

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293313

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫におけるOncoantigenの同定と再発予防ワクチンへの応用

研究課題名(英文) Identification of glioma oncoantigens for the development of the vaccine

研究代表者

戸田 正博(Toda, Masahiro)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20217508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：Oncoantigenは、腫瘍悪性化に關与する抗原として提唱され、腫瘍発生初期に免疫学的に排除される抗原と異なり、免疫逃避される可能性が低いため、ワクチンへの応用が期待されている。本研究では、グリオーマの遺伝子・蛋白発現比較解析、他の癌腫で同定された腫瘍抗原のグリオーマにおける遺伝子・蛋白発現解析、グリオーマにおける機能解析を行った結果、脳腫瘍oncoantigenとして2つの分子の同定に成功した。これらの分子は、脳腫瘍組織、脳腫瘍細胞、脳腫瘍幹細胞において高発現を呈し、脳腫瘍細胞の増殖に關与する。今後は、同定したoncoantigenを用いた免疫療法の開発を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Oncoantigen are tumor antigens required for the neoplastic process and when cancer vaccine against oncoantigen, the chance that escape immune recognition to tumor should be reduced. In order to identify oncoantigens against glioma, we performed the comparative gene expression analysis of gliomas and also gene expression analysis of known oncoantigens against other cancers in gliomas. Then, functional analysis of oncoantigen candidates selected was performed in glioma cells. We succeeded in identify two oncoantigens against glioma that are expressed highly in malignant glioma tissues, glioma cell lines, and glioma stem cells isolated from glioma patients. These oncoantigens were shown to be involved in the growth of glioma by gene knockdown experiments. Furthermore, in a mouse in vivo glioma model, the gene knockdown of the oncoantigen showed a significant therapeutic effect. We plan to perform an immunotherapy using the oncoantigen identified for the treatment of malignant gliomas.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳腫瘍 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

Oncoantigen は、腫瘍悪性化に関与する抗原として提唱され、悪性転化した腫瘍細胞およびその微小環境を形成する細胞に発現している抗原の総称である。腫瘍悪性化分子 oncoantigen は、腫瘍発生初期に免疫学的に排除され、免疫不応答になる抗原と異なり、免疫逃避される可能性が低いと考えられており、ワクチンへの応用が期待されている。これまで oncoantigen およびそのワクチンへの応用研究は、ERBB2 遺伝子 transgenic マウスが女性における乳癌発生から進展過程をよく再現していることから、乳癌を中心に進められてきた。とくに ERBB2 遺伝子 transgenic マウスでは、100%乳癌が発生し、ERRB2 蛋白やペプチドワクチンを投与すると乳癌発生を予防しうることから、その免疫学的な機序が詳しく解析されてきた。一方、これまで様々なグリオーマモデルの報告はあるが、安定して自然発生するマウスモデルはなく、また脳腫瘍に関する oncoantigen の解析・同定はなされていない。

これまで我々は、グリオーマ抗原の同定、解析を先駆的に行なっており、SEREX 法、RLGS 法など様々なクローニング法を駆使して、10種類以上のグリオーマ抗原を同定している。また、ヒトグリオーマ細胞株の SP 細胞分画や患者検体より脳腫瘍幹細胞 (BCSC) 細胞株を樹立し、グリオーマ抗原ペプチドにより誘導された T 細胞が BCSC を破壊しうることを証明した。本研究では、これまで我々が確立した抗原解析技術を基盤に、脳腫瘍の oncoantigen を同定し、マウスモデルを用いてワクチンの有効性を検証し、悪性グリオーマに対する再発予防ワクチンの臨床応用を目指す。

2. 研究の目的

Oncoantigen は、腫瘍悪性化に関与する抗原として提唱され、腫瘍発生初期に免疫学的に排除される抗原と異なり、免疫逃避される可能性が低いいため、ワクチンへの応用が期待されている。一方、oncoantigen によるワクチン研究は、癌発生過程を再現可能な transgenic mouse を用いてその有効性が検証されてきたが、これまでグリオーマが安定して発生するマウスモデルはなく、また、脳腫瘍の oncoantigen は同定されていない。そこで、本研究では、我々の脳腫瘍幹細胞 (BCSC) 誘導・解析技術を基盤に、高頻度にグリオーマを発生するマウスモデルを確立する。さらに、我々の抗原解析技術を基盤に、脳腫瘍 oncoantigen を同定し、マウスモデルを用いてワクチンの有効性を検証し、悪性グリオーマに対する再発予防ワクチンの臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウスグリオーマモデルの確立

