

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10338

研究課題名(和文) 悪性グリオーマの腫瘍内免疫におけるWntの役割解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the role of Wnt in tumor immunity of malignant glioma and its application to therapy

研究代表者

平野 宏文 (HIRANO, Hirofumi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：00264416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Wntの腫瘍内発現やPDL-1発現と治療効果の関係について研究を行ったが、膠芽腫におけるWnt5aとPD-L1の発現の相関は弱く、PD-L1の発現程度による膠芽腫患者の生存期間の差は明瞭ではなかった。

Gene Expression Omnibus Databaseの解析では、Wnt-5aと高相関の遺伝子候補としてPD-1があったが、in vitroではWnt5a刺激による腫瘍細胞の免疫抑制に関する遺伝子発現の変化は捉えられず、マクロファージを介した作用でも免疫チェックポイント関連遺伝子発現の著明な変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We studied the relationship between intratumoral expression of Wnt and expression of PDL-1 and therapeutic effect, but the correlation between Wnt5a and PD-L1 expression in glioblastoma was weak, and the expression level of PD-L1 in patients with glioblastoma did not show the difference in survival time.

In the analysis of Gene Expression Omnibus Database, there was PD-1 as a highly correlated gene candidate with Wnt-5a, but in vitro study the gene expression change related to immunosuppression of tumor cells by Wnt5a stimulation could not be detected, and macrophage-mediated influence was not obvious in expression of immunity checkpoint-related genes.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：Wnt-5a グリオーマ 相互作用 免疫 PD-L1 膠芽腫

1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマを筆頭とする悪性グリオーマ(神経膠腫)は、脳実質組織から発生し、浸潤性に発育する特徴を持ち、患者を死に至らしめる。グリオーマの中で星細胞系列の腫瘍が grade 2 の星細胞腫から grade 3 の悪性星細胞腫, grade 4 の膠芽腫(グリオブラストーマ)へと遺伝子異常を蓄積しながら経時的に悪性化するものと当初から膠芽腫として発生するものがある。Wnt シグナル系は、大腸癌などで細胞の増殖/発癌に関するシグナル伝達と細胞の運動(浸潤)に関係するシグナル伝達が互いに関連し合う領域として注目されはじめていた。我々は Wnt に関する初期の研究(悪性グリオーマにおける Wnt シグナル活性化の検討と診断・治療への応用、基盤研究(C))で、悪性グリオーマにおける Wnt の発現は、Wnt5a が多く、数種類のグリオーマ細胞株に共通して高発現していることを確認し、Wnt5a の発現とグリオーマの grade が相関していることを報告した。また、in vitro において、Wnt5a を RNAi で抑制するとグリオーマ細胞の運動能力が低下し、逆に Wnt5a を添加することで、細胞運動能が上昇すること、さらに Wnt5a をノックダウンすることで腫瘍細胞の matrix metalloproteinase (MMP) の低下が生じることを報告した。これは Wnt シグナル経路として、従来の Wnt/ β -catenin 経路(canonical 経路)以外の Frizzled 経路の確認へと繋がった(Wnt/Frizzled 系腫瘍メッセジ経路探索による新しい抗グリオーマ戦略・基盤研究(C))。一方、膠芽腫内には、多くのマクロファージが認められる。通常、免疫細胞の組織内進入は免疫系の活動上昇を示す現象である。しかし、グリオーマの場合、悪性度が上がるほどマクロファージの浸潤が多くなるにもかかわらず、生存期間は短くなる。膠芽腫では腫瘍細胞産生の MCP1 により、マクロファージの誘導が引き起こされるが、何らかの免疫機構の抑制が生じていることが予想された。このような中、2013 年、Wnt5a が CCL2/MCP1 を介した血球系細胞の chemotaxis に関与しているとの報告が見られた。そこで誘導マクロファージを用いて確認したところ、先の Wnt/ β -catenin 経路以外の Wnt5a のレセプターのいくつかが発現していることが確認され、Wnt5a から始まるシグナルは、腫瘍内環境における免疫応答にまで関与している可能性が推測された。また、2014 年、大腸癌で Wnt5a や Wnt3a はマクロファージを介した炎症を惹起し、この炎症は、TLR4 や MyD88 依存性であるとの報告が見られた。以上のことを踏まえ、脳(膠芽腫)においても、Wnt シグナルは、腫瘍内免疫担当細胞の

構成を制御している可能性が推測された。さらに、リンパ球表面にある PD-1 (programmed cell death protein 1)は活性化リンパ球を抑制する(負のシグナル)受容体であり、その関連抗体薬がメラノーマの治療に利用されつつあるが、PD-1 のリガンドである PDL-1 は、膠芽腫細胞でも発現していることから、膠芽腫の免疫抑制にも強く関与していると推測した。

