

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591547

研究課題名(和文) 弱毒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 live-attenuated poliovirus

研究代表者

豊田 秀実 (Toyoda, Hidemi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60525327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：1才半以降に発症する神経芽腫の予後は不良であり、新しい治療法の開発が望まれている。これまで我々は、*in vitro*と*in vivo*の実験により、ポリオウイルス(PV)は神経芽腫に対し強い抗腫瘍効果を持ち、さらにPVにより神経芽腫が治癒したマウスには、神経芽腫に対する抗腫瘍免疫が誘導されることを証明してきた。これらの基礎実験を踏まえ、三重大学病院では再発・難治性神経芽腫の患者さんを対象に、PVによる神経芽腫の第1相臨床試験を開始し、現在まで2名の患者さんの治療を行った。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of neuroblastoma patients is poor. Thus, to develop a novel treatment is necessary. Our previous studies show that poliovirus has strong anti-neuroblastoma effects both *in vitro* and *in vivo*, and anti-neuroblastoma immune response was induced in neuroblastoma cured mice. In accordance with these findings, we started phase 1 clinical trial for relapse and refractory neuroblastoma patients. We have treated two relapsed neuroblastoma patients so far.

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 (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<sup>CD155</sup>)、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。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の脾細胞を採取し、Neuro-2a 細胞または Neuro-2a<sup>CD155</sup> 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。さらに、マウス脾細胞から CD4, CD8, NK 細胞をそれぞれ取り除いて実験した結果、抗腫瘍免疫の担当細胞は CD8 陽性 cytotoxic T 細胞であることが明らかになった。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、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。

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た。さらに、三重大学医学部倫理委員会の承認を受け、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た。

2. 研究の目的

- (1) 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
- (2) 弱毒 PV による神経芽腫治療の臨床応用

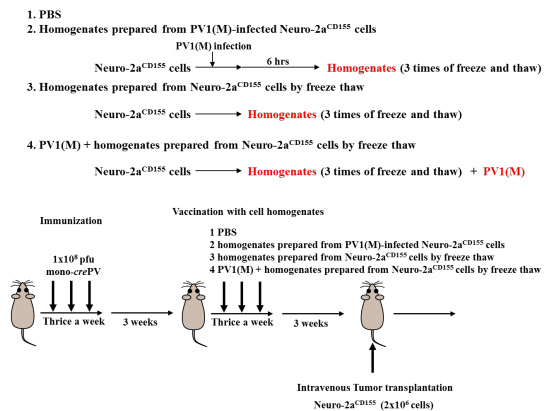
3. 研究の方法

- (1) 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-2a<sup>CD155</sup> 細胞と、凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2a<sup>CD155</sup> 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<sup>CD155</sup> 細胞 (Homogenate)
- 3, 凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2a<sup>CD155</sup> 細胞 (Homogenate)
- 4, 凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2a<sup>CD155</sup> 細胞 (Homogenate) + Sabin 1

免疫終了 3 週間後、Neuro-2a<sup>CD155</sup> 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)。



(2) 弱毒 PV による神経芽腫治療の臨床応用 (第 1 相臨床試験)  
 治療抵抗性となった進行神経芽腫患者を対象とし、弱毒生 PV (Sabin1) の腫瘍内投与の安全性および認容投与量・方法を評価するための第 1 相臨床試験を実施した。Primary endpoint は治療中、治療終了後 4 週間以内の臨床症状 (末梢神経麻痺)、検査値 (末梢血液検査・生化学検査・検尿・胸部レントゲン検査・心電図・心血管超音波検査) 異常の出現頻度、重症度の評価を行った。Secondary endpoint は腫瘍マーカー値 (尿中 VMA/HVA、血中 NSE、骨髄中神経芽腫腫瘍細胞量) の減少率、MRI 検査での腫瘍容積の減少率とした。臨床試験の実施に際しては、患者及び家族の人権を守り、利益を保護することを最優先するよう十分な措置を講じた。具体的には患者あるいは親権者に対するインフォームドコンセントのための十分な説明と研究協力への任意性を確保した。患者名は匿名化し厳重管理した。倫理委員会の指示を遵守した臨床試験を行った。

本臨床研究の選択基準と除外基準は以下とした。

#### 選択規準

1. 腫瘍マーカー検査、核医学的検査、病理組織検査より神経芽腫の診断が得られている再発神経芽腫患者。
  2. 臨床病期 3 期または 4 期でプラチナ製剤、アンスラサイクリン系抗癌剤およびアルキル化剤に対する抵抗性を有していると判断されている患者。
  3. 年齢が 1.5 歳以上、10 才未満。
  4. 心、肺、肝、腎機能が保持されている。
  5. ポリオウイルス (PV1、Sabin 1) に対し中和抗体を有するもの。
  6. Performance Status (ECOG) が 0 または 1。
- 本研究への参加にあたり十分なインフォームド・コンセントの後に、親権者 (及び患者本人) の自由意思による文書同意が得られている

