

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16596

研究課題名(和文)希少悪性脳腫瘍に対する免疫監視機構を標的とした新規治療法開発のための基礎的研究

研究課題名(英文)A fundamental research for novel therapies development targeting immune surveillance of rare malignant brain tumor.

研究代表者

西本 真章(NISHIMOTO, Masaaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50815082

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究は治療法が確立されていない難治性の希少悪性脳腫瘍に対する新規治療の開発を目的として、主に頭蓋内孤発線維性腫瘍/血管周皮腫(SFT/HPC)や胚細胞腫瘍において腫瘍免疫(自身の免疫力によって腫瘍の増大を抑える機構)との関連性を解明するための研究が行われた。研究の結果として、SFT/HPCまたは胚細胞腫瘍の患者の臨床経過と、腫瘍微小環境(腫瘍免疫に関わる分子や腫瘍免疫の働きを抑制するような分子がどうなっているか)との関連を証明し、それぞれ世界で初めて論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SFT/HPCや胚細胞腫瘍のような難治性希少腫瘍疾患は研究対象が非常に少なく、特に再発難治例に対する代替治療が確率していないため、治療法の新規開発が急務であると考えられている。本研究の結果は、このような疾患に対する免疫チェックポイント阻害薬(腫瘍免疫を抑制するような分子の活動を抑え、腫瘍免疫の効果を発揮させる治療薬)の可能性を見いだす価値のある研究結果であり、SFT/HPCや胚細胞腫瘍に対する免疫チェックポイント阻害薬を用いた治験を行うための礎となる重要な研究となったと考える。

研究成果の概要(英文):The purpose of this study is to develop a novel treatment for rare malignant brain tumors, such as solitary fibrous tumor / hemangiopericytoma (SFT/HPC) or germ cell tumor (GCT), which treatment has not been established especially for recurrent cases.

We investigated the tumor immunity in SFT/HPC or GCT to determine whether there were any correlations between the statuses of these immune-related molecules and clinical manifestations in patients with SFT/HPC or GCT.

The result of this study revealed the association between the clinical course of SFT/HPC or GCT and the tumor microenvironment for the first time in the world.

研究分野：若年者悪性脳腫瘍

キーワード: germinoma solitary fibrous tumor hemangiopericytoma tumor immunity immune checkpoint PD-1 PD-L1 tumor microenvironment

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭蓋内孤発線維性腫瘍(SFT)及び血管周皮腫(HPC)は稀な髄膜腫瘍であるが(3/10万人)、手術や放射線治療を行っても、約10年の経過で80%前後の症例で局所再発及び頭蓋外転移を来し、特に頭蓋外転移の症例では確立された治療法がない。また、頭蓋内胚細胞腫瘍(GCT)は日本を始め東アジアに多く、中でも最も発生頻度の高い胚腫(germinoma)は、化学療法や放射線に対する治療感受性が高いが、10年、20年生存率はそれぞれ90%、80%程度であり、再発時の治療法は確立されていない。さらに卵黄嚢腫や絨毛癌の成分を含む胚細胞性腫瘍(non-germinomatous germ cell tumor: NGGCT)は予後不良であり、5年生存率は80%以下である。GCTは小児及び若年成人に多く、また下垂体・視床下部などの内分泌学的に重要な部位に好発するため長期にわたる後遺症に苦しむ例も少なくなく、さらなる治療戦略の開発が望まれる。

一方近年、様々な癌種において、CTLA-4やPD-1/PD-L1などの免疫チェックポイント分子を標的とした治療法の臨床効果が注目されており、これらの免疫チェックポイント阻害剤の効果予測については議論があるが、腫瘍におけるPD-L1発現や体細胞変異の多さ(mutation burden)などとの関連が示唆されている。

我々は、頭蓋内SFT/HPC患者の予後、特に頭蓋外転移までの期間と腫瘍のPD-L1発現との負の相関を認めるという結果を見出した。さらに、我々は胚腫を解析しPD-L1の発現を全例で認め、他の腫瘍免疫機構に関連する因子とともに腫瘍増大に関する相関が示唆されている。

頭蓋内SFT/HPCや胚細胞腫瘍などの希少悪性腫瘍に対して、免疫チェックポイント阻害に際し、抗体等による阻害に加え、チェックポイント分子の発現そのものを抑制することができれば、阻害効果を増強できるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、希少であるが難治性の髄膜腫瘍である頭蓋内SFT/HPC、また、治療感受性が高いもののさらなる治療戦略が必要な頭蓋内胚細胞性腫瘍に対して、免疫チェックポイント機構阻害による新規治療法を検討、開発することである。

