

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07862

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・准教授

研究者番号：60525327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は、ポリオウイルス(以下PV)は神経芽腫細胞に対して強い抗腫瘍活性を持つ事を報告してきた。これまで代表者らが研究で用いた神経芽腫細胞株は、マウス神経芽腫細胞株にCD155を高発現させた細胞である。抗腫瘍免疫を獲得したマウスに、CD155無発現のマウス神経芽腫細胞株を移植しても、腫瘍形成を認めずCD155が抗腫瘍免疫の標的分子になっていないことを確認した。また、神経芽腫をPVで治療することにより得られる抗腫瘍免疫では、CD8T細胞が重要であることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、PVにより細胞死を誘導された腫瘍細胞は、抗腫瘍免疫を誘導することを証明し、CD8T細胞が抗腫瘍免疫に重要な役割を果たしていることを証明した。このことから、PVで細胞死を誘導した腫瘍細胞を、がんワクチンとして使用できる。さらに抗腫瘍免疫を誘導する原因タンパクが同定できれば、その遺伝子のコードするタンパクをがんワクチンの抗原として使用でき、またその抗原を標的としたCAR-T細胞療法の応用につながる。さらに、PVは神経芽腫だけでなく脳腫瘍を初めとする他の固形腫瘍にも細胞死を誘導することが知られており、これらの難治性小児がんの治療への臨床応用が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that poliovirus (PV) has strong antitumor activity against neuroblastoma cells. The neuroblastoma cell line used in our study was a mouse neuroblastoma cell line with high CD155 expression. Transplantation of a mouse neuroblastoma cell line without CD155 expression into mice that had acquired antitumor immunity did not result in tumor formation, confirming that CD155 is not a target molecule for antitumor immunity. The study also demonstrated that CD8 T cells are important in the anti-tumor immunity obtained by treating neuroblastoma with PV.

研究分野：小児血液腫瘍

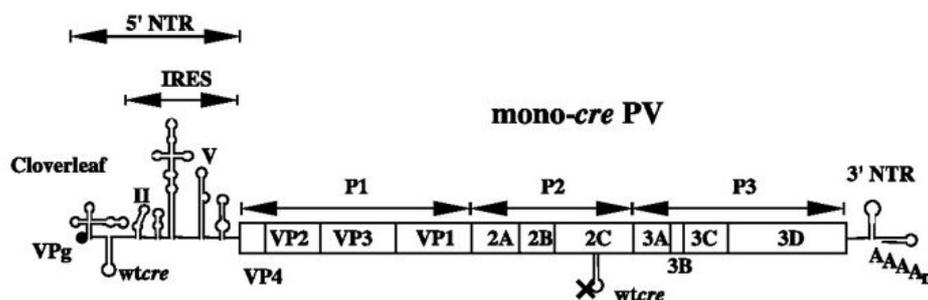
キーワード：神経芽腫 ポリオウイルス 抗腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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(下図)(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。

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を対象に、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

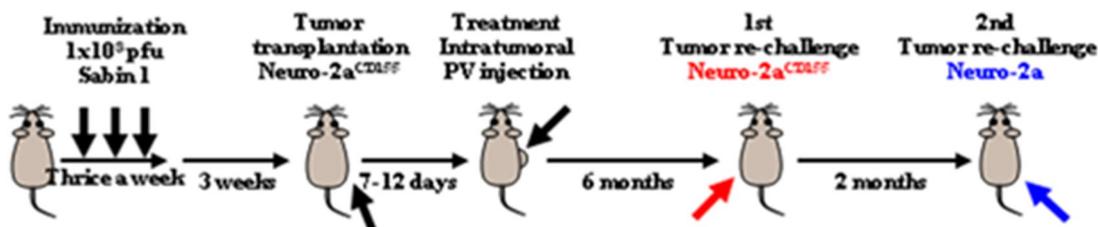
- (1) 神経芽腫腫瘍を PV で治療した後、長期間再発せず生存したマウスの抗腫瘍効果の検討
- (2) PV 感染により細胞死した神経芽腫細胞をワクチンとした抗腫瘍免疫の誘導

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-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。

