

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670508

研究課題名(和文)小児がんにおける地固め療法としてのペプチドワクチン療法の確立

研究課題名(英文)The establishment of peptide vaccine as a consolidation therapy for childhood cancer.

研究代表者

細井 創 (Hosoi, Hajime)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20238744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：横紋筋肉腫の生存率は概ね改善したものの、PAX3-FOXO1陽性横紋筋肉腫の予後は不良である。我々は新規治療として免疫療法に着目し、検討を行った。本検討により、横紋筋肉腫特異的融合遺伝子であるPAX3-FOXO1はPD-L1の発現を亢進させ、抗腫瘍免疫に対し抑制的に働くことが示唆された。PAX3-FOXO1陽性横紋筋肉腫は、PD-L1を介してCD8陽性T細胞を抑制することにより、腫瘍免疫から逃避している可能性が示唆された。PD-L1を介した免疫逃避を抑制し、抗腫瘍免疫を高めるPD-1経路阻害薬はPAX3-FOXO1陽性横紋筋肉腫の新規治療法となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Novel therapeutic strategy is required to cure patients with PAX3-FOXO1 positive metastatic rhabdomyosarcoma (RMS). Programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) plays a major role in suppressing the immune system. Here, we examined the relationship between PAX3-FOXO1 fusion gene and PD-L1 expression to explore the possibility of using anti-PD-1 antibody as treatment for metastatic RMS.

Four PAX3-FOXO1-positive RMS cell lines (RM2, Rh4, Rh30, Rh41) were used. The PD-L1 expression was determined by real-time qPCR and flow cytometry. The PD-L1 expressions of the Rh30 and the RM2 cell line were high among the four cell lines. PAX3-FOXO1 knockdown resulted in decrease in cell-surface expression of PD-L1 in Rh30 and RM2 cells.

Our results show that PAX3-FOXO1 plays a role in PD-L1 mediated immune escape. Anti-PD-1 antibody can be a novel therapeutic strategy against PAX3-FOXO1-positive RMS.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：小児がん 免疫療法 横紋筋肉腫 免疫チェックポイント PD-L1 PD-1 融合遺伝子

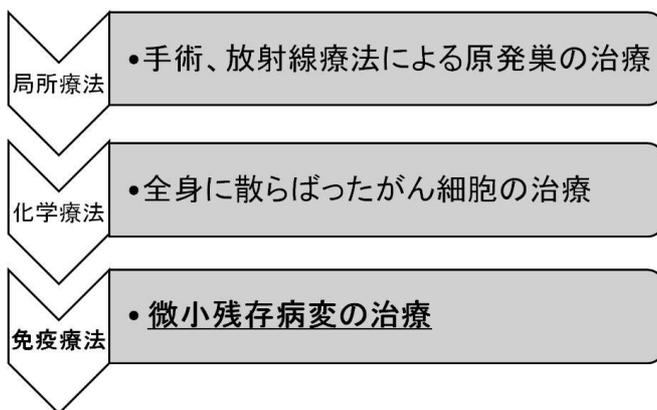
### 1. 研究開始当初の背景

小児がんの生存率は概ね改善したものの、高リスクの小児がんは依然として予後不良である。放射線療法、手術や化学療法のこれ以上の強化は治療関連毒性のために困難であり、予後の改善のためには、革新的な治療法の導入が必要である。近年、成人がんでは、がんワクチンや抗体療法の導入により、治療成績の改善を認めている。また、代表的な小児がんである神経芽腫では抗 GD2 抗体を IL-2 併用にて地固め療法として用いることにより、2 年の無イベント再発率が 44% から 66% へ向上し、著しい予後の改善を認めた (Yu AL, et al. N Engl J Med, 2010)。これにより、小児がんにおいても、免疫療法が化学療法や放射線療法とは異なる機序により効果を示し、微小残存病変の治療に有用であることを証明した。

