒性の評価が困難である。そこで我々は A/J マウス由来の神経芽腫細胞株 (Neuro-2a) に CD155 を発現させ (Neuro-2a^{CD155})、これを CD155 トランスジェニック A/J マウス (CD155tgA/J マウス) に移植し、PV の抗腫瘍効果だけでなく副作用の評価も可能な実験系を確立した (H.Toyoda et. al. Cancer Research 2007)。マウスを弱毒 PV で免疫し中和抗体を獲得させた後、皮下に神経芽腫細胞株を移植し腫瘍形成後に PV の腫瘍内投与を行うと 12 匹のマウスのうち 10 匹で抗腫瘍効果が長期間 (180 日以上) 持続し再発も認められなかった。さらに 180 日以上再発を認めていないマウスにもう一度神経芽腫細胞株を移植したが、腫瘍形成は認められなかった。

2. 研究の目的

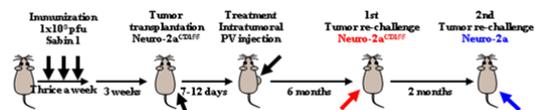
(1) 神経芽腫腫瘍を PV で治療した後、長期間再発せず生存したマウスの抗腫瘍効果の検討

(2) PV 感染により細胞死した神経芽腫細胞をワクチンとした抗腫瘍免疫の誘導

3. 研究の方法

(1) 神経芽腫腫瘍を PV で治療した後、長期間再発せず生存したマウスの抗腫瘍効果の検討

神経芽腫の治療のために PV を患児に投与した場合、PV による運動神経麻痺が発症する可能性があるため弱毒化した安全な PV を使用する必要がある。今回の実験では弱毒生 PV ワクチン株である Sabin 1 を使用した。また、マウスは CD155 を持たないため PV の感染が成立せず、PV の神経毒性の評価が困難なため、A/J マウスと CD155 トランスジェニックマウスの F1 マウスである CD155 トランスジェニック A/J マウス (CD155tgA/J マウス) を使用することで抗腫瘍効果と PV の神経障害を同時に評価できるようにした。さらに A/J マウス由来の神経芽腫細胞株 (Neuro-2a) に CD155 を発現させ (Neuro-2a^{CD155}) PV に対し感受性のある神経芽腫細胞を作成し、これを使用した。予後不良の進行神経芽腫を発症する患児は 1 才半以上の年長児に多く、すでにポリオワクチンを接種されている場合がほとんどである。我々の動物モデルをより臨床に近い状態にするため、マウスを弱毒 PV で免疫し中和抗体を獲得させた後、皮下に神経芽腫細胞株を移植し腫瘍形成後に PV の腫瘍内投与を行った (下図)。抗腫瘍効果が長期間持続し再発も認められず、もう一度同じ神経芽腫細胞株 (Neuro-2a^{CD155}) を移植しても腫瘍形成が認められなかったマウス (cured mice) に対し、CD155 を発現していない Neuro-2a を移植し腫瘍形成が認められるかどうか観察した (下図)。獲得された抗腫瘍効果をさらに詳細に検討するため、cured mice から脾細胞を分離し神経芽腫細胞と混合培養し、脾細胞に抗腫瘍効果がみられるかどうか検討した。さらに、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞をビーズによって取り除いた脾細胞と、神経芽腫細胞を混合培養し抗腫瘍効果に差がみられるか検討した。



(2) PV 感染により細胞死した神経芽腫細胞をワクチンとした抗腫瘍免疫の誘導

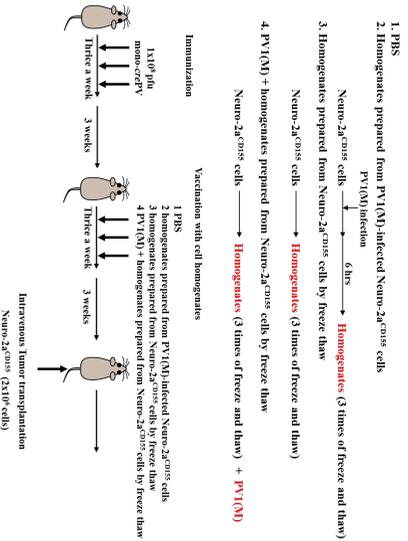
Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞と、凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞の 2 種類の Homogenate を準備した。Sabin 1 を 1 週間おきに 3 回 CD155tgA/J マウスの腹腔内に注射し、PV に対する中和抗体を獲得させた。3 週後にこれらの CD155tgA/J マウスを Homogenate で 1 週間おきに 3 回免疫し抗腫瘍免疫の誘導を試みた。その際、以下の 4 グル

ーゾに分けて免疫した。

PBSのみ

Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞 (Homogenate) 凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞 (Homogenate) 凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞 (Homogenate) + Sabin 1

