

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19950

研究課題名(和文) HUVECワクチンの悪性脳腫瘍における免疫学的機序の解明と血管芽腫への適応拡大

研究課題名(英文) Elucidation of immunological mechanism in malignant brain tumor of HUVEC vaccine and expansion of adaptation to hemangioblastoma

研究代表者

高柳 俊作 (Takayanagi, Shunsaku)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90406489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)ワクチンは、腫瘍血管新生を抑制することで、腫瘍増大抑制を考えると考えられ、我々東京大学医学部附属病院にて、HUVECワクチンの臨床試験を行ってきた。ワクチン治療にて、HUVEC特異的免疫が誘導されている事が確認され、悪性脳腫瘍においては、予後改善する可能性がある事が示された。また、ヒト血小板製剤でHUVECが培養できる可能性も示された。さらに、腫瘍血管新生が著明である血管芽腫に対しては、網羅的ゲノム解析を行い、VHL遺伝子異常の重要性がはっきりし、今後の新規血管新生機序解明とHUVECワクチン治療導入につなげる事ができた。

研究成果の概要(英文)：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) vaccine is thought to inhibit tumor growth by inhibiting tumor angiogenesis, and we have been conducting the clinical trial of HUVEC vaccine at the Tokyo University Hospital. It was confirmed that HUVEC specific immunity was induced by the vaccine treatment and it was shown that there is a possibility of improving prognosis in the patients with malignant brain tumors. It also showed the possibility of culturing HUVEC in human platelet preparations. Furthermore, comprehensive genome analysis was performed on hemangioblastomas the tumor angiogenesis of which are remarkable. Our study showed the importance of VHL gene abnormality in tumorigenesis of hemangioblastomas. These results will be able to lead to the future elucidation of the mechanism of neovascularization and introduction of HUVEC vaccine therapy to hemangioblastomas

研究分野：脳腫瘍

キーワード：HUVECワクチン 血管芽腫

1. 研究開始当初の背景

以前より、腫瘍血管内皮細胞を標的とした抗血管新生療法が癌治療において注目されていた。実際、血管新生誘導因子である VEGF (Vascular endothelial growth factor) を標的とした Bevacizumab (抗 VEGF 抗体) が、2013 年、悪性神経膠腫に対して日本でも保険収載された。しかし、本治療による全生存期間の有意な延長は認めず、新機軸の血管新生抑制療法の創出が待たれていた。

研究代表者(高柳)は、悪性脳腫瘍疾患を対象に、東京大学医学部附属病院で新たに開発された、腫瘍血管内皮細胞を標的としたヒト臍帯静脈内皮細胞(以下、HUVEC と略)ワクチン療法の臨床試験を行っていた。HUVEC は、胎児由来の血管内皮細胞であり、腫瘍新生血管と共通の膜抗原を、複数、発現することが確認されている。そのため、HUVEC を患者に免疫することで、腫瘍血管に特異的な免疫応答を誘導できると予想され、臨床試験を行っていた。実際、一部の症例では、腫瘍増大の抑制効果、および予後改善効果を認めた。しかし、その免疫学的機序は不明瞭のままであった。

また、研究代表者(高柳)は、2014 年 3 月まで、東京大学脳神経外科に大学院生として所属し、神経膠腫と中枢神経系血管芽腫(以下、HB と略す)の網羅的遺伝子解析の研究を行ってきた。さらに、HB が多発する VHL(von Hippel-Lindau)病の専門外来も行っており、豊富な症例を有している。VHL 病の HB は、多発性である事が多く、その場合は、有効な治療がないのが現状である。しかし、HB は、元々腫瘍血管が非常に豊富な腫瘍であり、さらに、腫瘍自身が血管芽細胞(hemangioblast)由来とされており、HUVEC ワクチン療法が有効である可能性が高い事が予想された。

2. 研究の目的

上記より、本研究の当初の目的は、HUVEC ワクチン療法を行った症例の血液や腫瘍検体

を用いて、腫瘍増大抑制の免疫学機序を解明すると共に、血管芽腫の細胞株に対する HUVEC の腫瘍抑制効果などを解析する事で、血管芽腫への適応拡大についての検討を行う事であった。しかし、当院では、平成 27 年度の途中まで、HUVEC ワクチンの臨床試験を行っていたが、ワクチン作成において、FBS を用いており、プリオン病対策が不十分という事で、中止を命じられ、いまだ、臨床試験再開をできていない状況となってしまった。従って、本研究の最終的な目的は、下記のごとくである。