PBS のみ

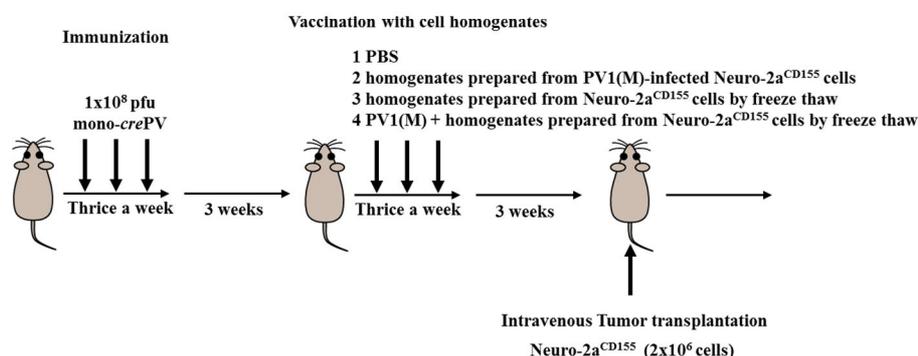
Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 細胞 (Homogenate)

凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 細胞 (Homogenate)

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（下図参照）。

1. PBS
2. Homogenates prepared from PV1(M)-infected Neuro-2a^{CD155} cells
 - Neuro-2a^{CD155} cells $\xrightarrow{\text{PV1(M) infection, 6 hrs}}$ Homogenates (3 times of freeze and thaw)
3. Homogenates prepared from Neuro-2a^{CD155} cells by freeze thaw
 - Neuro-2a^{CD155} cells \longrightarrow Homogenates (3 times of freeze and thaw)
4. PV1(M) + homogenates prepared from Neuro-2a^{CD155} cells by freeze thaw
 - Neuro-2a^{CD155} cells \longrightarrow Homogenates (3 times of freeze and thaw) + PV1(M)

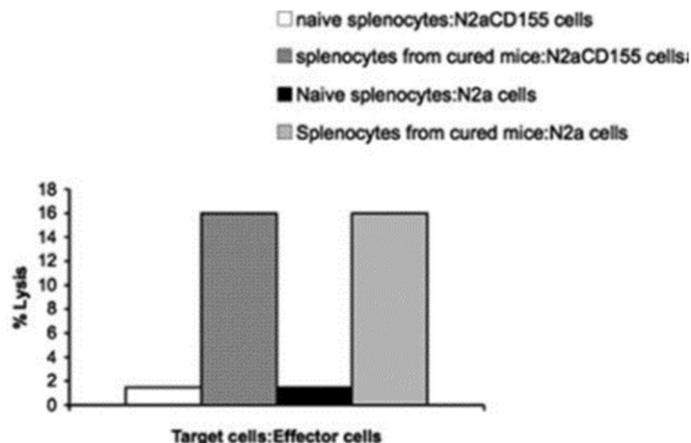


4. 研究成果

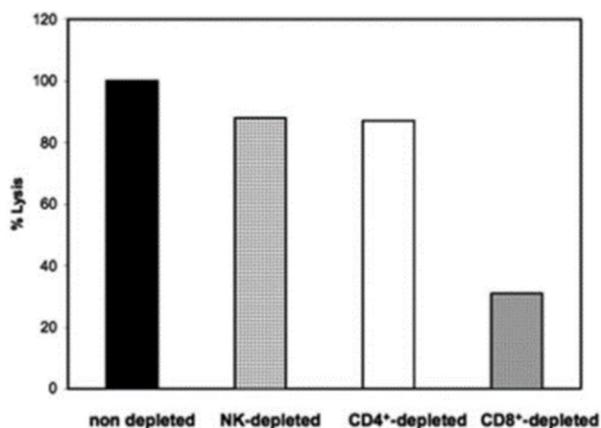
(1) 神経芽腫腫瘍を PV で治療した後、長期間再発せず生存したマウスの抗腫瘍効果の検討