#### 除外規準

1. 治療開始前に運動神経麻痺を有する患者。再発神経芽腫に対し化学療法を施行中の患者。
2. Sabin 1 浮遊液にアレルギーを有する患者。
3. 重篤な肝疾患を有する患者 (AST(GOT)もしくは ALT(GPT)が 100 IU/L 以上)。
4. 試験薬投与開始前 3 か月以内に他の臨床試験 (治験) に参加した患者。
5. 研究責任医師または研究分担医師が被験者として不適当と判断した患者。

#### 実施計画

腫瘍内投与には、日本ポリオ研究所提供の弱毒生ポリオウイルス (Sabin1) を使用する。

投与方法は、腫瘍 (神経芽腫) に対し超音波ガイド下に  $1 \times 10^8$  pfu の Sabin 1 を週 3 回腫瘍内投与する。患者がポリオウイルスに対する中和抗体を持つ場合、1 回投与では抗腫瘍効果が不十分であるため複数回の投与が必要であり (H. Toyoda et. al. Cancer Research 2007) 週 3 回投与とした。0.6 cm<sup>3</sup> の腫瘍を治療するために  $10^6$  pfu の Sabin 1 が必要であり (H. Toyoda et. al. International Journal of Oncology 2004)、一般的な再発神経芽腫腫瘍 (60cm<sup>3</sup>) を治療するためには  $10^8$  pfu の Sabin 1 が必要と考えられるため、投与量は  $10^8$  pfu に設定した。なお、 $10^8$  pfu の Sabin 1 を腫瘍内投与を行った場合、神経障害を起こす可能性は少ないと考えられる (P. Jiang, J. Faase, H. Toyoda et. al. PNAS 2007)。

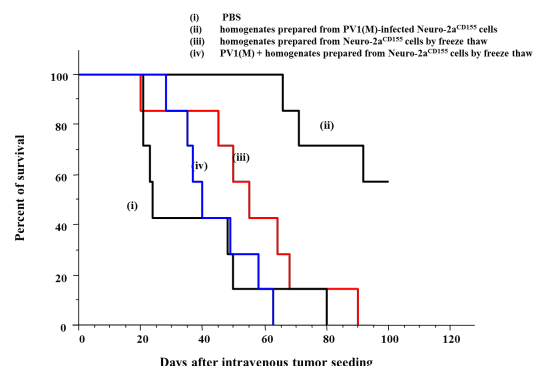
#### 4. 研究成果

(1) 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  $1 \times 10^6$  の Neuro-2a<sup>CD155</sup> 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)。上記第 1 ~ 4 群で CD155tgA/J マウスをワクチンした後、マウスに N2a<sup>CD155</sup> 細胞を尾静脈から移植したところ、Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2a<sup>CD155</sup> 細胞 Homogenate (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<sup>CD155</sup> injection.



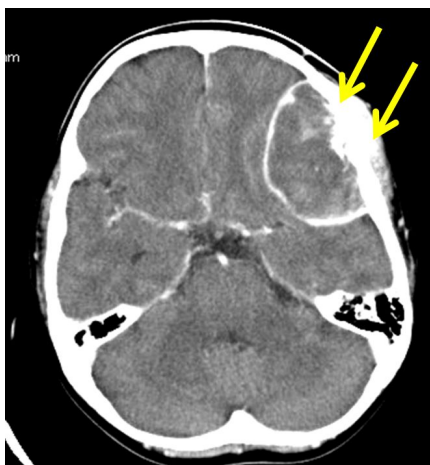
(2) 弱毒 PV による神経芽腫治療の臨床応用 (第1相臨床試験)

選択基準に合致した2例の患者さんに治療を行った。

症例1: 6才10ヶ月 男児。2才0ヶ月発症の左副腎原発神経芽腫(第4期)。4才0ヶ月時に右後頭部に再発、5才2カ月に右眼周囲に再々発し、治療抵抗性となる。下図は、弱毒ポリオウイルスにて治療した再発神経芽腫患児の顔写真と頭部CT画像。円はウイルスの腫瘍内投与を施行した部位で、矢印は腫瘍内投与の穿刺方向。腫瘍内へのPV投与により、神経麻痺等の有害事象は認められなかったが、腫瘍縮小効果は認められなかった。



症例2: 8才4ヶ月 男児。4才5ヶ月発症の右副腎原発神経芽腫(第4期)。6才8ヶ月: 左頭蓋に局所再発し、治療抵抗性となる。下図は、弱毒ポリオウイルスにて治療した再発神経芽腫患児の顔写真と頭部CT画像。円はウイルスの腫瘍内投与を施行した部位で、矢印は腫瘍内投与の穿刺方向。腫瘍内へのPV投与により、神経麻痺等の有害事象は認められなかったが、腫瘍縮小効果は認められなかった。



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 12 件)