今までに HUVEC ワクチン療法を行った症例で、きちんと、HUVEC 特異的免疫が誘導されているかを確認する

HUVEC ワクチン療法を施行している症例において、予後などを調査し、予後因子を調査する。

HUVEC ワクチン作成において、FBS を用いないで、作成できる方法を開発する。

腫瘍血管新生が著明である HB の腫瘍検体を用いて、網羅的ゲノム解析を行う事で、新規の血管新生機序の解明を行い、HB に対する HUVEC ワクチン療法の可能性に関して模索する。

3. 研究の方法

HUVEC ワクチン療法施行前後の血液を採取して、HUVEC の膜抗原特異的 IgG を、ELISA 法にて定量する。HUVEC ワクチンによって、特異的細胞性免疫が誘導されているかを、ELISPOT 法(IFN- 分泌)を用いて確認する。

HUVEC ワクチン療法を行った症例の、治療開始からの予後(progression free survival, overall survival)を調査し、さらに、年齢、腫瘍部位、ステロイドの使用などを調査し、予後因子解析を行った。

トロンピンを用いて、濃縮したヒト血小板製剤を活性化して、HUVEC の増殖を調査した。

東京大学脳神経外科にて摘出術を施行した、血管芽腫(HB)の検体(全32例、VHL病症例11例、非VHL病症例21例)のDNAを用い、VHL遺伝子異常の解析(direct sequencing, Ion torrent を用いた target sequencing, MLPA)、及びコピー数解析のための SNP array(Affymetrix)を施行した。VHL遺伝子 promoter 領域のメチル化の解析のために、Methylation specific PCR, bisulfite sequencing を施行した。VHL病の好発腫瘍である腎癌においては、VHLだけでなく、PBRM1やBAP1, SETD2の遺伝子異常が多い事が知られているが、当科のHB検体において、これらの遺伝子に対する target sequence を行った。

4. 研究成果

HUVEC ワクチン療法を施行した症例8例の施行前後の血清を用いて、HUVEC 膜抗原特異的 IgG を、ELIZA 法で定量したところ、8例全例で、特異的 IgG が誘導されている事が確認された。また、HUVEC ワクチン療法を施行した症例7例の施行前後の血清を用いて、ELISPOT 法(IFN-分泌)を行って、全例に、HUVEC 特異的細胞性免疫が誘導されている事が確認された。

実際にHUVEC ワクチン療法を施行した悪性脳腫瘍症例17例で解析を行い、progression free survival が5.5カ月、overall survival が11.4カ月であった。標準治療による overall survival は、だいたい8~9カ月と報告されており、標準治療より予後が延長している可能性が示された。予後因子としては、若いほど、HUVEC ワクチン療法後の予後が良好である事が示された。

ヒト血小板製剤を10倍に濃縮し、その後、トロンピン処理を行い、遠心後、上清を採取した。その後、非働化を行わないで、HUVEC の培養を行ったところ、FBS を用いて HUVEC の培養を行ったのと同じぐらい、安定して

HUVEC が増殖することが確認できた。

HB の網羅的ゲノム解析 () VHL 遺伝子異常解析

32例のHB検体に対して、VHL 遺伝子の direct sequencing をまず、行い、11検体の症例で、VHL 遺伝子変異を認めた。VHL 病症例:7/11, 64%, 非VHL 病症例:4/21, 19%で、VHL 病症例で有意に多くの変異を認めた。Direct sequencing にてVHL 遺伝子変異を認めなかった非VHL 病症例17例に対して、Target sequencing を行った。これにより、9例に新たに、VHL 遺伝子変異を同定することができた。

() SNP アレイ解析

32例のHB検体すべてに、SNP アレイ解析を行い、VHL 遺伝子が存在する3番染色体、あるいは3pのLOHを認めたのが、14例(44%)あった。さらに、3番染色体、あるいは3pのcopy-neutral LOHを認めたのが、5例あり、全体として、19例(59%)の3番染色体、あるいは3pのLOHを認めた事になる。3番染色体、あるいは3pのLOHは、VHL 病症例で7/11(64%), 非VHL 病症例で12/21(57%)認めており、両群ともほぼ同じ割合であった。

今回の検体では、非VHL 病症例で、6番、または10番染色体のLOHを9例(43%)みとめたが、VHL 病症例では1例も認めなかった。

() HB 検体の MLPA 解析

32例のHB検体すべてに、VHL 遺伝子の MLPA を行った。VHL 病症例において、direct sequencing でVHL 遺伝子変異を認めなかった4例全例に、VHL 遺伝子 exon3 の欠失を同定できた。これにより、VHL 病症例では、全例、VHL 遺伝子の異常を認めた事がわかった。

