

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08550

研究課題名(和文) Immune checkpoint 遮断を導入した新規神経芽腫集学的治療の開発

研究課題名(英文) Basic research for the development of antitumor immunotherapy for neuroblastoma using immune checkpoint inhibition

研究代表者

井上 成一郎 (Seiichiro, Inoue)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70431690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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抗体を用いた免疫阻害療法の効果を検討した。皮下に接種した神経芽腫の腫瘍結節形成は両抗体の共投与により著明に抑制された。その際、腫瘍細胞表面のPD-L1抗原発現は抑制されていた。さらに腫瘍結節にはCD8+リンパ球、CD11c+MHC II+活性化樹状細胞の浸潤が促進された。混合培養実験では抗PD-L1抗体の作用が貪食細胞の腫瘍細胞貪食を促進することが示された。この際に腫瘍増殖を促進するmyeloid系CD11b+Gr-1+細胞は抗体投与の影響を受けていないことが判明した。神経芽腫の免疫チェックポイント阻害は新たな免疫療法となり得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性進行小児神経芽腫に対する新たな免疫療法として、抗PD-1抗体PD-L1抗体の同時投与は抗腫瘍効果を示すことを確認し、pre clinical dataとして提供することができた。さらにこの抗体治療の効果のメカニズムには腫瘍に浸潤するリンパ球と貪食細胞が関与し、Antigen dependent cell phagocytosisの効果が有効に働いていることが示唆された。これらの結果は神経芽腫に対する新たな免疫治療の可能性を提示しながら、さらに腫瘍免疫学という基礎医学領域における新たな知見を示すことができた。これは腫瘍免疫学に関する発展に大きく貢献できる可能性があり意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The effect of immune checkpoint inhibitor on mouse neuroblastoma was investigated and host immune cells were analyzed in the tumor microenvironment. Neuro-2a cells were inoculated subcutaneously into mice, followed by intraperitoneal injection of antibodies targeting PD-1 and PD-L1. Tumor-infiltrating cells were analyzed. Growth of subcutaneous tumors was significantly suppressed, and PD-L1-expressing tumor cells were depleted by the antibody treatment. Neuro-2a cells opsonized by the anti-PD-L1 antibody were phagocytosed in the in vitro setting. In the treated tumor microenvironments, CD8+ lymphocyte and CD11c+ MHC II+ cells were accumulated. Immune suppressive effects of CD11b+Gr-1+ myeloid-derived suppressor cells by the administration of anti-PD-1 and PD-L1 antibodies were not observed. The possibility that co-administration of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies have a synergistic effect on inhibition of tumor growth and could be an effective therapy against neuroblastoma.

研究分野：小児外科学

キーワード：neuroblastoma 免疫チェックポイント阻害 dendritic cell

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

予後不良の進行神経芽細胞腫に対する集学的治療における全身療法に、より効果が期待でき安全性も期待される新しい免疫療法を開発して組み合わせることで、予後不良な進行神経芽腫の治療成績を向上させることが期待された。特に抗 PD-1 PD-L1 抗体を用いた免疫チェックポイント阻害療法は様々な癌腫で効果が報告されていたが神経芽腫に対する報告は少なかった。また進行神経芽腫は外科手術、放射線照射、化学療法による局所療法と、多剤併用の強力な化学療法による転移、再発に対する全身療法の組み合わせにより生存期間延長の努力がなされてきた。従来、多剤併用による化学療法は、患児の免疫能を抑制することから、腫瘍免疫学的見地からは不利と考えられていた。しかし一部抗腫瘍薬が抗腫瘍免疫反応を様々なメカニズムを介して誘導することが示され、Chemoimmunotherapy という分野として注目されていた。従来の化学療法に新しい免疫チェックポイント阻害療法を組み合わせることで新たな集学的治療の開発に有効であると考えられた。そのためまず神経芽腫に対する免疫チェックポイント阻害の有効性を示し、その免疫メカニズムを詳細に解析することが必要と考えられた。

### 2. 研究の目的

進行神経芽腫に対する新たな集学的治療を開発する為、神経芽腫に対する免疫チェックポイント阻害の有効性を示し、その免疫メカニズムを詳細に解析することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