昨今の免疫チェックポイント阻害剤の他癌種に対する有効性、並びに前述の基礎データから、本治療戦略が有効である可能性は十分にあり、また、本研究で対象とする2腫瘍型に対する新規治療法の開発は社会的に求められている。

3. 研究の方法

(1) 頭蓋内胚細胞性腫瘍における、腫瘍免疫関連分子の組織学的検索：

我々は、当院で治療された頭蓋内胚細胞性腫瘍15例(胚腫12例、NGGCT3例)において、TIL浸潤(CD3/4/8/20/163, FOXP3)、PD-1/PD-L1の発現をHE染色と免疫染色にて解析、臨床経過(発症から診断までの期間、生命予後など)との関係を比較、検討した。予備実験にて、発症から診断までの期間とTILの数及びPD-L1発現との間に相関が示唆されており、これを完遂する。

(2) 頭蓋内SFT/HPC、頭蓋内胚細胞性腫瘍における、PD-L1発現メカニズムの解析：

前述のごとく、これまでの我々の研究データでは、頭蓋内SFT/HPC及び頭蓋内胚細胞性腫瘍では全例でPD-L1が発現しており、また臨床経過と腫瘍免疫回避機構との関連が示唆されている。腫瘍におけるPD-L1発現メカニズムを解析し、発現そのものをブロックすることにより、腫瘍免疫が増強される可能性がある。PD-L1発現メカニズムは腫瘍により異なり、定まったものはないが、以下2つの手法により解析を行う。

a) 各腫瘍型において、3'-UTR切断の頻度を検索する：

b) 各腫瘍型において、遺伝子発現プロファイル解析により、PD-L1発現と関連する分子経路を同定する

(3) 培養細胞を用いた機能解析：

上記において、PD-L1発現に関わる分子経路を見出すことができた場合、Seminoma cell lineを用いて、その阻害剤やsiRNAなどで処理をすることにより、PD-L1の発現の変化を、FACSを用いて評価し、その関連を確認する。

(4) LCMを用いた、頭蓋内胚細胞性腫瘍における染色体異常及びDNAメチル化の解析：

胚細胞性腫瘍はリンパ球浸潤が著明なため、今日まで腫瘍細胞のみの解析に基づく、網羅的な遺伝子、染色体解析の報告はない。FFPEから、LCMにより腫瘍細胞DNAだけを抽出し、メチル化アレイにて解析し、腫瘍発生のメカニズム、またPD-L1発現のメカニズム(amplificationの有無、関連する分子経路・遺伝子異常など)を検索する。

4. 研究成果

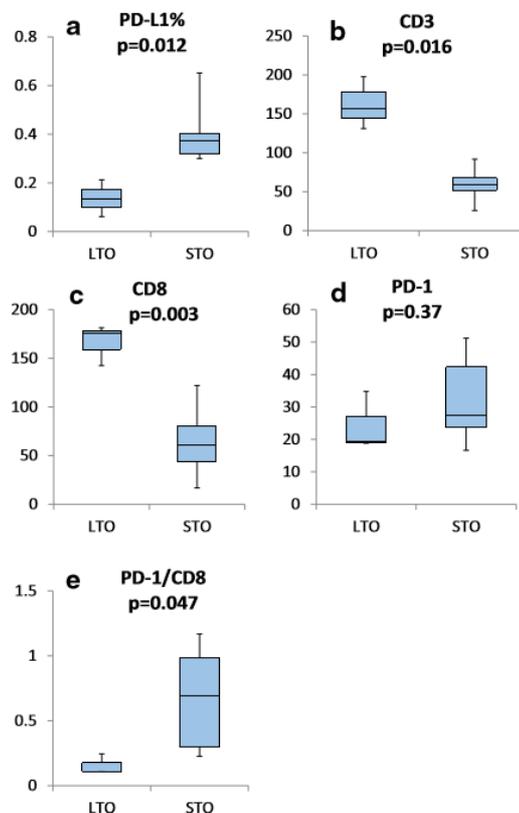
(1) 頭蓋内胚細胞性腫瘍における、腫瘍免疫関連分子の組織学的検索

慶應義塾大学病院で2012~2019年までに加療された胚細胞腫瘍のうち、手術にて腫瘍検体を得られ、病理学的にpure germinomaと診断された症例を後方視的に解析した。発症から診断までの期間で症例を2群に分け、長期経過(一年以上と定義)での発症群をlong term onset: LTO、

短期経過（一年以内と定義）での発症を short term onset: STO とした。各症例において、画像所見の評価、病理組織学的評価、免疫染色（CD3, CD4, CD8, PD-1, PD-L1, FOXP3）による評価を行い、臨床経過との比較検討を行った。