以上の背景より、我々は、未だ予後不良である高リスク小児がんを対象に免疫療法を臨床応用するための基礎検討を行うことを提案する (図 1)。

図 1

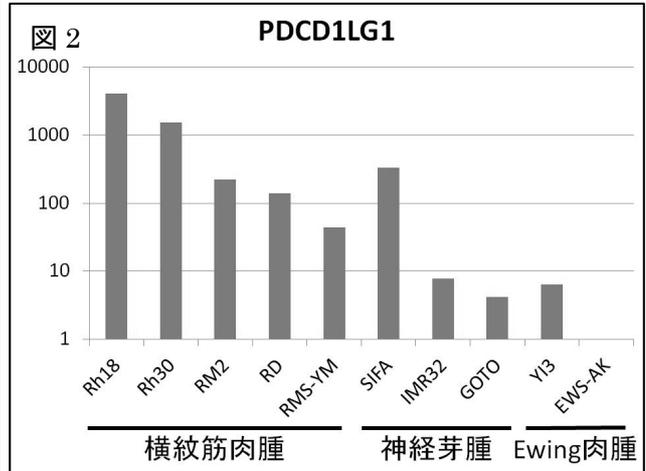
免疫療法を地固め療法として用いる小児がん治療の提案



### 2. 研究の目的

本研究では、免疫療法の効果をも高めるバイオマーカーの同定を目指している。成人癌での免疫療法の検討より、単にがん抗原に対して、ワクチンや抗体療法を行うだけでは不十分であり、腫瘍間、あるいは、個人間の免疫療法に対する感受性の違いをバイオマーカーにより識別して、免疫療法の効果を最大限に引き出せるようにする工夫が必要であることが分かってきた。例えば、腫瘍における PD-L1 の高発現は細胞障害性 T 細胞 (CTL) の機能抑制の原因となり免疫療法の効果を低下させるが、一方で PD-L1 抗体療法で PD-L1 を抑制することにより、CTL の機能を向上させ、免疫療法の効果をも高めることが可能である。我々は、PD-L1 の小児がん細胞株間での発現を定量的リアルタイム PCR によ

り検討した (図 2: EWS-AK 細胞株の発現を 1 とした)。



その発現は横紋筋肉腫細胞株では高い傾向を示し、PD-L1 抗体療法が有用な小児がんである可能性を示した。一方で、Ewing 肉腫では PD-L1 は低発現であり、PD-L1 抗体療法は有効ではないこと予想される。以上の検討より、それぞれの小児がんにおいて、腫瘍免疫の機序は一樣でないことが分かる。

このように、バイオマーカーについての検討を行うことで、これまで未踏の分野であった小児がんにおける免疫療法の開発に大きく貢献していくことが予想される。

### 3. 研究の方法

- (1) PAX3-FOXO1 陽性ヒト横紋筋肉腫細胞株である Rh4、Rh30、Rh41、RM2 細胞株を用いた。
- (2) PAX3-FOXO1 ノックダウンは、siRNA をリポフェクション法により細胞株に導入して行った。
- (3) PD-L1 発現はフローサイトメトリー法により定量し、PAX3-FOXO1 ノックダウンによる腫瘍細胞表面の PD-L1 発現の変化を検討した。

### 4. 研究成果

- (1) PAX3-FOXO1 陽性横紋筋肉腫細胞株 PD-L1 発現  
4 つの PAX3-FOXO1 陽性横紋筋肉腫細胞株の中では、Rh30 細胞株と RM2 細胞株において PD-L1 の高発現を認めた。
- (2) PAX3-FOXO1 陽性横紋筋肉腫細胞株における IFN- $\gamma$  による腫瘍細胞表面 PD-L1 発現誘導  
IFN- $\gamma$  を添加することで、Rh30、RM2 の両細胞株の PD-L1 発現が、mRNA レベルとタンパクレベルの双方で誘導された (図 3)。

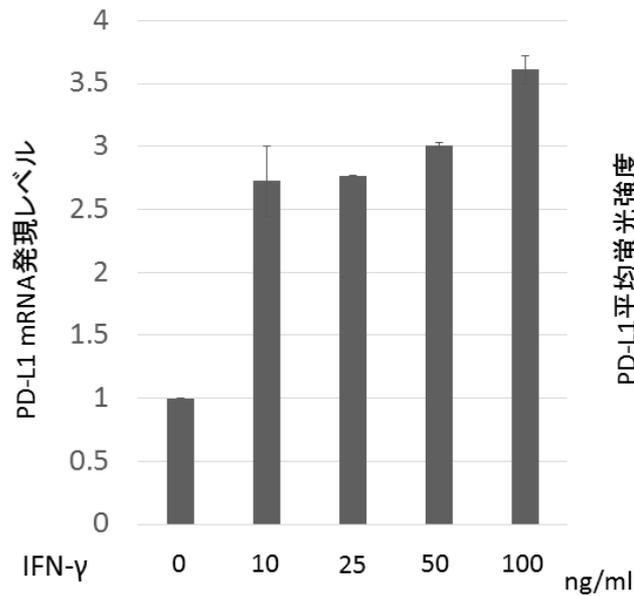
(3) *PAX3-FOXO1* ノックダウンが、IFN- $\gamma$  による腫瘍細胞表面 PD-L1 の発現誘導に及ぼす影響  
Rh30 細胞株と RM2 細胞株における *PAX3-FOXO1* ノックダウンは、IFN- $\gamma$  によ

