

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659657

研究課題名(和文) 脳腫瘍幹細胞抗原および微小環境を標的とした複合的免疫療法の開発

研究課題名(英文) Immunotherapy targeting brain tumor stem cell antigen and niche

研究代表者

戸田 正博(Toda, Masahiro)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20217508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グリオーマ細胞、脳腫瘍幹細胞、およびグリオーマ組織において、免疫抑制性のVEGF/VEGFR系が高発現していることを明らかにした。また、再発悪性神経膠腫8症例に対してVEGFR1/2ペプチドワクチン療法を施行し、重篤な有害事象なく2例の不変(stable disease: SD)が得られた。投与前後のVEGFR特異的T細胞(CTL)の解析(6症例)を行った結果、ワクチン後にVEGFR1特異的CTLが6例中6例、VEGFR2特異的CTLが6例中2例で誘導された。以上からVEGF阻害(腫瘍免疫抑制の制御および腫瘍血管新生抑制)による新たな免疫療法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that glioma cells and brain tumor stem cells (BTSCs) expressed highly VEGF (vascular endothelial growth factor) and VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) in vitro. Furthermore, VEGFR was shown to express highly within malignant glioma tissues compared with surrounding brain tissue. In a clinical study, we performed a novel immunotherapy using VEGFR1/VEGFR2 peptides in 8 patients with recurrent malignant glioma and analyzed the cytotoxic T lymphocytes (CTLs) specific to VEGFR1/VEGFR2. After the vaccination with VEGFR1/VEGFR2, CTLs specific to VEGFR1 were induced in 6 out of 6 patients analyzed and CTLs specific to VEGFR2 in 2 out of 6 patients. These results suggest that an immunotherapy using VEGFR1/2 peptides to inhibit the VEGF/VEGFR signal may be effective for the treatment of malignant glioma.

研究分野：脳神経外科

キーワード：腫瘍幹細胞 免疫療法 微小環境

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍幹細胞 (brain cancer stem cell; BCSC) の存在が明らかとなり、抗癌剤や放射線療法に抵抗性を示すことから、グリオーマ治療の重要な標的として解析が急速に進められている。これまで我々は、グリオーマ組織や細胞株から BCSC 株を樹立し、BCSC 高発現分子および増殖因子の解析を進めている。また、BCSC 抗原 SOX6 由来の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) ペプチドを同定し、BCSC 特異的免疫を誘導することを証明し、BCSC を標的とした新たな免疫療法の臨床研究準備を進めている。

一方、近年、癌免疫療法の臨床試験が実施され、癌抗原ワクチンのみでは十分な抗腫瘍効果が得られない症例があり、さらにそれらの症例において免疫抑制解除などの免疫制御法を改良することにより、治療効果が著明に改善されることが明らかになった。がん組織微小環境中では、がん細胞自身が分泌する様々な因子によって、免疫抑制性の細胞が誘導され、がん細胞の浸潤、悪性化、転移の誘導に関与している。我々は、BCSC により産生され、腫瘍免疫抑制作用を有する TGF- β に着目し、TGF- β 阻害抗体による免疫療法の増強作用を明らかにした。最近では、TGF- β 抗体により BCSC 増殖を抑制することも明らかになり、臨床応用が進められている。一方、血管内皮増殖因子である VEGF は、同様に腫瘍免疫抑制作用を有し、BCSC の腫瘍血管新生および微小環境構築に深く関与している。VEGF 抗体はすでに臨床応用され、様々な VEGF 阻害剤も臨床試験中である。そこで本研究では、TGF- β /VEGF による腫瘍免疫抑制作用と BCSC の細胞増殖・腫瘍血管新生作用に着目して、治療抵抗性の BCSC を標的とした新たな複合的な免疫療法の開発を試みる。

