

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10346

研究課題名(和文) グリオーマ癌幹細胞を標的とした樹状細胞療法の開発に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on development of dendritic cell therapy targeting glioma cancer stem cells

研究代表者

浅井 昭雄 (ASAI, Akio)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：50231858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は難治性疾患で、新規治療法の開発が望まれる。治療抵抗性の原因として、がん幹細胞の存在が提唱されている。我々はグリオーマがん幹細胞を標的とした樹状細胞治療の開発を目指し、基礎実験を計画した。手術検体からグリオーマがん幹細胞を樹立し、免疫関連分子のプロファイルを行った。がん幹細胞にもHLA class 分子が発現し、T細胞に認識されうることを示した。膠芽腫に対する標準的治療薬であるテモゾロミドは、樹状細胞に対して生存率や炎症性サイトカインの産生能に影響を与えなかった。しかし、IL-10分泌を低下させ、アロMLR系で細胞傷害性T細胞の量的かつ質的に機能を増強することを示した。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma multiforme (GBM) is the most fatal malignant primary brain tumor. GBM contains functional subsets of cells called glioblastoma stem-like cells (GSCs), which are radioresistant and chemoresistant and eventually lead to tumor recurrence. We established GSCs lines and analyzed the expression of immune-associated molecules. GSCs lines were positive for MHC- , which indicated that GSCs can be recognized by T cells. Temozolomide (TMZ) is an oral alkylating agent with established anti-tumor activity in patients with GBM. We focused on the TMZ function and explored its influence on human dendritic cells (DCs) subsets. TMZ suppressed the secretion of IL-10 from DCs. Moreover, the addition of TMZ into peripheral blood mononuclear cells with DCs significantly enhanced the DC mediated ex vivo expansion and expression of cytotoxic molecules in CD8+ T cells. Our present findings suggest that TMZ is a potential anti-tumor reagent suitable for the combination use with DC-vaccine therapy.

研究分野：医学

キーワード：グリオーマ 膠芽腫 癌幹細胞 樹状細胞 免疫抑制 免疫治療 テモゾロミド

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (GBM) は難治性疾患の代表として知られている。集学的治療によっても、必ず再発し、腫瘍死は免れない。その中で近年、癌幹細胞が GBM に対する、新しい治療標的として注目されているが、癌幹細胞を標的とした治療はこれまでにいまだ開発されていない。我々はこれまでに免疫治療として、GBM に対して樹状細胞療法を行い、一定の効果をj得ている。しかし、抗原として使用する腫瘍細胞の量的限界があることや再発の原因となる癌幹細胞に対する特異性が低いという問題点がある。ヒト GBM 組織より、グリオーマ癌幹細胞株を樹立し、それを標的とした樹状細胞治療コンセプト確立のための基礎データの蓄積と新たな治療戦略を構築する必要があったと考えた。

2. 研究の目的

GBM の発生・再発のキーファクターである癌幹細胞を標的として、樹状細胞にて抗原特異的な抗腫瘍効果を、ヒト細胞を中心に据えたうえで、マウスにおける *in vivo* 解析や病態モデルでの応用といったトランスレーショナルな解析を行った。

3. 研究の方法

ヒト GBM の組織より neurosphere assay にてグリオーマ癌幹細胞を単離した。グリオーマ癌細胞の形質評価を網羅的に行った。特に、B7 family や TNF superfamily については、免疫応答の調整に関わっており、MES type と PN type での相違について解析した。In vitro で樹状細胞を用いて、癌幹細胞特異的なキラー T 細胞の誘導を行った。細胞傷害能についても比較検証した。GBM マウスモデルにおいて、癌幹細胞の lysate でプライミングを行った樹状細胞をマウスに皮下注射し、体内で癌幹細胞特異的なキラー T 細胞を誘導した。生存率の評価、腫瘍内浸潤リンパ球、自己免疫疾患発生の有無の評価を行った。

4. 研究成果

膠芽腫患者の腫瘍検体より neurosphere assay を用いてグリオーマ癌幹細胞株を単離した。グリオーマ癌幹細胞は、半永久的に継代可能で、癌幹細胞マーカーである CD133 や CD44 の発現を認めた。ヌードマウス脳に移植することで、脳腫瘍を形成した。グリオーマ癌幹細胞が、T 細胞免疫の標的になりうるかを検討するために、免疫関連分子の発現について網羅的に解析を行った。その結果、グリオーマ癌幹細胞は HLA-class 分子を発現しているため、T 細胞に認識されることがわかった(図 1)。