本研究では、予防ワクチンとしての有効性を

解析するために、高頻度 (できれば 100%) でかつ短期間に悪性グリオーマが形成されるモデルマウスを確立する。最近の報告から遺伝子変異 Ras に p16(Ink4a)/p19(Arf) 欠失が加わると、高頻度に悪性グリオーマが発生し、さらに p53 欠失が加わると短期間で発生することが報告されている。実際に p16(Ink4a)/p19(Arf) の神経幹細胞 (NSC) に H-Ras/V12 を遺伝子導入することにより、in vitro で BCSC を誘導しうることは確認している。そこで、本研究では、グリオーマ発生に重要かつ実際にマウスグリオーマ発生モデルで用いられた遺伝子として、P16(Ink4a)/P19(Arf) 欠失、p53 欠失、H-Ras/V12 に着目して、前癌状態から悪性転化する過程を再現しうるモデルを作製する。また BCSC は NSC から発生する可能性が高いため、成熟マウス脳内に NSC が存在する脳室周囲および海馬へと脳腫瘍が高頻度に発生する部位である深部白質を標的として、脳腫瘍発生の頻度および期間を解析する。

(2) 脳腫瘍 Oncoantigen の探索・同定

low grade glioma と secondary glioblastoma 組織との網羅的遺伝子および蛋白発現比較を行い、low grade glioma と比較して、secondary glioblastoma で高発現し、正常組織において低発現分子を選出する。上記と同様に遺伝子発現を RT-PCR により検証し、抗体が入手可能な場合は蛋白発現を Western blot、免疫細胞染色、免疫組織染色により解析し、その発現特異性を検証する。また、すでに他の癌腫で Oncoantigen として同定された分子の脳腫瘍における発現解析を行い、脳腫瘍 oncoantigen 候補として同定する。

(3) Oncoantigen 候補分子の機能解析

発現パターンから選出された oncoantigen 候補分子の遺伝子情報をインターネット検索により、細胞の生存、増殖、細胞周期に関与する分子を oncoantigen として同定。機能不明な分子を含め、Oncoantigen として同定された分子の BCSC およびグリオーマ細胞における機能解析を行うため、レンチウイルスベクターに組み換えた過剰発現系と、RNAi による遺伝子ノックダウン系を構築して、BCSC におけるスフェア形成能 (幹細胞維持・自己複製能)、多分化能、増殖、生存の変化、グリオーマ細胞における増殖・細胞周期・生存の変化を解析して、oncoantigen としての機能を検証する。さらに、すでにグリオーマ抗原として同定された分子の BCSC におけるスフェア形成能 (幹細胞維持・自己複製能)、多分化能、増殖、生存の変化、グリオーマ細胞における増殖・細胞周期・生存の変化を解析し、脳腫瘍 oncoantigen を同定する。

(4) 同定 Oncoantigen による治療効果の解析

同定された oncoantigen の治療効果を解析するため、本研究で確立するマウスグリオーマ

モデルおよびすでに確立したモデルである *p16(Ink4a)/p19(Arf)* の NSC に *H-Ras/V12* を遺伝子導入した BCSC 移植モデルを用いて、oncoantigen によるグリオーマに対する治療効果の解析を行なう。

4. 研究成果

脳腫瘍 oncoantigen を同定するため、ヒト low grade glioma と secondary glioblastoma 組織の遺伝子・蛋白発現比較を行い、さらにインターネット上で公開されている分子情報および機能解析により、細胞の生存、増殖に関与する分子を oncoantigen の候補として解析を行った。その結果、4 分子を候補抗原として選出した。さらに oncoantigen 候補として選出された 4 抗原分子に関して、脳腫瘍組織、脳腫瘍細胞、BCSC における発現解析、および脳腫瘍細胞における機能解析を行った。その結果、KIF10A(kinesin family member 20A)が、脳腫瘍組織、脳腫瘍細胞、BCSC において高発現を呈し、脳腫瘍細胞における増殖に深く関与する分子であることが明らかになった。