免疫終了3週間後、Neuro-2aCD155 細胞をマウスの尾静脈から静注し播種性腫瘍形成を予防できるか否か検討した (下図参照)。

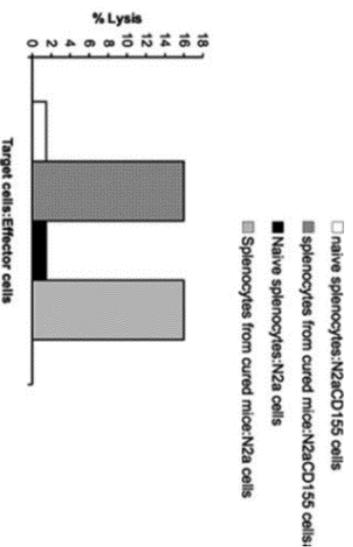


4. 研究成果

(1) 神経芽腫腫瘍を PV で治療した後、長期間再発せず生存したマウスの抗腫瘍効果の検討

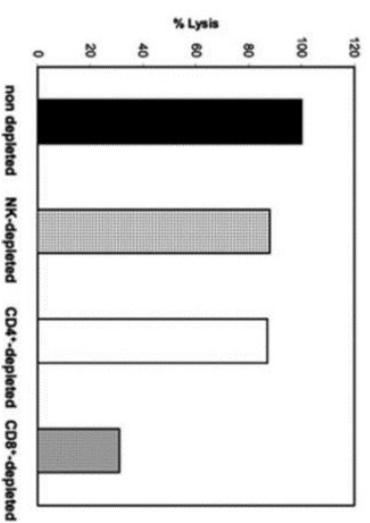
長期間再発せず、抗腫瘍免疫を獲得したと考えられるマウス (cured mice) に、Neuro-2a を移植しても腫瘍形成は認められなかった。このことから、マウスにとつて異種タンパクである CD155 は、抗腫瘍免疫獲得のターゲットになっていないことが明らかになった。

cured mice から分離した脾細胞と、Neuro-2a 細胞または Neuro-2a^{CD155} 細胞と混合培養した結果、両者に対し抗腫瘍効果が認められた (下図)



さらに、cured mice の脾細胞から CD4, CD8, NK 細胞をそれぞれ取り除いた脾細胞 (それぞ

れ CD4 depleted 脾細胞、CD8 depleted 脾細胞、NK depleted 脾細胞) と Neuro-2a あるいは Neuro-2a^{CD155} を混合培養した結果、CD8 depleted 脾細胞と神経芽腫細胞株を混合培養したときの抗腫瘍効果が認められなかった (下図)。これらの実験結果より、抗腫瘍免疫の担当細胞は CD8 陽性 cytotoxic T 細胞であり、神経芽腫を PV で治療することにより抗腫瘍免疫が誘導され、CD8 cytotoxic T 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかになった。



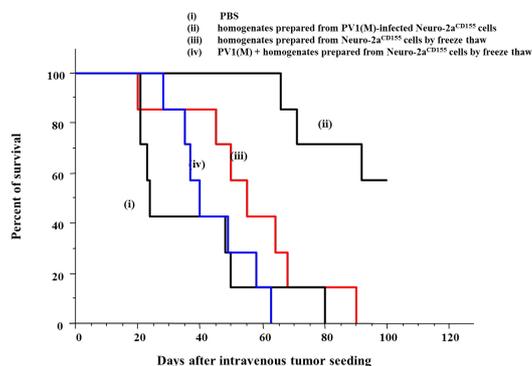
(2) PV 感染により細胞死した神経芽腫細胞をワクチンとした抗腫瘍免疫の誘導

CD155tgA/J マウスの尾静脈から 1×10^6 の Neuro-2a^{CD155} 細胞を静注した予備実験では、肝臓の多発性病変のため全例が 60 日以内に死亡した (下写真)



第1~4群(第1群:PBSのみ、第2群:Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 細胞 (Homogenate)、第3群:凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞 (Homogenate)、第4群:凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞 (Homogenate) + Sabin 1) のそれぞれで CD155tgA/J マウスを免疫した後、マウスに Neuro-2a^{CD155} 細胞を尾静脈から移植した。Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 細胞 Homogenate でワクチン下群 (第2群) では、腫瘍増殖抑制効果が認められた (下図)。このことから、PV 感染で細胞死した神経芽腫細胞には抗腫瘍免疫誘導能があることが明らかになった。

Percentage of tumor-free mice after intravenous Neuro-2a^{CD155} injection.



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10件)