1. 豊田秀実、弱毒性ポリオウイルスを用いた神経芽腫の新しい治療、日本小児血液・がん学会雑誌 (Japanese journal of Pediatric Hematology/Oncology) 51(5), 406-411, 2014 (査読なし)
2. Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. Int J Hematol. 2014 Nov;100(5):437-442. (査読有り)
3. Toyoda H, Hirayama J, Sugimoto Y, Uchida K, Ohishi K, Hirayama M, Komada Y. Polycythemia and paraganglioma with a novel somatic HIF2A mutation in a male. Pediatrics. 2014 Jun;133(6):e1787-1791. (査読有り)
4. Khan S, Toyoda H, Linehan M, Iwasaki A, Nomoto A, Bernhardt G, Cello J, Wimmer E. Poliomyelitis in transgenic mice expressing CD155 under the control of the Tage4 promoter after oral and parenteral poliovirus inoculation. J Gen Virol. 2014 Aug;95(Pt 8):1668-1676. (査読有り)
5. Iwamoto S, Yonekawa T, Azuma E, Fujisawa T, Nagao M, Shimada E, Nakamura R, Teshima R, Ohishi K, Toyoda H, Komada Y. Anaphylactic transfusion reaction in homozygous haptoglobin deficiency detected by CD203c expression on basophils. Pediatr Blood Cancer. 2014 Jul;61(7):1160-1161. (査読有り)
6. Atsumi S, Matsumine A, Toyoda H, Niimi R, Iino T, Sudo A. Prognostic significance of CD155 mRNA expression in soft tissue sarcomas. Oncol Lett. 2013 Jun;5(6):1771-1776. (査読有り)
7. Qi L, Toyoda H, Shankar V, Sakurai N, Amano K, Kihira K, Iwasa T, Deguchi T, Hori H, Azuma E, Gabazza EC, Komada Y. Heterogeneity of neuroblastoma cell lines in insulin-like growth factor 1 receptor/Akt pathway-mediated cell proliferative responses. Cancer Sci. 2013 Sep;104(9):1162-1171. (査読有り)
8. Toyoda H, Azuma E, Kawasaki Y, Iwasa T, Ohashi H, Otsuki S, Iwamoto S, Hirayama M, Itoh-Habe N, Wada H, Kondo M, Keida

- Y, Ito T, Komada Y. Cord blood transplantation combined with rituximab for Wiskott-Aldrich syndrome with autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Jul;132(1):226-227. (査読有り)
9. Hirayama M, Azuma E, Nakazawa A, Iwamoto S, Toyoda H, Komada Y. Simultaneous occurrence of gastric antral vascular ectasia and protein-losing enteropathy in chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* 2013 Apr;97(4):529-534. (査読有り)
10. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsui N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 2013 Feb;90(2):164-168. (査読有り)
11. Atsumi S, Matsumine A, Toyoda H, Niimi R, Iino T, Nakamura T, Matsubara T, Asanuma K, Komada Y, Uchida A, Sudo A. Oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas using live attenuated poliovirus. *Int J Oncol.* 2012 Sep;41(3):893-902. (査読有り)
12. Hosoki K, Hirayama M, Kephart GM, Kita H, Nagao M, Uchizono H, Toyoda H, Senba Y, Imai Y, Komada Y, Ihara T, Fujisawa T. Elevated numbers of cells producing interleukin-5 and interleukin-10 in a boy with Kimura disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158 Suppl 1:70-74. (査読有り)
- Sugimoto, et. al. 第75回日本血液学会学術集会(ロイトン札幌、札幌市) 2013.10.12.
6. 齊 磊、豊田秀実、Vipin Shankar、櫻井直人、天野敬史郎、木平健太郎、岩尾 篤、出口隆生、平山雅浩、堀 浩樹、東 英一、駒田美弘 第54回日本小児血液・がん学会学術集会(パシフィコ横浜、横浜市) 2012.11.30.
7. 招待講演 豊田秀実 筑波大学医学部講演会(筑波大学医学部附属病院、茨城県つくば市) 2012.8.30.
8. 豊田秀実、川崎裕香子、岩佐 正、大槻祥一郎、大橋啓之、岩本彰太郎、出口隆生、平山雅浩、堀浩樹、東 英一、駒田美弘 第34回日本造血細胞移植学会総会(大阪国際会議場、大阪市) 2012.2.24
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
豊田秀実 (TOYODA HIDEMI)  
 三重大学・大学院医学研究科・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

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 招待講演 豊田秀実 アフラック三重県アソシエイツ会講演会(じばさん三重、三重県四日市市) 2014.8.5
2. 豊田秀実、川崎裕香子、岩佐 正、大槻祥一郎、大橋啓之、岩本彰太郎、出口隆生、平山雅浩、堀浩樹、東 英一、駒田美弘 第36回日本造血細胞移植学会総会(沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市) 2014.3.7.
3. シンポジウム 豊田秀実 第55回日本小児血液・がん学会学術集会(ヒルトン福岡シーホーク、福岡市) 2013.12.1.
4. 招待講演 豊田秀実 聖路加国際病院講演会(聖路加国際病院、東京都中央区) 2013.7.22.
5. Jyunya Hirayama, Hidemi Toyoda, Yuka