非VHL 病症例では、先ほどの SNP アレイ解析では、3番染色体のLOHが19例同定できていたが、MLPAでは5例しか同定できなかった。

() HB 検体のメチル化解析

32例のHB検体すべてに、Methylation specific PCR と bisulfite sequencing を行

った。Methylation specific PCR では、2 例の非 VHL 病症例でのみ、メチル化を認めた。Bisulfite sequencing では、7 例でメチル化を認め、全例、非 VHL 病症例であった。(7/21,33%) VHL 病症例では 1 例もメチル化を認めなかった。

()HB 検体における VHL 遺伝子不活化

これまでの解析結果を表 1 に掲げる。VHL 遺伝子変異、3 番染色体 LOH、VHL 遺伝子 promotor 領域のメチル化、この 3 つの内、2 つがあれば、VHL 遺伝子不活化されていると定義した。そうしたところ、VHL 病症例では、64%、非 VHL 病症例では、52%の症例で不活化を認め、両群ともほぼ同じ割合で、かつ半分以上の症例で、VHL 遺伝子不活化を認めた事がわかった。

表 1 : HB におけるゲノム解析結果のまとめ

	VHL病群	散発性群
VHL変異	100%(11/11)	62%(13/21)
3番染色体欠失	64%(7/11)	57%(12/21)
VHLメチル化	0%(0/11)	33%(7/21)
VHL 2hit	64%(7/11)	52%(11/21)
6,10番染色体欠失	0%(0/11)	33%(7/21)

()VHL 遺伝子以外の target sequencing

Direct sequencing にて VHL 遺伝子変異を認めなかった非 VHL 病症例 17 例に対して、PBRM1, BAP1, SETD2 の target sequencing を行ったが、有意な変異は認められなかった。

研究成果のまとめ

より、当院で施行している HUVEC ワクチン療法により、HUVEC 特異的細胞性、液性免疫が誘導されている事が判明し、かつ従来の標準療法よりも予後が改善している事が示された。

により、従来は、FBS を使用しないと困難であった HUVEC の培養が、ヒト血小板製剤により可能かもしれない事が示され、今後の HUVEC ワクチン療法の臨床試験再開につなげ

られる可能性が出てきた。

により、HB 腫瘍化には、VHL 不活化が、改めて重要である事が判明した。従って、VHL が関与するシグナル回路異常の解明を行う事で、腫瘍血管新生の新規機序の解明と、ひいては、抗腫瘍血管新生治療である HUVEC ワクチン療法の有用性を検討できると考えられた。

<引用文献>

Takayanagi S, Mukasa A, Tanaka S, Nomura M, Omata M, Yanagisawa S, Yamamoto S, Ichimura K, Nakatomi H, Ueki K, Aburatani H, Saito N. Differences in genetic and epigenetic alterations between von Hippel-Lindau disease-related and sporadic hemangioblastomas of the central nervous system; Neuro-Oncology. 2017 (19), 1228-1236

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)

[雑誌論文](計4件)

Takayanagi S, Mukasa A, Nakatomi H, Kanno H, Kuratsu JI, Nishikawa R, Mishima K, Natsume A, Wakabayaashi T, Houkin K, Terasaka S, Yao M, Shinohara N, Shuin T, Saito N. Development of Database and Genomic Medicine for von Hippel-Lindau Disease in Japan; Neurol. Med. Chir. (Tokyo). 2017(57), 59-65 査読有
DOI:10.2176/nmc.ra.2016-0206

Takayanagi S, Mukasa A, Tanaka S, Nomura M, Omata M, Yanagisawa S, Yamamoto S, Ichimura K, Nakatomi H, Ueki K, Aburatani H, Saito N. Differences in genetic and epigenetic alterations between von Hippel-Lindau disease-related and sporadic hemangioblastomas of the central nervous

system;Neuro-Oncology.2017(19),1228-123
6 査読有
DOI:10.1093/neuonc/nox034

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人. 血管芽腫と VHL 遺伝子解析 ;Clinical Neuroscience:2016(34),1052-1053,査読無
DOI:なし

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人. von Hippel-Lindau 病 ;Clinical Neuroscience:2015(33),433-436,査読無
DOI:なし

[学会発表](計14件)

高柳 俊作、武笠 晃丈、長谷川 洋敬、田中 将太、相原 功輝、柳澤 俊介、野村 昌志、高橋 長久、滝田 順子、小林 敏之、樋野 興夫、水口 雅、齊藤 延人. 結節性硬化症に合併した膠芽腫に対する分子病理学的解析 第 16 回日本分子脳神経外科学会 浜松 2015.8.28

