

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16280

研究課題名（和文）小児脳腫瘍に対する新規樹状細胞治療における抗原提示機序の分子免疫学的解析

研究課題名（英文）Immunomolecular study of the dendritic cell therapy in pediatric brain tumor

研究代表者

山岡 正慶（Yamaoka, Masayoshi）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70614874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は小児脳腫瘍に対する免疫療法の奏効機序を明らかにしより効果的な治療法を確立することを目的としている。今回、樹状細胞療法を施行した難治性小児脳腫瘍症例を対象に分子免疫学的な解析を試みた。その結果、小児脳腫瘍の中でも上衣腫がWT1などの特定の腫瘍関連ペプチドが他の癌腫と異なった発現パターンを呈していることを見出した。また、本免疫療法が奏効している上衣腫症例を対象に全エクソン解析および全トランスクリプトーム解析にて腫瘍特異的な変異型蛋白リストを作成した。変異ペプチドとHLAとの結合能を予測し、ネオアンチゲンの候補となる分子を選定することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児脳腫瘍はその希少性と多様性から治療の標準化が困難とされるが、我々は自家腫瘍細胞と樹状細胞を用いた新規免疫療法の奏効例を通して、治療標的となりうる腫瘍特異的ペプチドの候補を見出すことができ、自家樹状細胞を用いた個別化された免疫療法の有用性が示唆された。本研究によって融合細胞を用いた新規樹状細胞療法が確立され、より効果的な治療法や免疫モニタリング法が開発されれば、後遺症なき救命を目指した小児脳腫瘍の個別化治療を可能とする新たながん免疫治療の実現への大きな一歩となる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the response mechanism of immunotherapy for pediatric brain tumors and to establish a more effective treatment method. We performed the molecular immunological analysis of refractory pediatric brain tumor treated with dendritic cell therapy. As a result, we found that a specific tumor-associated peptide showed a different expression pattern in ependymomas from other tumors. In addition, a tumor-specific peptide list was prepared by exome and transcriptome analysis for ependymoma cases for which this immunotherapy was clinically effective. By predicting the binding ability between the mutant peptide and HLA, it was possible to select a molecule as a candidate for neoantigen.

研究分野：小児科学

キーワード：小児脳腫瘍 樹状細胞 免疫治療 抗原提示 ネオアンチゲン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の診断・治療技術の著しい進歩により小児がんの長期生存率は目覚ましく向上した。しかし、脳腫瘍は未だに難治なものも多く、救命出来ても重篤な後遺症をもたらすことで知られる。脳腫瘍の子どもたちの『救命と Quality of Life (QOL) の向上』は全世界共通の急務である。しかし、小児脳腫瘍はその希少性と多様性から治療の標準化が非常に困難とされる。特に発達期の脳に対する放射線治療の影響は無視できず、将来の QOL 低下を鑑みて照射を選択されない場合も多く、治療選択に難渋する。

近年、がん治療における新戦略として、免疫療法が注目を集めているが、小児固形腫瘍においては腫瘍細胞における遺伝子変異は少なく抗原特異性が低いため、免疫チェックポイント阻害剤等のがん免疫療法の効果は期待できない可能性が示唆された。

そこで我々は疾患ごとに共通した腫瘍抗原や免疫制御機構を標的とした治療開発は小児には不向きであると考え、個々人の腫瘍と樹状細胞を用いた融合細胞ワクチン療法の開発を開始した。先行研究として成人悪性神経膠腫に対して同治療を行い一定の効果を確認しており、今回小児脳腫瘍に対する融合細胞を用いた樹状細胞ワクチン療法は世界初の試みであり、この臨床検体を用いて、抗腫瘍効果をもたらすための分子機構を解明すべく研究の立案に至った。

### 2. 研究の目的

腫瘍細胞と自家樹状細胞を用いた融合細胞療法における奏効機序の詳細な分子基盤を明らかにし、より効率的な治療法の開発や治療奏効群の予測を可能にすることを目標とする。具体的には本免疫療法によってどのような分子が腫瘍抗原として認識され、抗腫瘍効果をもたらしているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では小児脳腫瘍に対する免疫療法における Key molecule を見出すべく、主に下記の3つの手法を用いて免疫学的な解析を行った。

