

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591718

研究課題名(和文)

グリオーマに対するペプチドCTL療法効率化とテモゾロミドによる免疫抑制環境の改善

研究課題名(英文)

Improvement of peptide induced CTL therapy against malignant glioma by HDAC inhibitor

研究代表者

佐藤 秀光 (SATO HIDEMITSU)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70363801

研究成果の概要(和文)：

悪性グリオーマの免疫療法の開発を行った。当初の目的の1つのテモゾロミドによる免疫抑制環境の改善の方は結果を伴わなかったが、もうひとつの目的である悪性グリオーマに対するCTLを誘導しうるペプチドを新たに3種類見出した。さらにHDAC阻害薬のHLA発現増強作用に着目し、CTLの抗腫瘍免疫を強化する研究を行った。HDAC阻害作用のあるバルプロ酸をグリオーマ細胞に作用させるとHLAが増強しCTL活性も上昇した。今後の発展性によっては免疫療法の選択肢が広がる可能性も示唆される意義深い結果となった。

研究成果の概要(英文)：

We found three new peptides binding HLA-A24 which could induce CTLs against malignant gliomas. Furthermore, VPA, valproic acid, which have an activity of HDAC, histone deacetylase, inhibitor could enhance the expression of HLA on the surface of a glioma cell line YKG-1. CTL activity was also enhanced by VPA application. VPA is known as an anticonvulsant and can pass through a blood brain barrier into brain. If immunotherapy against malignant glioma is undergone to patients who are needed with antiepileptic drug application, VPA might be recommended.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、7304脳神経外科学

キーワード：malignant glioma, immunotherapy, cytotoxic T lymphocytes, dendritic cell, peptides, histone deacetylase inhibitor, valproic acid, temozolomide

## 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマには決定的な治療法がない。それはグリオーマの強い浸潤能も理由の一つである。広がっていく腫瘍細胞を根絶させるには免疫の力を使うのも1つの手段である。これまで免疫療法も試みられてきたが、有効とまではいえないため、免疫力を強化する必要がある。

脳は免疫学的特権部位として知られ免疫療法の効果がないとされていた。しかし、最も難治性の神経膠芽腫に対する免疫療法の著効例も我々は経験しており(図1)、条件次第では免疫療法は有効である。

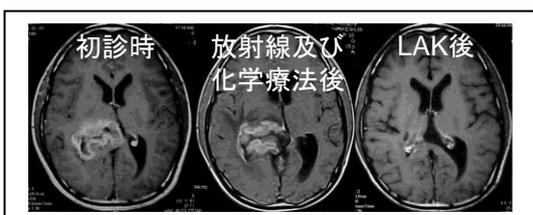


図1 19歳男性 神経膠芽腫 (左(初診時))であるが、化学療法、放射線療法でも効果が認められず腫瘍が増大し(中央)、LAK (Lymphokine Activated Killer) 療法を施行した。その結果、**腫瘍はほぼ完全に消退し(右)**、6年経過後の現在も再発が認められない。なお時期の関係で経過中テモゾロミド使用していない。

## 2. 研究の目的

この症例のように、難治性のグリオーマの治療において、免疫療法はブレイクスルーとなる可能性を秘めている。しかしほとんどの症例ではこれほどの効果がないことからこのような免疫療法の効果を向上させる手法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### ア. ペプチドの設計

変異IDH, MGMT蛋白のアミノ酸から、CTLを誘導するための9~10merのペプチドを作製する。

### イ. DCの誘導

HLA-A24の健常人の血液を単球とリンパ球に分離し単球をGM-CSF, IL-4を用いて6日間培養することによりimmature DCに誘導した。Immature DCに作製したペプチド及びIFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>を加えて培養することによりmature DCとし、Th1, Tc1を誘導するDCであるDC1を誘導した。これにリンパ球を加え、IL-2, IL-7を添加した培地で培養した。1週間毎にpeptide をパルスした DC等で刺激し4週以降に<sup>51</sup>Cr release assayを行った。このペプチドをパルスするときにVPAをはじめとしたHDAC阻害薬を作用させ、CTL誘導の効率を検討した。

### ウ. DC, CTL, グリオーマ細胞の表面抗原に対するHDAC阻害薬の効果判定

誘導したDC, CTL, およびグリオーマ細胞株のVPAをはじめとしたHDAC阻害薬およびコントロールとして、HDAC阻害作用のない抗てんかん薬を作用させ、それぞれの表面抗原をFlowcytometryで解析した。(図2)

### エ. CTL assay (細胞傷害性試験)

誘導したCTLをエフェクターとして、グリオーマ細胞株として、YKG-1 (HLA-A24陽性)を標的として<sup>51</sup>Cr release assayを行った。

このときにも、VPAを作用させ、CTL活性が最も高い条件を検討した。(図3)

