

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15549

研究課題名（和文）ケトン食による免疫原性亢進と免疫チェックポイント阻害剤による新たな膠芽腫治療戦略

研究課題名（英文）New treatment strategies of glioblastoma with Ketogenic diet and immune checkpoint inhibitors

研究代表者

堀 達雄 (Hori, Tatsuo)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：00900169

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：膠芽腫患者髄液を用いて炎症関連メディエーターの濃度を調べ、腫瘍関連マクロファージとの関係を検討した。膠芽腫の髄液は大きく2つのクラスターに分類された。sCD163濃度はCD163陽性腫瘍関連マクロファージの腫瘍内浸潤量と相関し、sTNF-R1, sTNF-R2, TNFSF13, TNFSF13B, sIL-6Ra, Pentraxin, MMP-2が強い正の相関を持ち、逆にIL-35, IL-32, IL-34, IFN- β , IL-22が強い負の相関を持っていた。また、IFN- β , IL-2, IL-22, IL-34, IL-35の低い患者は有意に予後が不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫（GBM）は極めて悪性で、手術および放射線化学療法などの集学的治療が施行されるも、5年生存率は10%未満である。従って、新たな治療法が切望される。膠芽腫組織内には様々な免疫細胞（リンパ球やマクロファージ）が存在し、免疫微小環境を構築しているが、詳細は明らかでない。本研究では髄液中の炎症関連メディエーターの濃度およびその相関性から、腫瘍内の免疫環境を解析した。sCD163濃度およびCD163陽性マクロファージの浸潤量は、様々なメディエーターと関連性があり、膠芽腫組織内の免疫微小環境に大きく影響することが明らかとなった。sCD163の測定は腫瘍内免疫微小環境の把握には有用である。

研究成果の概要（英文）：We examined the concentration of inflammation-related mediators in glioblastoma(GBM) patients' cerebrospinal fluid and examined their relationship with tumor-associated macrophages. Cerebrospinal fluid of GBM patients was classified into two major clusters. sCD163 concentration correlated with the amount of CD163-positive tumor-associated macrophages infiltrating into the tumor, and sTNF-R1, sTNF-R2, TNFSF13, TNFSF13B, sIL-6Ra, Pentraxin, and MMP-2 had a strong positive correlation, however, IL-35, IL-32, IL-34, IFN- β , IL-22 had a strong negative correlation. In addition, patients with low IFN- β , IL-2, IL-22, IL-34, IL-35 had a significantly worse prognosis.

研究分野：Brain tumor

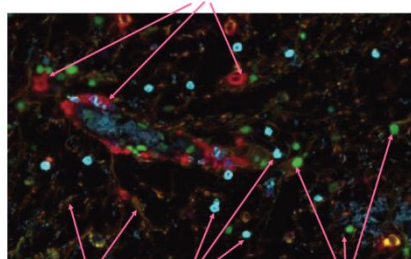
キーワード：glioblastoma immunomicroenvironment macrophage

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (GBM) は、極めて悪性で不均一な脳腫瘍であり予後は不良である。組織内には膠芽腫細胞のみでなく、様々な免疫細胞 (リンパ球やマクロファージ) が存在する。治療は外科的切除とその後の放射線療法および化学療法 (テモゾロミド、ベバシズマブ) の集学的治療が施行されるが、生存期間中央値は約 15 か月で、5 年生存率は 10% 未満である (J Pathol. 2014; 232: 165-77)。近年の膠芽腫の遺伝子、染色体、エピゲノム解析により、腫瘍の性質は非常に理解されてきたが、治療手段は殆ど変わらず、新しい治療アプローチが必要である。膠芽腫は原発性脳腫瘍の中で最も悪性の腫瘍である。脳は免疫システムの影響を受けにくい臓器であることから、膠芽腫は免疫原性のない cold tumor に分類され、免疫チェックポイント阻害剤が働きにくい。これまでの臨床試験の結果からも、膠芽腫に対して免疫チェックポイント阻害剤の有効性は認められていない。ケトン食 (ketogenic diet; KD) は高脂質 / 低炭水化物の食事であり、グルコースからでなくケトン体からエネルギーを産生させる。ケトン食療法で膠芽腫の組織内には免疫細胞の浸潤が増加して、免疫原性が高まるとの報告がある。GBM の新しい治療アプローチとして腫瘍代謝を標的とした治療がある。中でも、ケトン食療法 (Ketogenic diet; KD) は有望視されている。KD は、難治性てんかんの治療にも使用される高脂肪 / 低炭水化物 / 中タンパク質の栄養療法で、細胞内のエネルギー源をグルコースからケトン体にシフトさせる (Lancet Neurol. 2008; 7: 500-6)。KD は悪性神経膠腫のマウスモデルの生存率を高めるとの報告や (Nutr Metab. 2010; 7: 74, Cancer Lett. 2015; 356: 289-300)、KD を放射線照射と組み合わせでマウスの生存率が延長することが示されている (PLoS One. 2012; 7: e36197)。

