

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23592137

研究課題名(和文) HDAC阻害薬を併用した微量抗原を標的としたグリオーマに対する免疫療法の開発

研究課題名(英文) Immunotherapy with HDAC inhibitor against malignant glioma

研究代表者

佐藤 秀光 (SATO, Hidemitsu)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：70363801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫の標準治療薬はテモゾロミドなどに限られており新規治療を開発する必要がある。脳は血液脳関門の存在のため、薬剤が脳腫瘍に到達しがたいため、中枢神経に作用する薬の中から治療薬を探索した。われわれは、Histone Deacetylase inhibitor(以下HDAC阻害薬)作用をもつ抗てんかん薬バルプロ酸の膠芽腫に対する免疫増強作用をin vitroで確認した。

さらにバルプロ酸のテモゾロミド耐性にかかわるO6-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ(以下MGMT)に影響をわれわれは検討したが、プロモータ領域へのメチル化への影響は認められず耐性化しないという結果であった。

研究成果の概要(英文)：Valproate(VPA) is an anti-epileptic agent with abilities of a histone deacetylase inhibitor (HDACi) which enhances immune response. Recent studies suggest that VPA is associated with improved survival in glioblastomas (GBMs). We examined the immunological mechanisms of VPA against GBMs. VPA emphasized the cytotoxic activity against GBM cell line by stronger expression of immune related surface markers like major histocompatibility complex (MHC) class I resulted in enhanced expression of glioma antigens.

Moreover, we examined the influence of VPA against the methylation of O6-methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT) promotor by pyrosequence analysis. In our study, VPA did not have adverse influence of temozolomide resistant activity in GBMs. Taken together, we suggested that VPA might be recommended to use for combined therapy of temozolomide and immunotherapy against GBMs.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：glioblastoma immunotherapy HDAC inhibitor MGMT promotor temozolomide valproate

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫 (GBM) は日本で年間約 2000 人が発症する。2005 年の Stupp らの報告 (NEJM) で、temozolomide (以下 TMZ) を用いた標準的治療が初めて確立したが、治療には程遠く生存期間中央値は 14.6 ヶ月、5 年生存率で 10% にも満たないため、更なる治療法の開発が必要である。

われわれは手術、放射線、化学療法に加えて第四の治療法として免疫療法に注目した。免疫療法も万能ではないが、当院でおこなった活性化自己リンパ球療法 (以下 LAK) の症例では長期生存例もあり、一部効果がある可能性が示唆されている。(図)

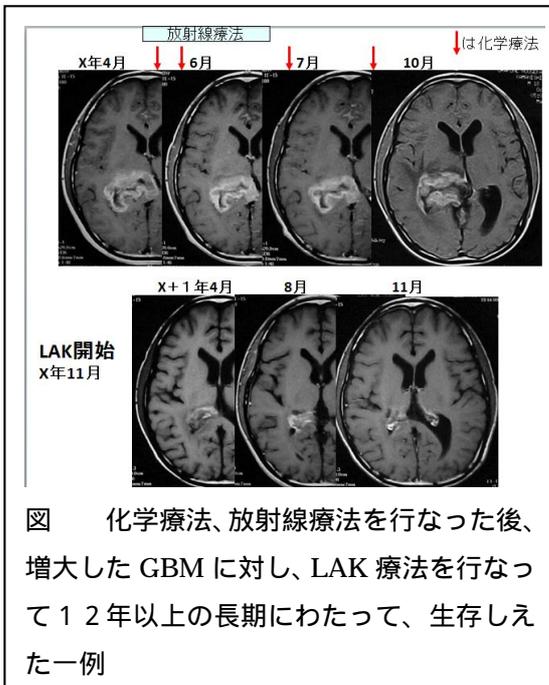


図 化学療法、放射線療法を行なった後、増大した GBM に対し、LAK 療法を行なって 12 年以上の長期にわたって、生存しえた一例

グリオーマは、遺伝子変異が多段階的におこるため、単一の分子を免疫療法の標的としても、生き残った細胞が増殖することになる。

したがって、免疫療法を行うには、腫瘍がもつ様々な変異分子を抗原提示させる機能があると理想的である。この免疫療法の作用を増強する手法の開発を目的としている。histone deacetylase (以下 HDAC) 阻害薬には、抗腫瘍作用があることが知られている。腫瘍細胞に、細胞周期の停止やアポトーシスが

