

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19983

研究課題名(和文) B7 familyを標的にした膠芽腫の癌幹細胞に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy targeting for B7 family on glioma cancer stem cells

研究代表者

岩田 亮一 (IWATA, Ryoichi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60580446

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)：本研究では、グリオーマ癌幹細胞で発現するICOSリガンドが、どのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的としたものである。本研究により、ICOSリガンドはmesenchymal typeのグリオーマ癌幹細胞で発現し、予後不良因子であることが判明した。さらに、ICOSリガンドは腫瘍微小環境におけるIL-10産生T細胞の増幅に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to reveal the role of ICOS ligand in glioblastoma development. We have revealed that mesenchymal type glioma cancer stem cells express the ICOS ligand. Expression of ICOS ligand is associated with poor prognosis. Moreover, ICOS ligand promote the expansion of IL-10 producing T cells in the tumor microenvironment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：グリオーマ 癌幹細胞 免疫治療

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は、最も発生頻度の高い原発性脳腫瘍であり、その主たる組織型である神経膠芽腫において生存期間中央値はわずか 14.6 ヶ月と予後が悪い。膠芽腫癌幹細胞が、放射線治療や抗がん剤治療への抵抗性を保持し、腫瘍の再発の根源と考えられている。近年、がんに対する免疫療法は、外科的療法、化学療法、放射線療法に次ぐ第4の治療法として、注目されつつある。膠芽腫では、癌の全ゲノム解析が行われ、単一疾患ではなく、放射線治療や化学療法に対する反応性や予後の異なる、2つのサブタイプに分類された (Mesenchymal (MES) type と Proneural (PN) type)。免疫療法においても、MES type では、腫瘍内浸潤リンパ球が有意に多く、樹状細胞療法などの免疫治療に対する反応性を示す。しかし、この免疫応答の違いが起こる機序は不明である。膠芽腫の根源や治療抵抗性の原因として、癌幹細胞の存在が提唱されている。癌幹細胞は自己複製能、分化能力、腫瘍形成能を有し、癌形成の新しいモデルとして考えられている。我々は、これまで膠芽腫癌幹細胞について、研究してきた。その結果、膠芽腫癌幹細胞においても、MES type と PN type に分類できることが判明した。膠芽腫癌幹細胞を標的とした免疫治療を新規に開発することを目的とし、これまでに、TNF-superfamily や B7 family について網羅的な解析を行ってきた結果、MES type においてのみ、B7 family の ICOS リガンドが発現していることを見出した。近年、癌による免疫抑制状態を是正するために様々な抗体医薬が開発され、臨床において有効な結果が報告されている。その中でも特に B7 family は、リンパ組織において、免疫賦活や免疫抑制への共刺激シグナルを有しており、注目されている。B7 family には8つの分子が同定されており、CD80、CD86、PDL-1、PDL-2、ICOS リガンド、B7-H3、B7-H4 などがある。これらの分子は、非リンパ組織においては、いくつかの癌細胞で B7 family が発現していることが報告されている。PDL-1 を発現している癌では、T 細胞のアポトーシスを引き起こし、腫瘍周囲環境を免疫抑制状態にさせるために、予後悪化因子である。肺がんやメラノーマなどでは、免疫抑制を是正する目的に PDL-1/PD-1 に対する抗体医薬が、現在欧米を中心に治験が行われている。しかし、膠芽腫に関しては、B7 family についてこれまで詳細な検索が行われていない。われわれはグリオーマ癌幹細胞で特異的に ICOS リガンドが発現していることを見出しており、このことが新規治療法の開発につながると考えている。ICOS リガンドは癌において、腫瘍内に浸潤している形質細胞様樹状細胞に発現を認め、ICOS 陽性 IL-10 産生制御性 T 細胞の誘導・増幅に関与していると報告されている。ICOS 陽性の制御性 T 細胞は、癌の予後不良因子であ

る。グリオーマ癌幹細胞においても自身が ICOS リガンドを発現し、制御性 T 細胞の誘導・増幅を引き起こし、腫瘍の免疫環境を構築している可能性があると思われる。免疫抑制環境は腫瘍の増大・進展と関与しており、免疫抑制環境の是正が予後改善に結びつく。本研究は膠芽腫癌幹細胞で発現する B7 family の免疫応答における役割解明とそれを標的とした治療法の開発を目的とする。

