

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670613

研究課題名(和文) 免疫誘導・作用の場を考慮した脳腫瘍に対する新規免疫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapy against malignant glioma

研究代表者

齋藤 竜太 (SAITO, RYUTA)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10400243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で、免疫共刺激因子OX40を用いた脳腫瘍免疫治療法の開発を行った。本研究では、共刺激因子併用によるOX40ワクチン治療の増強を目指すとともに、新規LAK療法の開発を目指した。しかし、研究を進めると併用共刺激因子として使用したCD40刺激がより強い抗腫瘍免疫を誘導することが判明した。そこで、特にCD40に注目して新規免疫治療法の開発を目指した。臨床検体でCD40、CD40Lの遺伝子発現に相関して生存が改善することが示された。さらにCD40刺激抗体を腫瘍ワクチンに添加することによりマウス脳腫瘍モデルのみならず脳腫瘍幹細胞モデルに対しても強い抗腫瘍効果を示すことが確認された。

研究成果の概要(英文)：In the preceding study, we attempted to develop the new immunotherapeutic strategy using one of the costimulatory molecule, OX40. In the present study, we attempted to augment the efficacy of OX40 stimulation by adding it to subcutaneous tumor vaccination therapy. However, during our effort to augment the efficacy by adding similar costimulation molecule, CD40, we realized that CD40 evokes stronger antitumor effect than OX40. Therefore, we concentrated on CD40 and tried to develop effective immunotherapeutic strategy using this molecule. From analyses of clinical tumor samples, we demonstrated that gene expression of CD40 and CD40L (ligand) corresponded with the patients' progression-free and overall survival. Subsequently, we demonstrated the efficacy of CD40 stimulation by adding CD40 agonistic antibody to subcutaneous tumor vaccines. This strategy prolonged the survival of intracranial tumor models in both glioma model and glioma initiating cell derived glioma models.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍ワクチン 脳腫瘍 免疫治療 共刺激因子

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫を代表として悪性神経膠腫の治療成績は、現時点でのあらゆる治療手段を用いても絶対的に不良であり、新規治療法の開発は急務である。私達は、東北大学で単離された免疫関連タンパク OX-40 (免疫の共刺激因子として T 細胞活性化に関与)を用いた免疫治療の開発を目指して研究を進めてきた。この研究の中で、私たちは OX-40 分子の持つ新しい役割を見出し、さらに腫瘍環境内外での働きの違いに関する興味深い知見を得た。OX40 は膠芽腫において相反する役割果たすことが分かってきた。私たちは、これまで免疫機構に関わる細胞のみに発現していると考えられていた OX40L が膠芽腫に発現していることを同定した。この発現の意味を詳細に検討すると、膠芽腫は、OX40 シグナルを介して低酸素環境下で IL10 を誘導することにより宿主免疫を逃れていることが判明した。一方で、低酸素環境を解除すると従来知られているように T 細胞を活性化することが分かり、このように腫瘍の酸素状態により相反する働きを示すことが分かった。この結果から免疫を賦活化する作用は腫瘍内の低酸素環境ではなく、皮下などの酸素化に問題ない部位で得られやすいと考えられ、皮下ワクチンとして OX40 シグナルを用いる治療法の実現に取り組んできた。当初、本研究では 2 つの課題を設定した。一つは OX-40 シグナルを基礎とした皮下ワクチン治療の確立である。これまでの研究で OX-40 は、皮下でのワクチンとしての投与により強い免疫賦活効果を発揮することが示された。この方法論による免疫治療法の確立を目指す。また、免疫の共刺激因子は通常の免疫誘導においては、いくつかは共同して働いており、この酸素状態を考慮した皮下でのワクチン治療として共刺激因子を併用することでさらに効果的な抗腫瘍免疫を誘導することを目的とする。また第二として、リンパ球は低酸素下では OX40 シグナルを受けても、抗腫瘍免疫活性が低下することが分かった。本研究では HIF-1 のような低酸素応答シグナルを阻害したリンパ球を作製し新規養子免疫療法(LAK 療法)を開発することを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究においては、予定どおり OX40 刺激を皮下ワクチン投与とともに使用する治療法開発を行い、同じ共刺激因子である CD40 もしくは樹状細胞と併用することによる効果の増強を確認した。しかしこの中で、CD40 刺激がより強い抗腫瘍効果を示すことを確認し、CD40 刺激を皮下腫瘍ワクチンと併用する治療法開発に主眼を絞っ

