

令和元年6月19日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16661

研究課題名(和文)脳腫瘍幹細胞に対するDEPDC1を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new treatment for brain tumor stem cells

研究代表者

菊地 亮吾(Kikuchi, Ryogo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：10594723

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): 脳腫瘍幹細胞を用いたモデルマウスにおいて、DEPDC1を抑制させると、腫瘍内でのアポトーシス/ネクローシス細胞の増加が認められ、著明な生存期間の延長を認めた。CD4, CD8陽性のリンパ球が腫瘍周囲に増殖しており、DEPDC1の抑制が腫瘍の免疫寛容を阻害する可能性を示した。

GL261を用いたモデルマウスにおける治療実験として、ペプチドワクチンとPD-1抗体を併用することで、腫瘍増殖の抑制と生存期間の延長が確認された。免疫染色を用いた解析でPD-1抗体併用によりT細胞浸潤が増加する可能性が示された。

臨床応用に向け、DEPDC1の機能・ワクチンの投与方法に対する知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性脳腫瘍の代表格である膠芽腫の標準治療は、最大限の手術摘出と、引き続きtemozolomideを用いた化学療法と放射線療法を組み合わせた集学的療法であるが、近年でもその生存予後は1.5年程度と過去数十年間ほとんど改善していない。特に術前画像・術中所見にて判別できない正常脳への腫瘍細胞の浸潤が問題で、腫瘍特異的に作用する新たな分子標的療法の開発が望まれる。本研究では腫瘍幹細胞の発現する腫瘍抗原DEPDC1と、標的分子に対するペプチドワクチンに着目し、DEPDC1を用いたペプチドワクチンの臨床応用に向け基礎研究を行なった。

研究成果の概要(英文): DEPDC1 knockdown prolonged overall survival and increased apoptosis / necrosis cells. Immunohistochemical staining showed that CD4 or CD8 positive lymphocytes proliferated around the tumor, suggesting that suppression of DEPDC1 might inhibit tumor immune tolerance.

Treatment experiments were conducted in brain tumor mouse model using GL261. The combined therapy of the peptide vaccine and the PD-1 antibody confirmed suppression of tumor growth and prolongation of survival time. Analysis using immunohistochemical staining suggested that PD-1 antibody combination may increase T cell infiltration.

Our data suggested potential of clinical application using peptide vaccine.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍幹細胞 ペプチドワクチン DEPDC1 PD-1抗体

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍の代表格である膠芽腫の標準治療は、脱落症状を呈さない範囲での最大限の手術摘出と、引き続き temozolomide を用いた化学療法と放射線療法を組み合わせた集学的療法であるが、近年でもその生存予後は 1.5 年程度と過去数十年間ほとんど改善していない。

臨床においては特に術前画像・術中所見にて判別できない正常脳への腫瘍細胞の浸潤が問題であり、これに対して腫瘍特異的に作用する新たな分子標的療法の開発が望まれる。昨今のがん研究の進展により、腫瘍に含まれるごくわずかな腫瘍幹細胞が、腫瘍の発生と維持、そして治療抵抗性に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。さらに脳腫瘍幹細胞 (BTSC) は周辺脳実質に強く浸潤する性質を有し、実臨床での治療効果を改善するためには、周辺脳に浸潤する BTSC の根絶が、最重要課題であると考えられる。我々はこれまで、BTSC および悪性神経膠腫に発現する腫瘍抗原のうち、特に BTSC に高発現する分子に注目し研究を行ってきた。DEPDC1 (DEP domain containing 1) は新規腫瘍抗原の一分子であるが、悪性神経膠腫および BTSC に発現し、NF- κ B シグナルを介して腫瘍増殖に関わることを示し、分子標的療法のよい標的と考えられる。

2. 研究の目的

DEPDC1 の脳腫瘍幹細胞における機能解析を行い、マウスを用いた治療実験と作用機序の解明に加え、新規治療、特にペプチドワクチンと併用療法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) DEPDC1 の誘導脳腫瘍幹細胞 (imBTSC) における *in vitro* 機能解析
glioma 細胞において、DEPDC1 が NF- κ B シグナルを介して細胞増殖に影響していることが確認されている。BTSC における機能解析を行った。imBTSC として、Ink4a/Arf 遺伝子欠損のマウス神経幹細胞に H-RasV12 遺伝子を導入した細胞の供与を受け、使用した。shRNA を用いて DEPDC1 を knockdown した。Western blot を cell titer glo を用いた *in vitro* における増殖実験を行った。

(2) 脳腫瘍幹細胞を用いた膠芽腫マウスモデルにおける DEPDC1 の機能解析
imBTSC を用いた免疫正常な膠芽腫マウスモデルにおいて DEPDC1 の抑制が腫瘍細胞の Apoptosis/Necrosis に関わっていると思われる *in vivo* における機能解析を行った。shRNA を用いて DEPDC1 を knockdown した imBTSC を C57/BL6 マウス脳に移植し膠芽腫マウスモデルを作成した。生存期間を control 群と比較した。さらに摘出腫瘍の免疫染色を行い、免疫細胞の浸潤程度を解析した。

