

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17548

研究課題名（和文）神経芽腫における抗腫瘍免疫抑制機序解明と新規免疫療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of immunosuppressive mechanism in neuroblastoma to develop a new treatment

研究代表者

吉澤 比呂子（Yoshizawa, Hiroko）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60814746

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）： 神経芽腫細胞株培養上清下で樹状細胞の抗腫瘍免疫抑制を引き起こすメカニズム解析のため、神経芽腫細胞株培養上清側と樹状細胞側の両者からアプローチを行った。既存の神経芽腫細胞株培養上清の中に分泌されているタンパク質の同定のため、上清中に含まれる全タンパク質の解析を行い、候補タンパク質を同定した。また、それぞれの分化過程の樹状細胞から抽出したRNAを用いて網羅的遺伝子解析を行い、それぞれの分化過程での遺伝子発現を比較し、候補遺伝子を同定した。これらの候補タンパク質、候補遺伝子を用いて現在抗腫瘍免疫抑制を引き起こすメカニズムについて現在解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、神経芽腫に対する新規治療として、腫瘍細胞表面に発現する糖脂質抗原Disialoganglioside (GD2) 抗原に対するモノクローナル抗体とIL-2、GM-CSFを併用した抗GD2抗体療法が、集学的治療を完了した高リスク神経芽腫の5年生存率を改善させることが報告されている。しかし、再発抑制に対する効果は限定的であり、未だ予後不良な患者が少なくない。本研究では、神経芽腫による抗腫瘍免疫抑制機序を解明し、抗腫瘍免疫の抑制状態を制御することで、より強力ながん免疫療法の新規開発を行うことを目的とする。この新規治療により予後が改善することで、神経芽腫の治療成績向上に貢献できる。

研究成果の概要（英文）： To elucidate the mechanism that causes antitumor immunosuppression of dendritic cells under the existence of neuroblastoma cell line culture supernatant, a comprehensive analysis of gene and protein expression of dendritic cells and tumor cell lines was performed. To identify the soluble proteins secreted from neuroblastoma cell lines, all proteins in the culture supernatant were analyzed by proteomic analysis, and candidate proteins were identified. In addition, gene expression profiling of dendritic cells with or without culture supernatant was performed, and candidate genes that might be related to the suppression of anti-tumor immune responses were identified. We are currently investigating the mechanism of how these molecules suppress the anti-tumor immune response.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：神経芽腫 樹状細胞 NKT細胞

## 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、小児固形がんの中で脳腫瘍に次いで多い疾患で、その治療成績は手術や化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩により向上しているものの診断時に高リスク群と判定される神経芽腫の治療成績は依然不良である。

### 2. 研究の目的

これまでに我々は、*in vitro*において、神経芽腫腫瘍環境で神経芽腫細胞株から培養上清中に分泌される可溶性因子が末梢血単球の樹状細胞への分化を阻害し、成熟樹状細胞からの IL-12 産生が著明に抑制されることで抗腫瘍免疫を抑制することを報告してきた。本研究では、神経芽腫細胞株から分泌される可溶性因子の同定と、その可溶性因子による樹状細胞の抗腫瘍免疫抑制機構について解明し抗腫瘍免疫の抑制状態を制御することで、より強力ながん免疫療法の新規開発を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 神経芽腫細胞株による樹状細胞を介した免疫抑制効果のメカニズムの解析

これまでの研究において、単球を IL-4、GM-CSF を用いて培養し樹状細胞へと分化させる際に、ある種類の神経芽腫細胞株の培養上清を加えると、樹状細胞上の表面分子の発現に変化がみられることが判明している。また、成熟刺激時に樹状細胞からの IL-12 産生量が大幅に低下しており、神経芽腫細胞株の培養上清により抗腫瘍免疫抑制が誘導される可能性が示唆された。さらに、既存の神経芽腫細胞株の中には、抗腫瘍免疫抑制を誘導する培養上清（抑制群）と誘導しない上清（非抑制群）が存在することが判明している。コントロールとして、腫瘍細胞培養上清を添加せずに誘導した樹状細胞もしくは IL-12 産生抑制を誘導しない神経芽腫細胞株の培養上清を添加して誘導した樹状細胞を用いる。神経芽腫細胞株上清を添加して培養した細胞とコントロール群の細胞を、培養過程で経時的にそれぞれ回収し、遺伝子発現解析を行う。培養上清添加によって特異的に変動する遺伝子群の検出のために、経時的に回収した細胞から抽出した RNA を用いて RNA-sequence による網羅的解析を行う。それぞれの細胞における遺伝子発現の違いにより、腫瘍株上清に含まれる可溶性因子が単球から樹状細胞への分化過程でどのように作用し、樹状細胞の分化に影響を及ぼしたかについてそのメカニズムを解析する。特に IL-12 産生低下に関連して得られた遺伝子に関しては Real-time PCR にて確認し、Western blotting、FACS を用いてタンパク発現を解析する。同定された遺伝子群の結果を踏まえ、遺伝子のノックダウンやノックアウト、遺伝子導入をして抗腫瘍免疫抑制に関わる遺伝子やタンパクの同定を進めていく。また、同定された分子の阻害実験にて、IL-12 産生能や NKT 細胞活性化能の回復効果を検討する。

#### (2) 神経芽腫細胞株から産生される腫瘍免疫抑制を有する可溶性因子の検索

IL-10 や TGF- $\beta$ 1 などの抑制性サイトカイン、IL-6 や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインによって、tolerogenic DC が誘導されることが報告されている (Torres-Aguilar et al. *J Immunol*, 2010)。既存の神経芽腫細胞株の培養上清に、これらのサイトカインの存在の有無を確認したが、現在までに有意に存在するサイトカインは得られなかった。サイトカイン以外のタンパクの検索のため、上清中のタンパク抽出のためのプロテオーム解析などにより同定する。同定された候補タンパクの結果を踏まえ、神経芽腫細胞株の遺伝子のノックダウンやノックアウト、遺伝子導

入をして抗腫瘍免疫抑制に関わるタンパクの同定を進めていく。また、同定されたタンパクの阻害実験にて、IL-12 産生能や NKT 細胞活性化能の回復効果を検討する。

#### 4 . 研究成果

本研究では、神経芽腫がもつ抗腫瘍免疫に対する抑制効果の作用機序解明と、免疫抑制状態の打破を目指した樹状細胞を用いた免疫療法の開発を目的とした。

令和 2 年度は、樹状細胞の機能を抑制する腫瘍細胞株群の培養上清に含まれる可溶性因子同定のため、腫瘍細胞を RNA-sequence で網羅的遺伝子発現解析し、培養上清のプロテオーム解析を行った。樹状細胞の機能を抑制しない腫瘍細胞株群と比較し、抑制する腫瘍細胞株群で特に発現変動の大きかった遺伝子およびタンパクの候補として 10 種類まで絞りこんだ。また、神経芽腫細胞株から分泌される可溶性因子によってヒト単球由来樹状細胞の分化が阻害されるメカニズムおよびサイトカイン産生抑制機構について、RNA-sequence を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した。コントロールとして、腫瘍細胞培養上清を添加せずに誘導した樹状細胞もしくは IL-12 産生抑制を誘導しない神経芽腫細胞株の培養上清を添加して誘導した樹状細胞を用い、腫瘍細胞培養上清添加群の樹状細胞とそれぞれの遺伝子発現量を比較した。

その他、詳細な実験結果については論文投稿・受理されたのちに報告する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------