

令和 4 年 3 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15301

研究課題名(和文) 腫瘍幹細胞治療に対する免疫共刺激因子CD40刺激；機序解明とPD-1阻害剤の併用

研究課題名(英文) Efficacy of co-stimulatory molecule CD40 against glioma stem cells; research for mechanism and combination with PD-1 inhibitor.

研究代表者

長南 雅志 (Chonan, Masashi)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90813676

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)：研究計画に基づき、抗CD40抗体および抗PD-1抗体全身投与の生存試験を実施し、CD40治療群およびCD40およびPD-1併用群がコントロール群およびPD-1治療群より生存期間が短いことを確認した($p < 0.05$)。また、併せて発光in vivo imagingを行い、定量的にCD40治療群およびCD40よPD-1併用群で腫瘍増殖が速いことを確認し、生存試験の結果を裏付ける結果が得られた。今後、ワクチン療法で同様の生存試験を行い、その治療効果について腫瘍浸潤免疫細胞解析を実施する計画である。全身投与の効果と比較し、効果の違いについて考察を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫を代表とした悪性神経膠腫の治療成績は、現時点での外科的摘出術、化学療法、放射線治療を用いても依然として絶対的に不良であり、第4の治療法として注目されている免疫治療の開発が急務とされている。近年、悪性神経膠腫の治療抵抗性には腫瘍幹細胞が関与しているとされ、我々は免疫共刺激因子であるCD40(樹状細胞やB細胞活性化し間接的に抗腫瘍効果を発揮するとともに、腫瘍細胞に対しては直接的にアポトーシスを誘発)の刺激抗体を用いた免疫治療の開発を目指して研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：Efficacy of immunotherapy using intravenous administration of anti-CD40 antibody in combination with intravenous administration of anti-PD-1 antibody was performed against rodent brain tumor model. Brain tumor mice were randomly assigned to 4 treatment groups; Group1 control, Group2 anti-CD40 antibody, Group 3 anti-PD-1 antibody, Group 4 combination. As a result, survival of mice in treatment groups 2 and 4, which received anti-CD40 antibody treatment, was significantly shorter than control as well as anti-PD-1 antibody group ($p < 0.05$). In vivo imaging study performed simultaneously revealed rapid growth of tumors in group 2 and 4 confirming the result of survival study. Analysis of tumor infiltrating immune cells is now on-going. We are also planning another survival study using vaccination, i.e. subcutaneous administration of anti-CD40 antibody and/or anti-PD-1 antibody in combination with tumor lysate based subcutaneous vaccine and evaluate the difference in efficacy.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：CD40 OX40 免疫療法 神経膠腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、本学免疫学教室で世界に先駆けて単離された免疫共刺激因子である OX40 (Nature Reviews Immunology. Sugamura K, Ishii N, Weinberg. 2004) の刺激抗体が活性化 T 細胞を有効に刺激できることに着目し、脳腫瘍免疫治療法として開発を進めてきた。これまでの研究で OX40 刺激抗体と TLs の皮下ワクチン療法は GL261 神経膠腫モデルマウスに対しては有効な抗腫瘍効果を示したが、NSCL61 腫瘍幹細胞モデルマウスに対する抗腫瘍効果は不十分であった。このため、同様の共刺激因子である CD40 刺激抗体との併用療法を開発し、治療抵抗性の NSCL61 腫瘍幹細胞モデルマウスに対しても有効性を認めた。そこで、膠芽腫患者 86 例の摘出腫瘍を検討したところ、CD40/CD40L の高発現が予後良好因子であることが判明した。さらに、CD40 刺激の腫瘍幹細胞治療に対する機序を解明するために腫瘍幹細胞マーカーである SOX2, Nestin, MELK の発現解析を行ったところ、SOX2, Nestin においては CD40 刺激における発現変化を認めなかったが MELK の発現が著明に低下した。再び、膠芽腫患者 95 例の摘出腫瘍の検討で、CD40/CD40L と MELK の発現に負の相関を認めた。これらのことから CD40 刺激は腫瘍幹細胞治療に有効である可能性が示唆され、CD40 刺激の抗腫瘍効果の機序解明と免疫治療の強化に着目した。