(3) GL261 を用いた膠芽腫マウスモデルを用いたペプチドワクチンと PD-1 抗体併用実験
ヒト glioma でのペプチドワクチンと PD-1 抗体の併用療法を動物モデルにおいて検討するため、マウス glioma 細胞株である GL261 を用いた膠芽腫マウスモデルを作成し、GL261 の腫瘍抗原である GARC-1 をモデル抗原として用い、ペプチドワクチンの投与と PD-1 抗体の影響を確認した。

ワクチン投与時期の検討

GL261 を C57/BL6 マウス脳内に移植する。まずワクチン皮下投与の効果検討を行うため、投与日を各種設定し、control 群と GARC-1 ペプチドワクチン投与群での生存期間の比較を行った。

ワクチンアジュバントの検討

ワクチンのアジュバントとして、Montanide ISA51 および poly(I:C) を比較して使用し、ワクチン投与効果の比較を行った。

ワクチンと PD-1 抗体投与併用効果の検討

ワクチン投与群、PD-1 抗体投与併用群との生存期間の比較を行い、組織中の T 細胞浸潤の変化や、PD-1、PD-L1 の発現の変化を免疫染色を用いて比較した。

4. 研究成果

(1) DEPDC1 の誘導脳腫瘍幹細胞(imBTSC)における in vitro 機能解析

誘導脳腫瘍幹細胞(imBTSC)に対し、shRNA を用いて DEPDC1 を knockdown し、発現が抑制されていることを western blot で確認した(図 1)。作成した shDEPDC1-imBTSC の in vitro における増殖実験を行ったところ、DEPDC1 を抑制することで、むしろ imBTSC の増殖が促進されることが確認された。



図 1 imBTSC における DEPDC1 knockdown の効果

(2) 脳腫瘍幹細胞を用いた膠芽腫マウスモデルにおける DEPDC1 の機能解析

in vivo における増殖実験として shDEPDC1-imBTSC を C57/BL6 マウス脳に移植し、生存期間を control 群と比較した。腫瘍内において Apoptosis/Necrosis 細胞の増加が認められ、著明な生存期間の延長が確認された(図 2)。免疫染色を行うと、CD4, CD8 陽性のリンパ球が腫瘍周囲に増殖しており、DEPDC1 の抑制が腫瘍の免疫寛容を阻害する可能性が示唆された。

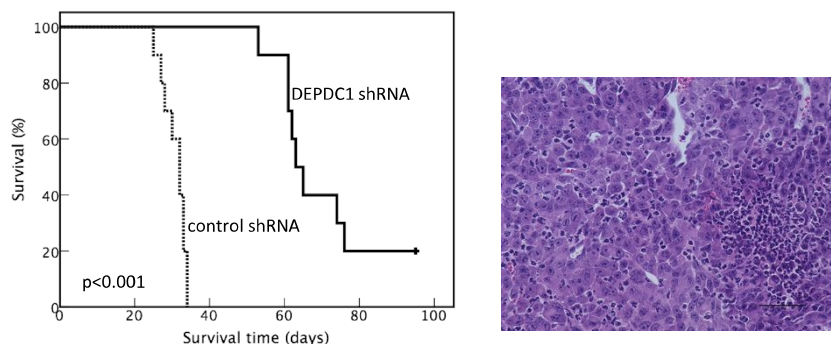


図 2. imBTSC 移植マウスの生存曲線と DEPDC1 抑制群での腫瘍組織

(3) GL261 を用いた膠芽腫マウスモデルを用いたペプチドワクチンと PD-1 抗体併用実験

継代された GL261 に GARC-1 が発現しているかを PCR で確認した。次に GL261 を C57/BL6 マウス脳内に移植し、ワクチン皮下投与の効果検討を行うため、安定したモデル作成ができることを確認した。

次に投与日を数種類設定し、control 群と GARC-1 ペプチドワクチン投与群での生存期間の比較を行った。Day 7, 14 の投与のみではワクチンの効果がないため、day3 も追加することとした。並行してアジュバントの検討を行い、Montanide ではなく Poly(I:C)の方が安定したワクチン効果が認められることを確認し、GARC-1 ペプチドワクチン投与によりモデルマウスの生存延長効果が確認できた。

これらの結果を踏まえ、ペプチドワクチンと PD-1 抗体の併用実験を行った。PD-1 抗体を併用することで、腫瘍増殖の抑制と生存期間の延長が確認された。また免疫染色を用いた解析で PD-1 抗体併用により T 細胞浸潤が増加する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kikuchi R, Ueda R, Saito K, Shibao S, Nagashima H, Tamura R, Morimoto Y, Sasaki H, Noji S, Kawakami Y, Yoshida K, Toda M.

A Pilot Study of Vaccine Therapy with Multiple Glioma Oncoantigen/Glioma Angiogenesis-Associated Antigen Peptides for Patients with Recurrent/Progressive High-Grade Glioma.

J Clin Med. 2019 Feb 20;8(2). pii: E263. doi: 10.3390/jcm8020263. (査読あり)

Kikuchi R, Sampetean O, Saya H, Yoshida K, Toda M.

Functional analysis of the DEPDC1 oncoantigen in malignant glioma and brain tumor initiating cells.

J Neurooncol. 2017 Jun;133(2):297-307. doi: 10.1007/s11060-017-2457-1. (査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

Ryogo Kikuchi, et al.

Clinical Trial of Peptide Vaccination for Patients with Malignant Glioma

第14回アジア脳腫瘍学会議, 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。