A/J マウス(H2-Ka)皮下にマウス神経芽腫細胞 neuro-2a(H2-Ka, CCL-131)を接種し腫瘍形成し担癌マウスを作製する。担癌マウスに抗 PD-1 PD-L1 抗体を経腹腔投与する。腫瘍サイズを経時的に測定し縮小効果を評価する。最も腫瘍効果の得られる抗体投与方法を確認する。脾臓、リンパ節、腫瘍局所に浸潤する免疫細胞(リンパ球、自然免疫細胞)の細胞表面抗原の発現をフローサイトメトリーで評価した。

### 4. 研究成果

マウス皮下に神経芽腫細胞(neuro-2a)を接種し、腫瘍結節を生じさせた状態で、抗マウス PD-1/PD-L1 抗体を経腹膜投与した際に、抗腫瘍効果が得られた。特に抗 PD-1、PD-L1 抗体を同時投与すると、それぞれの抗体を投与した場合よりより抗腫瘍効果が認められた。この抗腫瘍効果が認められた腫瘍組織から腫瘍に浸潤する免疫細胞を分離し、FACS 解析した。腫瘍に浸潤する CD8 陽性リンパ球は抗腫瘍効果が認められた組織により多く含まれていた。腫瘍増殖に働くと考えられる CD11bGr-1 陽性細胞の浸潤には大きな差が確認されなかったが、特に抗腫瘍効果が得られた腫瘍組織には貪食細胞の一つである CD11cMHC Class II 陽性の活性化された樹状細胞(DC)が多く浸潤していた。さらに、in vitro の実験では、腫瘍細胞に抗 PD-L1 抗体を作用させて貪食細胞(Macrophage)と混合培養すると、より腫瘍細胞の貪食が促進される ADCP(Antibody dependent cell phagocytosis)の効果が確認された。これらの結果を総合的に判断し、神経芽腫に対する免疫チェックポイント阻害療法では抗体投与により抗腫瘍免疫反応を誘導する活性化された貪食細胞(特に DC)の浸潤が促進され、加えて抗 PD-L1 抗体による ADCP が促進されることで CD8 陽性の細胞障害性リンパ球の腫瘍組織浸潤が誘導されて抗腫瘍効果が得られると考えられた。以上の結果を Journal of Surgical Research に報告し、また日本小児外

科学会、国際小児腫瘍学会に報告した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Inoue S, Horiuchi Y, Setoyama Y, Takeuchi Y, Beck Y, Odaka A	4. 巻 253
2. 論文標題 Immune checkpoint inhibition followed by tumor infiltration of dendritic cells in murine Neuro-2a neuroblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 201-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2020.03.059.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Inoue S, Horiuchi Y, Setoyama Y, Takeuchi Y, Beck T, Murakami T, Odaka A
2. 発表標題 Mobilization of multi-functional tumor infiltrating lymphocytes following co-administration of anti-PD-1/PD-L1 antibodies in a murine neuroblastoma model
3. 学会等名 51st congress of the International Society of Pediatric Oncology (Lyon, France) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上成一朗、堀内大、竹内優太、瀬戸山由美子、別宮好文、村上孝、小高明雄
2. 発表標題 PD-L1陰性神経芽腫に対する免疫チェックポイント遮断による腫瘍浸潤リンパ球の抗腫瘍免疫誘導メカニズム
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内優太、井上成一朗、瀬戸山由美子、別宮好文、小高明雄
2. 発表標題 TH-MYCN トランスジェニックマウスにおける腫瘍免疫環境の評価-導入遺伝子が免疫に与える影響
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上成一朗、堀内大、瀬戸山由美子、竹内優太、別宮好文、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る多機能性腫瘍浸潤リンパ球の誘導効果 -マウス神経芽腫モデルを用いた解析-
3. 学会等名 第17回RCGM フロンティアシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue S, Setoyama Y, Takeuchi Y, Mori T, Odaka A, Beck Y.
2. 発表標題 Immune checkpoint inhibitor induce activated dendritic cell infiltration in PD-L1 negative tumor in mouse neuroblastoma model
3. 学会等名 50th congress of the International Society of Pediatric Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上成一朗、小高明雄、瀬戸山由美子、小山直基、森隆、別宮好文
2. 発表標題 小児外科におけるトランスレーショナルリサーチに適している研究分野とその活用法
3. 学会等名 第55回日本小児外科学会学術集会
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
---------	---------