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

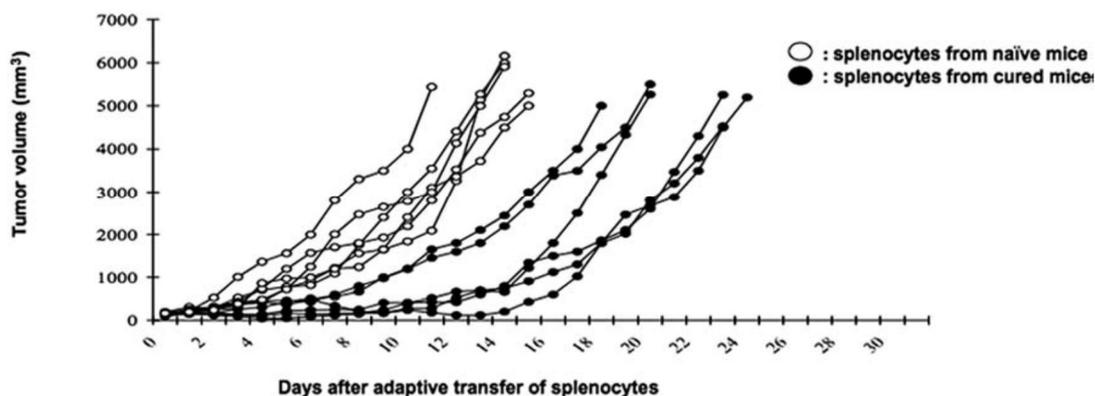
植しても腫瘍形成は認められなかった。このことから、マウスにとって異種タンパクである CD155 は、抗腫瘍免疫獲得のターゲットになっていないことが明らかになった。cured mice から分離した脾細胞と、Neuro-2a 細胞または Neuro-2aCD155 細胞と混合培養した結果、両者に対し抗腫瘍効果が認められた（下図）。



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-2aCD155 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み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。



長期間再発せず、抗腫瘍免疫を獲得したと考えられる CD155tgA/J マウス (cured mice) と抗腫瘍免疫を獲得していない CD155tgA/J マウス (naïve mice) の両者から脾細胞を採取し、Neuro-2a^{CD155} を移植後 10 日の CD155tgA/J マウスの尾静脈から輸注し、腫瘍サイズを経時的に経過観察した。Naïve mice の脾細胞を輸注した群に比べ、cured mice の脾静脈を輸注した群では腫瘍の増大速度が緩やかであった（下図）。



このことから、PV で神経芽腫を治療することで、抗腫瘍免疫を獲得できることが明らかになった。

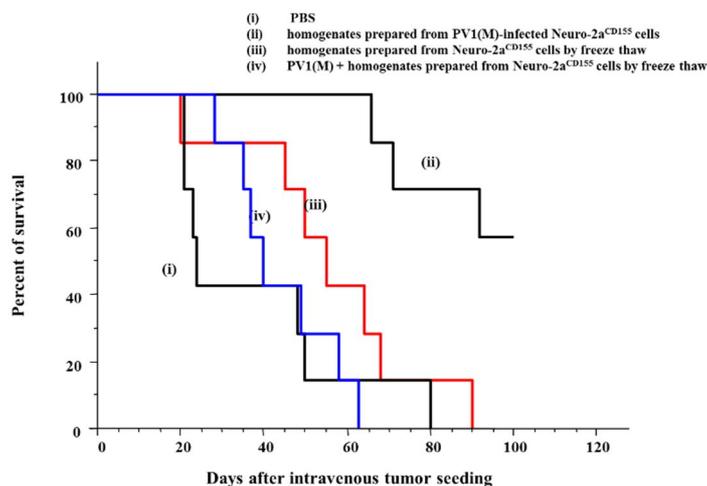
(2) PV 感染により細胞死した神経芽腫細胞をワクチンとした抗腫瘍免疫の誘導

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-2a^{CD155} 細胞 (Homogenate)、第 4 群 : 凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2a^{CD155} 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