本研究では、8 症例の pure germinoma が対象となり、3 例が LTO 群、5 例が STO 群に分類された。発症から診断までの期間の平均値はそれぞれ 35.0 ヶ月、5.1 ヶ月であった。免疫染色の結果から、LTO 群において、腫瘍細胞の膜に染まる PD-L1 は STO 群に比して有意に多かった ($p = 0.01$)。また、腫瘍周囲において、CD3 または CD8 陽性のリンパ球数は、LTO 群では STO 群に比して有意に高かった (CD3 $p = 0.016$; CD8 $p = 0.003$)。さらに、PD-1 陽性リンパ球数は両群で有意差は見られなかったものの ($p = 0.37$)、CD8 陽性リンパ球における PD-1 陽性リンパ球の比率は LTO 群において有意に低かった ($p = 0.047$)。画像所見において、腫瘍径は LTO 群では STO 群に比して有意に小さい傾向にあった ($p = 0.02$)。

本研究の結果から、頭蓋内 germinoma では増殖力の高い群において腫瘍に発現する PD-L1 の割合が高く、腫瘍浸潤 T リンパ球の割合が低く、そのリンパ球に発現する PD-1 の割合が高いことが示された。本研究は、頭蓋内 germinoma の増殖の過程において、PD-1/PD-L1 pathway を中心とした腫瘍免疫機構が関連していることを臨床経過と関連して示すことのできた初めての報告であり、本研究の内容は Journal of Neuro-Oncology に論文として投稿した。本研究の結果から、頭蓋内 germinoma に対して免疫チェックポイント阻害薬が有効である可能性を示唆することとなり、そのような新規治療の導入が放射線治療の晩期障害の低減や、再発難治例に対する治療選択肢増加に寄与すべく、本研究が臨床試験に進むための基礎研究となりうると考えられる。



(2) 頭蓋内 SFT/HPC、頭蓋内胚細胞性腫瘍における、PD-L1 発現メカニズムの解析

頭蓋内 SFT/HPC において、PD-L1 遺伝子 3' -UTR sequence をプローベとする Fluorescence in situ hybridization (FISH) を用いて amplification を確認したが、本研究では認められなかった。また、PD-L1 の N 末端 (Cell Signaling Technology)、C 末端 (Spring Bioscience) をそれぞれ認識する抗体を用いて免疫染色を行ったが染色を認めず。他の遺伝子との融合は認めなかった。

現時点では本研究で用いた慶應義塾大学病院での腫瘍検体において、PD-L1 発現のメカニズムは確定には至っていない。

(3) LCM を用いた、頭蓋内胚細胞性腫瘍における染色体異常及び DNA メチル化の解析

慶應義塾大学病院で 2012 ~ 2019 年までに加療された頭蓋内胚細胞腫瘍のうち、手術にて腫瘍検体を得られ、病理学的に pure germinoma と診断された症例を対象とし、Laser Capture Microdissection の技術を利用して腫瘍検体のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) を用いたスライドを作成の上、大型の腫瘍細胞と小型のリンパ球との分離を行い、1 スライドから約 600 個程度の腫瘍細胞のみを抽出することに成功した。今後は得られた腫瘍細胞のみを収集した検体を用いて遺伝子変異を解析し、頭蓋内胚細胞腫瘍の腫瘍細胞のみに対する網羅的な遺伝子、染色体解析を進め、これまで報告することができなかった腫瘍細胞のみの遺伝子プロファイルの解析に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamamoto Dai, Ohara Kentaro, Kitamura Yohei, Yoshida Kazunari, Kawakami Yutaka, Sasaki Hikaru	4. 巻 139
2. 論文標題 Association between programmed cell death ligand-1 expression and extracranial metastasis in intracranial solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 251 ~ 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-018-2876-7	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 -

1. 著者名 Masaaki Nishimoto, Kentaro Ohara, Dai Kamamoto, Ryota Tamura, Tomoru Miwa, Kazunari Yoshida, Hikaru Sasaki	4. 巻 146
2. 論文標題 Tumor immune microenvironment is associated with the growth of intracranial germinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03355-0	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西本真章
2. 発表標題 頭蓋内Germinomaにおける腫瘍免疫機構関連因子の検討
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimoto M, Ohara K, Kamamoto D, Tamura R, Miwa T, Yoshida K, Sasaki H
2. 発表標題 Clinical, pathological and immune microenvironment evaluation for tumor immunity in germinoma patients
3. 学会等名 SNO; 24th Annual Meeting of the Society for NeuroOncology (国際学会)
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
研究協力者	吉田 一成 (YOSHIDA Kazunari)		
研究協力者	河上 裕 (KAWAKAMI Yutaka)		
研究協力者	佐々木 光 (SASAKI Hikaru)		
研究協力者	釜本 大 (KAMAMOTO Dai)		
研究協力者	津崎 尚子 (TSUZAKI Naoko)		