る腫瘍細胞表面 PD-L1 の発現誘導を低下させた (図 4、5)。

図3

IFN- $\gamma$  添加により、PD-L1 の発現は *PAX3-FOXO1* 陽性横紋筋肉腫細胞株において増加する。

【定量的リアルタイムPCR法】



【フローサイトメトリー法】

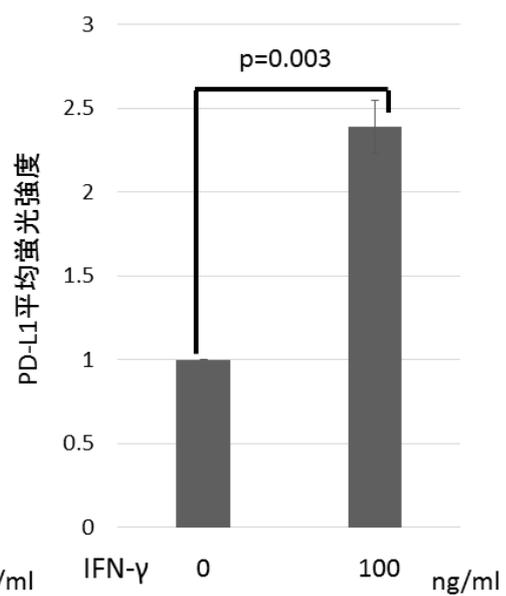
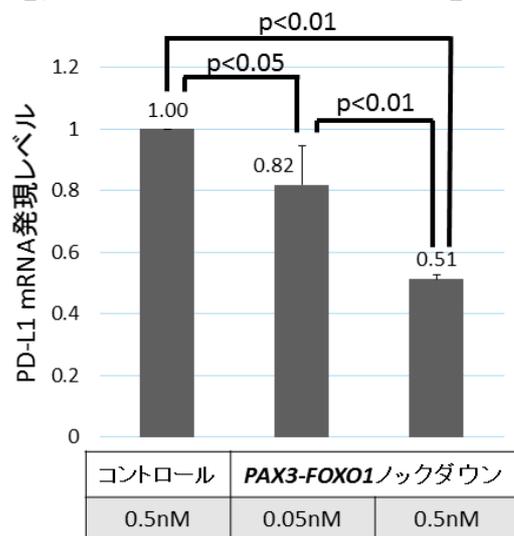


図4

Rh30細胞株において、*PAX3-FOXO1* ノックダウンにより、PD-L1 発現は低下する。

【定量的リアルタイムPCR法】



【フローサイトメトリー法】

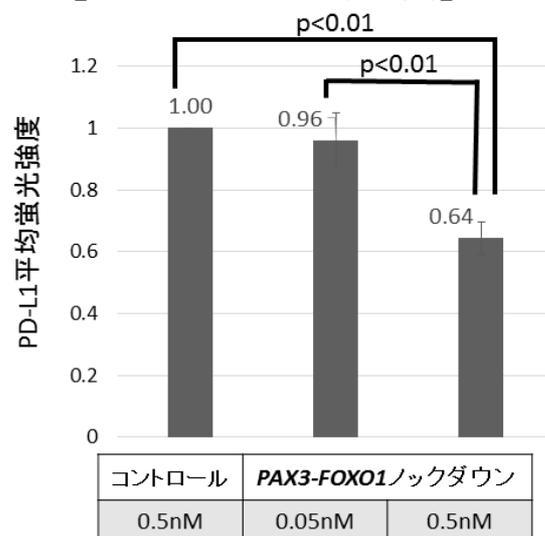
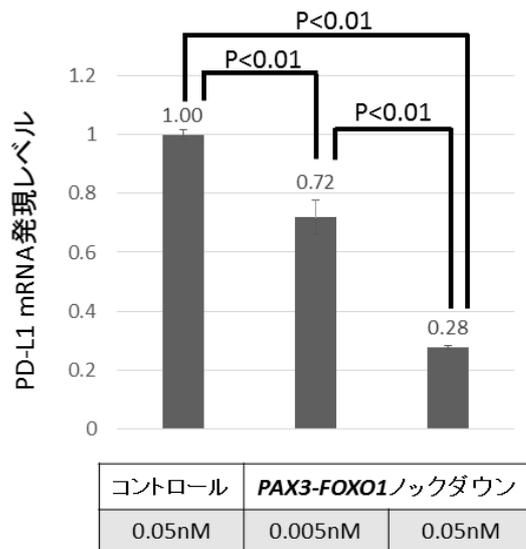