過去の上衣腫および髄芽腫の腫瘍検体を用いた免疫組織学的腫瘍抗原解析

実際に免疫療法（融合細胞治療）を行った症例の腫瘍検体を用いた腫瘍抗原解析

患者末梢血単核球から作成した誘導マイクログリアを用いた貪食実験

なお、本研究の申請段階では一部の部分は免疫治療前後の患者 T 細胞を用いたレパトア解析を試みる予定であったが、その後、末梢血を用いたレパトア解析の有用性の限界が明らかとなり、本研究では適切でないと判断し、腫瘍内微小環境を解析するための手法の一助として末梢血誘導マイクログリアを用いた研究に変更とした。

#### 免疫組織学的腫瘍抗原解析

東京慈恵医会医科大学属病院にて治療を行った小児脳腫瘍の腫瘍検体（ホルマリン固定パラフィン包埋標本）を対象に、方法：CD4、CD8、CD56、CD68、Iba-1、HLA-class 1、HLA-class 2、WT-1 等を癌腫別の蛋白発現の差異を免疫組織化学的手法にて解析する。

#### 腫瘍検体を用いた腫瘍抗原解析

本解析には融合細胞療法を行い臨床的に効果的であった上衣腫症例の培養腫瘍細胞を用いる。次世代シーケンサー（TorrentSuite5.0, ThermoFisher）により全エクソン解析から遺伝子変異情報、全トランスクリプトーム解析から遺伝子発現情報を取得し、発現している変異型ペプチドと HLA との結合能を NetMHCpan version 3.0 を用いて検討する。野生型ペプチドよりも強い結合能が予測された変異型ペプチドを腫瘍変異候補とし、その遺伝子変異や発現をサンガー法シーケンスや quantitative RT-PCR 等で評価する。

#### 患者由来誘導マイクログリアを用いた腫瘍貪食実験

ボランティアおよび融合細胞療法を行った小児脳腫瘍症例の末梢血単核球から CD11b 磁気ビーズを用いて単球のみを分離し、各種サイトカイン（IL-34・GM-CSF 等）を添加し培養し誘導マイクログリアを作成する。フローサイトメトリー法にて P2RY12 の発現の有無にてマイクログリア分化を確認し、腫瘍細胞と共培養し、貪食能を確認する。貪食能の評価は目視による形態評価とする。

### 4. 研究成果

#### 免疫組織学的腫瘍抗原解析

当院で治療した上衣腫 10 例と髄芽腫 7 例の腫瘍検体を用いて上記の免疫染色を行った。上衣腫は 10 例全てにおいて WT1 の高度な発現が確認された一方、髄芽腫では WT1 は血管内皮のみで腫瘍細胞における発現が見られなかった。また、T 細胞やマイクログリア等の免疫担当細胞の分布においても、上衣腫で特に腫瘍組織内の細胞浸潤を認めた。以上より、上衣腫の腫瘍内微小環境における腫瘍免疫的 Key player が明らかとなり、小児脳腫瘍、特に上衣腫に対するがん免疫療法への期待が高まった。

#### 腫瘍検体を用いた腫瘍抗原解析

融合細胞療法が臨床的に奏効した患者由来の上皮腫細胞を用いた全エクソン解析より 2557 の遺伝子変異を認め、そのうち全トランスクリプトーム解析で対応する遺伝子発現を持つ変異型アミノ酸を同定し、HLA-A と高い結合能を示す 9mer 変異型ペプチドは 361 個あり、その中でも対応する野生型ペプチドよりの高い結合能を有す変異型ペプチドが 16 個検出され、これらが抗原提示の標的となるネオアンチゲンである可能性が示唆された。実際に患者リンパ球がこのペプチドに反応した免疫反応が起きるかの免疫誘導試験は今回の解析では行うことが出来ず、今後の検討課題となった。