2. 研究の目的

(1) グリオーマ癌幹細胞で、免疫に関わる表面マーカーを網羅的に検索する。特に B7 family の発現とグリオーマ癌幹細胞のサブタイプ (MES type と PN type) での相違について明らかにする。

(2) 癌幹細胞で発現する B7 family の機能について、in vitro で解析する。

(3) 癌幹細胞で発現する B7 family の機能について、in vivo で解析する。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ癌幹細胞の単離

本研究を行うにあたり、院内の倫理委員会での承認はすでに得ており、患者にインフォームドコンセントを行い、膠芽腫患者の腫瘍組織を使用する。腫瘍細胞を無血清培地 (DMEMF12) に EGF、FGF を添加した neurosphere assay にて、培養し、グリオーマ癌幹細胞を分離する。癌幹細胞の確認として、自己複製能、分化能 (ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3系統)、マウスに移植し、腫瘍形成能を評価する。また樹立した癌幹細胞株の表面マーカーの解析、遺伝子解析を行い、MES type か PN type かの表現型を決定する。

グリオーマ癌幹細胞の B7 family、TNF superfamily などの表面マーカーについてフローサイトメトリーを用いて解析する。

(2) 腫瘍組織の免疫組織学的検査

膠芽腫組織における B7 family (特に ICOS リガンド) の発現の有無とリンパ球の浸潤程度、表現型の関係を明らかとする。特に ICOS リガンド発現のグリオーマ組織では、ICOS 陽性や Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の浸潤との関連について検証する。また ICOS リガンドの発現と生存率など臨床パラメーターとの相関関係も検証する。

(3) グリオーマ癌幹細胞の conditioned medium を用いて、リンパ球を培養する。

グリオーマ癌幹細胞から産生される soluble factor がリンパ球に与える影響を明らかにする。これまでに TGF などの報告があるが、癌幹細胞では、ICOS リガンドを発現しており、その分泌型がリンパ球に影響を与える可能性がある。グリオーマ癌幹細胞を 102-106 cells/ml で培養し、48 時間後にその上清を回収する。ELISA を用いて、可溶性の ICOS リガンドを測定する。また、この培養上清を用いて、リンパ球との共培養を行い、その表現型 (CD3, CD4, CD8, ICOS, Foxp3) に与える影響

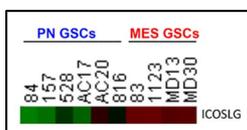
をフローサイトメトリーで測定する。Condition medium で培養されたリンパ球の上澄みを回収し、産生されたサイトカイン (IL-10, TGFb, IFN-) を ELISA で測定する。また ICOS リガンドの中和抗体を用いて、その抑制効果を検証する。

(4) 膠芽腫マウスモデルでの ICOS リガンド中和抗体の効果

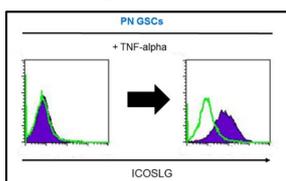
グリオーマ癌幹細胞をマウス脳に移植し、膠芽腫モデルマウスを作製する。マウスに ICOS リガンドの中和抗体を投与し、その有効性を検証する。評価項目は、マウスの生存率、腫瘍内に浸潤するリンパ球および末梢血のリンパ球の表現型と機能を評価する。

4. 研究成果

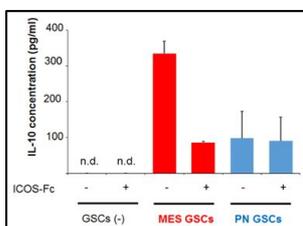
本研究では、グリオーマ癌幹細胞で発現する B7 family について解析を行った。グリオーマ癌幹細胞は mesenchymal type と proneural type に分類できるが、B7 family のうち ICOS リガンドが mesenchymal type でのみ発現することを見出した。



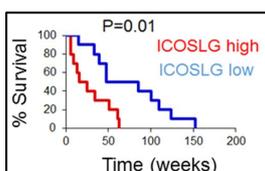
また、proneural type のグリオーマ癌幹細胞に、TNF-alpha を添加することで、ICOS リガンドの発現を認めるようになった。