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakato Daisuke, Iwamoto Shotaro, Amano Keishiro, Ito Takahiro, Toyoda Hidemi, Hanaki Ryo, Morimoto Mari, Niwa Kaori, Tawara Isao, Imanaka-Yoshida Kyoko, Ogawa Masahiro, Hirayama Masahiro	4. 巻 2023
2. 論文標題 Improved Antitumor Effect of NK Cells Activated by Neutrophils in a Bone Marrow Transplant Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mediators of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2023/6316581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Tomoya, Toyoda Hidemi, Tsuboya Naoki, Hanaki Ryo, Amano Keishiro, Hirayama Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Successful hematopoietic stem cell transplantation for two patients with relapse of intrachromosomal amplification of chromosome 21-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 01-05
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2022.960126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiono Ai, Bonno Motoki, Toyoda Hidemi, Ogawa Masahiro, Tanaka Shigeki, Hirayama Masahiro	4. 巻 2022
2. 論文標題 Autonomic Nervous System in Preterm Very Low Birth Weight Neonates with Intraventricular Hemorrhage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Perinatology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1926-0335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Mari, Toyoda Hidemi, Niwa Kaori, Hanaki Ryo, Okuda Taro, Nakato Daisuke, Amano Keishiro, Iwamoto Shotaro, Hirayama Masahiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Nafamostat mesylate prevents metastasis and dissemination of neuroblastoma through vascular endothelial growth factor inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2022.2571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Kuniaki, Kato Itaru, Dobashi Yuu, Imai Jun ichi, Mikami Takashi, Kubota Hirohito, Ueno Hiroo, Ito Mamoru, Ogawa Seishi, Nakahata Tatsutoshi, Takita Junko, Toyoda Hidemi, Ogawa Chitose, Adachi Souichi, Watanabe Shinya, Goto Hiroaki	4. 巻 113
2. 論文標題 The first Japanese biobank of patient derived pediatric acute lymphoblastic leukemia xenograft models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3814 ~ 3825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hanaki Ryo, Toyoda Hidemi, Iwamoto Shotaro, Morimoto Mari, Nakato Daisuke, Ito Takahiro, Niwa Kaori, Amano Keishiro, Hashizume Ryotaro, Tawara Isao, Hirayama Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Donor derived M2 macrophages attenuate GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity, Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 1489 ~ 1499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iid3.503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Kyoko, Toriyabe Kuniaki, Kitamura Asa, Morikawa Fumihiro, Minematsu Toshio, Ikejiri Makoto, Suga Shigeru, Toyoda Hidemi, Amano Keishiro, Kitano Masako, Usui Satoko, Masuda Sawako, Ikeda Tomoaki	4. 巻 41
2. 論文標題 Primary cytomegalovirus infection during pregnancy and congenital infection: a population-based, mother-child, prospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Perinatology	6. 最初と最後の頁 2474 ~ 2481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41372-021-01157-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ushida Eri, Toyoda Hidemi, Hanaki Ryo, Amano Keishiro, Okamoto Masahiko, Yamada Seiji, Nojima Takayuki, Hirayama Masahiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Secondary malignancy after carbon ion radiotherapy in a 15 year old female with Ewing sarcoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.30676	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Yusuke, Hanaki Ryo, Toyoda Hidemi, Emori Koichi, Miyahara Masazumi, Hirayama Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Case report: Thyroid storm in a three-year-old girl presenting with febrile status epilepticus and hypoglycemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2023.1213040	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyagawa Naoyuki, Goto Hiroaki, Ogawa Atsushi, Kikuta Atsushi, Kosaka Yoshiyuki, Sekimizu Masahiro, Tomizawa Daisuke, Toyoda Hidemi, Hiramatsu Hidefumi, Hara Junichi, Mochizuki Shinji, Nakayama Hideki, Yoshimura Kenichi, Iijima-Yamashita Yuka, Sanada Masashi, Ogawa Chitose	4. 巻 118
2. 論文標題 Phase 2 study of combination chemotherapy with bortezomib in children with relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 267 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-023-03609-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Arend von Stackelberg, Jean-Pierre Bourquin, Martin Zimmermann, Tamas Revesz, Andishe Attarbaschi, Alina Ferster, Lucie Sramkova, Thomas Leth Frandsen, Paivi Maria Lahteenmaki, Ronit Elhasid, Hidemi Toyoda
2. 発表標題 Acute Lymphoblastic Leukemias: Therapies, Excluding Transplantation and Cellular Immunotherapies
3. 学会等名 American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------