2. 研究の目的

癌幹細胞は様々な免疫抑制分子を産生し、腫瘍局所における免疫抑制環境を構築すると考えられているが、その詳細は明らかでない。本研究では、第一に脳腫瘍幹細胞 (brain cancer stem cell; BCSC) が産生し、強力な腫瘍免疫抑制作用を有する TGF- β および VEGF に着目して、グリオーマの免疫学的微小環境および BCSC による腫瘍免疫抑制・抵抗性の解析を行う。さらに TGF- β は BCSC の増殖促進作用を有し、VEGF は腫瘍血管新生作用を有する機能分子である。そこで本研究では、極めて難治性の BCSC に対する治療法を開発するため、BCSC 抗原を用いたワクチン療法と TGF- β /VEGF 阻害抗体 (腫瘍免疫抑制の制御作用および腫瘍増殖・腫瘍血管新生の抑制作用) を組み合わせ、新たな複合的免疫療法の有効性を検証する。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ組織における免疫抑制因子の解析

本解析では、グリオーマ組織および周辺組織が得られた症例に焦点を当て、免疫抑制因子を含め免疫関連分子の発現を解析した。

(2) グリオーマ細胞および BCSC における免疫抑制因子の解析

我々が樹立した複数のヒト BCSC 株およびグリオーマ細胞株を用いて免疫抑制因子を含め免疫関連分子の発現・分泌を解析した。

(3) BCSC モデルにおける免疫抑制分子の発現解析

in vivo における複合的免疫治療の効果解析のために、マウス由来神経幹細胞にがん遺伝子を導入して誘導された BCSC の脳内移植モデルを作成し、マウス脳内免疫抑制分子の発現解析を行った。

(4) 悪性神経膠腫に対する VEGFR1/VEGFR2 ペプチドワクチン療法における免疫抑制分子の解析

再発悪性神経膠腫の症例 (8 例) に対して VEGFR1/VEGFR2 ペプチドワクチン療法を施行し、生存解析、ワクチン投与前後の血中の VEGFR 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) および血清中 sVEGFR の ELISA 解析を行った。

4. 研究成果

悪性グリオーマ組織において、VEGF および VEGFR の発現と、血管内皮細胞抗原であると CD34 との発現を比較解析したところ、CD34 は腫瘍内と腫瘍辺縁部において同等な発現を示したのに対して、VEGFR は腫瘍内での発現が高く腫瘍辺縁部での発現は低かった。さらにマウス BCSC モデルにおいても、VEGFR は周辺脳組織と比較して、腫瘍内で高い発現を示した。以上、グリオーマ組織では、周辺組織と比較して VEGF/VEGFR 系が高発現していることが明らかになった。

次にグリオーマ細胞および BCSC における VEGF/VEGFR 系の発現解析を行ったところ、VEGF はグリオーマ細胞の 4/5、BCSC において 4/6 の細胞で高発現しており、さらに VEGFR に関してもグリオーマ細胞の 3/5、BCSC の 3/6 において発現が認められた。

以上の発現解析結果から、グリオーマおよび BCSC は免疫抑制因子である VEGF を産生し、腫瘍内血管内皮細胞にシグナル伝達するパラクライン機構が存在すること、さらに腫瘍細胞自身にもシグナル伝達するオートクライン

機構を有する可能性が示された。

一方、臨床研究として、再発悪性神経膠腫 8 症例に対して VEGFR1/VEGFR2 ペプチドワクチン療法を施行した結果、重篤な有害事象なく 2 例の不変 (stable disease: SD) が得られた。ヒストリカルコントロールと比較して、VEGFR1/VEGFR2 ペプチドワクチンにより生存期間の延長傾向が認められた。

ワクチン投与前後の VEGFR 特異的 CTL の解析 (6 症例) を行った結果、ワクチン後に VEGFR1 特異的 CTL が 6 例中 6 例、VEGFR2 特異的 CTL は 6 例中 2 例で誘導されていた。また、腫瘍抑制性が示唆されている sVEGFR2 に関して、ワクチン後の血清を用いた ELISA 解析を行ったところ、SD の症例で上昇していた。