起きる。われわれは、HDAC 阻害による抗腫瘍免疫作用に着目した。

ただし、脳には血液脳関門 (以下 BBB) があるため、BBB を超えることができる低分子の薬剤の探索が必要となる。そこで、われわれは、BBB を超えることが確実な中枢神経に作用する薬の中から HDAC 阻害作用があるものを探索することとした。その結果、抗てんかん薬バルプロ酸 (以下 VPA) が候補にあがった。

しかし、多少の抗腫瘍効果があったとしても、標準治療薬 TMZ の効果を阻害してしまうのは効果が相殺されてしまうことになる。悪性グリオーマの TMZ に対する感受性は MGMT 蛋白の発現の有無で異なる。そして、MGMT の発現はメチル化でコントロールされており、エピジェネティックな関与が知られている。臨床データでは、VPA と TMZ の併用において、予後に差があるかどうかは、研究によって異なり意見の一致をみていない。In vitro においても、VPA が MGMT のメチル化にどのようにかかわっているのか詳細なデータはない。

2. 研究の目的

HDAC 阻害作用をもつ VPA をグリオーマ細胞に作用させた場合に、抗腫瘍免疫や抗腫瘍作用が増強するか否かを確認する。

さらに標準治療薬 TMZ との併用において、VPA が、MGMT のメチル化に関してどのように影響しているのかをしらべる。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ細胞株 (YKG、T98G、TP276MG、U87MG、U251MG) を用いた。

(2) グリオーマ細胞株に VPA を作用させ、免疫学的表面マーカーの変化を FACS で調べた。

(3) グリオーマ細胞の腫瘍抗原の候補から、ペプチド (未発表データ) を合成し、細胞障害性 T 細胞 (以下 CTL) を誘導した。さらにその反応液中に VPA を作用させて、細胞障害

活性の変化をみた。

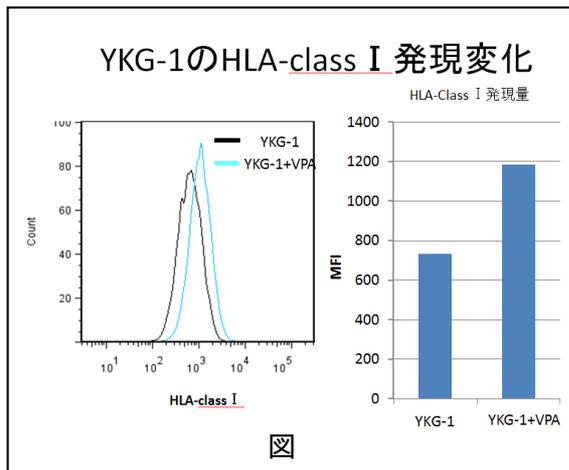
(4) グリオーマ細胞への TMZ と VPA の併用による殺腫瘍効果をみた。

(5) VPA 添加培地で継代したグリオーマ細胞の MGMT プロモーター全領域のメチル化の変化を pyrosequence 法で調べた。この実験には、国立がん研究センターの協力を得て行った。

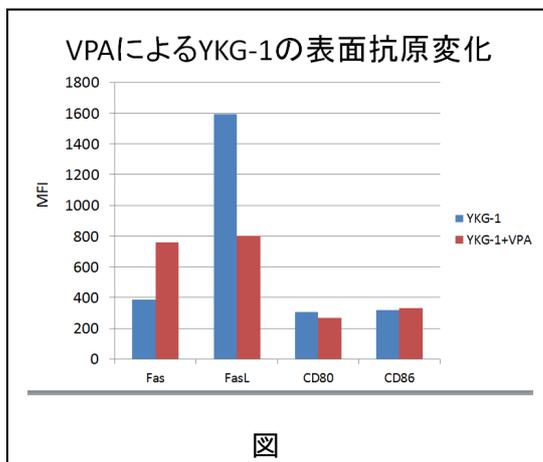
4. 研究成果

(1) VPA による HLA クラス I の発現

VPA 1 mM を培地に添加し、24, 48, 96 時間後に HLA クラス I の発現を確認したところ、VPA 添加群で発現増強が確認された。(図)



