

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18437

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対する複合免疫療法と高内皮細静脈(HEV)様組織の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of high endothelial venule and immunotherapeutic approach for malignant glioma

研究代表者

吉田 啓佑 (YOSHIDA, Keisuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10836737

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)：悪性神経膠腫に対して、VEGFRペプチドワクチン+免疫チェックポイント阻害剤の併用療法により脳内で高内皮細静脈(HEV)様の組織が誘導され、免疫担当細胞を動員している可能性を得た。グリオーママウス細胞株(GL261 ffLuc)、マウスグリオーマ幹細胞株(TSG ffLuc)モデルに対して併用療法下での腫瘍増大抑制効果とOS延長を確認した。同プロトコールにHEV阻害剤を追加した結果、生存期間の延長を阻害され、HEVの寄与が疑われた。また脳切片上で抗MECA-79抗体により同定されるHEV様静脈との相関などを解析した。しかし、HEV様細静脈のみを効率よく単離することは困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、通常リンパ節が存在しない中枢神経に生じる腫瘍内の高内皮細静脈(HEV)様細静脈の果たす役割を解明するものである。悪性神経膠腫に対して、VEGF受容体に対する免疫療法+免疫チェックポイント阻害剤の併用療法により通常リンパ節が存在しない脳内で高内皮細静脈(HEV)様の組織が誘導され、細胞障害性T細胞等の免疫担当細胞を動員している可能性が示唆された。頭蓋内におけるHEV様静脈に関する報告はほとんど認めず、その存在・機能等不明な点が多い。HEV様静脈は細胞障害性T細胞を動員する核となりうるため、悪性神経膠腫内にHEV様静脈を誘導することが、各種免疫療法のブレイクスルーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that combination strategy with VEGFR peptide vaccine and immune checkpoint inhibitor can induce high endothelial venules (HEVs) in the brain of glioma mouse model. Survival of mouse glioma model and mouse glioma stem cell model were prolonged by this combination strategy. Histopathological analysis showed that tumor-associated HEVs are major sites of lymphocyte entry into tumors. Tumor-associated HEVs were detected around tumor cells using anti-MECA-79 antibody. This study have demonstrated the importance of HEVs for the immunotherapy against the central nervous system tumors.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：悪性神経膠腫 高内皮細静脈様細静脈 HEV VEGFR PD-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1992年にPD-1/PD-L1免疫チェックポイントが報告されてから、癌に対する免疫治療が再び注目を浴びている[Iwai Y. *J Exp Med.* 2003; Freeman GJ. *J Exp Med.* 2000]。しかし、最難治の脳腫瘍として知られる悪性神経膠腫に対して免疫療法は、著明な効果を上げるに至っていない。そもそも中枢神経系は、内皮細胞間の強固なtight junctionにより血液脳関門が構築されるため、免疫学的に遮断された環境であることが大きな要因の一つである。申請者は現在までに、継続して悪性神経膠腫に対する血管新生及び、それに伴う腫瘍免疫環境について研究を続けており、悪性神経膠腫内部に生じる、血管新生及びそれに伴う免疫担当細胞のheterogeneityを報告してきた[Tamura R. *J Neurooncol.* 2018; Tamura R. *World Neurosurg.* 2018]。さらに申請者は、血管新生を引き起こすVEGF receptor (VEGFR)をターゲットとしたペプチドワクチンの臨床研究を行っている[Shibao S. *Oncotarget.* 2018]。その中で、申請者は、ペプチドワクチンにより誘導された細胞障害性T細胞(CTL)が、VEGFR1/2を発現した腫瘍血管内皮細胞に加えて、VEGFR1を発現した腫瘍細胞、さらにVEGFR2を発現した制御性T細胞をターゲットとし多種に渡る細胞に対してアポトーシスを誘導していることを、実際のヒト悪性神経膠腫に対するin situ observationにより明らかにしており、現在頻用されている抗VEGF-Aモノクローナル抗体Bevacizumabの副作用、薬剤抵抗性等の欠点を克服する治療薬としての有用性を示した(論文投稿準備中)。現在申請者は、VEGFR peptide vaccineを抗PD-1抗体と併用することにより、悪性神経膠腫(グリオーマ)モデルマウスに対してさらに有意に生存期間を延長させることを明らかにした。さらに、通常二次リンパ組織に存在し、脳内にはほとんど認めないはずの高内皮細静脈(HEV)と同様の形態を有する細静脈(HEV様静脈)が腫瘍内に誘導され、さらにそれは、抗PD-1抗体との併用により著明に増加し、腫瘍の縮小効果と相関をもつ可能性が示唆された(論文投稿準備中)。HEVは、CTL動員の核となり、現在までにリンパ球ホーミングのためのL-セレクチン等の接着因子について多く研究されており、免疫環境の変化や、慢性炎症等の環境にて大きく亢進・低下することが知られている[Miyasaka M. *Nat. Rev. Immunol.* 2014]。中枢神経系に通常リンパ節は認めないため、グリオーマにおけるHEVの研究はほとんどなく、このHEV様静脈の存在、果たす機能に関しては不明な点が多く、本研究は基礎・臨床の両側面から、その解明を目指すものである。申請者は、予備実験により、中枢神経系においても、HEV様静脈の形成調節が適切なリンパ球動員と免疫応答を誘導する鍵となりうると考えており、悪性神経膠腫の新たな治療ストラテジーの構築を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、通常リンパ節が存在しない中枢神経に生じる腫瘍内の高内皮細静脈(HEV)様細静脈の果たす役割を解明するものである。悪性神経膠腫に対して、VEGF受容体に対する免疫療法+免疫チェックポイント阻害剤の併用療法により通常リンパ節が存在しない脳内で高内皮細静脈(HEV)様の組織が誘導され、細胞障害性T細胞等の免疫担当細胞を動員している可能性が示唆された。頭蓋内におけるHEV様静脈に関する報告はほとんど認めないため、その存在・機能等不明な点が多い。HEV様静脈は細胞障害性T細胞を動員する核となりうるため、悪性神経膠腫内にHEV様静脈を誘導することが、各種免疫療法のブレイクスルーとなる可能性がある。本研究において、まずマウス脳腫瘍内に誘導されたHEV様静脈を特異的マーカーにて単離し、遺伝子プロファイル解析を行うことで、その性質を解析する。さらに、HEVに対する阻害剤を投与することで、HEV様静脈の免疫療法に対し果たす機能を解析する。最後に実際に同免疫療法を行ったヒト悪性神経膠腫検体を用いて、ヒト組織におけるHEV様静脈の存在、または予後に与える影響を解析する。現在まで悪性神経膠腫に対する免疫療法は、著明な効果を上げるに至っていないが、本研究により、中枢神経系においても、HEV様静脈の形成調節が適切なリンパ球動員と免疫応答を誘導する鍵となりうることを解明し、悪性神経膠腫の新たな治療ストラテジーの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) HEV様細静脈の単離と次世代シーケンサーによる遺伝子プロファイル解析