これまで、抗腫瘍免疫は刺激する方向性と免疫抑制を解除する方向性で研究が進められてきた。これまでに東北大学免疫学分野で単離された OX40 と、同様の共刺激因子 CD40 に注目して免疫を刺激する方向性の研究を進めてきた。この中で、CD40 刺激が脳腫瘍幹細胞に対して腫瘍幹細胞の増殖・維持に重要な MELK の発現を低下させることを見出した。これは CD40 の新たな作用機序を示唆するものであり、本邦発の治療開発につながるものと考えられる。ヒト CD40 刺激抗体である CP-870,893 は海外で膵臓癌などの他癌種に対して第 1 相試験が施行されており、化学療法との併用療法で治療効果が示唆されているが、この先への研究は進んでいない。一方で、免疫抑制を解除する抗 PD-1 抗体は悪性黒色腫や肺癌に対して国内ですでに使用されており高い抗腫瘍効果を示している。海外では再発膠芽腫患者における第 3 相試験が施行されており、その安全性は示されたが生存期間の延長は得られなかった。膵癌モデルマウスでは、CD40 刺激抗体と抗 PD-L1 抗体の併用療法が有効であるとされており脳腫瘍幹細胞モデルマウスに対して相乗効果が期待される。このため、抗 PD-1 抗体との併用療法に着目した。CD40 刺激抗体と抗 PD-L1 抗体の併用療法の高い抗腫瘍効果を示すことができれば治療抵抗性である悪性神経膠腫への有効な治療法となる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、CD40 刺激が抗原提示細胞の活性化を中心とした腫瘍免疫の誘導および腫瘍幹細胞機能の低下がこの抗腫瘍効果に繋がっているとの仮説をもとに、この免疫刺激シグナル CD40 刺激と癌細胞の免疫回避機序として注目され、高い抗腫瘍効果を示す programmed cell death protein 1 (PD-1) の阻害剤との併用による有効な腫瘍幹細胞治療の開発を目指す。

具体的には、CD40 シグナルを基礎とした皮下ワクチン療法の強化である。これまでの研究で CD40 刺激抗体は TLs とともに皮下ワクチン投与することで皮下ワクチンの効果は増強され、強い抗腫瘍効果を示した。CD40 刺激は主に樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞賦活による間接的な抗腫瘍効果と腫瘍にアポトーシスを誘導する直接的な抗腫瘍効果を併せ持ち、

更に CD40 刺激により腫瘍幹細胞の増殖・維持に重要な Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) の発現が低下することが判明した。一方で、近年、腫瘍細胞の免疫回避機序として活性化 T 細胞に発現する PD-1 と腫瘍細胞に発現する PD ligand protein 1 (PD-L1) の阻害剤が悪性黒色腫や肺癌患者などの他癌種に対して効果を示している。脳腫瘍に対する免疫刺激に働く（アクセルとして働く）CD40 の刺激と免疫抑制を阻害する（ブレーキを外すことになる）抗 PD-1 抗体の併用療法は強力かつ有効な抗腫瘍免疫をもたらす可能性がある。このため CD40 刺激抗体と抗 PD-1 抗体との併用療法による有効な免疫療法の開発を目的とする。

3．研究の方法

研究計画に基づき、(研究 1) CD40 刺激抗体と抗 PD-1 抗体との併用療法の NSCL61 腫瘍幹細胞モデルマウスに対する有効性の検討、(研究 2) CD40 刺激による腫瘍幹細胞の分化誘導の検討、(研究 3) CD40 刺激により腫瘍幹細胞から産生される IL-10 と TGF- β の分泌の変化に関する解析を目的として、(研究 1) - (研究 3) を実施した。

(研究 1) CD40 皮下ワクチンを基礎とした免疫治療法に関する研究：NSCL61 腫瘍幹細胞モデルを作成し、選定した抗体を使用し CD40 皮下ワクチンの有効性を確認する生存実験を行った。未治療群、コントロール群、CD40 抗体全身投与群、ワクチン 1 回投与群、ワクチン 2 回投与群の 5 群で生存比較を行った。