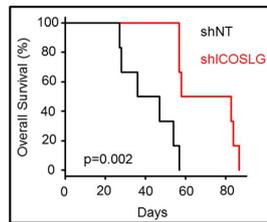
グリオーマ癌幹細胞で発現する ICOS リガンドはリンパ球との共培養により、IL-10 産生性の T 細胞の分化増幅に関連することを明らかにした。



膠芽腫の臨床検体を用いた解析により、ICOS リガンド発現は生命予後不良と関連した。



ICOS リガンドをノックダウンしたグリオーマ癌幹細胞をヌードマウスに移植すると、マウスの生存期間が延長した。



ICOS リガンドは膠芽腫に対する新たな治療標的となりうると考えられた。

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)

[雑誌論文](計5件)

[1] Hyperperfusion syndrome after clipping of an unruptured aneurysm by transsylvian approach: A Case Report. Ryoichi Iwata, Kunikazu Yoshimura, Yoko Fujita, Tatsuo Uesaka, Hideyuki Oshige, Akio Asai. Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management. 2017, 8, 11-13 (査読あり)

[2] Application of transpulmonary thermodilution monitoring (PiCCO) in patients with neurogenic pulmonary edema and acute obstructive hydrocephalus due to a central neurocytoma: A case report. Ryoichi Iwata, Kunikazu Yoshimura, Yoko Fujita, Tatsuo Uesaka, Hideyuki Oshige, Akio Asai. Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management. 2017, 8, 57-59 (査読あり)

[3] 治療後長期間生存している悪性視神経膠腫の1例. 藤原望, 中内正志, 正健一郎, 山田晴彦, 最所千晶, 岩田亮一, 亀井孝昌, 浅井昭雄, 高橋寛二. 臨床眼科. 2016.70.1473-1478 (査読あり)

[4] Serine/Threonine Kinase MLK4 Determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NF- B-dependent Manner. Kim SH, Ezhilarasan R, Phillips E, Gallego-Perez D, Sparks A, Taylor D, Ladner K, Furuta T, Sabit H, Chhipa R, Cho JH, Mohyeldin A, Beck S, Kurozumi K, Kuroiwa T, Iwata R, Asai A, Kim J, Sulman EP, Cheng SY, Lee LJ, Nakada M, Guttridge D, DasGupta B, Goidts V, Bhat KP, Nakano I. Cancer Cell. 2016 Feb 8;29(2):201-13. (査読あり)

[5] MESENCHYMAL TYPE GLIOMA STEM CELL EXPRESS ICOS LIGAND AND UPREGULATE ICOS+IL-10+ T CELLS. Ryoichi Iwata, Ichiro

Nakano, Akio Asai, et al. Neuro-Oncology
17(suppl 5):v116-v116 · November 2015 (査
読あり)

(4)研究協力者
中野伊知郎 (Nakano Ichiro)

〔学会発表〕(計3件)

[1] Effect of Temozolomide on brain
metastasis of Neuroendocrine carcinoma.
Ryoichi Iwata. ASNO, Sydney, Australia,
12th, September, 2016

[2] Immunomodulatory Drugs (IMiDs),
lenalidomide and pomalidomide, have
regulatory functions for human myeloid
dendritic cells, Phan Thi, Ito T, Inaba T,
Kibata K, **Iwata R**, Tanaka A, Katashiba N,
Nomura S. International Congress of
Immunology, MELBOURNE

AUSTRALIA, 21-26 AUGUST 2016.

[3] 内視鏡下 5 アミノレブリン酸 (5-ALA)
蛍光診断 (PDD) ~ 連続 45 症例の検討 ~. 武
田純一, 埜中正博, 亀井孝昌, **岩田亮一**,
羽柴哲夫, 吉村晋一, 浅井昭雄. 第 34 回日
本脳腫瘍学会学術集会. 甲府富士屋ホテル.
山梨. 2016. 12.4-6

〔図書〕(計1件)

[1] 転移性脳腫瘍の治療, 日本臨牀 74 巻増
刊号 7 脳腫瘍学 基礎研究と臨床研究の進
歩, **岩田亮一**, 浅井昭雄, 2016, 5 頁

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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岩田亮一 (IWATA RYOICHI)
関西医科大学医学部・助教
研究者番号: 60580446