さらに他の癌腫で同定された腫瘍抗原の中から、蛋白発現比較およびインターネット上で公開されている分子情報により oncoantigen 候補を選出して、脳腫瘍組織、脳腫瘍細胞、BCSC における発現解析、および脳腫瘍細胞における機能解析を行った。その結果、DEPDC1 が、脳腫瘍組織、脳腫瘍細胞、BCSC において高発現を呈し、脳腫瘍細胞における増殖に深く関与する分子であることが明らかになった。以上、本研究において我々は 2 つの新たな脳腫瘍 oncoantigen の同定に成功した。

p16(Ink4a)/p19(Arf) の NSC に *H-Ras/V12* を遺伝子導入した BCSC をマウス脳内に移植した in vivo マウスグリオーマモデルを作成した。生存解析、組織解析を行ったところ、全例のマウス脳組織において、浸潤性が高く多様な組織像を呈すグリオーマが確認された。以上から、ヒトグリオーマと同様の組織像を呈する腫瘍を安定して形成するマウスモデルを確立した。そこで、同定した oncoantigen である DEPDC1 を標的として、*p16(Ink4a)/p19(Arf)* の NSC に *H-Ras/V12* を遺伝子導入した BCSC マウスモデルを用いて DEPDC1 ノックダウンによる治療効果を解析したところ、著明な治療効果が確認された。

以上、本研究において、新たな脳腫瘍 oncoantigen を同定し、その機能解析および治療解析を行った。脳腫瘍 Oncoantigen は新たな治療標的分子としての有用性が期待され、今後は oncoantigen を用いた免疫療法の臨床応用を目指して、研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 27 件)

- 1) Kikuchi R, Toda M, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Surgical outcome of endoscopic endonasal surgery for non-functional pituitary adenoma by a team of neurosurgeons and otolaryngologists, Turkish Neurosurg, 査読有、2016(in press)
- 2) Borghei-Razavi H, Tomio R, Fereshtehnejad S-M, Shibao S, Schick U, Toda M, Yoshida K, Kawase T, Pathologic Location of Cranial Nerves in Petroclival Lesions: How to Avoid Their Injury with the Anterior Petrosal Approach, J of Neurol Surg-Part B, 査読有、2016(in press)
- 3) Fukaya R, Ohta S, Yaguchi T, Matsuzaki Y, Sugihara E, Okano H, Saya H, Kawakami Y, Kawase T, Yoshida K, Toda M, MIF maintains the tumorigenic capacity of brain tumor-initiating cells by directly inhibiting p53, Cancer Res, 査読有、Vol.76, No.10, 2016, pp.1011, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1011
- 4) Ozawa H, Tomita T, Watanabe Y, Sekimizu M, Ito F, Ikari Y, Saito S, Toda M, Ogawa K, Sigmoid incision rescue nasoseptal flap technique for endoscopic endonasal skull base surgery, Acta Otolaryngol, 査読有、Vol.136, No.6, 2016, pp.636-640, DOI: 10.3109/00016489.2016.1143122.
- 5) Tamura R, Toda M, Kohno M, Watanabe Y, Ozawa H, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Vascularized middle turbinate flap for the endoscopic endonasal reconstruction of the anterior olfactory groove, Neurosurg Rev, 査読有、Vol.39, No.2, 2016, pp.297-302, DOI: 10.1007/s10143-015-0688-1.
- 6) Mizutani K, Toda M, Yoshida K, Analysis of the Intercavernous Sinus in Sellar Lesions Using Multidetector Computed Tomography Digital Subtraction Venography, World Neurosurg, 査読有、Vol.86, 2016, pp.336-340, DOI: 10.1016/j.wneu.2015.08.079.
- 7) Shibao S, Toda M, Orii M, Fujiwara H, Yoshida K, Various patterns of the middle cerebral vein and preservation of venous drainage during the anterior transpetrosal approach, J Neurosurg, 査読有、Vol.124, No.2, 2016, pp.432-439, DOI: 10.3171/2015.1.JNS141854.