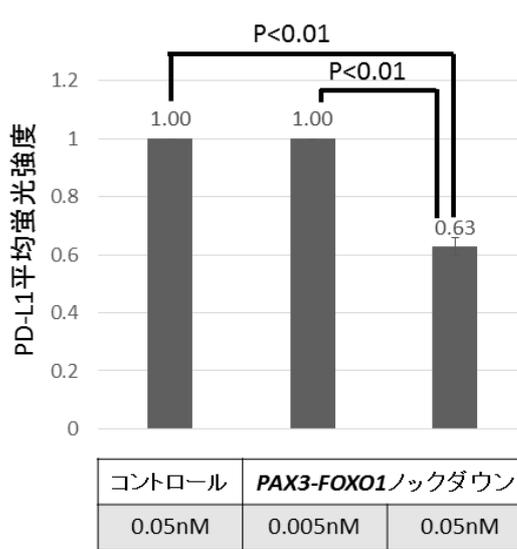
図5

RM2細胞株において、PAX3-FOXO1ノックダウンにより、PD-L1発現は低下する。

【定量的リアルタイムPCR法】



【フローサイトメトリー法】



以上の結果より、PAX3-FOXO1はPD-L1の発現を亢進させ、抗腫瘍免疫に対し抑制的に働くことが明らかになった。PAX3-FOXO1陽性横紋筋肉腫は、PD-L1を介してCD8陽性T細胞を抑制することにより、腫瘍免疫から逃避している可能性が示唆された。

PD-L1を介した免疫逃避を抑制し、抗腫瘍免疫を高めるPD-1経路阻害薬はPAX3-FOXO1融合遺伝子陽性横紋筋肉腫の新規治療法となり得ると考えられた。

#### 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)

〔学会発表〕(計 3件)

宮地 充 . シンポジウム1 小児固形がんに対する分子標的治療開発 . PAX3-FOXO1融合遺伝子陽性横紋筋肉腫におけるPD-1経路阻害の意義 . 第58回日本小児血液・がん学会学術集会 . 2016年12月15日~17日;東京 .

Nitta Y, Miyachi M, Ouchi K, Yoshida H, Yagyu S, Kikuchi K, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H . PAX3-FOXOa KNOCKDOWN REDUCES PD-L1 EXPRESSION IN AN ALVEOLAR RHABDOMYOSARCOMA CELL LINES . CTOS 2016 . 2016年11月9-12日, Lisbon, Portugal .

新田義宏、宮地充、大内一孝、吉田秀樹、土屋邦彦、栗原康通、家原知子、細井創 . ワークショップ . 胞巣型横紋筋肉腫細胞株Rh30において、PAX3-FOXO1ノックダウンはPDL1発現を低下させる . 第57回小児血液・がん学会学術集会 . 2015年11月27日~29日;甲府

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

細井 創 (HOSOI, Hajime)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児科学・教授  
研究者番号：20238744

##### (2)研究分担者

家原 知子 (IEHARA, Tomoko)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児科学・准教授  
研究者番号：20285266

栗原 康通 (KUWAHARA, Yasumichi)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科分子生化学・講師  
研究者番号：30590327

菊地 顕 (KIKUCHI, Ken)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児科学・助教

研究者番号：40453104

宮地 充 (MIYACHI, Mitsuru)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児  
科学・助教  
研究者番号：40584983