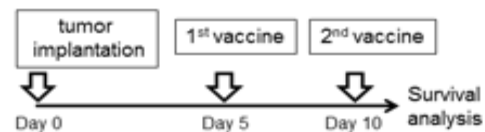
て研究を進めた。本研究の成果としては主に OX40 刺激を応用した治療法開発を行った論文(Shibahara I, Saito R, et al. Mol Cancer, doi: 10.1186/s12943-015-0307-3)と CD40 刺激を応用した治療法開発を行った論文(Chonan M, Saito R, et al. Neuro-Oncology, in press)に報告したが、ここでは本研究において主眼とした CD40 研究を中心に報告する。

まず CD40 もしくは CD40L の発現が持つ意味を明らかにするために東北大学脳神経外科で手術を実施した悪性神経膠腫検体を用いて CD40, CD40L の発現を遺伝子レベル、タンパクレベルで検討した[実験 1]。また、その発現と患者の生存期間の相関を検討した[実験 2]。続いてマウス脳腫瘍モデル[実験 3]、脳腫瘍幹細胞モデル[実験 4]に対する CD40 刺激抗体添加腫瘍ワクチン皮下投与の効果を検討した。また、そのワクチンに同様な共刺激因子である OX40 を刺激する抗体もしくは樹状細胞を添加した際の抗腫瘍効果の増強を検討した。

### 3. 研究の方法

[実験 1] 東北大学脳神経外科で手術を実施した悪性神経膠腫検体 (grade III 36 例、grade IV 86 例) の凍結腫瘍検体から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて CD40, CD40L の遺伝子発現を解析した。また、高発現している検体の組織切片を作製して免疫組織化学法により CD40, CD40L タンパクの発現を検討した。[実験 2] 実験 1 で確認した遺伝子発現量と患者生存の関連性を検討した。CD40 発現は RT-PCR において内部標準とした actin の発現比で 0.01 以上を高発現群、以下を低発現群として検討した。また CD40L においては同様に 0.001 以上を高発現群、以下を低発現群として検討した。

[実験 3] GL261 神経膠腫培養細胞をマウス脳内に移植した脳腫瘍モデルに対して腫瘍ワクチンに CD40 刺激抗体を追加した際の抗腫瘍効果を以下のプロトコールで検討した。

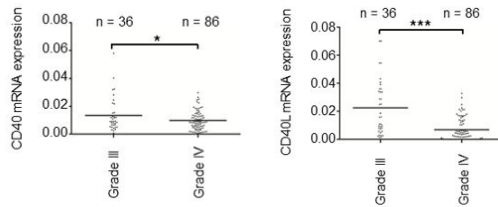


さらに各治療群におけるリンパ球の局所浸潤の差を免疫染色で検討した。

[実験 4] 引き続き脳腫瘍幹細胞 NSCL61 細胞をマウス脳内に移植して作製した脳腫瘍幹細胞モデルを用いて同様の検討を実施した。この検討に際しては、同じ共刺激因子の一つである OX40 に対するアゴニスト抗体、また樹状細胞との併用も検討した。さらにこれらの併用による治療効果増強の機序の解明を目指して、治療施行後の組織切片を TUNEL 染色で検討することによりアポトーシスを調べた。

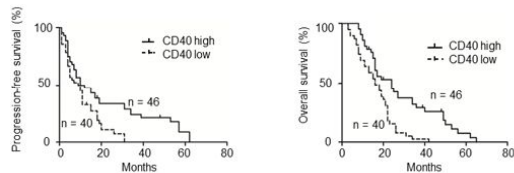
#### 4. 研究成果

[実験 1] 悪性神経膠腫臨床検体を用いて CD40, CD40L の遺伝子発現を検討した。

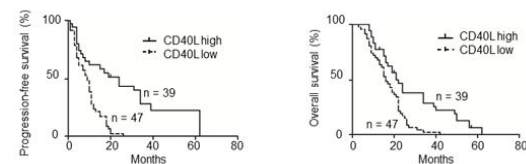


ともに Grade IV に比して Grade III で発現が高い蛍光が認められた。また、CD40, CD40L ともに遺伝子発現が高い症例で組織切片を作製してタンパクの発現を検討したが、ともに腫瘍が染色されることが判明した。

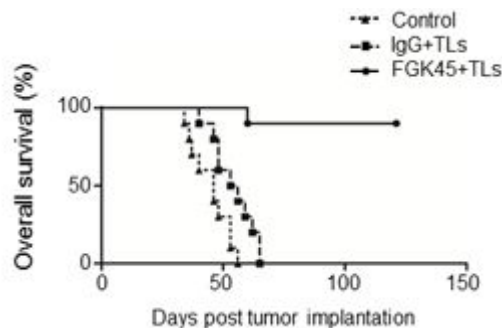
[実験 2] 実験 1 で確認した遺伝子発現量と各症例の生存を progression free survival (PFS) と overall survival (OS) の比較で検討した。CD40 発現が高い症例ほど、生存が長いことが判明した。



