

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08962

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞およびiPS細胞を用いた免疫細胞の不活性化の機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of immune cell inactivation using glioma stem cells and iPS cells

研究代表者

石川 栄一 (Ishikawa, Eiichi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：30510169

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)：膠芽腫の再発や予後に影響を与える因子の探索のため、化学療法耐性幹細胞株の特性の解析およびマウスモデルに対する免疫療法の効果を検証した。この幹細胞は免疫チェックポイント分子のPD-L1を発現しており、これに加えてマクロファージ(M<sub>1</sub>)の誘導、分化に関する因子の発現が確認された。マウス皮下腫瘍モデルに対して抗PD-L1抗体と免疫抑制性M<sub>1</sub>阻害剤を併用したところ、免疫療法施行後のM<sub>1</sub>浸潤が抑えられることで延命効果が得られた。ヒト膠芽腫においても、免疫療法後の早期再発組織に浸潤M<sub>1</sub>が増加しており、再発の一因となっている可能性が示唆された。これらの経験も踏まえ原著論文と総説論文を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法耐性グリオーマ幹細胞は免疫チェックポイント分子のPD-L1を発現しており、これに加えてマクロファージの誘導、分化に関する因子の発現が確認されたことから、膠芽腫標準治療後の再発の一因として治療抵抗性の幹細胞による免疫抑制微小環境の形成が影響していることが明らかとなった点は、初めての報告であり今後の悪性神経膠腫への薬剤開発の発展に寄与する。また、マウス皮下腫瘍モデルにおいて抗PD-L1抗体と免疫抑制性マクロファージ阻害剤を併用効果についても、初めての知見であり学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：To search for factors that influence recurrence and prognosis of glioblastoma, we characterized a chemotherapy-resistant stem cell line and tested the effects of immunotherapy using a mouse model. The stem cells expressed the immune checkpoint molecule PD-L1. In addition, expression of some factors related to macrophage induction and differentiation are observed. The combination of anti-PD-L1 antibody and immunosuppressive macrophage inhibitors in a mouse subcutaneous tumor model prolonged survival time by suppressing macrophage infiltration after immunotherapy. Also in human glioblastoma, infiltrating macrophages were increased in early recurrent tissues after immunotherapy, suggesting that they may contribute to the recurrence of the disease. Based on these experiences, we made research papers and review articles.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性神経膠腫 免疫療法 PD-L1 マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は治療抵抗性の腫瘍であり、様々な新規治療の開発が行われている。免疫療法についても開発が盛んに行われているが、これまで我々や他の研究者が開発してきた放射線化学療法後(あるいは併用として)の免疫療法(ワクチン療法を含む)においても、早期再発を来す症例が生じることが問題となっていた。

### 2. 研究の目的

膠芽腫(GBM)の再発や予後に影響を与える因子の探索のため、標準治療後の再発要因を想定して、人工の神経膠腫幹細胞を長期の化学療法剤処理することで化学療法耐性幹細胞株を作製し、細胞の特性の解析およびマウスモデルに対する免疫療法の効果を検証した。

### 3. 研究の方法

テモゾロミド(TMZ)治療した人工の神経膠腫幹細胞(TMZRTS)による神経膠腫モデルを用いて、マクロファージ(M )の浸潤を含む腫瘍微小環境に対する抗 PD-L1 抗体の効果を詳細に検討した。さらに、in vitro で腫瘍増殖や免疫療法抵抗性に関連した分子の変化に関する検証を行った。次に、TMZRTS 細胞を C57BL/6 マウスに皮下移植し、M2M マーカーと考えられている CD163 陽性 M の阻害剤である IPI-549 および抗 PD-L1 抗体の有効性を検討した。

さらに、脳腫瘍の発現データセットを可視化・解析するためのウェブアプリケーション GlioVis を用いて、GBM 患者における CD163 mRNA 発現のデータセットを解析した。また、ヒト GBM 患者からのサンプルにおける CD163 の発現を評価すべく、当院で標準的な放射線化学療法を受けた GBM 患者さん 6 名と標準的療法と免疫療法の両方を受けた GBM 患者さん 6 名の初回切除および再発時に摘出した腫瘍の CD163 陽性細胞の免疫染色検査を追加実施した。