2. 研究の目的

Wnt5a, PD-1 や PDL-1 に関連した治療薬や、がんワクチン療法が、グリオーマに対して利用される可能性があると考えられ、Wnt の脳内、腫瘍内発現や PD-1, PDL-1 発現と治療効果の関係を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膠芽腫における Wnt 系シグナルと、免疫活性化のシグナルの関与を明らかにするため、Wnt5a, MIB-1 LI と腫瘍免疫に関与する PD-L1(programmed cell death 1 ligand-1)の発現を免疫組織学的に検討した。【対象と方法】2 回以上の手術を行った膠芽腫 39 例(男/女=19/20, 平均年齢 53.9 歳)の、初回、二回目手術標本について、MIB-1 LI を求めた。また、Wnt5a, PD-L1 の染色結果から腫瘍細胞の染色性を 3 段階に分け、MIB-1 LI, Wnt5a, PD-L1 発現と初回手術、二回目手術からの生存期間の関係を調べた。

(2) グリオーマに特異的な局所の細胞間のコミュニケーションの存在が疑われる。そこで、NCBI(National Center for Biotechnology Information)上の Gene Expression Omnibus (GEO) Database に登録されているグリオーマサンプルの DNA アレイデータを用いた検討を行った。Wnt-5a のシグナル値に注目して 3 階層に分割し、Wnt-5a 高発現(上位)と低発現(下位)のサンプルを比較し、Wnt-5a 発現と相関の高い遺伝子の抽出を行った。

(3) グリオーマ細胞株 U251 を Wnt5a で刺激し、mRNA の発現変化をマイクロアレイで確認した。

(4) Wnt-5a で白血球系培養細胞を刺激するとサイトカイン産生が亢進することが報告されている。そこでグリオーマが放出する Wnt-5a がマクロファージに作用し、PD-1, PD-L1 など免疫チェックポイントと関係するのではないかと予想し、マウスマクロファージ系培養細胞 Raw264 細胞とヒト単球系培養細胞 THP-1 を Wnt-5a 蛋白で刺激し、IL-1, IL-6, ICAM-1, TNF α , PD-1, MCP-1 などの遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR で解析した。

(5)(2)~(4)の結果が思わしくなかったため、グリオーマ細胞が分泌する物質によるマクロファージへの作用をシステムティックに解析することとし、グリオーマ由来細胞株 U251 の培養上清 (conditioned Medium, CM) でマクロファージ細胞株を刺激して各種サイトカインの遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR で解析した。さらに、あらかじめ U251 細胞と THP-1 細胞を同一容器で共培養して作成した培養上清を用いて、THP-1 を刺激し解析した。

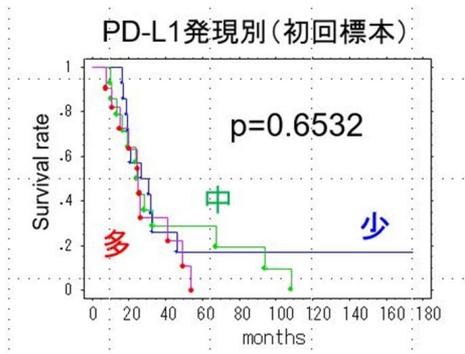
(6) U251 培養上清や THP-1 細胞上清、U251 細胞と THP-1 細胞を同一容器で共培養して作成した培養上清内のサイトカイン類を QplexELISA システムを用いて測定した。

(7) IL-1 アンタゴニスト存在下で作製した U251 細胞培養上清で THP-1 細胞を刺激し、サイトカイン類の遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR で解析した。同様に IL-23 中和抗体存在下に U251 細胞培養上清で THP-1 細胞を刺激し解析した。

(8)(1)で PD-L1 の免疫組織学的な発現 (一次抗体: Rabbit Monoclonal Antibody [Clone ID: OR-5E3]) と膠芽腫患者の生存期間に関し調べているが、この当時の判定は、検者目視による 3 段階評価であった。PD-L1 発現と膠芽腫の生存期間の関係は重要であるため、再検討を行った。

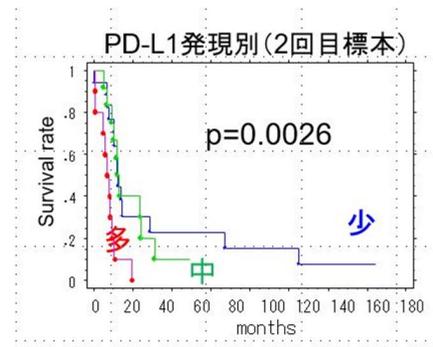
4. 研究成果

(1) MIB-1LI 平均値は初回 27.9%、二回目 12.0% で差があった ($p=0.0018$) が、初回と二回目の LI に相関はなかった。PD-L1 は全標本で発現を認め、二回目標本の染色性は増加 11 例、不変 14 例、減少 14 例で、初回と二回目に相関は認めなかった。Wnt5a と PD-L1 の発現の相関は弱かった。PD-L1 発現程度による群分けでは初回標本は初回手術からの Kaplan-Meier 生存曲線の分離が悪かった。