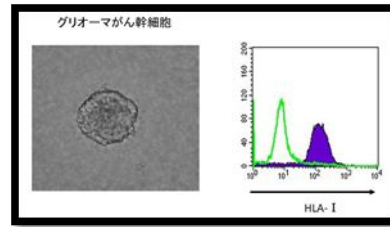


図 1 グリオーマ癌細胞における HLA-1 の発現

そこでグリオーマ癌幹細胞を抗原とした樹状細胞療法を開発することを計画した。現在、膠芽腫に対する標準的治療薬でテモゾロミドは、その副作用として免疫抑制が知られている。そこで、テモゾロミドが樹状細胞に与える影響について、*ex vivo* で解析を行った。健康人により末梢血中の樹状細胞を単離した。テモゾロミドが、樹状細胞の活性化や TH1 誘導の抗原提示能に影響がないことを確認した。一方でテモゾロミドは免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生を抑制した(図 2)。

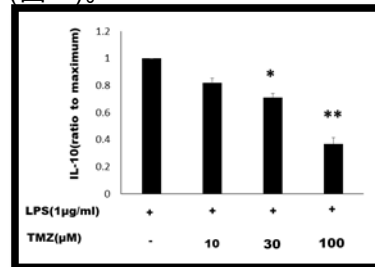


図 2 テモゾロミドは樹状細胞から産生される IL-10 を低下させる。

上記より、テモゾロミドは樹状細胞治療との相性が良い可能性が示唆された(図 3)。

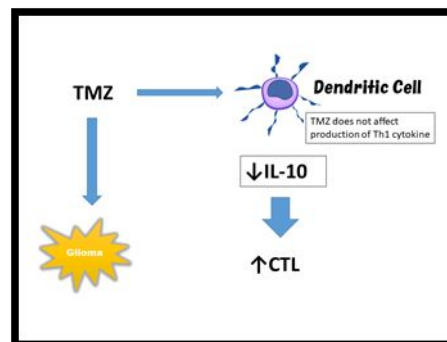


図 3 テモゾロミドと樹状細胞の関係

次にグリオーマ癌幹細胞を標的とした樹状細胞療法のモデルマウスを作成するために、syngeneic のグリオーママウスモデルを作成した。腫瘍組織内には浸潤 T 細胞が存在しているが、Foxp3 陽性の制御性 T 細胞が存在し、腫瘍内微小環境は免疫抑制されていることが示唆された。

本研究から、有効な樹状細胞治療を行うため

に有用な知見が得られた。

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)

転移性脳腫瘍とがん幹細胞の関連, Cytometry Research28 (1): 1-6, 2018. **岩田亮一**, 丸山正人, 大舟晃平, 中野洋輔, 大江総一, 林美樹夫, 吉村晋一, 埜中正博, **淺井昭雄** (in press) (査読無)

JCOG0911 INTEGRA study: a randomized screening phase II trial of interferon β plus temozolomide in comparison with temozolomide alone for newly diagnosed glioblastoma. J Neurooncol. 2018 (in press). Wakabayashi T, Natsume A, Mizusawa J, Katayama H, Fukuda H, Sumi M, Nishikawa R, Narita Y, Muragaki Y, Maruyama T, Ito T, Beppu T, Nakamura H, Kayama T, Sato S, Nagane M, Mishima K, Nakasu Y, Kurisu K, Yamasaki F, Sugiyama K, Onishi T, Iwadate Y, Terasaki M, Kobayashi H, Matsumura A, Ishikawa E, Sasaki H, Mukasa A, Matsuo T, Hirano H, Kumabe T, Shinoura N, Hashimoto N, Aoki T, **Asai A**, Abe T, Yoshino A, Arakawa Y, Asano K, Yoshimoto K, Shibui S; Members of Japan Clinical Oncology Group Brain Tumor Study Group (JCOG-BTSG). (査読有)

Enlarging pediatric ectopic Rathke's cleft cyst in the prepontine cistern: case report. J Neurosurg Pediatr. 2017 Nov;20(5):480-484. Kamei T, Nonaka M, Uemura Y, Yamanouchi Y, Komori Y, **Iwata R**, Takeda J, Hashiba T, Yoshimura K, **Asai A**. (査読有)

5-ALA fluorescence-guided endoscopic surgery for mixed germ cell tumors. J Neurooncol. 2017 Aug;134(1):119-124.