## 4. 研究成果

新たに3種類のグリオーマに対するペプチドを開発した。さらに、HDAC阻害薬であるバルプロ酸を併用することにより、抗腫瘍効果

を高めることに成功した。  
 種々の抗てんかん薬をグリオーマ細胞株に添加し、細胞表面のHLAの発現を確認したところ、VPAにその増強作用があることがわかった。他の抗てんかん薬（ゾニサミド等）には、その作用はみられなかった。  
 VPAには、HDAC阻害作用があることが報告されており、HDAC阻害薬には、HLA発現増強効果があることもわかっている。今回、VPAにはグリオーマ細胞に対して、そのHLA class I 増強作用があることが示された。（図2）

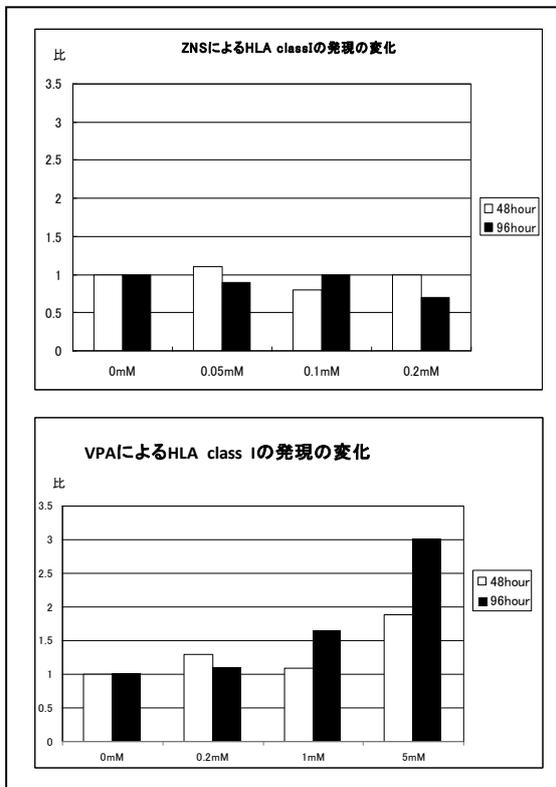


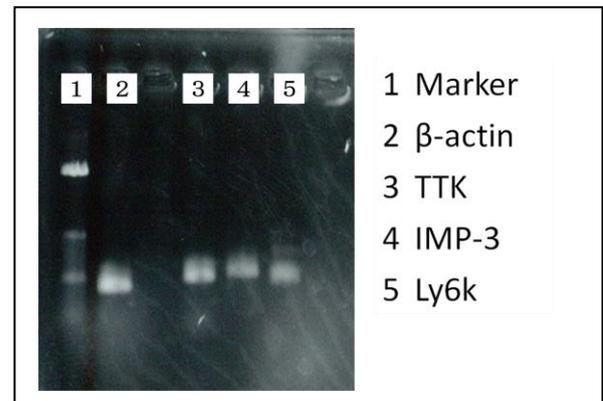
図2上 ZNS 暴露群 下 VPA 暴露群  
 □48時間 ■96時間  
 0mM0時間のHLA発現量を1として、それに対する比を示している。  
 VPAを作用させることで、ほぼ濃度依存性にグリオーマ細胞表面上のHLA class Iの発現が亢進する。

VPAの有効血中濃度とされる50~100  $\mu$ g/mlは、0.3~0.6mMに相当する。  
 さらに経時的な検討を行ってみると、

HLA class Iの発現は、96時間までの検討では暴露時間が長いほど向上する傾向があることがわかった。（data not shown）

このHLA増強作用に着目し、これまでグリオーマでは注目されていなかった発現量の低い抗原に対して、VPAを組み合わせることにより免疫力を増強できないか検討した。他の癌腫でCTLの誘導が確認できるペプチドが報告されている抗原3種類（TTK, IMP-3, Ly6k）について、まずグリオーマでの発現を検討した。

図3



RT-PCR（図3）では、グリオーマ細胞株YKG-1において、上記3種類の発現が確認された。そこでHLA-A24拘束性のTTK567（SYRNEIAYL）IMP-3 508（KTVNELQNL）Ly6k177（RYCNIEGPPI）の3種類のペプチドを作成しCTLを誘導した。（図4）

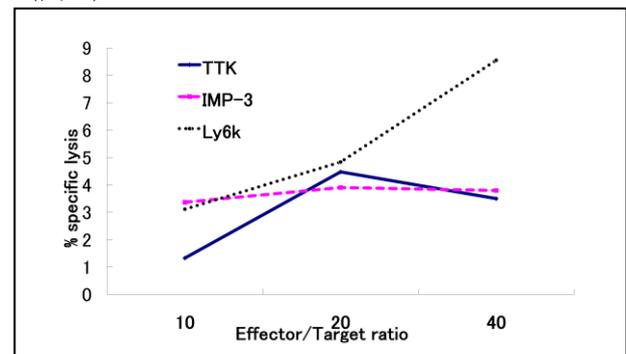


図4  $^{51}\text{Cr}$  release assayの結果  
 標的細胞はYKG-1。それぞれのペプチドを用いて誘導したCTLを標的とし、細胞障害性試験を行ったところ、Ly6kペプチドが3者の中では細胞比に応じた細胞障害能の上昇がみられた。