同様に CD40L についても高発現群で PFS, OS ともに良好であることが示された。

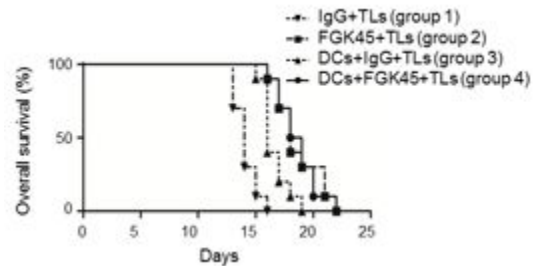


[実験 3] GL261 脳腫瘍モデルに対して、腫瘍ワクチンに CD40 刺激抗体を追加した際の抗腫瘍効果を検討した。コントロール群、IgG (コントロール IgG)+腫瘍ワクチン治療群、CD40 アゴニスト抗体 (FGK45)+腫瘍ワクチン治療群を作製し、生存を Kaplan-Meier 法で検討した結果、CD40 刺激により腫瘍ワクチンの効果が増強することが示された。

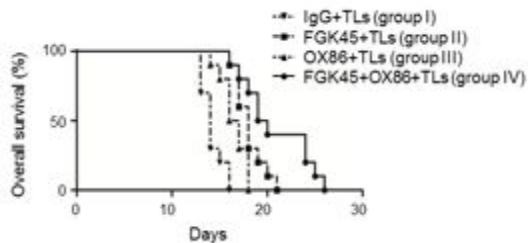


この抗腫瘍効果増強の機序として、CD40 刺激群において腫瘍局所へ CD4/CD8 陽性リンパ球の浸潤が増強されることが免疫染色により示された。

[実験 4] NSCL61 神経膠腫幹細胞モデルに対して、腫瘍ワクチンに CD40 刺激抗体を追加した際の抗腫瘍効果を検討した。また、同時に樹状細胞 (dendritic cells; DCs) 免疫治療との併用、OX40 アゴニストの併用効果を検討した。



樹状細胞免疫治療との併用効果は著明なものではなかった。引き続き、OX40 アゴニスト抗体 OX86 を併用して同様に検討した。



OX40 刺激は CD40 刺激と併用により相乗的に生存延長効果を示すことが判明した。抗腫瘍効果増強の機序としては、組織切片を用いて TUNEL 染色を行った結果、併用治療群においてアポトーシスが有意に増加していることが示された。

#### 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 11 件)

1. Chonan M, Saito R, 他 8 名. CD40/CD40L expression correlates with the survival of patients with glioblastomas and an augmentation in CD40 signaling enhances the efficacy of vaccinations against glioma models. 査読有 Neuro-Oncol 2015 in press.

2. Shibahara I, Saito R, 他 17 名. OX40 ligand expressed in glioblastoma modulates adaptive immunity depending on the microenvironment: a clue for successful immunotherapy. Mol Cancer. 査読有 2015 Feb 15;14(1):41. DOI:

10.1186/s12943-015-0307-3.  
3.Sonoda Y, Shibahara I, Kawaguchi T, Saito R, 他 5 名. Association between molecular alterations and tumor location and MRI characteristics in anaplastic gliomas. Brain Tumor Pathol. 査読有 2014 Dec 24. DOI:10.1007/s10014-014-0211-3.  
4.Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, Murakami S, Dodo M, Kitamura H, Taguchi K, Shibata T, Watanabe M, Suzuki H, Shibahara I, Saito R, 他 5 名.. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. Neuro Oncol. 査読有 2014 Oct 10. pii: nou282. DOI: 10.1093/neuonc/nou282.  
5.Kawaguchi T, Kumabe T, Saito R, 他 5 名. Practical surgical indicators to identify candidates for radical resection of insulo-opercular gliomas. J Neurosurg. 査読有 2014 Nov;121(5):1124-32. DOI: 10.3171/2014.7.  
6.Shibahara I, Sonoda Y, Shoji T, Kanamori M, Saito R, 他 8 名. Malignant clinical features of anaplastic gliomas without IDH mutation. Neuro Oncol. 査読有 2014 Jun 23. pii: nou112. DOI: 10.1093/neuonc/nou112.  
7.Yang X, Saito R, 他 7 名. Peri-tumoral leakage during intra-tumoral convection-enhanced delivery has implications for efficacy of peri-tumoral infusion before removal of tumor. Drug Deliv. 査読有 2014 May 28:1-6. DOI: 10.3109/10717544.2014.914987.  
8.Kanamori M, Kikuchi A, Watanabe M, Shibahara I, Saito R, 他 5 名. Rapid and sensitive intraoperative detection of mutations in the isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes during surgery for glioma. J Neurosurg. 査読有 2014 Apr 18. DOI: 10.3171/2014.3.JNS131505.  
9.Sonoda Y, Saito R, 他 4 名. The Association of Subventricular Zone Involvement at Recurrence with Survival after Repeat Surgery in Patients with Recurrent Glioblastoma. Neurol Med Chir (Tokyo). 査読有 2013 Dec 27. DOI: 10.2176/nmc.oa.2013-0226.  
10.Zhang R, Saito R, 他 5 名. Concentration rather than dose defines the local brain toxicity of agents that are effectively distributed by convection-enhanced delivery. J Neurosci Methods. 査読有 2014 Jan 30;222:131-7. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.11.004. Epub 2013 Nov 20.  
11.Saito R, 他 7 名. Early response to chemotherapy as an indicator for the

management of germinoma-like tumors of the pineal and/or suprasellar regions. J Clin Neurosci. 査読有 2014 Jan;21(1):124-30. DOI: 10.1016/j.jocn.2013.05.014. Epub 2013 Nov 12.

〔学会発表〕(計 10 件)

1) 齋藤竜太、他 4 名. 第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会 (at 千葉県浦安市 シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル 2014/11/30) (ポスター) 初回再発悪性神経膠腫に対する摘出術後塩酸ニムスチン convection enhanced delivery 投与とテモゾロミド内服-Phase I/II 臨床試験-  
2) 齋藤竜太、他 6 名. 日本脳神経外科学会 第 73 回学術総会 (at 東京都港区 グランドプリンスホテル新高輪 2014/10/11) (口演) MRI モニタリング下化学療法剤局所投与による脳幹部悪性神経膠腫新規治療法の開発  
3) 長南雅志、齋藤竜太、他 9 名. 第 15 回日本分子脳神経外科学会 (山形県山形市 大手門パル 2014/9/26) (口演) 脳腫瘍幹細胞モデルに対する共刺激因子 CD40 免疫治療の開発  
4) 齋藤竜太、他 5 名. 日本癌治療学会第 52 回学術集会 (at 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 2014/8/29) (口演) MRI モニタリング下化学療法剤局所投与による脳幹部悪性神経膠腫新規治療法の開発.  
5) Saito R, 他 5 名. 20th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. (at Lake Tahoe, California USA, 2014/7/22) (口演) Convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride for brainstem malignant glioma: current study and development of new device.  
6) 齋藤竜太、他 6 名. 第 42 回小児脳神経外科学会 (at 宮城県仙台市 向陽グランドホテル 2014/5/30) (シンポジウム) Early Response to Chemotherapy as an Indicator for the Management of Germinoma-Like Tumors of the Pineal and/or Suprasellar Region.  
7) 齋藤竜太、他 5 名. 第 31 回日本脳腫瘍学会 (at 宮城県宮崎市 フェニックス・シーガイア・リゾート 2013/12/8) (口演) 脳幹部再発神経膠腫に対する MRI ガイド下 CED による塩酸ニムスチン投与: Phase I 臨床研究  
8) Saito R, 他 5 名. 4th Quadrennial Meeting on the World Federation of Neuro-Oncology (at Marriott Marquis Hotel, San Francisco USA, 2013/11/21-24) (口演) Convection-enhanced delivery of chemotherapeutic agent for brainstem malignant glioma: from bench to bedside.  
9) 齋藤竜太、他 6 名. 日本脳神経外科学会 第 72 回学術総会 (神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 2013/10/16) (シンポジウム) MRI

モニタリング下ニトロソウレア剤局所投薬による脳幹部再発神経膠腫新規治療法の開発.

10) Saito R, 他 2 名. 15th WFNS World Congress of Neurosurgery (at Coex Convention Center, Seoul, Korea, 2013/9/13) (口演)  
Convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride for malignant glioma affecting brainstem.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 竜太 (SAITO RYUTA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10400243

### (2) 研究分担者

石井 直人 (ISI NATO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60291267

### (3) 連携研究者

菊地 利明 (KIKUCHI TOSHIAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10280926