#### 患者由来誘導ミクログリアを用いた腫瘍貪食実験

まずは健常ボランティアの末梢血を用いて、誘導ミクログリアの作成を試みた。3 回施行し、いずれも培養開始から 7~10 日目に形態的にミクログリア様細胞への分化を認めた。次にフローサイトメトリーによる表面抗原解析にてミクログリア様細胞で P2RY12 が優位に発現していることを確認でき、誘導ミクログリア細胞の作成に成功したことを確認した。その後、培養腫瘍細胞（髄芽腫）との共培養を行い、形態的に細胞融合（=貪食）が起きたことを確認した。

これらの解析を通して、腫瘍免疫の誘導に関わる Key molecule の候補を同定することが出来、小児脳腫瘍に対する腫瘍細胞と自家樹状細胞の融合細胞療法における奏功機序の一端を見出すことが出来た。特に上皮腫においては免疫治療の標的となる分子として WT1 やその他の新規ペプチドが候補となる可能性が示唆された。また、患者末梢血から誘導ミクログリアを分化・誘導することに成功し、より効果的な腫瘍免疫を誘導するための腫瘍内微少環境の免疫モニタリングツールとして活用できる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukuoka Kohei, Kanemura Yonehiro, Yamaoka Masayoshi et al	4. 巻 6
2. 論文標題 Significance of molecular classification of ependymomas: C11orf95-RELA fusion-negative supratentorial ependymomas are a heterogeneous group of tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-018-0630-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama Masaharu, Yamaoka Masayoshi, Ohyama Wataru, Yokoi Kentaro, Ashizuka Shuichi, Aizawa Daisuke, Ikegami Masahiro, Suzuki Hideaki, Ozaki Koji, Ida Hiroyuki, Yuza Yuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic Profile and Microsatellite Instability in a Case of Secondary Esophageal Squamous Cell Carcinoma 12 Years After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Aplastic Anemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPH.0000000000001355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoka Masayoshi, Akiyama Masaharu, Ohyama Wataru, Tachimoto Hiroshi, Matsumoto Kenji	4. 巻 60
2. 論文標題 Acute lymphoblastic leukemia with hypereosinophilia in a 3-year-old boy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 88～90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.13454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamaoka M, Yamamoto S, Hashii Y, Hara J, Adachi S, Sakashita K, Inoue M, Yanagisawa T, Atsuta Y, Matsumoto K
2. 発表標題 High-dose chemotherapy (HDC) with autologous haematopoietic progenitor cell rescue for recurrent central nervous system germ cell tumours (CNS-GCTs)
3. 学会等名 The 50th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山岡正慶、本多隆也、村木國夫、花田琴絵、横井健太郎、秋山政晴、野中雄一郎、柳澤隆昭、井田博幸
2. 発表標題 視床下部障害による高体温から多臓器不全を発症した小児視神経膠腫2例
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岡正慶、本多隆也、横井健太郎、野中雄一郎、秋山政晴、柳澤隆昭
2. 発表標題 眼球突出を主訴に診断に至った小児腫瘍性疾患11例
3. 学会等名 第35回日本眼腫瘍学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山岡正慶、本多隆也、横井健太郎、野中雄一郎、秋山政晴、柳澤隆昭
2. 発表標題 Survival and functional outcome of childhood intramedullary spinal cord low grade gliomas initially treated chemotherapy: A successful management
3. 学会等名 第59回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山岡正慶、本多隆也、横井健太郎、秋山政晴、野中雄一郎、赤崎安晴、柳澤隆昭
2. 発表標題 小児・若年成人発症視床神経膠腫の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山岡正慶、本多隆也、横井健太郎、野中雄一郎、秋山政晴、鈴木智成、西川亮、柳澤隆昭
2. 発表標題 再発中枢神経系Germinomaに対する造血幹細胞移植併用大量化学療法
3. 学会等名 第40回造血細胞移植学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 監修 栗原敏、監訳 大橋十也、岡野ジェイムス洋尚、本郷賢一、横尾隆、翻訳 山岡正慶 他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 518
3. 書名 イラストレイテッド 総合臨床基礎医学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考