Takeda J, Nonaka M, Li Y, Komori Y, Kamei T, **Iwata R**, Hashiba T, Yoshimura K, **Asai A**. (査読有)

Establishment of a tumor sphere cell line from a metastatic brain neuroendocrine tumor. Med Mol Morphol. 2017 Dec;50(4):211-219. **Iwata R**, Maruyama M, **Ito T**, Nakano Y, Kanemura Y, Koike T, Oe S, Yoshimura K, Nonaka M, Nomura S, Sugimoto T, Yamada H, **Asai A**. (査読有)

Genome-wide methylation profiles in primary intracranial germ cell tumors indicate a primordial germ cell origin for germinomas. Acta Neuropathol. 2017 Mar;133(3):445-462. Fukushima S, Yamashita S, Kobayashi H, Takami H, Fukuoka K, Nakamura T, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura H, Totoki Y, Kato M, Suzuki T, Mishima K, Yanagisawa T, Mukasa A, Saito N, Kanamori M, Kumabe T, Tominaga T, Nagane M, Iuchi T, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Tamura K, Sakai K, Sugiyama K, Nakada M, Yokogami K, Takeshima H, Kanemura Y, Matsuda M, Matsumura A, Kurozumi K, Ueki K, Nonaka M, **Asai A**, Kawahara N, Hirose Y, Takayama T, Nakazato Y, Narita Y, Shibata T, Matsutani M, Ushijima T, Nishikawa R, Ichimura K; Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium (The iGCTConsortium) (査読有)

Serine/Threonine Kinase MLK4 Determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NF- κ B-dependent Manner. Cancer Cell. 2016 8(29):201-13. Kim SH, Ezhilarasan R, Phillips E, Gallego-Perez D, Sparks A, Taylor D, Ladner K, Furuta T, Sabit H, Chhipa R, Cho JH, Mohyeldin A, Beck S,

Kurozumi K, Kuroiwa T, **Iwata R**, **Asai A**, Kim J, Sulman EP, Cheng SY, Lee LJ, Nakada M, Guttridge D, DasGupta B, Goidts V, Bhat KP, Nakano I. (査読有)

Application of transpulmonary thermodilution monitoring (PiCCO) in patients with neurogenic pulmonary edema and acute obstructive hydrocephalus due to a central neurocytoma: A case report. Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management 2017, 8, 57-59. **R Iwata**, K Yoshimura, Y Fujita, T Uesaka, H Oshige, **A Asai** (査読有)

Hyperperfusion syndrome after clipping of an unruptured aneurysm by transsylvian approach: A Case Report. Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management. 2017, 8, 11-13. **R Iwata**, K Yoshimura, Y Fujita, T Uesaka, H Oshige, **A Asai** (査読有)

Recurrent neomorphic mutations of MTOR in central nervous system and testicular germ cell tumors may be targeted for therapy. Acta Neuropathol. 2016 Jun;131(6):889-901. Ichimura K, Fukushima S, Totoki Y, Matsushita Y, Otsuka A, Tomiyama A, Niwa T, Takami H, Nakamura T, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Mishima K, Nakazato Y, Hosoda F, Narita Y, Shibui S, Yoshida A, Mukasa A, Saito N, Kumabe T, Kanamori M, Tominaga T, Kobayashi K, Shimizu S, Nagane M, Iuchi T, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Tamura K, Maehara T, Sugiyama K, Nakada M, Sakai K, Kanemura Y, Nonaka M, **Asai A**, Yokogami K, Takeshima H, Kawahara N, Takayama T, Yao M, Kato M, Nakamura H, Hama N, Sakai R, Ushijima T, Matsutani M, Shibata

T, Nishikawa R; Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium. (査読有)