(図1) 膠芽腫組織内の免疫細胞

CD163 (M2マクロファージ)

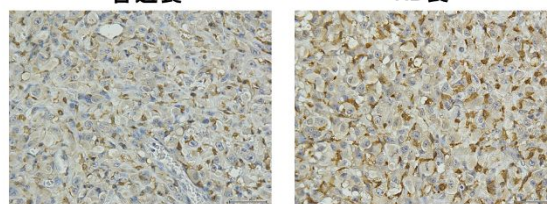


膠芽腫細胞 Tリンパ球 マクロファージ

(図5) Iba1染色 (マクロファージ)

普通食

KD食



KD食マウスの膠芽腫組織内には多数のマクロファージが浸潤している

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケトン食療法と免疫チェックポイント阻害剤との併用での効果を検討することである。そこで、まず始めに腫瘍内の免疫微小環境の状態を調べ、マクロファージやミクログリアがどのように腫瘍内に存在し、免疫環境に影響しているかを検討する。そして、膠芽腫細胞株をマウスの脳内に移植し、ケトン食を投与し、さらに免疫チェックポイント阻害剤を投与して、マウスの生存期間や抗腫瘍効果を調べる。

3. 研究の方法

1) 膠芽腫患者髄液を用いて、網羅的に炎症関連メディエーターの濃度を解析

34 例の膠芽腫を含む 53 例の神経膠腫の患者髄液を用いて、Bio-Plex Pro Human Inflammation Assays を使用し、37 個の髄液中の炎症関連メディエーターを測定。主成分分析と、判別分析を行い、神経膠腫のグレードでの違いを検討する。

Grade	Pathology	Age (mean)	Sex (f/m)	IDH mutation	Dead/ Alive	炎症性メディエーター			
Grade 1 (n=2)	PA:1 RFGNT: 1	32	0/2	0	Dead:0 Alive: 2				
Grade 2 (n=10)	DA: 9 OG: 1	47	5/5	9	Dead: 5 Alive: 5				
Grade 3 (n=7)	AA: 5 AOG: 2	48	3/4	1	Dead:7 Alive: 0				
Grade 4 (n=34)	GBM: 34	65	11/23	1	Dead:31 Alive: 3				

TNF-関連 (7)	IL-関連 (19)	IFN-関連 (3)	その他 (8)	
TNFSF12 / TWEAK	IL-2	IL-27 (p28)	IFN-α2	Osteocalcin
TNFSF13 / APRIL	IL-8	IL-28A / IFN-λ2	IFN-β	Osteopontin
TNFSF13B / BAFF	IL-10	IL-29 / IFN-λ1	IFN-γ	Pentraxin-3
TNFSF14 / LIGHT	IL-11	IL-32		sCD163
TNFRSF8 / sCD30	IL-12 (p40)	IL-34		Chitinase-3-like 1
sTNF-R1	IL-12 (p70)	IL-35		MMP-1
sTNF-R2	IL-19	TSLP		MMP-2
	IL-20	sIL-6Rα		MMP-3
	IL-22	sIL-6Rβ		
	IL-26			

2) 炎症関連メディエーターの相互関係について解析

37 種類の炎症関連メディエーターの濃度を多変量相関解析を行い、炎症性メディエーター間での相関について解析する。また、個々のメディエーター間の相関関係について解析し、免疫状態のクラスターを同定し、免疫微小環境について解析する。

3) sCD163 と腫瘍関連マクロファージとの関連について解析

sCD163 の濃度を測定し、神経膠腫でのグレードでの sCD163 濃度について解析する。また、膠芽腫組織内の CD163 陽性マクロファージ (M2 マクロファージ) の浸潤量を免疫染色で測定し、sCD163 の濃度との関連を検討する。

