

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08626

研究課題名(和文) 腫瘍組織浸潤免疫細胞解析に基づく新たな神経芽腫免疫チェックポイント阻害療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immune checkpoint inhibition therapy for neuroblastoma focusing on the tumor infiltrating immune cells

研究代表者

井上 成一郎 (INOUE, Seiichiro)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70431690

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)：マウス神経芽腫モデルを用いて、抗PD-1/PD-L1抗体を用いた免疫チェックポイント阻害療法により得られる抗腫瘍効果の免疫学的メカニズムの解析を、腫瘍に浸潤する免疫細胞に注目して解析した。本モデルで得られる抗腫瘍効果は約80%前後にとどまり、全例に奏功するのではないことが判明した。そこで十分な抗腫瘍効果が得られたマウスと得られなかったマウスの腫瘍に浸潤する免疫細胞を解析すると、抗腫瘍効果が得られたマウスの腫瘍にはCD49b陽性NK細胞とCD69陽性の活性化CD8陽性Tリンパ球の浸潤がより多く認められることが判明し、この2種の免疫細胞の浸潤が抗腫瘍免疫反応に大きく関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床データでは、進行神経芽腫に対する免疫チェックポイント阻害療法は、単一の抗体投与では期待されたほどの十分な治療効果が得られていないことが報告された。本研究では、治療効果不良群ではNK細胞及び活性化CD8リンパ球の浸潤が治療効果良好群に比べ少ないことが示され、抗腫瘍免疫反応を十分に得るためには、このNK細胞および活性化CD8リンパ球の浸潤を促進することが重要であることが証明された。NK細胞浸潤及びCD69陽性CD8Tリンパ球の腫瘍浸潤を促進することができれば、有効性の高い新規免疫療法を開発することが可能であると示しており、今後の新規治療開発に有効な知見が得られたといえる。

研究成果の概要(英文)：For the analysis of antitumor immune reaction to the neuroblastoma induced by the immune checkpoint inhibition therapy, we focused on the tumor infiltrating immune cells induced by the immune checkpoint inhibition therapy. Using mouse neuroblastoma model, we applied anti-mouse PD-1/PD-L1 antibody therapy to the neuroblastoma bearing mouse. Then we analyzed the tumor infiltrating immune cells.

We found that in tumor which the growth of nodule was effectively suppressed by treatment, infiltration of CD49b+ NK cell and CD69 positive activated CD8 tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were effectively promoted.

We concluded that in immune checkpoint inhibition therapy using anti-PD-1/PD-L1 antibodies, promotion of the tumor infiltration of NK cell and activated CD8+ TIL is very important. And finding the method of promoting these cells infiltration may induce the establishment of effective and novel immune therapy for neuroblastoma.

研究分野：小児神経芽腫免疫治療

キーワード：神経芽腫 NK細胞 腫瘍浸潤リンパ球 免疫チェックポイント阻害療法 抗腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床におけるヒト由来神経芽腫組織の解析で神経芽腫細胞の表面抗原発現の解析の報告で神経芽腫に対する免疫チェックポイント阻害療法の可能性が示された(Zuo et al *Pediatr Surg Int.* 2020)ものの、神経芽腫に対する免疫チェックポイント阻害療法はまだ広く普及しておらず、様々な併用療法による実験的報告が主となっていた (Mao et al. *Clin Cancer Res* 2016, Seibelt et al. *Oncol Immunol* 2017)。またヒト神経芽腫においても腫瘍浸潤 T リンパ球(Tumor Infiltrating Lymphocytes: TIL)の浸潤が多いほど予後が良好であることが報告されていた(Mina et al. *Oncology* 2015)。免疫チェックポイント阻害療法は TIL のリンパ球疲弊からの回復により抗腫瘍効果が得られるとされているが(Barber et al. *Nature* 2006, Wherry et al. *Nat Rev Immunol.* 2015)、この説を否定する研究成果も報告されていた(Prado-Garcia et al. *Cancer Immunol Immunother* 2017)。TIL 疲弊の指標と TIL の機能評価は抗腫瘍免疫反応のメカニズム解析に必須であると考えた。一方、近年一部の癌腫で腫瘍細胞に発現する PD-1 抗原 (intrinsic PD-1 molecule) に抗 PD-1 抗体を作用させると獲得免疫のシステムを介さない経路で腫瘍免疫は賦活されることが報告され、免疫チェックポイント阻害療法がさらに広がる可能性も指摘された(Kleffel et al. *Cell* 2015, Xiaoqiang et al. *Hepatology* 2017, Zhao et al. *Cell Reports* 2018, Wang et al. *PNAS* 2020)。