以上、本研究により VEGF 阻害 (腫瘍免疫抑制の制御作用および腫瘍増殖・腫瘍血管新生の抑制作用) による新たな免疫療法の有効性が示唆された。そこで今後は、腫瘍抗原と VEGF 阻害による複合的免疫療法の有効性を検討するため、VEGFR1/VEGFR2 ペプチドに加えて腫瘍抗原ペプチドを用いたカクテルワクチンの臨床試験を予定している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

Tamura R, Takahashi S, Emoto K, Nagashima H, Toda M, Yoshida K, GH-producing Pituitary Adenoma and Concomitant Rathke ' s Cleft Cyst: A case report and short review, Case Reports in Neurological Medicine, 査読有、2015、2015、948025
DOI: 10.1155/2015/948025

Shibao S, Toda M, Orii M, Fujiwara H, Yoshida K, Various patterns of the middle cerebral vein and preservation of venous drainage during the anterior transpetrosal approach, J Neurosurg, 査読有、 -、2015、in press
DOI: なし

Mizutani K, Toda M, Kikuchi R, Uchida H, Yoshida K, Steroid psychosis caused by perioperative steroid replacement for pituitary adenoma: A case report, Keio J Med, 査読有、64、2015、11-15
DOI: 10.2302/kjm.2014-0007-CR

Shibao S, Toda M, Tomita T, Saito K, Kawase T, Ogawa K, Yoshida K, Petrous apex cholesterol granuloma: importance of pedicled nasoseptal flap in addition to silicone T-tube for prevention of occlusion of drainage

route in transsphenoidal approach - a technical note, Neurol Med Chir (Tokyo), 査読有、55、2015、351-355
DOI: 10.2176/nmc.tn.2014-0254

Tomio R, Toda M, Sutiono AB, Horiguchi T, Aiso S, Yoshida K, Grüber ' s ligament as a useful landmark of Abducens nerve in transnasal approach, J Neurosurg, 査読有、122(3)、2015、499-503
DOI: 10.3171/2014.10.JNS132437

Saito K, Toda M, Yoshida K, Pilocytic astrocytoma with anaplastic features presenting good long-term clinical course after surgery alone: a case report, Childs Nerv Syst, 査読有、31(1)、2015、167-171
DOI: 10.1007/s00381-014-2509-1

Saito K, Iizuka Y, Ohta S, Takahashi S, Nakamura K, Saya H, Yoshida K, Kawakami Y, Toda M, Functional analysis of a novel glioma antigen, EFTUD1, Neuro Oncol, 査読有、16(12)、2014、1618-1629
DOI: 10.1093/neuonc/nou132

Shidoh S, Toda M, Kawase T, Nakajima H, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Transoral vs. Endoscopic Endonasal Approach for Clival/Upper Cervical Chordoma, Neurol Med Chir (Tokyo), 査読有、54(12)、2014、991-998
DOI: 10.2176/nmc.st.2014-0135

Shibao S, Toda M, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Analysis of the bacterial flora in the nasal cavity and the sphenoid sinus mucosa in patients operated on with an endoscopic endonasal transsphenoidal approach, Neurol Med Chir (Tokyo), 査読有、54(12)、2014、1009-1013
DOI: 10.2176/nmc.oa.2014-0129

Saito K, Toda M, Shido S, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Isolated Pituitary Tuberculoma - Case Reports -, NMC Case Report Journal, 査読有、 -、2014、2013-0330
DOI: 10.2176/nmccrj.2013-0330

Tomio R, Toda M, Tomita T, Yazawa M, Kono M, Ogawa K, Yoshida K, Primary dural closure and anterior cranial base reconstruction using pericranial and nasoseptal multi-layered flaps in endoscopic-assisted skull base surgery, Acta Neurochirurgica, 査読有、

-、2014、ISSN 0001-6268
DOI: 10.1007/s00701-014-2174-x

Tomio R, Toda M, Yoshida K, Borghei-Razavi H, Anterior petrosal approach (Letter to the Editor), J Neurosurg, 査読有、120、2014、1249-1250
DOI: 10.3171/2013.10.JNS132121

Shidoh S, Toda M, Nakajima H, Tomita T, Ogawa K, Kawase T, Yoshida K, Transoral-transpalatal approach and endoscopic endonasal approach for chordomas of the craniovertebral junction, J Neurol Neurophysiol, 査読有、4(4)、2013、162
DOI: 10.4172/2155-9562.1000162

Ohta S, Misawa A, Lefebvre V, Okano H, Kawakami Y, Toda M, Sox6 up-regulation by macrophage migration inhibitory factor promotes survival and maintenance of mouse neural stem/progenitor cells, PLoS One, 査読有、8(9)、2013、e74315
DOI: 10.1371/journal.pone.0074315.

Sano K, Toda M, Sasaki H, Kitamura Y, Mikami S, Hirato J, Inoue S, Kawase T, Yoshida K, Infratentorial low-grade oligoastrocytoma with aggressive clinical behavior in an adult: a case report with genetic characterization, Brain Tumor Pathol, 査読有、30(2)、2013、99-103
DOI: 10.1007/s10014-012-0111-3.

Toda M, Glioma Stem Cells and Immunotherapy for the Treatment of Malignant Gliomas, ISRN Oncology, 査読有、2013、2013、1-13
DOI: 10.1155/2013/673793.

Saito K, Toda M, Tomita T, Sano K, Ogawa K, Yoshida K, Application of endoscopic transsphenoidal approach to true type transsellar transsphenoidal meningoencephalocele in an adult: A case report and literature review, Acta Neurochir (Wien), 査読有、154(8)、2012、1511-1515
DOI: 10.1007/s00701-012-1346-9.

Ichimura S, Yoshida K, Kagami H, Inaba M, Orii M, Kitamura Y, Saga I, Toda M, Epidural anterior petrosectomy with subdural visualization of sphenobasal vein via the anterior transpetrosal approach-technical case report, Neurosurg Rev, 査読有、35(4)、2012、

609-614
DOI: 10.1007/s10143-012-0405-2.

Ohta S, Misawa A, Fukaya R, Inoue S, Kanemura Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M, Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival and proliferation of neural stem/progenitor cells, J Cell Sci., 査読有、125、2012、3210-3220
DOI: 10.1242/jcs.102210.

Saito K, Toda M, Tomita T, Ogawa K, Yoshida K, Surgical results of an endoscopic endonasal approach for clival chordomas, Acta Neurochir (Wien), 査読有、154(5)、2012、879-886
DOI: 10.1055/s-0034-1387184.

[学会発表](計17件)

戸田 正博、ペプチドワクチンの臨床試験、第10回信濃町脳腫瘍セミナー、2015年2月7日、慶應義塾大学病院新教育研究棟講堂(東京都・新宿区)

柴尾 俊輔、戸田 正博、菊地 亮吾、斉藤 克也、植田 良、佐々木 光、吉田 一成、悪性神経膠腫に対するVEGFR1/2 ワクチン療法、第32回日本脳腫瘍学会学術集会、2014年12月1日、シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県・浦安市)

菊地 亮吾、戸田 正博、斉藤 克也、吉田 一成、神経膠芽腫における新規標的抗原の発現・機能解析、日本脳神経外科学会第73回学術総会、2014年10月9日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)

戸田 正博、脳腫瘍の最新治療、第19回日本脳腫瘍の外科学会 市民公開講座、2014年9月14日、慶應義塾大学病院3号館北棟1階ラウンジ(東京都・新宿区)

中川 佑、佐々木 光、戸田 正博、大平 貴之、河瀬 斌、吉田 一成、Glioblastoma 長期生存例の検討、第19回日本脳腫瘍の外科学会、2014年9月12日、東京ドームホテル(東京都・文京区)

菊地 亮吾、戸田 正博、斉藤 克也、吉田 一成、神経膠芽腫における新規標的抗原の発現解析、第32回日本脳腫瘍病理学会学術集会、2014年5月23日、あわぎんホール(徳島県郷土文化会館)(徳島県・徳島市)