Ly6k ペプチドで、グリオーマに対する CTL の誘導が確認されたものの、その細胞障害活性は弱いことがわかった。ここで、HDAC 阻害薬として知られる VPA を添加し、その効果がどう変化するか検討した。(図 5)

(図 5)

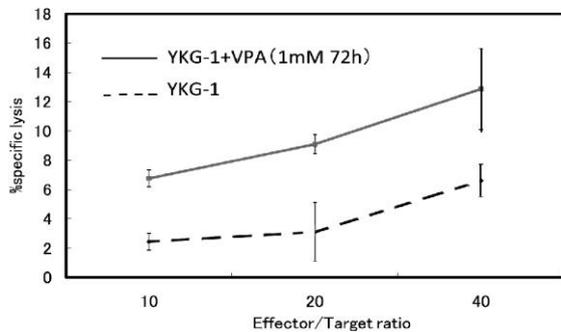


図 5

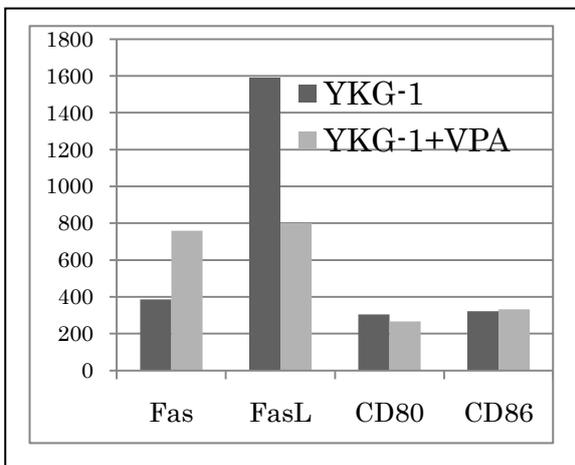
HDAC 阻害作用を持つバルプロ酸 (VPA) をグリオーマ (YKG-1) に作用させることにより CTL 活性が向上した

VPA の作用により、細胞障害性の弱い CTL の作用を増強させることができることが確認された。つまり、VPA は細胞表面抗原を変化させるだけではなく、機能的にも抗腫瘍免疫に有利に働くことが示された。

このメカニズムを検討するために、グリオーマ細胞表面抗原をフローサイトメーターで確認した。

VPA の作用で、CD80、CD86 は変化しなかったものの、Fas の発現上昇、FasL の発現低下がみられた (図 6)。

(図 6)



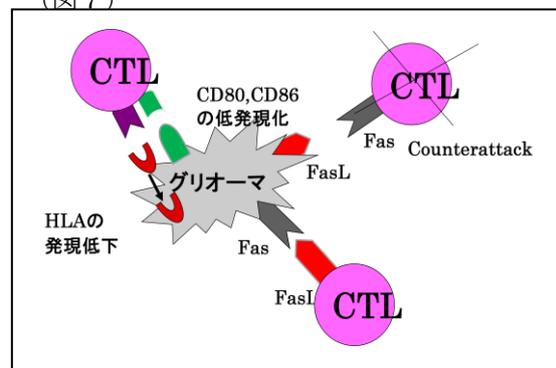
今回検討されたグリオーマ細胞に対する VPA の作用をまとめると (図 7) のようになる。グリオーマは、細胞免疫から逃れるための逃避機構として、

- ①HLA classI の発現低下
  - ②CD80, CD86 の発現低下
  - ③Fas の発現低下
  - ④FasL の発現上昇
- などがあげられる。

①、②は、CTL が腫瘍細胞を認識するための必要な分子が低下しているために、たとえ CTL があっても、機能しにくい。

③は、CTL の FasL を介したグリオーマ細胞の障害作用を低下し、逆に FasL の上昇により、グリオーマ細胞による CTL を傷害するカウンターアタックがおこる。今回の VPA の作用は、この①、③、④に働き、抗腫瘍免疫を有利に働かせる作用があるのではないかと考えられる。

(図 7)



## 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 1 件)

1) 佐藤秀光: A case report of autopsy received cyberknife for recurrent malignant glioma、ニューロ・オンコロジーの会、2011 In press

〔学会発表〕（計 4 件）

1) 佐藤秀光：治療に難渋している脳病変の一例、第 21 回神奈川脳腫瘍フォーラム、横浜、2011 年 1 月 28 日

2) 佐藤秀光：グリオーマ細胞に対する抗てんかん薬バルプロ酸による抗腫瘍免疫の増強効果の検討、第 28 回日本脳腫瘍学会、軽井沢、2010 年 11 月 29 日

3) 佐藤秀光：LAK 療法が著効したと思われる膠芽腫のその後、第 20 回神奈川脳腫瘍フォーラム、横浜、2010 年 9 月 10 日

4) Hidemitsu Sato：Valproic acid could enhance the CTL activity against glioma cells induced with peptide pulsed dendritic cells、14th International Congress of Immunology、神戸、2010 年 8 月 26 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 秀光 (SATO HIDEMITSU)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70363801

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：