2. 研究の目的

マウス神経芽腫モデルで抗マウス PD-1/PD-L1 抗体を用いた免疫チェックポイント阻害療法を施行し、最も効果の得られる投与方法を確認する。治療により抗腫瘍効果が得られた腫瘍から、腫瘍組織に浸潤する免疫細胞を分離し、腫瘍に浸潤する CD8 リンパ球、NK 細胞及び樹状細胞(DC)などの抗原提示細胞を分離し、細胞表面抗原を解析することで抗腫瘍効果を示す腫瘍浸潤リンパ球を誘導する免疫細胞を同定し、この抗原提示細胞による細胞治療と抗体投与を組み合わせより効果の高い新規免疫チェックポイント阻害療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス神経芽腫モデルにおける抗PD-1 PD-L1抗体全身投与による抗腫瘍効果の解析

A/J マウス(H2-K^a)皮下にマウス神経芽腫細胞 neuro-2a(H2-K^a, CCL-131)を接種して腫瘍形成させ担癌マウスを作製した。担癌マウスに抗 PD-1/PD-L1 抗体を経腹腔投与しながら腫瘍サイズを経時的に測定し縮小効果を評価し最も腫瘍効果の得られる抗体投与方法を確認した。

免疫チェックポイント阻害療法とTILの機能解析

上記で免疫チェックポイント阻害療法を施行したマウスの腫瘍結節を collagenase 処理し細胞浮遊液を作成した。CD45 beads を用いた MACS sorting 法を用いて腫瘍細胞と浸潤免疫細胞を分離し、CD8⁺ TIL 細胞内に発現する CD69 (活性化リンパ球の指標)の発現をフローサイトメーターで解析した。

免疫チェックポイント阻害療法と抗腫瘍効果を促進する抗原提示細胞の解析

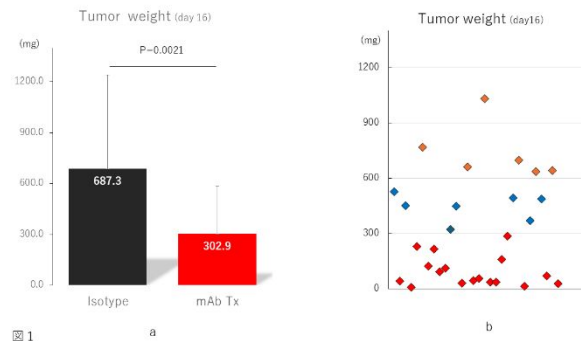
免疫チェックポイント阻害療法で抗腫瘍効果を認めた腫瘍から上記と同様の方法で分離した CD45 陽性の腫瘍浸潤免疫細胞のうち CD3、CD11b、CD11c、CD49b 抗原の発現を確認し細胞を同定した。

4. 研究成果

マウス神経芽腫細胞 neuro-2a cell を、T リンパ球を持たない Nude マウスに接種したのち、マ

ウス腹腔内に抗 PD-1/PD-L1 抗体を投与した場合、正常な T リンパ球をもつ A/J マウスを使用し実験で得られていた抗腫瘍効果が消失した。これにより抗体投与により得られる抗腫瘍効果に T リンパ球が重要な役割を果たしていることが示された。

さらに A/J マウス皮下に neuro-2a cell (1×10^6 cells/mouse) を接種し、接種後 7 日目に皮下に腫瘍結節を生じたマウスに対し抗 PD-1/PD-L1 抗体 ($250 \mu\text{g}/\text{mouse}$) を腫瘍接種後計 5 回経腹膜投与し 16 日目にマウスを犠牲死させて皮下腫瘍を切除した。腫瘍重量を評価すると抗体投与により抗腫瘍効果が得られるが、対照群と比較して腫瘍サイズが有意に小さいものは治療群全体のうち 80% にとどまり、約 20% は抗腫瘍効果が得られないことが判明した (図 1 a, b Inoue et al. J Surg Res 2023 より一部改変)。そこで、腫瘍に浸潤する免疫細胞を、対照群、治療効果が得られた群、治療効果が得られなかった群に分け、それぞれフローサイトメーターを用いて解析した。