- 8) Shibao S, Toda M, Yoshida K, Giant cell tumors of the clivus: Case report and literature review, *Surg Neurol Int*, 査読有, Vol.6, Suppl 25, 2015, pp.623-627, DOI: 10.4103/2152-7806.170459.
- 9) Borghei-Razavi H, Tomio R, Fereshtehnejad SM, Shibao S, Schick U, Toda M, Kawase T, Yoshida K, Anterior petrosal approach: The safety of Kawase triangle as an anatomical landmark for anterior petrosectomy in petroclival meningiomas, *Clin Neurol Neurosurg*, 査読有, Vol.139, 2015, pp.282-287, DOI: 10.1016/j.clineuro.2015.10.032.
- 10) Sasaki H, Hirose Y, Yazaki T, Kitamura Y, Katayama M, Kimura T, Fujiwara H, Toda M, Ohira T, Yoshida K, Upfront chemotherapy and subsequent resection for molecularly defined gliomas, *J Neurooncol*, 査読有, Vol.124, No.1, 2015, pp.127-135, DOI: 10.1007/s11060-015-1817-y
- 11) Tamura R, Takahashi S, Emoto K, Nagashima H, Toda M, Yoshida K, GH-Producing Pituitary Adenoma and Concomitant Rathke's Cleft Cyst: A Case Report and Short Review, *Case Rep Neurol Med*, 査読有, 2015, 948025, DOI: 10.1155/2015/948025.
- 12) Mizutani K, Toda M, Kikuchi R, Uchida H, Yoshida K, Steroid psychosis caused by perioperative steroid replacement for pituitary adenoma: a case report, *Keio J Med*, 査読有, Vol.64, No.1, 2015, pp.11-15, DOI: 10.2302/kjm.2014-0007-CR.
- 13) Shibao S, Toda M, Tomita T, Saito K, Ogawa K, Kawase T, Yoshida K, Petrous apex cholesterol granuloma: importance of pedicled nasoseptal flap in addition to silicone T-tube for prevention of occlusion of drainage route in transsphenoidal approach--a technical note, *Neurol Med Chir (Tokyo)* 査読有, 2015, Vol.55, No.4, pp.351-355, DOI: 10.2176/nmc.tn.2014-0254.
- 14) Mizutani K, Toda M, Yoshida K, Analysis of the intercavernous sinuses using multidetector computed tomography digital subtraction venography (CT-DSV), *Clin Neurol Neurosurg*, 査読有, Vol.131, 2015, pp.31-34, DOI: 10.1016/j.clineuro.2015.01.021
- 15) Kikuchi R, Toda M, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Analysis of sphenoid sinus lateral pneumatization for endonasal endoscopic surgery, *Surg Neurol Int*, 査読有, Vol.27, No.6, 2015, pp.166, DOI: 10.4103/2152-7806.168313.
- 16) Saito K, Toda M, Yoshida K, Pilocytic astrocytoma with anaplastic features presenting good long-term clinical course after surgery alone: a case report, *Childs Nerv Syst*, 査読有, Vol.31, No.1, 2015, pp.167-171, DOI: 10.1007/s00381-014-2509-1
- 17) Tomio R, Toda M, Sutiono AB, Horiguchi T, Aiso S, Yoshida K, Grüber 's ligament as a useful landmark of Abducens nerve in transnasal approach, *J Neurosurg*, 査読有, Vol.122, No.3, 2015, pp.499-503, DOI: 10.3171/2014.10.JNS132437
- 18) Tomio R, Toda M, Yoshida K, Borghei-Razavi H, Anterior petrosal approach(Letter to the Editor), *J Neurosurg*, 査読有, Vol.120, No.5, 2014, pp.1249-1250, DOI: 10.3171/2013.10.JNS132121.
- 19) Tomio R, Toda M, Tomita T, Yazawa M, Kono M, Ogawa K, Yoshida K, Primary dural closure and anterior cranial base reconstruction using pericranial and nasoseptal multi-layered flaps in endoscopic-assisted skull base surgery, *Acta Neurochirurgica*, 査読有, Vol.156, No.10, 2014, pp.1911-1915 DOI: 10.1007/s00701-014-2174-x.
- 20) Saito K, Toda M, Shido S, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Isolated Pituitary Tuberculoma -Case Reports-, *NMC Case Report Journal*, 査読有, Vol.1, 2014, pp.33-36, DOI: 10.2176/nmccrj.2013-0330
- 21) Shibao S, Toda M, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Analysis of the bacterial flora in the nasal cavity and the sphenoid sinus mucosa in patients operated on with an endoscopic endonasal transsphenoidal approach, *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 査読有, Vol.54, No.12, 2014, pp.1009-1013, DOI:10.2176/nmc.oa.2014-0129
- 22) Shidoh S, Toda M, Kawase T, Nakajima H, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Transoral

vs. endoscopic endonasal approach for clival/upper cervical chordoma, *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 査読有、Vol.54, No.12, 2014, pp.991-998,
DOI: 10.2176/nmc.st.2014-0135

