

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591359

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 of neuroblastoma by live-attenuated poliovirus

研究代表者

豊田 秀実（TOYODA HIDEMI）

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60525327

研究成果の概要（和文）：我々は今まで、ポリオウイルス（PV）の神経細胞に対する親和性に着目し、PV を神経芽腫の治療に応用しようと試みてきました。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ました。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ました。以上の結果をふまえ、三重大学医学部附属病院では 2010 年から、再発神経芽腫の患者さんに弱毒 PV の腫瘍内投与により治療する、第 1 相の臨床試験を開始しました。

研究成果の概要（英文）：In a previous study, we demonstrated that neuroblastoma subcutaneously implanted in immuno-competent mice is eliminated by intratumoral administration of neuroattenuated poliovirus (PV). Our results also suggested that the in vivo destruction of neuroblastoma cells by virotherapy lead to a robust antitumor immune response. In accordance with these findings, we started phase 1 clinical trial, novel treatment of neuroblastoma by live-attenuated poliovirus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

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

神経芽腫は小児固形腫瘍で最も多い悪性腫瘍で、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ます。一方、ポリオウイルス（以下 PV）は小児麻痺

の原因ウイルスで、ポリオウイルスレセプター（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します。こうした PV の神経細胞に対する親和性に着目し、我々は PV を神経芽腫の治療に応用しようと試みてきました。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ました(H.Toyoda et. al. International Journal of Oncology 2004)。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ります。そこで我々は、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ました(H.Toyoda et. al. Cancer Research 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す。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ました(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ませんでした。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ましたが、腫瘍形成は認められませんでした。このことより神経芽腫を PV で治療することにより抗腫瘍免疫が誘導されることが示唆されました(H.Toyoda et. al. Cancer Research 2007)。以上の結果をふまえ、我々は抗腫瘍免疫獲得の機序を解明し、神経芽腫の腫瘍特異抗原を同定するとともに、これらを応用してがんワクチンの作成を目指しました。

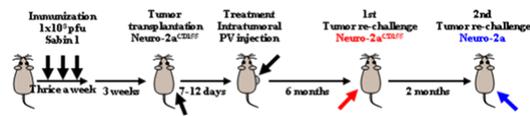
2. 研究の目的

- (1) CD155 が抗腫瘍免疫の標的分子か否かの検討
- (2) in vitro での抗腫瘍効果の実験
- (3) in vivo での抗腫瘍効果の実験
- (4) 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) PV ワクチン株である 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 週後に右側腹部に 1×10^7 の Neuro-2a^{CD155} 細胞を皮下移植し、7-12 日後に 150mm^3 の腫瘍を形成した時点で Sabin1 の腫瘍内投与

を 1 週間毎日行った。その後 180 日間腫瘍サイズをモニターし、腫瘍再発を認めないマウスの左側腹部に 1×10^7 の Neuro-2a^{CD155} 細胞を移植 (1st tumor-rechallenge) した後 2 ヶ月間腫瘍形成の有無を経過観察した (下図)。

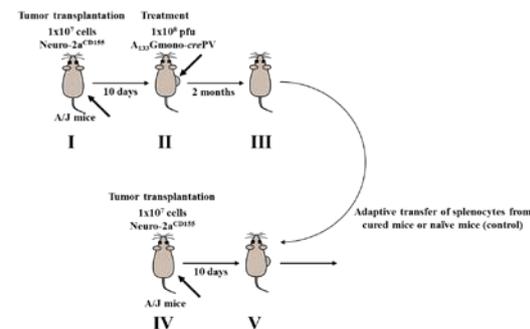


(2)

上記 (1) の 2nd tumor-rechallenge 後で腫瘍形成を認めず、抗腫瘍免疫を獲得したと考えられるマウスから脾臓を摘出し脾細胞を得た。その脾細胞と Neuro-2a^{CD155} 細胞または Neuro-2a 細胞を 0.1, 1, 10, 50 の effector/target ratio で 96 穴プレートを用いて混合培養し、一定期間培養後に培養上清中の LDH 値を測定して脾細胞の抗腫瘍効果を検討した。さらに、抗腫瘍免疫の担当細胞を同定するために、CD4, CD8, NK 細胞をビーズ結合のモノクロナル抗体を用いて除去し、抗腫瘍効果に差がでるか否かを検討した。

(3)

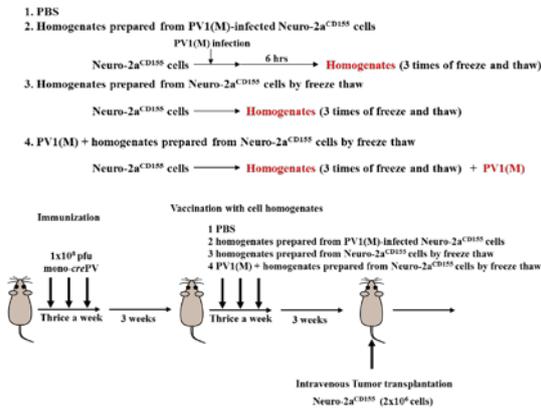
A/J マウスの側腹部に 1×10^7 の Neuro-2a^{CD155} 細胞を皮下移植し、7-12 日後に 150mm^3 の腫瘍を形成した時点で、2nd tumor-rechallenge 後の CD155tgA/J マウスから脾臓を摘出し脾細胞を得た。 1×10^7 の脾細胞を尾静脈から A/J マウスに静注し腫瘍形成の有無を検討した。