二回目標本は二回目手術からの生存曲線を

分離していたが不完全であった。



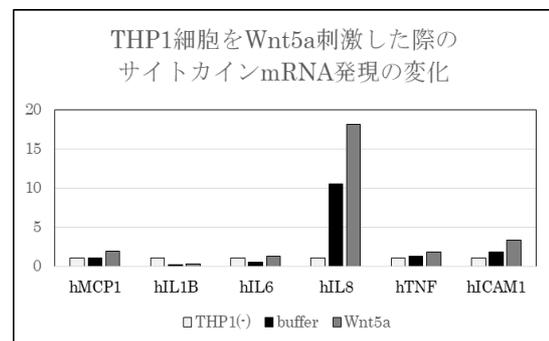
(2) Wnt-5a と高相関の遺伝子候補として Wnt-11, Wnt-5b, IL-6, IL-15, IL-23a, IL-32, TNFSF7, XCL-1, XCL-2, CXCL-1, CCL-5, CCL-20, CCL-26, MMP-1, MMP-2, MMP-12, CSF-2, FGF-5, FGF-19, IGF-2, VEGFC, PD-1 などが抽出された。

(3) PTGES (Prostaglandin E Synthase), PSTPIP2, SH3TC2, CECR5-AS1 などの遺伝子発現上昇が認められた。

グリオーマ U251 細胞を Wnt-5a 刺激した際に遺伝子発現が大きい遺伝子

遺伝子名	対照群	Wnt5a処理群	発現比
PTGES	17	325.96	19.174
PSTPIP2	17	124.09	7.299
SH3TC2	18.73	99.47	5.311
CECR5-AS1	22.49	106.96	4.756
XLOC_012978	17.49	82.46	4.715
LOC100507161	17	79.94	4.702
LIG3	54.96	254.25	4.626
EGR1	524.21	2359.67	4.501
XLOC_013809	17.49	78.46	4.486
ATG16L2	188	770.91	4.101

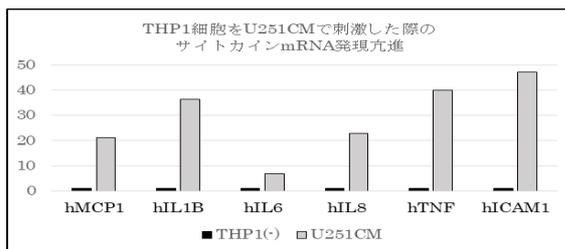
(4) 免疫チェックポイント関連遺伝子発現の著明な変化は認められなかった。



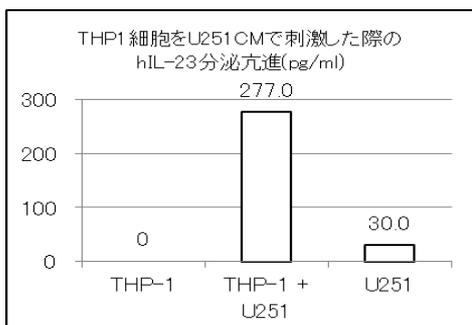
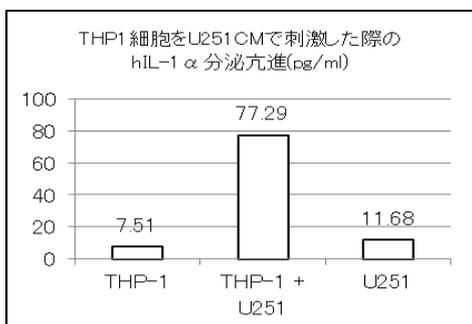
この結果を踏まえ、Wnt-5a と免疫の直接的関連についての検討は断念した。

(5) CM で刺激すると IL-1, IL-6, IL-8, ICAM-1, TNF, MCP-1 の遺伝子発現の変化がそれぞれ、35 倍、5 倍、25 倍、45 倍、40 倍、20 倍と著明に亢進していた。

さらに、あらかじめ U251 細胞と THP-1 細胞を同一容器で共培養して作成した培養上清を用いて、THP-1 を刺激すると上記の遺伝子発現やマトリクスメタロプロテアーゼ類(特に MMP-9)の亢進がさらに増強されることが明らかとなった。



(6) 群(共培養)では他の群と比較して、IL-1 が 10 倍多量、IL-6 が 4 倍、TNF が 10 倍分泌され、また、群では全く検出されなかった IL-23 が 多量に分泌されていることが明らかとなった。(5)、(6)より、サイトカインカスケードの亢進には共培養時に分泌更新する IL-1 や IL-23 が関与する可能性が高いと考え、(7)を実施した。