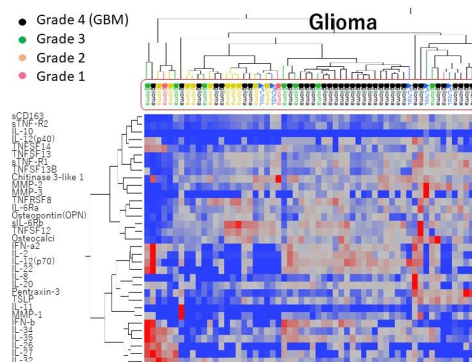
4) 予後に関連する炎症性メディエーターを同定

37 個の炎症関連メディエーターの濃度の高いものと低いもので、予後に有意差のあるメディエーターを同定し、免疫微小環境に影響する免疫関連メディエーターを同定する。

4. 研究成果

1) 膠芽腫患者髄液を用いて、網羅的に炎症関連メディエーターの濃度を解析

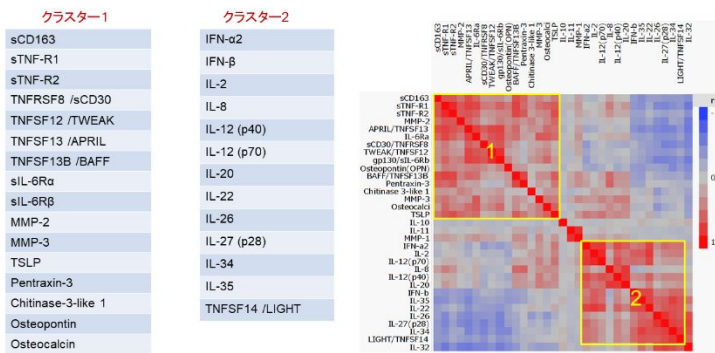
37 種類の炎症関連メディエーターを測定し、クラスター解析を行うと、グレード毎にクラスターが形成された。特に膠芽腫の grade 4 はメディエーターの濃度が高い傾向であった。



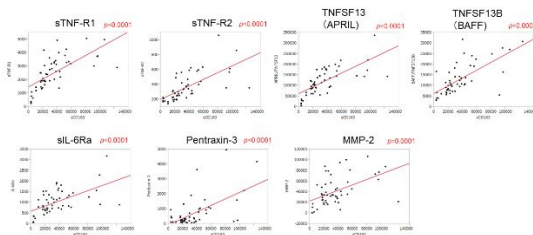
2) 炎症関連メディエーターの相互関係について解析

相互関係について解析すると、大きく2つのクラスターに分類された。1つはsCD163, sTNF-R, TNFSF12, TNFSF13, TNFSF13B, sIL-6R, MMP-2, MMP-3, TLSP などの TNF 関連であり、もう1つは IFN, IL-2, IL-8, IL-12, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27, IL-34, IL-35 など IFN 関連及びインターロイキン関連のメディエーターであった。個々の分子の相関について、特に sCD163 との関連について注目して解析すると、sTNF-R1, sTNF-R2, TNFSF13, TNFSF13B, sUK-6Ra, Pentraxin, MMP-2 が強い正の相関を持ち、逆に IL-35, IL-32, IL-34, IFN-b, IL-22 が強い負の相関を持っていた。

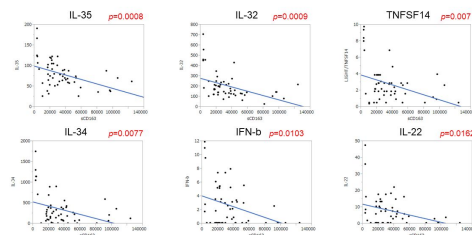
多変量相関解析 (グリオーマ, n=53)



sCD163との正相関分子(グリオーマ)



sCD163との負相関分子(グリオーマ)



3) sCD163 と腫瘍関連マクロファージとの関連について解析

sCD163 濃度は膠芽腫と悪性リンパ腫(PCNSL)患者の髄液で比較すると、膠芽腫は PCNSL に比較すると有意に低かった。また、腫瘍組織内の CD163 陽性マクロファージの浸潤量も PCNSL に比較すると膠芽腫内では有意に少なかった。しかし、sCD163 濃度と腫瘍内への CD163 陽性マクロファージ浸潤量は有意に相関しており、腫瘍内 CD163 陽性マクロファージの量を sCD163 は反映しているものと思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 東野 真志、藤本 陽介、藤田 祐一、堀 達雄、中井 友昭、木村 英仁、篠山 隆司
2. 発表標題 治療寛解後長期経過後に脊髄再発を認めた頭蓋内ジャーミノーマの2例
3. 学会等名 第82回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------