(2) VPA による他の免疫関連表面マーカー
腫瘍細胞の表面マーカーの変化をみると、CD80、CD86 は変化がなかったものの、Fas は発現増強し、FasL は発現低下がみられた。(図)

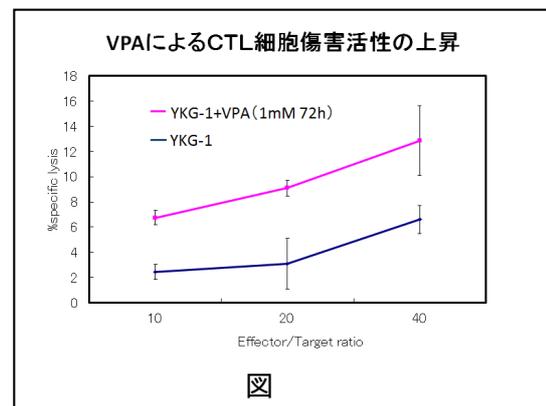


腫瘍細胞の FasL の低下は、CTL への腫瘍細胞による counter attack が減少し、Fas の増強は、CTL による細胞障害性の感受性が高まることを意味する。

表面マーカーの変化が機能に実際に反映するか知るために、細胞障害性試験を行った。

(3) VPA による CTL 活性

腫瘍抗原ペプチド(未発表データ)を樹状細胞に添加して誘導した CTL を用いて、VPA を添加すると細胞障害活性が上昇した。(図)