(7) IL-1 アンタゴニスト存在下で作製した U251 細胞培養上清で THP-1 細胞を刺激した場合、IL-8、IL-23、TNF、MCP-1、MMP-9 の発現に変化は認められなかった。さらに、IL-23 中和抗体存在下に U251 細胞培養上清で THP-1 細胞を刺激した場合、IL-8、IL-1、TNF、MCP-1、MMP-9 の発現に変化は認められなかった。よって、IL-1 や IL-23 が、腫瘍細胞とマクロファージの間の情報伝達に関与していると考えられる。

(8) 一次抗体の質をウェスタンブロット

で確認し、複数の抗体から非特異的反応の少ない一次抗体 (Rabbit Monoclonal Antibody [ab205921]) を選別し、免疫染色を再度実施した。染色性評価も、color deconvolution 法を用い、恣意性を排除して、コンピュータによる定量化を行った結果、初回手術、2 回目手術の標本の染色性共、カプランマイヤー法で生存期間との間に明確な関係を示さなかった。また、比例ハザードモデルを用いても、PD-L1 発現は、有意な生存期間影響因子ではなかった。この結果より、PD-L1 の免疫組織学的な発現の状態と膠芽腫患者の生存期間に関して、腫瘍組織中の PD-L1 発現が高ければ、腫瘍細胞が免疫機構から逃れ、結果、患者の生存期間が短くなるとの仮説が、膠芽腫患者においては成立していない可能性も示唆された。

まとめ

臨床データの分析によると、膠芽腫における Wnt5a と PD-L1 の発現の相関は弱く、PD-L1 の発現程度による膠芽腫患者の生存期間の差は明瞭ではなかった。

NCBI の Gene Expression Omnibus Database の解析では、Wnt-5a と高相関の遺伝子候補として PD-1 があったが、in vitro では Wnt5a 刺激による腫瘍細胞の mRNA レベルでの免疫抑制に関する遺伝子発現の変化は捉えられなかった。そこで、マクロファージを介した関与を見たが免疫チェックポイント関連遺伝子発現の著明な変化は認められなかった。このため、悪性グリオーマにおける Wnt-5a と免疫機構の直接的関連の探索は断念し、腫瘍とマクロファージの相互作用に関する研究へと方向を変えた。

グリオーマ細胞が産生するサイトカインのマクロファージへの作用に次いで、グリオーマ細胞とマクロファージが共存することにより、さらに強い相互作用が生じており、実際の腫瘍環境での MMP-9 発現の亢進、IL-1 や IL-23 の発現に対する相乗効果が予測された。

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 2 件)

Hirano H, Kawahara T, Niino M, Yonezawa H, Takajou T, Ohi Y, Kitazono I, Sakae K, Arita K: Anaplastic astrocytoma cells not detectable on autopsy following long-term temozolomide treatment: A case report. *Molecular and Clinical Oncology* 6: 321-326, 2017, 査読有

Moinuddin FM, Hirano H, Shinsato Y, Higa N, Arita K, Furukawa T: ATP7B expression in human glioblastoma is

related with temozolomide resistance.
Oncology letter 14: 7777-7782, 2017, 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

長期生存膠芽腫について 平野宏文, 内田裕之, 米澤大, 羽生未佳, 比嘉那優大, 有田和徳 第 34 回日本脳腫瘍学会, 2016/12/6 甲府

膠芽腫治療前後の MIB-1, PD-L1 染色性と生存期間に関する検討 平野宏文, 比嘉那優大, 米澤大, 内田裕之, 羽生未佳, 大吉達樹, 花谷亮典, 東拓一郎, 有田和徳 第 34 回日本脳腫瘍病理学会, 2016/5/27 東京

Improvement in treatment results of glioblastoma over the last three decades Hirofumi Hirano, Hiroto Kawano, Hiroyuki Uchida, Hajime Yonezawa, Mika Habu, Shingo Fujio, Tatsuki Oyoshi, Kazutaka Yatsushiro, Hitoshi Yamahata, Ryousuke Hanaya, Hiroshi Tokimura, Kazunori Arita
WFNS 2015, 2015/9/9 Rome

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 宏文 (HIRANO Hirofumi)
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号: 00264416

(2) 研究分担者

岸田 昭世 (KISHIDA Josei)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号: 50274064

米澤 大 (YONEZAWA Hajime)
鹿児島大学医歯学域附属病院・助教
研究者番号: 50550076

内田 裕之 (UCHIDA Hiroyuki)
鹿児島大学附属病院・特任助教
研究者番号: 80404482

有田 和徳 (ARITA Kazunori)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号: 90212646

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()