- 1) Nishii R, Moriyama T, Janke LJ, Yang W, Suiter C, Lin TN, Li L, Kihira K, Toyoda H, Hofmann U, Schwab M, Takagi M, Morio T, Manabe A, Kham S, Jiang N, Rabin KR, Kato M, Koh K, Yeoh AE, Hori H, Yang JJ. Preclinical evaluation of NUDT15-guided thiopurine therapy and its effects on toxicity and anti-leukemic efficacy. *Blood*. 2018 Mar 23. [Epub ahead of print] (査読あり)
- 2) Xu DQ, Toyoda H, Qi L, Morimoto M, Hanaki R, Iwamoto S, Komada Y, Hirayama M. Induction of MEK/ERK activity by AZD8055 confers acquired resistance in neuroblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Mar 30. [Epub ahead of print] (査読あり)
- 3) Xu DQ, Toyoda H, Yuan XJ, Qi L, Chelakkot VS, Morimoto M, Hanaki R, Kihira K, Hori H, Komada Y, Hirayama M. Anti-tumor effect of AZD8055 against neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. 2018 Apr 15;365(2):177-184. (査読あり)
- 4) Moriyama T, Nishii R, Lin TN, Kihira K, Toyoda H, Jacob N, Kato M, Koh K, Inaba H, Manabe A, Schmiegelow K, Yang JJ, Hori H. The effects of inherited NUDT15 polymorphisms on thiopurine active metabolites in Japanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2017 Jun;27(6):236-239. (査読あり)
- 5) Yodoya N, Iwamoto S, Matsumine A, Azuma E, Toyoda H, Miura Y, Nakatani K, Imai H, Hirayama M, Komada Y. Ewing Sarcoma of the Bone With EWS/FL11 Translocation After Successful Treatment of Primary Osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017 Jan;39(1):6-9. (査読あり)
- 6) Yamazaki T, Shibuya A, Ishii S, Miura N, Ohtake A, Sasaki N, Araki R, Ota Y, Fujiwara M, Miyajima Y, Uetake K, Hamahata K, Kato K, Kawakami K, Toyoda H, Moriguchi N, Okada M, Nishi M, Ogata Y, Takimoto T, Ohga S, Ohta S, Amemiya S. High-dose Cepharanthin for pediatric chronic immune thrombocytopenia in Japan. *Pediatr Int*. 2017 Mar;59(3):303-308. (査読あり)
- 7) Toyoda H, Wada H, Miyata T, Amano K, Kihira K, Iwamoto S, Hirayama M, Komada Y. Disease Recurrence After Early Discontinuation of Eculizumab in a Patient With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With Complement C3 I1157T Mutation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2016 Apr;38(3):e137-9. (査読あり)
- 8) Qi L, Toyoda H, Xu DQ, Zhou Y, Sakurai N, Amano K, Kihira K, Hori H, Azuma E, Komada Y. PDK1-mTOR signaling pathway inhibitors reduce cell proliferation in MK2206 resistant neuroblastoma cells. *Cancer Cell Int*. 2015 Sep 29;15:91. (査読あり)
- 9) Tanimura M, Dohi K, Hirayama M, Sato Y, Sugiura E, Nakajima H, Kanemitsu S, Toyoda H, Yamada N, Masuya M, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H, Azuma E, Ito M. Recurrent inflammatory aortic aneurysms in chronic mucocutaneous candidiasis with a gain-of-function STAT1 mutation. *Int J Cardiol*. 2015 Oct 1;196:88-90. (査読あり)
- 10) Shankar V, Hori H, Kihira K, Lei Q, Toyoda H, Iwamoto S, Komada Y. Mesenchymal stromal cell secretome up-regulates 47 kDa CXCR4 expression, and induce invasiveness in neuroblastoma cell lines. *PLoS One*. 2015 Mar 16;10(3):e0120069. (査読あり)

[学会発表](計6件)

- 1) 招待講演 豊田秀実 Oncolytic Virotherapy:ポリオウイルスによる神経芽腫治療 第55回静岡小児血液がん研究会(パルシェ会議室、静岡市葵区) 2017.9.16
- 2) 学会発表 平山淳也、天野敬史郎、豊田秀実、平山雅浩 当院で経験した骨肉腫症例における晩期合併症の検討 Late complications in patients with osteosarcoma: A single institutional experience 第59回日本小児血液がん学会(ひめぎんホール、愛媛県松山市) 2017.11.9

- 3) 学会発表 伊藤卓洋、天野敬史郎、豊田秀実、平山雅浩 顆粒球肉腫の自然退縮後に発症した AML の一例 Spontaneous remission of aleukemic cutaneous myeloid sarcoma followed by crisis of acute monoblastic leukemia 第 59 回日本小児血液がん学会（ひめぎんホール、愛媛県松山市）2017.11.9
- 4) 学会発表 森本真理、天野敬史郎、豊田秀実、平山雅浩 mTOR 阻害薬で DIC をコントロールしえたカポジ肉腫様血管内皮腫の 2 例 Successful treatment of kaposiform hemangioendothelioma with disseminated intravascular coagulation using mTOR inhibitor in 2 cases 第 58 回日本小児血液がん学会（品川プリンスホテル、東京都港区）2016.12.16
- 5) 学会発表 徐冬青、豊田秀実、堀浩樹、駒田美弘 mTOR 阻害剤による神経芽腫治療の研究、Treatment for neuroblastoma by mTOR inhibitor 第 57 回日本小児血液がん学会（甲府富士屋ホテル、山梨県甲府市）2015.11.27
- 6) 学会発表 長野由佳、井上幹大、豊田秀実、内田恵一、他 HIF-2 変異を伴う傍神経節腫多発再発に対し 123I-MIBG ラジオナビゲーション手術を施行した 1 例 A case of 123I-MIBG radio-guided navigation surgery for multiple recurrent lesions of paraganglioma with HIF-2alpha mutation 第 57 回日本小児血液がん学会（甲府富士屋ホテル、山梨県甲府市）2015.11.27

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田秀実 (TOYODA HIDEMI)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60525327

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし