

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791583
 研究課題名（和文） 局所治療と全身治療をつなぐ脳腫瘍免疫遺伝子治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of immuno-gene therapy strategy using co-stimulatory molecule linking local treatment and systemic anti-tumor effect.
 研究代表者
 齋藤 竜太 (SAITO RYUTA)
 東北大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：10400243

研究成果の概要（和文）：本研究では免疫の共刺激因子 OX40 シグナルが腫瘍拒絶に大きな影響を与えることを確認した。OX-40 アゴニストを用いて免疫誘導効果を検討、OX-40 シグナルの活性化は、皮下ワクチンと併用した際に最も有効であることを見出した。そこで、OX-40 シグナルを腫瘍局所で活性化する当初の目的を変更し、皮下ワクチンと併用する新規治療法の開発を行い、強力な腫瘍拒絶免疫が誘導できることを確認した。悪性神経膠腫に対する新規治療法として発展させたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we confirmed that co-stimulatory molecule OX-40 plays pivotal role in inducing strong anti-tumor efficacy. Using OX-40 agonistic antibody, immunostimulatory effect was evaluated. Induction of anti-tumor effect was strongest when OX-40 signal was activated together with subcutaneous tumor vaccination. Thus, we tried to develop new immunotherapeutic strategy against glioblastoma. Activation of OX-40 signaling can be promising immunotherapy for glioblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：中枢神経系薬剤送達、腫瘍ワクチン、脳腫瘍、化学療法、免疫治療、共刺激因子

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫の治療成績は、あらゆる治療手段を用いても不良である。悪性神経膠腫は脳実質に広く浸潤する性格を持ち、手術による治癒は不可能とされ、放射線療法、化学療法、免疫療法などの併用による治療効果の向上が期待されている。化学療法に関しては、Temozolomide (TMZ) の有効性が確認され、標準治療の一角を担うようになった。それでも尚、悪性神経膠腫の治療成績は満足できるものではなく、多くの症例が再発腫瘍により不幸な転帰をとる。この理由の一つとして化学療法剤の全身投与時の薬剤到達性の問題が指摘されている。つまり血液-脳関門の問題であり、また局所投薬においても薬剤の拡散が不良のため有効な投薬とならない。そこで、開発された局所投薬技術に Convection-enhanced delivery 法 (CED 法)

がある。本法は薬剤を陽圧下に脳組織に局所注入し高濃度かつ広範囲の薬剤分布を得る新規投薬法である。我々は現在、本法を用いた局所化学療法の開発を目指して研究を進めており、これまでに TRAIL (Saito R et al, Cancer Res, 2004), liposomal topotecan (Saito R et al, Neuro Oncol, 2006), liposomal CPT-11 (Noble CO, Saito R et al, Cancer Res, 2006), liposomal doxorubicin (Kikuchi T, Saito R, et al, J Neurosurg, 2008) などの有効性を示した。さらにこの研究を translational research として臨床応用することを目的に従来本邦で広く悪性脳腫瘍の治療に用いられてきた ACNU (ニドラン) を CED 法によって投与する有効性を動物実験にて証明し (Sugiyama S, Saito R et al, J Neurooncol, 2007)、さらにカニクイザルでの臨床前、安全性試験を経て東北大学病院倫理委員会の承認を得た上で再発悪性神経

膠腫に対する臨床研究を進めている。

一方で悪性神経膠腫で局所治療が成功した場合の問題点も近年明らかになってきた。私たちは anaplastic ependymoma を対象に局所治療を極限まで実施すると髄腔内播種による再発が問題となってくることを報告した (Saito R, et al, Neurosurg Rev, 2010)。前出の ACNU を用いた CED 法による臨床研究においても脳幹部膠芽腫の局所治療に成功した症例を経験した。しかし、この症例も最終的には髄腔内播種により死去した。従って、局所治療法の追求においては常に全身療法との橋渡しを必要とする。そこで UCLA の Maria Castro らのグループによる一連の研究に注目した (Ali S, et al., Cancer Res 2005)。彼らは HSV-tk と Flt3L を発現する adenovirus を用いた神経膠腫に対する免疫遺伝子治療の開発を試みている。HSV-tk 導入による殺腫瘍治療と免疫誘導因子である Flt3L 導入を併用することで、局所で damage される腫瘍細胞より発現する toll-like receptor による免疫誘導を Flt3L が増強し、有効な抗腫瘍免疫が誘導されることを示している。この研究は米国で Phase III study に向けた準備がなされている。私たちは免疫を調整する因子として東北大学で単離された OX-40 に注目する。OX-40 は TNF 受容体スーパーファミリーの分子で活性化 T 細胞に発現し、樹状細胞や活性化 B 細胞などの抗原呈示細胞や血管内皮細胞に発現する OX-40L と結合して、T 細胞の生存を助け、ヘルパー T 細胞の分化を促し、免疫記憶構築に重要な役割を果たす (Sugamura K, et al, Nat Rev Immunol, 2004)。癌免疫療法への応用も研究が進められており、特に当院呼吸器内科では OX-40 発現アデノウイルスを作成し、肺癌免疫遺伝子治療に向けた研究を進めている (Andarini S, et al, Cancer Res, 2004)。逆に、アデノウイルスを用いた脳腫瘍の遺伝子治療では遺伝子発現が注入局所に限局してしまう問題点が指摘されている (Lang FF, et al, J Clin Oncol, 2003)。従って、CED 法による OX-40 発現アデノウイルスベクターの投与は脳腫瘍内で空間的に広い遺伝子発現を可能とし、より有効な抗腫瘍免疫療法につながると思われる。局所治療 (ACNU/CED)、もしくは全身性化学療法 (TMZ 全身投与) との併用により、局所治療と全身治療の橋渡しをする新規免疫治療法の開発を目標とする。

2. 研究の目的

本研究では、当初の背景にある通り、当初 OX40 発現アデノウイルスベクター (Adeno OX-40) を Convection-enhanced delivery (CED) 法により局所投与する治療の開発を念頭においていた。そのため、まず Adeno OX-40/CED 治療効果の検討を実施した [実験 1]。しかし、結果に示すようにこの治療は有る程度の効果は示すものの、腫瘍モデルの生存延長は限定的で、期待する程の効果は示し得なかった。一方で、抗癌剤である ACNU の CED 法による投与において、局所の免

疫惹起について検討した [実験 2]。ここまでの研究で ACNU は局所投与により明らかに免疫を誘導する効果が認められるものの、OX-40 シグナルの局所での活性化は期待ほどの効果を示し得ないことが判明した。そこで、OX-40 シグナルが腫瘍拒絶免疫に果たす役割を検討する目的で OX-40 欠損マウスと wild type マウスに頭蓋内腫瘍モデルを作製し、その生存を比較した [実験 3]。結果として OX40 シグナルが腫瘍拒絶にやはり大きな影響を与えることを確認した。そこで、OX-40 アゴニストを用いた免疫誘導効果の検討を実施 [実験 4]。OX-40 シグナルの活性化は、皮下ワクチンと併用した際に最も有効であることを見出した。そこで、OX-40 シグナルを腫瘍局所で活性化する当初の目的を変更し、皮下ワクチンと併用する新規治療法の開発を行った [実験 5]。

3. 研究の方法

[実験 1] Adeno OX-40/CED 治療効果の検討。OX-40 リガンド (OX-40L) 発現アデノウイルスベクター (Adeno OX-40) と control ベクターを CED 法により 9L ラットグリオーマ細胞を用いて作製したラット頭蓋内腫瘍モデルの腫瘍内に投与、その生存延長効果を検討した。 [実験 2] 抗癌剤である ACNU の CED 法による投与において、局所の免疫惹起について検討した。

[実験 3] OX-40 欠損マウスと wild type マウスを用いた頭蓋内腫瘍モデル生存の比較。OX-40 欠損マウスと wild type マウスの頭蓋内にマウスグリオーマ細胞を移植して作製したマウス脳腫瘍モデルの生存期間を比較した。OX-40 欠損マウスは C57BL/6 マウスをもとに作製したものを本学免疫学教室より供与頂いた。Wild type マウスとしてもととなった C57BL/6 マウスを使用。

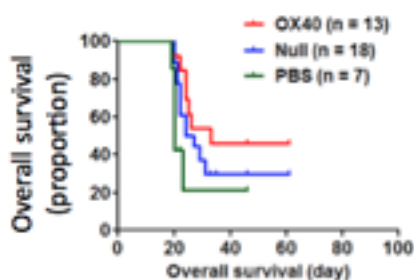
[実験 4] OX-40 アゴニストを用いた免疫誘導効果の検討。実験 1 で OX-40 シグナルを脳腫瘍局所で活性化することによる治療効果が期待したほどではなかったことから、OX-40 アゴニスト抗体を用いて OX-40 シグナル活性化の部位による違いを検討した。マウス頭蓋内腫瘍モデルを用いて OX-40 腹腔内投与と皮下ワクチンへの添加による投与とを比較した。GL261 マウスグリオーマ細胞を用いて頭蓋内腫瘍モデルを作製、OX-40 アゴニストを腹腔内投与する群、皮下投与する群を作製して検討した。

[実験 5] 皮下ワクチンと OX-40 シグナル併用による新規治療法の開発。実験 3 の結果より、OX-40 シグナルを皮下ワクチンに添加使用することで非常に強い抗腫瘍免疫が誘導されることが確認できたことから、本治療法の確立を目指し、治療が困難とされる脳腫瘍幹細胞モデルと肺癌モデルを用いた検討を実施した。

4. 研究成果

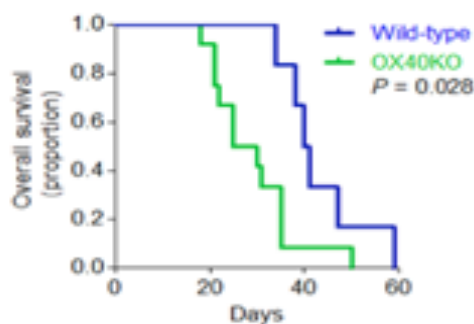
[実験 1] Adeno OX-40/CED 治療効果の検討：OX-40L 発現アデノウイルスベクターを

Convection-enhanced delivery 法を用いてラット脳腫瘍内に投与する研究を進めた。しかし、実施してみるとこの腫瘍内に OX40 を発現させる方法は期待ほどの効果を示さなかった。



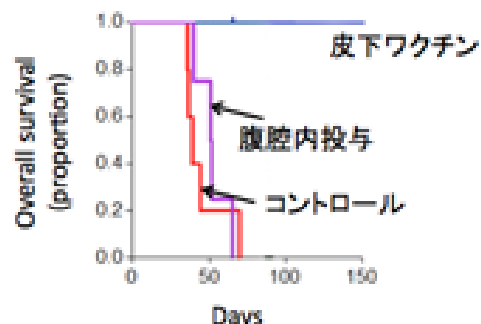
[実験 2] 抗癌剤 ACNU の局所投与による免疫惹起：ACNU は脳腫瘍細胞に対して Fas L の発現を増強させること、免疫抑制系サイトカインである TGF-beta の発現を抑制することを確認した。また、ラット脳内に ACNU を CED 法で投与することにより投与局所において血液脳関門 (BBB) の透過性が一過性に亢進することが示された。この BBB の一過性の透過性亢進に注目して、この時期に化学療法剤を全身投与することで治療効果の向上があるのではないかと仮説を立て、これを検証、ラット脳腫瘍モデルで解析しこれを証明した。ラット脳腫瘍モデルに対して ACNU を CED 法により投与し、BBB が開く時期にドキシソルピシン・リポソームを尾静脈より投与、局所への漏出の増加と脳腫瘍モデルラットの生存延長を確認した。これらの知見は、ACNU の CED 法による投与により、局所に免疫反応が起きやすい状況を誘導していることを示していると言える。本研究の成果は雑誌論文 15 に報告した。

[実験 3] OX-40 欠損マウスと wild type マウスを用いた頭蓋内腫瘍モデル生存の比較。GL261 マウスグリオーマ細胞の頭蓋内に移植、この移植を受けたマウスの生存期間を検討したところ OX-40 欠損マウスの生存が優位に短くなり、腫瘍拒絶に OX-40 分子が関与していることが示された。