16 日目に犠牲死させて切除した皮下腫瘍を Collagenase 処理して細胞浮遊液を作成し、MACS sorting により腫瘍に浸潤する CD45 陽性細胞を採取し、リンパ球活性化の指標となる CD69 を発現した活性化 CD8⁺ TIL をフローサイトメトリーで測定すると、より高い治療効果が得られた群で著明に CD8⁺CD69⁺ T リンパ球の腫瘍浸潤が生じていることが確認された (図 2a, Inoue et al. J Surg Res 2023 より一部改変)。

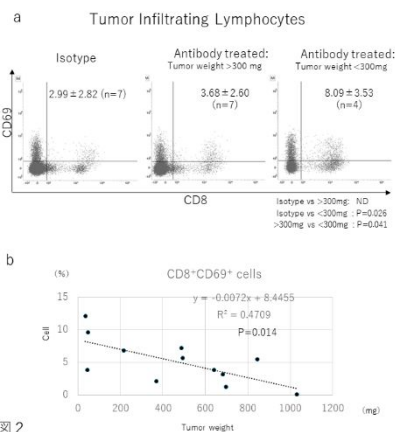


図 2

さらに腫瘍重量と腫瘍浸潤 CD8⁺CD69⁺ T リンパ球の浸潤リンパ球に対する比率は逆相関を示しており、抗 PD-1/PD-L1 抗体投与により、活性化リンパ球である CD8⁺CD69⁺ T リンパ球の腫瘍浸潤がより促進された個体で、より強い抗腫瘍効果が得られることが証明された (図 2b, Inoue et al. J Surg Res 2023 より一部改変)。なお、この CD69 陽性細胞は CD49b 分子を発現しておらず、この CD69⁺細胞は NK 細胞ではないことを確認した。

さらなる解析により抗 PD-1/PD-L1 抗体投与により腫瘍組織に CD3⁺CD49b⁺細胞の浸潤が促進されていることが確認されており、AAGM1 投与により NK 細胞を抑制したマウスでは

抗 PD-1/PD-L1 抗体を投与しても抗腫瘍効果が得られないことが確認されている。さらに CD8⁺CD69⁺ T リンパ球の浸潤とこの NK 細胞と思われる CD49b⁺細胞の浸潤に相関関係がある可能性が示唆されている。これら活性化リンパ球と NK 細胞の相互作用と抗腫瘍効果の関連の解明は今後さらなる解析を行う予定である。この 2 種の免疫細胞による抗腫瘍効果のメカニズムの解明は、新たな指摘免疫療法開発につながる可能性があると思われ、今後も引き続き研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Takeuchi Y, Inoue S, Odaka A | 4. 巻 39(1) |
| 2. 論文標題 Expression of programmed cell death-1 on neuroblastoma cells in TH-MYCN transgenic mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Pediatr Surg Int. | 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） 10.1007/s00383-022-05292-y | 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 Inoue S, Takeuchi Y, Horiuchi Y, Murakami T, Odaka A | 4. 巻 Sep289 |
| 2. 論文標題 CD69 on Tumor-Infiltrating Cells Correlates With Neuroblastoma Suppression by Simultaneous PD-1 and PD-L1 Blockade | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 J Surg Res. | 6. 最初と最後の頁 190-201 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2023.03.042. | 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 - |

