

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07817

研究課題名(和文)ポリオウイルスによる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 using 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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はポリオウイルスが神経芽腫細胞に対して抗腫瘍活性を持つ事を報告してきた。研究で用いた細胞は、マウス神経芽腫細胞(N2a)にCD155を導入した細胞であるため、強制発現させたCD155が抗腫瘍免疫の標的になっている可能性がある。CD155tgA/JマウスにN2aを移植すると腫瘍形成を認めたと、抗腫瘍免疫を獲得したマウスにN2aを移植すると腫瘍形成しなかったため、CD155は抗腫瘍免疫の標的になっていない。抗腫瘍免疫を獲得したマウスの脾細胞と神経芽腫細胞と混合培養すると、抗腫瘍効果を認めた。CD8T細胞を除去すると抗腫瘍効果が消失したため、CD8T細胞が抗腫瘍免疫に重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリオウイルスに感染した腫瘍細胞が抗腫瘍免疫を誘導することを証明できれば、ポリオウイルスで細胞死を誘導した腫瘍細胞を将来がんワクチンとして使用できる可能性も広がります。さらにマイクロアレイを用いて抗腫瘍免疫誘導の原因遺伝子が同定できれば、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することも可能になり、またCAR-T療法の応用につながります。さらに、ポリオウイルス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いるため、神経芽腫の治療だけでなく脳腫瘍など他の難治性小児がんの治療への臨床応用が可能な研究成果です。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that neuroblastoma (NB) subcutaneously implanted in immuno-competent mice is eliminated by intratumoral administration of poliovirus (PV). Our results also suggested that the in vivo destruction of NB cells by virotherapy lead to a robust antitumor immune response. Since we used CD155-transfected NB for experiments, CD155 might be a target for antitumor immune response. Although NB can grow in naive mice, no tumor growth was observed in mice cured of NB that were reinnoculated with NB cells. Splenocytes harvested from NB-bearing mice treated with PV exhibited higher lytic activity against NB cells than did those from splenocytes derived from naive mice. In vitro T-cell depletion experiments indicated that CD8+ T cells were essential for the cytotoxic antitumor activity of splenocytes.

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 (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-2aCD155)、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。

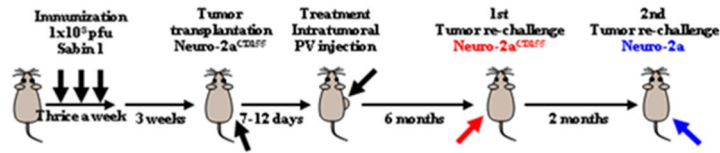
2. 研究の目的

- (1) 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-2aCD155)、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-2aCD155) 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-2aCD155 細胞と、凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 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

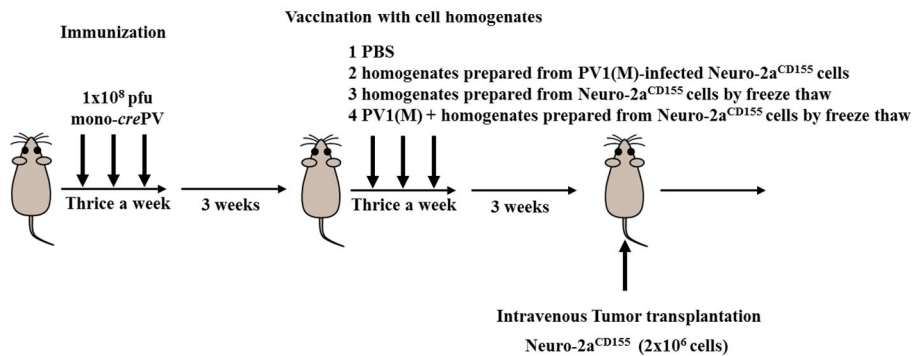
Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞 (Homogenate)

凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞 (Homogenate)

凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞 (Homogenate) + Sabin 1

免疫終了 3 週間後、Neuro-2aCD155 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)。

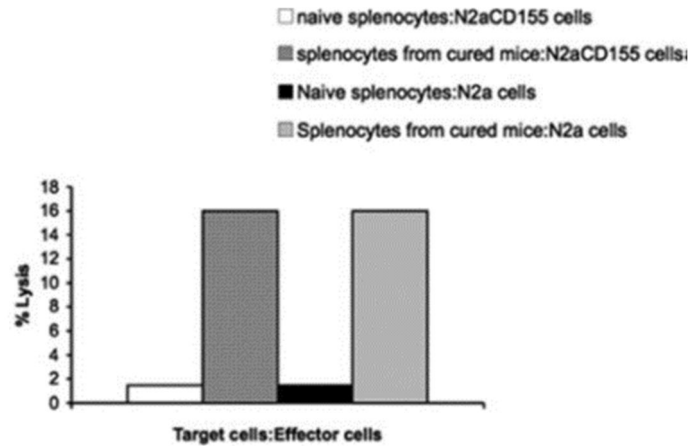
1. PBS
2. Homogenates prepared from PV1(M)-infected Neuro-2a^{CD155} cells
 Neuro-2a^{CD155} cells $\xrightarrow{\text{PV1(M) infection, 6 hrs}}$ Homogenates (3 times of freeze and thaw)
3. Homogenates prepared from Neuro-2a^{CD155} cells by freeze thaw
 Neuro-2a^{CD155} cells \longrightarrow Homogenates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



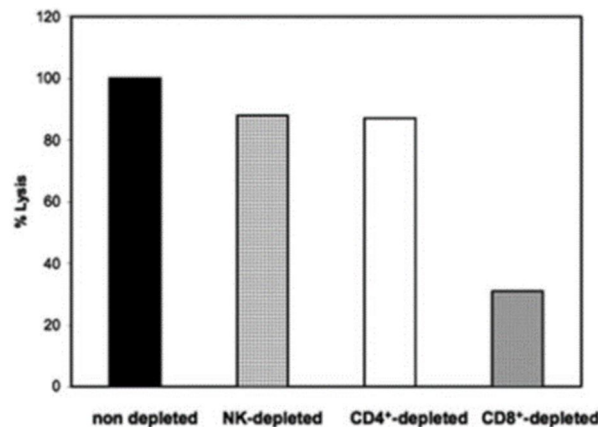
4 . 研究成果

(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。



(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

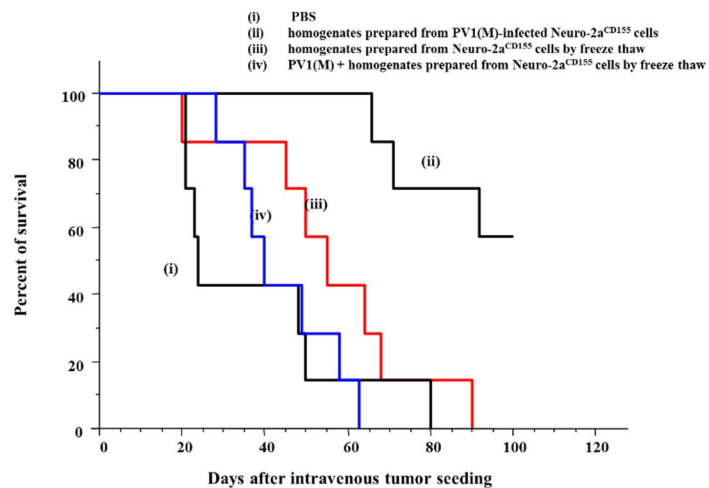
CD155tgA/J マウスの尾静脈から 1×10^6 の Neuro-2aCD155 細胞を静注した予備実験では、肝臓の多発性病変のため全例が 60 日以内に死亡した（下写真）。