柴尾 俊輔、戸田 正博、斉藤 克也、植田 良、吉田 一成、進行及び再発悪性神経膠腫に対する VEGFR1/2 ワクチン療法、第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、2013 年 12 月 9 日、フェニックス・シーガイア・リゾート（宮崎県・宮崎市）

佐々木 光、廣瀬 雄一、矢崎 貴仁、片山 真、北村 洋平、戸田 正博、大平 貴之、吉田 一成、Glioma に対する遺伝子診断に基づく neoadjuvant approach、第 18 回日本脳腫瘍の外科学会、2013 年 9 月 19 日、大津プリンスホテル（滋賀県・大津市）

戸田 正博、脳腫瘍幹細胞抗原の解析と新たな免疫療法の臨床試験、第 46 回慶應ニューロサイエンス研究会、2013 年 6 月 29 日、慶應義塾大学医学部新教育研究棟講堂 3（東京都・新宿区）

斉藤 克也、戸田 正博、木村 徳宏、池田 栄二、吉田 一成、Pilocytic astrocytoma with anaplastic (atypical) features の一例、第 31 回日本脳腫瘍病理学会、2013 年 5 月 24 日、KFC Hall 国際ファッションセンター（東京都・墨田区）

戸田 正博、再発悪性グリオーマに対するペプチドワクチン、第 9 回信濃町脳腫瘍セミナー、2013 年 2 月 16 日、慶應義塾大学医学部 新教育研究棟（東京都・新宿区）

斉藤 克也、戸田 正博、吉田 一成、リボソーム合成阻害を介した治療標的分子としてのグリオーマ新規抗原 EFTUD1 の解析、第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会、2012 年 11 月 26 日、グランドプリンスホテル広島（広島県・広島市）

戸田 正博、斉藤 克也、植田 良、佐々木 光、吉田 一成、進行・再発悪性グリオーマに対する VEGFR ワクチンの第 1/2 相臨床試験、第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会、2012 年 11 月 25 日、グランドプリンスホテル広島（広島県・広島市）

戸田 正博、遺伝学的解析に基づいた神経膠腫の治療戦略 指定発言、第 24 回脳神経外科臨床講座、2012 年 11 月 17 日、ベルサール八重洲（東京都・中央区）

佐々木 光、廣瀬 雄一、片山 真、矢崎 貴仁、北村 洋平、戸田 正博、大平 貴之、吉田 一成、Low-grade glioma に対する遺伝子診断に基づく neoadjuvant approach、日本脳神経外科学会第 71 回学術総会、2012 年 10 月 17

日、大阪国際会議場（大阪府・大阪市）

Sasaki H, Hirose Y, Katayama M, Yazaki T, Toda M, Ohira T, Yoshida K, Molecular-guided neoadjuvant approach for gliomas、The 19th International Brain Tumor Research and Therapy Conference、2012 年 6 月 21 日、Niagara Falls (Canada・Ontario)

Sasaki H, Hirose Y, Katayama M, Yazaki T, Toda M, Ohira T, Yoshida K, Moleclar-guided neoadjuvant approach for gliomas regardless of histology、第 4 回国際脳腫瘍病理シンポジウム、2012 年 5 月 24 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 3 件)

戸田 正博 他、寺田国際事務所/先端医療技術研究所、先端医療シリーズ 45 臨床医のための最新脳神経外科、2014 年、94-97

Toda M、Springer、In Landes Bioscience、Glioma : Immunotherapeutic approaches、2012 年、77-83

Saga I, Toda M、Lifescience Global、Journal of Cancer Research Updates、2012、28-38

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称：癌ワクチン
発明者：戸田正博、植田 良
権利者：学校法人慶應義塾
種類：特許
番号：特許第 5267969 号
取得年月日：2013 年 5 月 17 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者
戸田 正博 (Toda Masahiro)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：20217508

(2) 連携研究者
植田 良 (Ueda Ryo)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：30317143