(4)

まず Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 細胞と、凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 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 グループに分けて免疫した。1, PBS のみ、2, Sabin 1 感染により細胞死を誘導した

Neuro-2a^{CD155} 細胞 (Homogenate)、3、凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 細胞 (Homogenate)、4、凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 細胞 (Homogenate) + Sabin 1。免疫終了3週間後、Neuro-2a^{CD155} 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。

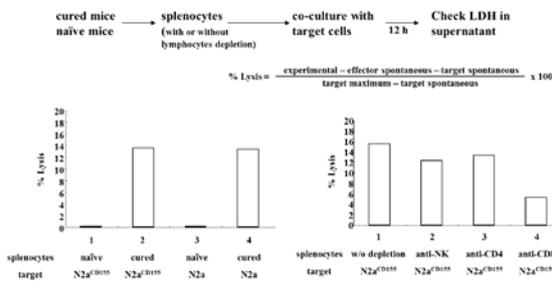


4. 研究成果

(1) 90%のマウスが180日間の経過観察中に再発を認めず、1st tumor-rechallengeの後に腫瘍形成したマウスは一例もなかった。腫瘍再発を認めないマウスの腹部に 1×10^7 の Neuro-2a 細胞を移植 (2nd tumor-rechallenge) したが、すべてのマウスで腫瘍形成は認められず、CD155 が抗腫瘍免疫の標的分子になっていないことが明らかになった。

(2)

上記(1)の2nd tumor-rechallenge後で腫瘍形成を認めず、抗腫瘍免疫を獲得したと考えられるマウスから得られた脾細胞は、Neuro-2a^{CD155} 細胞と Neuro-2a 細胞両方に対し、抗腫瘍効果が認められた。さらに、抗腫瘍免疫の担当細胞は CD8 陽性 cytotoxic T 細胞と同定された (下図)。

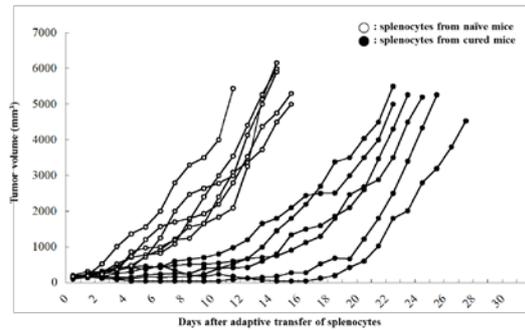


(3)

Neuro-2a^{CD155} に対し抗腫瘍免疫を獲得した A/J マウスから脾細胞を採取し、あらかじめ Neuro-2a^{CD155} を移植しておいた A/J マウスの

尾静脈から輸注した。その結果、Neuro-2a^{CD155} に対し抗腫瘍免疫を獲得した A/J マウスから脾細胞を輸注した群で、腫瘍形成は有意に遅延した。このことから、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ることが、in vivo で証明できた。

Tumor volume after adaptive transfer of splenocytes

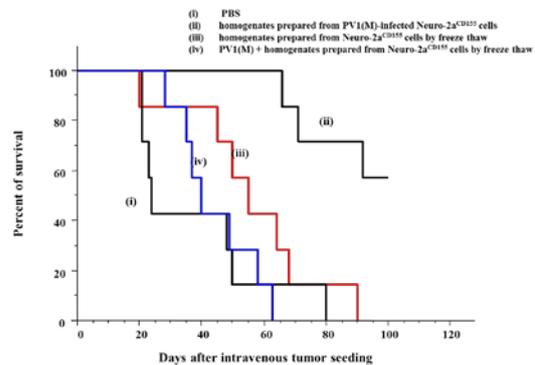


(4)

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 (写真)。しかし、PV 感染で細胞死した神経芽腫細胞で CD155tgA/J マウスをワクチンした後、このマウスに Neuro-2a^{CD155} 細胞を移植したところ、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 2 件)

1. Hidemi Toyoda, Jeronimo Cello, and Eckard Wimmer. Oncolytic poliovirus therapy and immunization with poliovirus-infected cell lysate induces potent antitumor immunity against neuroblastoma in vivo. International Journal of Oncology 38:81-87. 2011.
2. Hidemi Toyoda, Masaru Ido, Kyoichi Nakanishi, Takashi Nakano, Hitoshi Kamiya, Akihiko Matsumine, Atsumasa Uchida, Hitoshi Mizutani, Ludovic de Beaucoudrey, Guillaume Vogt, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jacinta Bustamante, Jean-Laurent Casanova, Yoshihiro Komada. Multiple cutaneous squamous cell carcinomas in a patient with IFN- γ receptor 2 deficiency. Journal of Medical Genetics 47:631-634. 2010.

[学会発表] (計 2 件)

1. 招待講演 豊田秀実 第 3 回大阪小児固形腫瘍研究会 (大阪大学) 2011. 4. 22.
2. 招待講演 豊田秀実 骨軟部腫瘍セミナー (京都リーガロイヤル) 2009. 8. 29.

[図書] (計 1 件)

1. Neuroblastoma - Present and Future
Edited by Hiroyuki Shimada, ISBN 978-953-307-016-2, Publisher: InTech, Published: February 08, 2012
Oncolytic Poliovirus Therapy in a Mouse Model of Neuroblastoma: Preclinical Data Analysis and Future Studies.
Hidemi Toyoda, p349-366.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 秀実 (TOYODA HIDE MI)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
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