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-2aCD155 細胞（Homogenate）、第 3 群：凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 細胞（Homogenate）、第 4 群：凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2aCD155 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-2aCD155 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-2aCD155 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13件（うち査読付論文 12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 Xu Dong-Qing, Toyoda Hidemi, Yuan Xiao-Jun, Qi Lei, Chelakkot Vipin Shankar, Morimoto Mari, Hanaki Ryo, Kihira Kentarou, Hori Hiroki, Komada Yoshihiro, Hirayama Masahiro	4. 巻 365
2. 論文標題 Anti-tumor effect of AZD8055 against neuroblastoma cells in vitro and in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 177 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2018.02.032	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 Xu Dong-qing, Toyoda Hidemi, Qi Lei, Morimoto Mari, Hanaki Ryo, Iwamoto Shotaro, Komada Yoshihiro, Hirayama Masahiro	4. 巻 499
2. 論文標題 Induction of MEK/ERK activity by AZD8055 confers acquired resistance in neuroblastoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 425 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.03.143	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 Matsumoto Takeshi, Toyoda Hidemi, Amano Keishiro, Hirayama Masahiro, Ishikawa Eiji, Fujimoto Mika, Ito Masaaki, Ohishi Kohshi, Katayama Naoyuki, Yoshida Yoko, Matsumoto Masanori, Kawamura Naohisa, Ikejiri Makoto, Kawakami Keiki, Miyata Toshiyuki, Wada Hideo	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical Manifestation of Patients With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With the C3 p.I1157T Variation in the Kinki Region of Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis	6. 最初と最後の頁 1301 ~ 1307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1076029618771750	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 Toyoda Hidemi, Deguchi Takao, Iwamoto Shotaro, Kihira Kentaro, Hori Hiroki, Komada Yoshihiro, Hirayama Masahiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Weekly Rituximab Followed by Monthly Rituximab Treatment for Autoimmune Disease Associated With RAS-associated Autoimmune Leukoproliferative Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 e516 ~ e518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001276	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 Yamamoto Wakako, Toyoda Hidemi, Xu Dong-qing, Hanaki Ryo, Morimoto Mari, Nakato Daisuke, Ito Takahiro, Iwamoto Shotaro, Bonno Motoki, Tanaka Shigeki, Hirayama Masahiro	4. 巻 2018
2. 論文標題 CD3+ B-1a Cells as a Mediator of Disease Progression in Autoimmune-Prone Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mediators of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/9289417	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 Toyoda Hidemi, Xu Dong-Qing, Qi Lei, Hirayama Masahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular Target Therapy against Neuroblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Chemistry - Advance Applications	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) 10.5772/intechopen.81706	査読の有無 無
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 Kurihara Kosuke, Toyoda Hidemi, Amoano Keishirou, Inoue Mikihiro, Uchida Keiichi, Sakurai Hiroyuki, Hayashi Akinobu, Hirayama Masahiro	4. 巻 60
2. 論文標題 Discontinuation of NTBC after liver transplantation in tyrosinemia type 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1039~1041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13697	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 Takada Akinori, Ii Noriko, Hirayama Masahiro, Toyoda Hidemi, Matsubara Toshio, Toyomasu Yutaka, Kawamura Tomoko, Daimon Takashi, Sakuma Hajime, Nomoto Yoshihito	4. 巻 23
2. 論文標題 Long-term follow-up of intensive chemotherapy followed by reduced-dose and reduced-field irradiation for intracranial germ cell tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Pediatrics	6. 最初と最後の頁 317~324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2018.9.PEDS18181	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 Takeoka Mami, Toyoda Hidemi, Hirayama Junya, Suzuki Naofumi, Hanaki Ryo, Amano Keishiro, Iwamoto Shotaro, Hirayama Masahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Report of 2 Pediatric Cases With Li-Fraumeni Syndrome Related Malignancy in a Family	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	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) 10.1097/MPH.0000000000001862	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 Morimoto Mari, Sawada Hirofumi, Yodoya Noriko, Ohashi Hiroyuki, Toriyabe Kuniaki, Hanaki Ryo, Sugiura Katsumi, Toyoda Hidemi, Matsushita Kohei, Koike Yuhki, Otake Kohei, Inoue Mikihiro, Uchida Keiichi, Imai Hiroshi, Mitani Yoshihide, Maruyama Kazuo, Komada Yoshihiro, Ikeda Tomoaki, Hirayama Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Refractory Ileal Perforations in a Cytomegalovirus-Infected Premature Neonate Resolved After Ganciclovir Therapy	5. 発行年 2020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.2020.00352	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 Kumamoto Tadashi, Goto Hiroaki, Ogawa Chitose, Horii Toshinori, Deguchi Takao, Araki Takuya, Saito Akiko M., Manabe Atsushi, Horibe Keizo, Toyoda Hidemi	4. 巻 112
2. 論文標題 FLEND (nelarabine, fludarabine, and etoposide) for relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia in children: a report from Japan Children's Cancer Group	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 720 ~ 724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02962-2	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 XU DONG-QING, YUAN XIAO-JUN, HIRAYAMA MASAHIRO, TOYODA HIDE MI	4. 巻 34
2. 論文標題 Huaier Extract Induces Apoptosis in Hepatoblastoma Cells Via the MEK/ERK Signaling Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2381 ~ 2388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12051	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 Xu Dong-qing, Yuan Xiao-jun, Toyoda Hidemi, Hirayama Masahiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Anti-tumor effect of Huaier extract against neuroblastoma cells in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.48219	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本 和歌子, 豊田 秀実, 花木 良, 森本 真理, 中藤 大輔, 伊藤 卓洋, 平山 雅浩
2. 発表標題 自己免疫疾患モデルマウスにおけるCD3陽性B-1a細胞の意義
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------