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、菅野 洋、執印 太郎、齊藤 延人. VHL 病のデータとゲノム医療の展開 日本脳神経外科学会第 74 回学術総会 札幌 2015.10.15

高柳 俊作、田中 将太、野村 昌志、武笠 晃丈、辛 正廣、中富 浩文、樋渡 光輝、滝田 順子、齊藤 延人. 遺伝性腫瘍疾患 Infantile myofibromatosis における新規原因遺伝子 *PDGFRB* の解析. 第 33 回日本脳腫瘍学会. 京都 2015.12.6

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、菅野 洋、矢尾 正祐、執印 太郎、齊藤 延人. VHL 病における厚労省班会議の活動とゲノム医療の展開. 第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会. 愛媛 2016.6.4

高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村 幸一、齊藤 延人. 次世代シーケンサを用

いた中枢神経系血管芽腫における VHL 遺伝子解析. 第 17 回日本分子脳神経外科学会. 東京 2016.8.26

高柳 俊作、中富 浩文、野村 征司、吉野 正紀、金 太一、武笠 晃丈、辛 正廣、齊藤 延人. von Hippel-Lindau 病症例に対する多角的・集学的診療の取り組み(シンポジウム) 第 21 回日本脳腫瘍の外科学会. 東京 2016.9.10

高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村 幸一、齊藤 延人. 中枢神経系血管芽腫非 VHL 病症例における VHL 遺伝子変異の重要性—一次世代シーケンサを用いた検討—. 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会. 福岡 2016.9.29

Shunsaku Takayanagi, Akitake Mukasa, Masashi Nomura, Shunsuke Yanagisawa, Shota Tanaka, Hirofumi Nakatomi, Hiroyuki Aburatani, Koichi Ichimura, Keisuke Ueki, Nobuhito Saito. Integrated genomic analysis for von Hippel-Lindau disease-related and sporadic hemangioblastomas of the central nervous system. 21st annual meeting of the society for neuro-oncology(SNO). Scottsdale Arizona USA 2016.11.19

高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村 幸一、齊藤 延人. 次世代シーケンサなどを用いた中枢神経系血管芽腫の統合的解析. 第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会. 山梨 2016.12.5

高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村 幸一、齊藤 延人. 中枢神経系血管芽腫における VHL 病症例と非 VHL 病症例の違い—次世代シーケンサを用いた検討—. 第 23 回日本家族性腫瘍学会学術集会. 札幌 2017.8.4

高柳 俊作、野村 征司、金 太一、中
富 浩文、齊藤 延人. 中枢神経系血管芽腫
摘出術における高精細コンピュータグラフ
ィックスを用いた手術検討. 第 22 回日本脳
腫瘍の外科学会. 鹿児島 2017.9.9

高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、
田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村
幸一、植木 敬介、齊藤 延人. 中枢神経系
血管芽腫に対する統合的ゲノム・エピゲノム
解析-VHL 病症例と非 VHL 病症例の違い-. 日
本脳神経外科学会第 76 回学術総会. 名古屋
2016.10.12

13 Shunsaku Takayanagi, Akitake Mukasa,
Masashi Nomura, Shota Tanaka, Hirofumi
Nakatomi, Koichi Ichimura, Keisuke Ueki,
Hiroyuki Aburatani, Nobuhito Saito.
Integrated genomic and epigenomic
analysis for hemangioblastomas of the
central nervous system. 22nd annual meeting
of the society for
neuro-oncology(SNO). San Francisco, USA
2017.11.17

14 高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、
田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村
幸一、植木 敬介、齊藤 延人. 中枢神経系
血管芽腫における VHL 病症例と非 VHL 病症例
の違い - 次世代シーケンサなどを用いた
統合的ゲノム解析 . 第 35 回日本脳腫瘍学
会学術集会. 香川 2017.11.27

〔図書〕(計 1 件)

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤
延人 メディカルビュー社 EBM に基づく脳
神経疾患の基本治療指針第 4 版 : 血管芽腫、
von Hippel-Lindau 病 2016 年
総ページ : 4 ページ (807 ページ)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

東京大学脳神経外科 : VHL, NF 外来

[http://www.h.u-tokyo.ac.jp/neurosurg/ga
irai/VHL.html](http://www.h.u-tokyo.ac.jp/neurosurg/gairai/VHL.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高柳 俊作 (TAKAYANAGI shunsaku)

東京大学 医学部附属病院 助教

研究者番号 : 90406489

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()