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件／うち国際学会 6件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Inoue S, Horiuchi Y, Takeuchi Y, Murakami T, Odaka A, |
| 2. 発表標題 Increased CD11b+CD49b+natural killer (NK) cell tumor infiltration after co-administration of anti-PD-1/PD-L1 antibodies in a murine neuroblastoma model |
| 3. 学会等名 54th congress of the International Society of Pediatric Oncology (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeuchi Y, Inoue S, Odaka A |
| 2. 発表標題 Expression pf Programmed cell death 1 (PD-1) molecule on neuroblastoma cells in TH-MYCN transgenic mice |
| 3. 学会等名 35th International Symposium of Pediatric Surgical Research (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上成一朗, 竹内優太, 小高明雄, 別宮好文 |
| 2. 発表標題 マウス神経芽腫免疫チェックポイント阻害療法における抗腫瘍リンパ球活性化の検討 |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井上成一朗, 竹内優太, 小高明雄, 別宮好文 |
| 2. 発表標題 マウス免疫チェックポイント阻害による腫瘍 DC 浸潤誘導のメカニズム解析 PD-1/PD-L1 blockade followed by tumor infiltration of DCs in neuroblastoma |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 竹内優太, 井上成一朗, 小高明雄, 別宮好文 |
| 2. 発表標題 マウス神経芽腫モデルを用いた経口不飽和脂肪摂取の生存延長メカニズム解析の試み |
| 3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上成一朗, 堀内大, 竹内優太, 村上孝, 小高明雄 |
| 2. 発表標題 マウス神経芽腫モデルにおける重複免疫チェックポイント阻害によるNK細胞腫瘍浸潤誘導と抗腫瘍効果の検討 |
| 3. 学会等名 第3回オール埼玉医大 研究の日 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹内優太、井上成一朗、小高明雄 |
| 2. 発表標題 神経芽腫マウスにおける 3/ 6不飽和脂肪酸経口摂取による脂肪酸解析の検討 |
| 3. 学会等名 第3回オール埼玉医大 研究の日 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上成一朗, 堀内 大, 竹内優太, 村上 孝, 小高明雄: |
| 2. 発表標題 骨髄由来樹状細胞の神経芽腫細胞貪食に対する免疫チェックポイント阻害による免疫効果 |
| 3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 竹内優太, 井上成一朗, 小高明雄 |
| 2. 発表標題 マウス神経芽腫細胞に発現する PD-1 抗原と 抗腫瘍効果免疫反応の検討 |
| 3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Inoue S, Horiuchi Y, Takeuchi Y, Murakami T, Odaka A |
| 2. 発表標題 Combination of anti-PD-1/anti-PD-L1 antibodies promotes tumor cell phagocytosis by bone marrow derived DCs in a murine neuroblastoma model |
| 3. 学会等名 53rd congress of the International Society of Pediatric Oncology (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takeuchi Y, Inoue S, Odaka A, |
| 2. 発表標題 Fatty acid analysis by oral intake of 3/ 6 unsaturated fatty acids in neuroblastoma mouse neuroblastoma model, |
| 3. 学会等名 53rd congress of the International Society of Pediatric Oncology (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井上成一朗, 竹内優太, 小高明雄 |
| 2. 発表標題 マウス神経芽腫に対する免疫チェックポイント阻害療法で誘導される CD69 陽性細胞の解析 Analysis of CD69 positive cell induced by ICI in mouse neuroblastoma |
| 3. 学会等名 第60回 日本小児外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹内優太, 井上成一朗, 小高明雄 |
| 2. 発表標題 TH-MYCN Tg マウスにおける不飽和脂肪酸 栄養療法による調節性 T 細胞への免疫効果 Immune effects of unsaturated fatty acid therapy on Treg in TH-MYCN Tg mouse |
| 3. 学会等名 第60回 日本小児外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Inoue S, Takeuchi Y, Horiuchi Y, Murakami T, Odaka A, |
| 2. 発表標題 Role of intratumoral CD11b+-CD49b+natural killer (NK) cells in murine neuroblastoma after co-administration of anti-PD-1/PD-L1 antibodies |
| 3. 学会等名 55th congress of the International Society of Pediatric Oncology (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takeuchi Y, Inoue S, Odaka A |
| 2. 発表標題 Impact of the oral unsaturated fatty acids nutrition on the anti-tumor immunity in mouse neuroblastoma model |
| 3. 学会等名 55th congress of the International Society of Pediatric Oncology (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上成一朗、堀内大、竹内優太、村上孝、小高明雄 |
| 2. 発表標題 重複免疫チェックポイント阻害により誘導される腫瘍浸潤NK細胞が抗腫瘍効果に果たす重要性の検討 |
| 3. 学会等名 4回オール埼玉医大 研究の日 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹内優太、井上成一朗、小高明雄 |
| 2. 発表標題 マウス神経芽腫モデルにおける不飽和脂肪酸経口摂取が腫瘍免疫に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第4回オール埼玉医大 研究の日 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
|---------|---------|