[実験 4] OX-40 アゴニストを用いた免疫誘導効果の検討。マウス頭蓋内腫瘍モデルを用いて OX-40 アゴニスト抗体を全身投与 (腹腔

内投与) する場合とワクチンとして皮下投与する場合の治療効果の違いを検討したところ、ワクチンとして投与した方が優位に生存延長効果があることが示された。



[実験 5] 皮下ワクチンと OX-40 シグナル併用による新規治療法の開発。皮下ワクチンとの併用で OX-40 アゴニストを皮下に投与する治療により、神経膠腫幹細胞モデル、肺癌皮下腫瘍モデルにおいても優位な生存延長が得られる事が示された。

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 15 件)

1. Sugiyama S, Saito R, 他 8 名. Computational simulation of convection enhanced drug delivery in the non-human primate brainstem: a simple model predicting the drug distribution. 査読有 Neurol Res 2013 in press. doi:<http://dx.doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000215>
2. 齋藤竜太、富永悌二. グリオーマ治療における Convection-enhanced Delivery. 癌と化学療法 査読無 2013, 40(6), in press.
3. Shibahara I, Sonoda Y, Saito R, 他 8 名. The expression status of CD133 is associated with the pattern and timing of primary glioblastoma recurrence. Neuro Oncol. 査読有 2013 May 7. [Epub ahead of print] PMID: 23658323
4. Chonan M, Kanamori M, Kumabe T, Saito R, 他 2 名. Pilomyxoid astrocytoma of the cerebellum with Williams syndrome. Childs Nerv Syst. 査読有 2013 Apr 20. [Epub ahead of print] PMID: 23604363
5. Saito R, 他 6 名. Infarction of the lateral posterior choroidal artery territory after manipulation of the choroid plexus at the atrium: causal association with subependymal artery injury. 査読有 J Neurosurg. 2013 Mar 29. [Epub ahead of print] PMID: 23540272

6. Mano Y, Kumabe T, Shibahara I, Saito R, 他3名. Dynamic changes in magnetic resonance imaging appearance of dysembryoplastic neuroepithelial tumor with or without malignant transformation. *J Neurosurg Pediatr*. 査読有 2013;11(5):518-525. doi: 10.3171/2013.1.PEDS11449.

7. Ito A, Kumabe T, Saito R, 他4名. Malignant pediatric brain tumor of primitive small round cell proliferation with bland-looking mesenchymal spindle cell elements. *Brain Tumor Pathol*. 査読有 2013;30(2):109-116. doi: 10.1007/s10014-012-0106-0.

8. Aizawa-Kohama M, Kumabe T, Saito R, 他5名. Clinicopathological analysis of nine consecutive central nervous system primitive neuroectodermal tumors in a single institute. *Brain Tumor Pathol*. 査読有 2013;30(1):15-27. doi: 10.1007/s10014-012-0097-x.

9. Kanoke A, Kanamori M, Kumabe T, Saito R, 他2名. Metachronous, multicentric glioma of pilocytic astrocytoma with oligodendroglioma-like component and oligodendroglioma through distinct genetic aberrations. 査読有 *J Neurosurg*. 2013;118(4):854-858. doi: 10.3171/2012.9.JNS112353.

10. Saito R, 他6名. Medial posterior choroidal artery territory infarction associated with tumor removal in the pineal/tectum/thalamus region through the occipital transtentorial approach. *Clin Neurol Neurosurg*. 査読有 2012 Dec 19. [Epub ahead of print] doi:pii: S0303-8467(12)00598-7. 10.1016/j.clineuro.2012.11.020.

11. Kanamori M, Kumabe T, Shibahara I, Saito R, 他5名. Clinical and histological characteristics of recurrent oligodendroglial tumors: comparison between primary and recurrent tumors in 18 cases. *Brain Tumor Pathol*. 査読有 2012 Oct 2. [Epub ahead of print] PMID: 23053495

12. Saito R, Tominaga T. Convection-enhanced delivery: from mechanisms to clinical drug delivery for diseases of the central nervous system. 査読有 *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(8):531-538. PMID: 22976134

13. Sugiyama S, Saito R, 他7名. Safety and feasibility of convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride co-infused with free gadolinium for real-time monitoring in the primate brain.

査読有 *Neurol Res*. 2012 ;34(6):581-587. doi: 10.1179/1743132812Y.0000000050.

14. Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, 他7名. IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas. 査読有 *Int J Clin Oncol*. 2012;17(6):551-561. doi: 10.1007/s10147-011-0323-2.

15. Nakamura T, Saito R, 他4名. Local convection-enhanced delivery of chemotherapeutic agent transiently opens blood-brain barrier and improves efficacy of systemic chemotherapy in intracranial xenograft tumor model. *Cancer Lett*. 査読有 2011;310(1):77-83. doi: 10.1016/j.canlet.2011.06.018.

[学会発表] (計15件)

1) 齋藤竜太, 他5名. 第30回日本脳腫瘍学会学術集会 (at 広島 2012/11/25-27) (ポスター) 脳幹部再発神経膠腫に対するMRIガイド下CEDによる塩酸ニムスチン投与

2) Saito R, 他5名. 2012 Society for Neurooncology Annual Meeting, (Washington DC, USA 2012/11/15-19) Convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride (ACNU) for recurrent glioma patients

3) 齋藤竜太, 他5名. 第71回日本脳神経外科学術総会 (at 大阪 2012/10/16-18) (シンポジウム) 再発神経膠腫に対するコンベクション・エンハンスド・デリバリー: Up date

4) Saito R, 他5名. Second International Meeting of the Society for CNS Interstitial Delivery of Therapeutics (Chicago USA, 2012/10/5-6) (oral presentation) Convection-enhanced Delivery of ACNU

5) 齋藤竜太, 他6名. 第13回日本分子脳神経外科学会 (at 熊本 2012/9/20-21) (一般口演) 抗癌剤分子性質による局所投薬時の脳局所毒性発現パターンの違いに関する研究

6) Saito R, 他5名. 第17回日本脳腫瘍の外科学会 (at 横浜 2012/9/7-8) (一般口演) Surgery for Thalamic Glioma

7) 齋藤竜太, 略. 第30回日本脳腫瘍病理学会学術集会 (名古屋 2012/5/24-26) (一般口演) 毛様性星細胞腫のMRI所見と病理

8) Saito R, 他4名. 2011 Society for Neurooncology Annual Meeting, (Orange County USA, 2011/11/17-20) Local Application of Chemotherapeutics Transiently Opens Blood-Brain Barrier and Improves Efficacy of Systemic Chemotherapy against Intracranial Xenograft Tumor Model

9) 齋藤竜太, 他3名. 第29回日本脳腫瘍学会

学術集会 (岐阜 2011/11/27-29) (ポスター)
脳腫瘍への有効な薬剤送達技術：コンベクション・エンハンスド・デリバリー

10) 齋藤竜太、他 6 名. 第 49 回日本癌治療学会学術集会 (at 名古屋 2011/10/27-29) (ポスター) MRI モニタリング下ニトロソウレア剤局所投薬による悪性神経膠腫新規治療法の開発

11) 齋藤竜太、他 5 名. 第 70 回日本脳神経外科学術総会 (横浜 2011/10/12-14) (シンポジウム) 悪性神経膠腫に対する

Convection-enhanced delivery : 現状と展望

12) 齋藤竜太、他 6 名. 第 16 回日本脳腫瘍の外科学会 (横浜 2011/9/9-10) (一般口演) 側脳室三角部近傍の腫瘍摘出における虚血性合併症に関して：脈絡叢障害による外側後脈絡動脈梗塞

13) Saito R, 他 5 名. 8th Annual World Congress of IBMISPS on Brain, Spinal Cord Mapping and Image Guided Therapy (San Francisco, USA 2011/6/8-10) (一般口演)

MRI Guided Convection-Enhanced Delivery of Nimustine Hydrochloride Against Recurrent Glioma Affecting Brain Stem

14) 齋藤竜太・他 8 名. 第 29 回日本脳腫瘍病理学会学術集会 (東京 2011/5/20-21) (一般口演) Infratentorial oligodendroglial tumor 4 例の臨床病理学的検討

15) 齋藤竜太・他 3 名. 第 31 回日本脳神経外科コンgres総会 (横浜 2011/5/6-8) (ランチョンセミナー) Convection-enhanced Delivery : 現状と展望

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 竜太 (SAITO RYUTA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10400243

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：