- 23) Saito K, Iizuka Y, Ohta S, Takahashi S, Nakamura K, Saya H, Yoshida K, Kawakami Y, Toda M, Functional analysis of a novel glioma antigen, EFTUD1, *Neuro Oncol*, 査読有、Vo.16, No.12, 2014, pp.1618-1629,
DOI: 10.1093/neuonc/nou132.
- 24) Shidoh S, Toda M, Nakajima H, Tomita T, Ogawa K, kawase T, Yoshida K, Transoral-transpalatal approach and endoscopic endonasal approach for chordomas of the craniovertebral junction, *J Neurol Neurophysiol*, 査読有、Vol.4, No.4, 2013, pp162, DOI: 10.4172/2155-9562.1000162
- 25) Ohta S, Misawa A, Lefebvre V, Okano H, Kawakami Y, Toda M, Sox6 up-regulation by macrophage migration inhibitory factor promotes survival and maintenance of mouse neural stem/progenitor cells, *PLoS One*, 査読有、Vol.8, No.9, 2013, e74315,
DOI: 10.1371/journal.pone.0074315
- 26) Toda M, Glioma Stem Cells and Immunotherapy for the Treatment of Malignant Gliomas, *ISRN Oncol*, 査読有、2013, 673793,
DOI: 10.1155/2013/673793
- 27) Sano K, Toda M, Sasaki H, Kitamura Y, Mikami S, Hirato J, Inoue S, Kawase T, Yoshida K, Infratentorial low-grade oligoastrocytoma with aggressive clinical behavior in an adult: a case report with genetic characterization, *Brain Tumor Pathol*, 査読有、Vol.30, No.2, 2013, pp.99-103,
DOI: 10.1007/s10014-012-0111-3

〔学会発表〕(計 10 件)

戸田正博、ペプチドワクチンの臨床経験、第 10 回信濃町脳腫瘍セミナー、2015 年 2 月 7 日、慶應義塾大学病院新教育研究棟講堂(東京都新宿区)
柴尾俊輔、戸田正博、菊地亮吾、斎藤克也、植田 良、佐々木光、吉田一成、悪性神経膠腫に対する VEGFR1/2 ワクチン療法、第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、2014 年 12 月 1 日、シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県浦安市)
菊地亮吾、戸田正博、斎藤克也、吉田一

成、神経膠芽腫における新規標的抗原の発現・機能解析、日本脳神経外科学会第 73 回学術総会、2014 年 10 月 9 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
戸田正博、脳腫瘍の最新治療、第 19 回日本脳腫瘍の外科学会 市民公開講座、2014 年 9 月 14 日、慶應義塾大学病院 3 号館北棟 1 階ラウンジ(東京都新宿区)
中川佑、佐々木光、戸田正博、大平貴之、河瀬 斌、吉田一成、Glioblastoma 長期生存例の検討、第 19 回日本脳腫瘍の外科学会、2014 年 9 月 12 日、東京ドームホテル(東京都文京区)
菊地亮吾、戸田正博、斎藤克也、吉田一成、神経膠芽腫における新規標的抗原の発現解析、第 32 回日本脳腫瘍病理学会学術集会、2014 年 5 月 23 日、あわぎんホール(徳島県郷土文化会館)(徳島県徳島市)
柴尾俊輔、戸田正博、斎藤克也、植田 良、吉田一成、進行及び再発悪性神経膠腫に対する VEGFR1/2 ワクチン療法、第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、2013 年 12 月 9 日、フェニックス、シーガイア・リゾート(宮城県宮崎市)
佐々木光、廣瀬雄一、矢崎貴仁、片山 真、北村洋平、戸田正博、大平貴之、吉田一成、Glioma に対する遺伝子診断に基づく neoadjuvant approach、第 18 回日本脳腫瘍の外科学会、2013 年 9 月 19 日、大津プリンスホテル(滋賀県大津市)
戸田正博、脳腫瘍幹細胞抗原の解析と新たな免疫療法の臨床試験、第 46 回慶應ニューロサイエンス研究会、2013 年 6 月 29 日、慶應義塾大学医学部(東京都新宿区)
斎藤克也、戸田正博、木村徳宏、池田栄二、吉田一成、Pilocytic astrocytoma with anaplastic (atypical) features の一例、第 31 回日本脳腫瘍病理学会、2013 年 5 月 24 日、KFC Hall 国際ファッションセンター(東京都墨田区)

〔図書〕(計 1 件)

戸田正博、寺田国際事務所/先端医療技術研究所、先端医療シリーズ 45 臨床医のための最新脳神経外科、2014、628

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 正博 (TODA, Masahiro)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 20217508

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

吉田 一成 (YOSHIDA, Kazunari)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号： 70166940

斉藤 克也 (SAITO, Katsuya)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 60464963