治療後長期間生存している悪性視神経腫の1例, 臨床眼科, 2016.70.1473-1478.藤原望, 中内正志, 正健一郎, 山田晴彦, 最所千晶, **岩田亮一**, 亀井孝昌, **淺井昭雄**, 高橋寛二 (査読有)

[学会発表](計10件)

膠芽腫幹細胞様細胞における内向き整流性Kチャンネルの機能発現
林美樹夫, **岩田亮一**, アンダリアナーツ, 大舟晃平, 吉村晋一, 埜中正博, **淺井昭雄**, 松田博子

第95回日本生理学会大会、香川、2017年
グリオーマがん幹細胞に対する非選択性陽イオンチャンネルを標的とした治療効果
岩田亮一, 大舟晃平, 林美樹夫, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 埜中正博, 松田博子, **淺井昭雄**
第35回日本脳腫瘍学会学術集会、高松、2017年11月

非選択性陽イオンチャンネルを標的とした悪性脳腫瘍の治療法の開発
大舟晃平, **岩田亮一**, 林美樹夫, 吉村晋一, 埜中正博, 松田博子, **淺井昭雄**
第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、岐阜、2017年9月

転移性脳腫瘍からのがん幹細胞株樹立
岩田亮一, 丸山正人, 中野洋輔, 小池太郎, 大江聡一, 吉村晋一, 埜中正博, 杉本哲夫, 山田久夫, **淺井昭雄**
第27回日本サイトメトリー学会学術集会、神戸、2017年6月

神経内分泌腫瘍の転移脳組織からの癌幹細胞
岩田亮一, 丸山正人, **伊藤量基**, 中野洋輔, 小池太郎, 大江聡一, 吉村晋一, 埜中正博, 野村昌作, 杉本哲夫, 山田久夫, **淺井昭雄**
第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、岐阜、2017年9月

ヒト神経膠芽腫由来U87MG細胞から樹立した高い腫瘍形成能を持つスフェロイドはPC3-Secreted Microproteinを高発現する
丸山正人, 中野洋輔, **岩田亮一**, 加瀬政彦, 杉本哲夫

Conbio2017(生命科学系学会合同年次大会: 第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会) 神戸、2017年12月

Effect of Temozolomide on Brain Metastasis of neuroendocrine carcinoma.

Ryoichi Iwata, Masato Maruyama, **Tomoki Ito**, Yoko Fujita, Yoshiyuki Matsuo, Yosuke Nakano, Kunikazu Yoshimura, Masahiro

Nonaka, Kiichi Hirota, Shosaku Nomura, Tetsuo Sugimoto, **Akio Asai**. The 13th Asian Society for Neuro-oncology (ASNO) Meeting. Sydney, Australia, 2016.9.11-14

Therapeutical Doses of Temozolomide Inhibit IL-10 Production by Dendritic Cells and Enhance the CTL Response. **Akio Asai**, **Ryoichi Iwata**, **Tomoki Ito**, Muneo Inaba, Noriko Katashiba, Kayoko Kibata, Akihiro Tanaka, Shosaku Nomura. The 21st International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. Okinawa, Japan, 2016.4.10-13

内視鏡下 5 アミノレブリン酸 (5-ALA) 蛍光診断 (PDD) ~ 連続 45 症例の検討 ~.

武田純一, 埜中正博, 亀井孝昌, **岩田亮一**, 羽柴哲夫, 吉村晋一, **浅井昭雄**

第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、山梨、2016 年 12 月

脊髓空洞症を伴い蝶形骨縁髄膜腫類似の画像を呈した膠芽腫の 1 例. 大重英行, 岩瀬正顕, 山原崇弘, 須山武裕, **浅井昭雄**

第 40 回日本脳神経 CI 学会総会、鹿児島、2016 年 3 月

〔図書〕(計 1 件)

転移性脳腫瘍の治療, 日本臨牀 74 巻増刊号 7 脳腫瘍学 基礎研究と臨床研究の進歩, **岩田亮一**, **浅井昭雄**

〔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 : 特になし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
浅井 昭雄 (ASAI, Akio)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 50231858

(2) 研究分担者

伊藤 量基 (ITO, Tomoki)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 70434826

岩田 亮一 (IWATA, Ryoichi)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 60580446