### 4. 研究成果

化学療法耐性幹細胞は免疫チェックポイント分子の PD-L1 を発現しており、これに加えてマクロファージの誘導、分化に関する因子の発現が確認されたことから、膠芽腫標準治療後の再発の一因として治療抵抗性の幹細胞による免疫抑制微小環境の形成が影響していることが明らかとなった。マウス皮下腫瘍モデルに対して抗 PD-L1 抗体と免疫抑制性マクロファージ阻害剤を併用したところ、免疫療法施

行後の早期に起こるマクロファージ浸潤が抑えられることで延命効果が得られた。

ヒト GBM においても、免疫療法後の早期再発組織には浸潤マクロファージが有意に増加しており、再発の一因となっている可能性が示唆された。具体的には、GlioVis データベースを用いた予後解析の結果、CD163 mRNA の発現は正常脳組織より GBM 組織で高く、この高発現が有意に予後不良因子であることがわかった。さらに、標準療法に加えて免疫療法を行った、または標準療法のみ患者から採取した一対の初発/再発 GBM 標本を抗 CD163 抗体で染色した。CD163 陽性細胞の浸潤は、標準治療のみを受けた GBM 患者の標本のペアでは 1.1 倍増加していたが、免疫治療を受けた患者の再発 GBM 標本では 2.7 倍増加していた。

これらの経験から、膠芽腫再発時には免疫抑制微小環境の形成が重要であることを確信したため、膠芽腫の免疫抑制微小環境における、液性因子、細胞外小胞、腫瘍浸潤免疫抑制細胞 (MDSC、M2 マクロファージ、Treg、Breg)、免疫チェックポイント分子の情報をまとめ、また、日本及び米国の免疫療法関連臨床試験の情報についても精査し、総説論文を作成した。

一方で、免疫抑制微小環境形成には腫瘍組織中の酸素・栄養状態や血管新生因子による免疫抑制細胞への影響が重要であることから、血管新生阻害治療と免疫療法の併用の可能性についても検討して総説論文を作成した。加えて、上記以外の観点において膠芽腫の再発や予後に 関連する因子についても付随的研究を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikawa Eiichi, Miyazaki Tsubasa, Takano Shingo, Akutsu Hiroyoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Anti-angiogenic and macrophage-based therapeutic strategies for glioma immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 149 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-021-00402-5	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

1. 著者名 Miyazaki Tsubasa, Ishikawa Eiichi, Matsuda Masahide, Sugii Narushi, Kohzuki Hedihiro, Akutsu Hiroyoshi, Sakamoto Noriaki, Takano Shingo, Matsumura Akira	4. 巻 37
2. 論文標題 Infiltration of CD163-positive macrophages in glioma tissues after treatment with anti-PD-L1 antibody and role of PI3K inhibitor as a combination therapy with anti-PD-L1 antibody in in vivo model using temozolomide-resistant murine glioma-initiating cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-020-00357-z	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

1. 著者名 Miyazaki Tsubasa, Ishikawa Eiichi, Sugii Narushi, Matsuda Masahide	4. 巻 12
2. 論文標題 Therapeutic Strategies for Overcoming Immunotherapy Resistance Mediated by Immunosuppressive Factors of the Glioblastoma Microenvironment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1960 ~ 1960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12071960	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 該当する

1. 著者名 石川 栄一、宮崎 翼	4. 巻 49
2. 論文標題 特集 グリオーマ-現在の常識と近未来のスタンダード グリオーマ治療法update -悪性神経膠腫に対する VEGFを中心とした-血管新生標的療法および免疫療法の効用と展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 597 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204433	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 -

〔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
研究 分 担 者	松田 真秀  (Matsuda Masahide)  (30614333)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	
研究 分 担 者	坪井 康次  (Tsuboi Koji)  (90188615)	筑波大学・医学医療系・名誉教授   (12102)	

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
---------	---------