(研究 2) CD40 刺激による NSCL61 細胞の免疫染色：前年度に条件確認を行った免疫細胞マーカーである CD4、CD8、CD11b の染色抗体を使用し、組織切片を用いて治療後の評価を行う。

(研究 3) CD40 刺激による通常神経膠腫モデル GL261 細胞、NSCL61 細胞からの IL-10 と TGF- β 産生量変化の解析：腫瘍浸潤免疫細胞の解析として、フローサイトメトリーを用いた解析を行う。脳腫瘍マウスモデルの脳組織を取り出し、免疫細胞を単離させて解析を行う。リンパ球の評価および骨髄球系のコンポーネントの変化を解析する。

4．研究成果

(研究 1)

抗 CD40 抗体および抗 PD-1 抗体全身投与の生存試験を行った。結果、CD40 治療群および CD40 および PD-1 併用群がコントロール群および PD-1 治療群より生存期間が短かった ($p > 0.05$)。発光 in vivo imaging を行い、定量的に CD40 治療群および CD40+PD-1 併用群で腫瘍増殖が速いことを確認し、生存試験の結果を裏付ける結果が得られた。

抗 CD40 抗体の全身投与で治療効果が得られない原因を解析するため、腫瘍浸潤免疫細胞解析を行った。モデル作製後 7 日目および 12 日目について解析が終了した。7 日目の結果では、脾臓の解析から全身の免疫細胞が活性化していることを確かめたが、脳の解析から CD40 治療群で腫瘍浸潤免疫細胞が少ないことが判明した。さらに 12 日目の解析の結果では、Control 群および CD40 治療群いずれも腫瘍浸潤細胞が増加していたが、CD40 治療群では腫瘍免疫の要である T 細胞の誘導が不十分であり、さらに抗原提示細胞の浸潤が少ないことが判明した。生存試験で抗 CD40 抗体の全身投与が有効でなかった理由として、CD40 抗体のシグナルにより免疫細胞が脳の腫瘍へうまく浸潤できない可能性が示唆された。より早期の 4 日目の解析を行い、後期における免疫細胞浸潤に関与する変化について検討を行った。今回の検討では、関与する変化は同定でき

ず、解析のタイミングや今回使用した実験系では解析できなかった免疫細胞についても検討する必要があるものと思われた。

(研究2)

CD40 刺激による NSCL61 細胞の免疫染色についてタイミングも合わせた条件が確立している。免疫細胞応答についてはT細胞 (CD4、CD8)、抗原提示細胞 (CD11b) 浸潤および分布について解析を行う。分化誘導については、これまでに腫瘍幹細胞マーカーである MELK の発現は低下し、sox2, nestin の発現に変化がないことを確認した。今後の研究として、CD40 刺激で腫瘍幹細胞に分化が見られるかを検討する。具体的には分化した神経細胞に発現する Glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現、Oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) の発現の変化を解析する。

(研究3)

フローサイトメトリー実験ではサンプルの調整から解析までの最適条件の確立が完了しており、GL261 モデルについては早期、後期での解析が終了している。今後、NSCL61 モデルにて解析を行う。今後 CD40 刺激による通常神経膠腫モデル GL261 細胞、NSCL61 細胞からの IL-10 と TGF- β 産生量変化の解析。フローサイトメトリーによる免疫細胞解析について、NSCL61 モデルで解析を行う。サイトカイン解析では、in vitro で GL261 細胞、NSCL61 細胞に CD40 刺激抗体を 24 時間、48 時間反応させ、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を用いて腫瘍細胞からの IL-10 と TGF- β の産生量を解析する。この際、コントロール群として IgG を反応させたものと比較する。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chonan M, Saito R, Kanamori M, Osawa SI, Watanabe M, Suzuki H, Nakasato N, Tominaga T.	4. 巻 15;60(1)
2. 論文標題 Experience of Low Dose Perampanel to Add-on in Glioma Patients with Levetiracetamuncontrollable Epilepsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 37-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.oa.2018-0245.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長南雅志、山下洋二、冨永悌二
2. 発表標題 脳悪性リンパ腫に対するHD-MTX療法とR-MPV療法の比較
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第78回学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------