リンパ節とパイエル板ではHEVに発現するコアタンパク質が異なることが報告されており[Uchimura K. *Nat. Immunol.* 2005; Izawa D. *Int Immunol.* 1999]、今回申請者が予備実験で得ているグリオーマモデルマウスに対して血管新生阻害薬及び免疫チェックポイント阻害剤使用下で生じるHEV様細静脈の性質・機能を明らかにするため、まずHEV様細静脈の単離を行う。HEV様細静脈は主に腫瘍内に分布するため、グリオーマモデルマウスを作製するが、使用する細胞は同種由来のマウスグリオーマ細胞株GL261、及びマウスグリオーマ幹細胞株TSGである。両細胞株にffLuc発現レンチウイルスベクター(CSII-EF-ffLuc)を感染させ、セルソーターによるクローンソートを行い、ffLucが安定高発現する細胞株を既に得ている。両細胞株を1×10⁵個C57/BL6マウスの右線条体に移植(Day 0)。その後Day2、9、16にVEGFR2-peptide vaccineを腋下リンパ節に投与。Day12、16、19に抗PD-1抗体(CD279)を腹腔内投与する。コントロールとして、無治療群、VEGFR2-peptide vaccineのみ投与群、抗PD-1抗体のみ投与群も作製する。IVIS生体イメージングシステムを用いて、腫瘍の増大を1週間後ごとに観察する。イメージングにより判定される抗腫瘍効果と、断頭下で得られた脳切片上で抗MECA-79抗体(sc-19602, Santa Cruz Biotechnology)により同定されるHEV様静脈との相関を解析する。申請者の予備実験では、HEV

様細静脈は特に両治療併用群で著明に増加する結果を得ており、併用群で生じた腫瘍検体からフローサイトメトリーUniversal pluriBead/Reagent Kit 及び抗 MECA-79 抗体を用いて、HEV 様細静脈を単離する。得られた HEV 様細静脈細胞から、RNA を抽出精製し、RNA 次世代シーケンシングにより遺伝子プロファイル解析を行い、既報のリンパ節やパイエル板で生じた HEV との比較を行う [Uchimura K. Nat. Immunol. 2005; Izawa D. Int Immunol. 1999]。また、なぜ血管新生阻害剤に比較して免疫チェックポイント阻害剤を併用すると HEV が増強するか、そのメカニズムは解明されておらず、同じ HEV 様静脈が増殖するかどうかは定かではない。そこで VEGFR2 peptide vaccine のみ投与群からも HEV 様細静脈細胞を単離し、比較解析を行う。