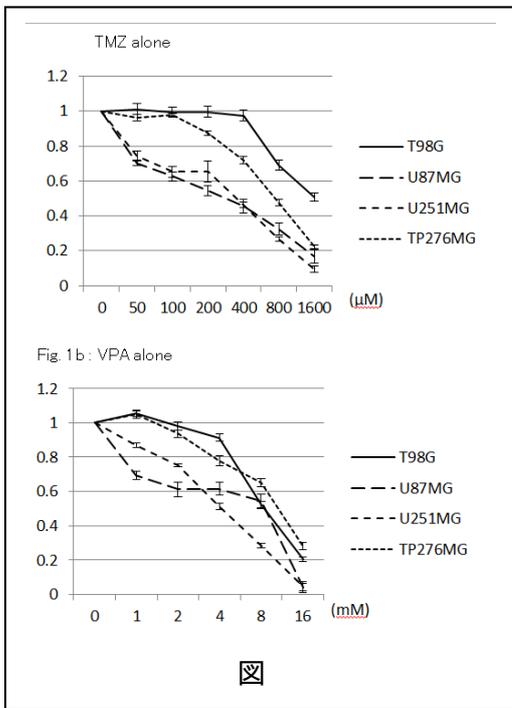


以上より、VPA による抗腫瘍免疫の効果の上昇が認められた。

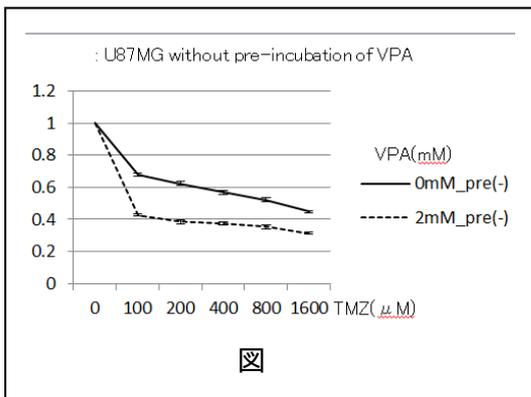
さらに VPA の免疫を介さない直接的な抗腫瘍効果を調べた。

(4) TMZ と VPA の併用効果

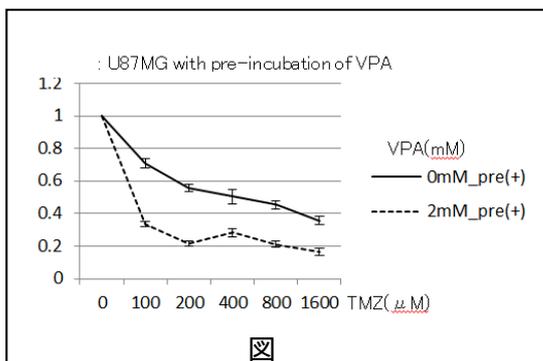
TMZ による殺腫瘍効果は知られているが、免疫細胞を介さずに VPA 単独でも濃度依存性に殺腫瘍効果があることが示された。ただし、腫瘍細胞の種類によって、感受性に差があることもわかった。我々の研究では、U251G と U87G は TMZ と VPA の感受性がともに高いことがわかった。(図)



さらに VPA を併用すると、TMZ の殺腫瘍効果が高まることがわかった。(図)



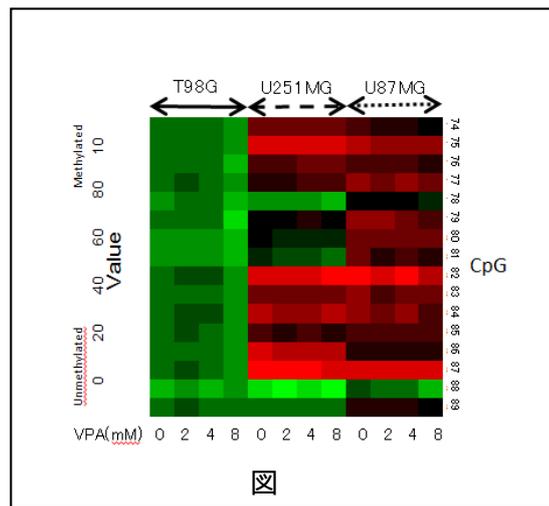
この効果をさらに高めるために、腫瘍培地にあらかじめ VPA を 2mM 添加して腫瘍を継代培養したものを用いた。そして同じように TMZ と VPA を併用すると、細胞株にもよるがさらに殺腫瘍効果が増強したものがあつた。(図)



が減弱したものはなかつた。

(5) VPA による MGMT プロモーターメチル化
さらに我々は、TMZ の感受性を規定する MGMT プロモーターのメチル化の VPA の影響を調べた。

プロモーターのどの部分に影響がでるかわからないため、全領域を調べる必要があつた。そこで国立がん研究センターとの協力を得て、pyrosequence 法で解析を行った。(図)



その結果、VPA が 0 ~ 8 mM までの間では、濃度によらず、MGMT のメチル化の程度に変化があつたものはなかつた。

U251MG と U87MG の MGMT のプロモーターメチル化は 60 ~ 70% であつたのに対し、T98G のメチル化は 40% 未満であつた。(図)

The average methylation level (%) of 3 glioma cell lines (T98G, U251MG, U87MG)				
VPA	0 mM	2 mM	4 mM	8 mM
U251MG	64.2	62.8	64.3	62.7
U87MG	72.1	68.4	69.9	65.4
T98G	36.3	38.6	38.3	31.3

われわれの条件下では、VPA は、MGMT のメチル化に影響せず、TMZ の感受性に悪影響をおよぼさないことが確認された。

結論

VPA は、悪性グリオーマの治療において、免疫療法を行う際には、有利に働く可能性があることが示された。さらに TMZ との併用においても、その効果を減却させることはないことがわかった。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

吉田俊 中村大志 佐藤秀光 川原信隆
市村幸一：悪性グリオーマにおけるバルブロ酸による MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態の解析、第 74 回日本脳神経外科学会総会、ロイトン札幌（北海道札幌市）、2015 年 10 月 14 日

佐藤秀光：悪性脳腫瘍の免疫療法、第 20 回横浜脳外科談話会、グランドセントラルタワー（神奈川県横浜市）、2014 年 7 月 25 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

菅野 洋 (KANNO, Hiroshi)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授
研究者番号：40244496