(2) HEV 様細静脈の生理機能の解析

一般に、HEV 内皮細胞にはリゾリン脂質産生酵素オートタキシン (ATX) が特異的に発現し、その産物であるリゾホスファチジン酸 (LPA) が内皮細胞の変形とリンパ球の通過に関与する。ATX は、マウスとヒトにおいて、リンパ節およびパイエル板の HEV 内皮細胞に強く発現し、HEV 以外の血管では発現が殆ど見られない。ATX および LPA 受容体の両者に対して阻害作用をもつ BrP・LPA (IC50=100-200 nM) を既報に準じてマウスに投与し、リンパ球移動を阻害した状態で [Nakasaka T. Am. J. Pathol. 2008]、(1)と同様の治療をグリオーマモデルマウスに行い、HEV 様細静脈及び治療効果を比較解析する。また、(1)(2)ともに、腫瘍細胞移植 21 日後に、経心臓的に還流固定し断頭した脳組織を用いて、各種腫瘍関連免疫細胞の挙動を解析する。具体的には、CD4, CD8 を始めとして、その他代表的な抗腫瘍免疫に対する抑制性細胞として、制御性 T 細胞 (CD4+CD25+Foxp3)、及び腫瘍関連 M2 マクロファージ (CD163) の動態を解析し、HEV 様細静脈が腫瘍免疫に及ぼす影響を解析する。

(3) ヒト悪性神経膠腫試料による HEV 様細静脈の解析

ヒト悪性神経膠腫に対する HEV 様細静脈の臨床経過との関与を解析するため、実際に VEGFR1/2 ペプチドワクチンを投与した初発・再発神経膠腫患者のワクチン投与前(一部、ワクチン投与前後の検体を含める)の FFPE 標本を使用する (UMIN000012774, UMIN000013381)。それぞれの組織にて、血管内皮細胞を抗 CD31 抗体・抗 CD34 抗体、HEV 様細静脈を抗 MECA-79 抗体、リンパ管内皮細胞 (近年リンパ管様構造が頭蓋内硬膜に存在すると報告 [Absinta M. eLIFE. 2017]) を抗 LYVE-1 抗体で免疫染色し解析する。また、凍結検体 (凍結検体が無い場合は各 FFPE 標本から NucleoSpin® TriPrep を用いて)からは RNA を抽出し、HEV 様細静脈の遺伝子発現と免疫療法後の予後との相関を解析する。

4. 研究成果

初年度は、予備実験で得ているグリオーマモデルマウス (GL261 ffLuc) に対して血管新生阻害薬及び免疫チェックポイント阻害剤使用下で生じる HEV 様細静脈の性質・機能を明らかにするため、まず、同様の複合免疫療法による HEV 様細静脈の誘導効果を GL261 ffLuc マウスモデルで再評価した。次年度は、マウスグリオーマ幹細胞株 TSG ffLuc を移植したマウスモデルでの誘導効果を同様に評価した。血管新生阻害薬 (VEGFR2-peptide vaccine) を腋下リンパ節に投与、その後、複数回抗 PD-1 抗体 (CD279) を腹腔内投与した。腫瘍の増大は、IVIS 生体イメージングシステムを用いて、1 週間後ごとに観察した。今年度は、GL261ffLuc マウスモデルを使用し、同プロトコールに HEV に対する阻害剤として LTβR 阻害薬を追加し、評価した結果、抗腫瘍効果と生存期間の延長は阻害された。各マウスモデル実験において、イメージングにより判定される抗腫瘍効果と、断頭下で得られた脳切片上で抗 MECA-79 抗体 (553863, BD Pharmingen) により同定される HEV 様静脈との相関を解析した。そのほか、各種腫瘍関連免疫細胞の挙動についても解析した。具体的には、CD4, CD8 を始めとして、その他代表的な抗腫瘍免疫に対する抑制性細胞として、制御性 T 細胞 (CD4+CD25+Foxp3)、及び腫瘍関連 M2 マクロファージ (CD163) の動態を解析し、HEV 様細静脈が腫瘍免疫に及ぼす影響を解析した。

しかし、当初予定していた HEV 様細静脈が増加している群において、腫瘍検体からフローサイトメトリーUniversal pluriBead/Reagent Kit 及び抗 MECA-79 抗体を用いての HEV 様細静脈を単離することは困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------