

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10327

研究課題名（和文）グリオーマ幹細胞に対する免疫チェックポイント阻害薬とワクチン療法の併用

研究課題名（英文）Combination of Immune checkpoint inhibitors and vaccine in glioma stem cell

研究代表者

石川 栄一（Ishikawa, Eiichi）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30510169

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000 円

研究成果の概要（和文）：グリオーマにおいて、免疫チェックポイント阻害薬とワクチン療法の併用が効果的かを実証するため、初回時と再発時の膠芽腫組織切片の免疫染色解析を行い、再発時にPD-1陽性細胞スコアが高値となる症例は、再発からの予後不良因子であることを見出した。また、PDL-1についても有意差は認めないものの同様の傾向を認めた。上記の臨床データを参考に、vitroやvivoでマウス人工グリオーマ幹細胞に化学療法剤やインターフェロン 投与を行ったところ、これらの治療が免疫チェックポイント機構を増強することを示唆する結果を示した。

研究成果の概要（英文）：This study was designed to clarify the change of the molecular expression, including programmed cell death 1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1), on the initial and secondary resected glioblastoma (GBM) specimens and to address the influence of these expressions for patient outcome after second surgery of glioblastoma. We investigated 16 GBM patients treated with radiotherapy and temozolomide. Four patients who were treated with immunotherapy using autologous formalin-fixed tumor vaccine were enrolled. Patients with high PD-1 expression of secondary specimen had bad prognosis after secondary resection. Similar result was seen also in PD-L1 expression. PD-1/PD-L1 pathway may be associated with patient outcome after second surgery of glioblastoma. Next, vitro and vivo study using induced murine glioma stem cell showed chemodrug and/or interferon gamma enhanced PD-1/PD-L1 pathway.

研究分野：脳神経外科

キーワード：glioma immunotherapy immune checkpoint glioma stem cell

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍を含む多くのがんが、単独の治療のみでは治療抵抗性であり、現状では手術、放射線療法等に加え、化学療法、分子標的療法などが行われている。近年、各臓器の形成に幹細胞が重要な役割を担うことが明らかとなっているが、悪性脳腫瘍においても腫瘍幹細胞が存在し、腫瘍・内皮細胞の増殖・構築に重要な役割をしていることが推測されてきている。更に、これらの幹細胞を標的とした治療法の可能性が示唆されている。

我々は、現在までに腫瘍ワクチンに対する多種の免疫療法を開発・臨床応用し、発表を行ってきた。初期の研究(研究1)では放射線およびワクチンの併用療法の臨床研究を行い、更に2013年までに、これらに更に化学療法を併用した臨床研究(研究2)を行ってきた。後者の研究では、更により成績を得ているものの、これらの治療に抵抗性の症例も依然存在していることも事実である。

また最近我々は、悪性グリオーマと組織・浸潤形態が類似し、モデル細胞として非常に有用な人工グリオーマ幹細胞を用いたマウス悪性グリオーマの研究により、ケモカインが、グリオーマ幹細胞の増殖・分化に関与していることを見出した。

古くより体内の腫瘍細胞を殺傷するキラーT細胞が過剰に活性化し暴走しないように、自身の細胞表面にブレーキ役となる免疫チェックポイントと総称されるいくつかの分子機構を有していることがわかっている。近年その免疫チェックポイント阻害薬であるPD-1・CTLA-4抗体療法について多種の癌で臨床応用が開始されたため、注目をあびている。悪性グリオーマにおいても、PD-1・CTLA-4抗体療法に関する基礎研究結果をもとに海外で治験が開始されている段階であるが、その基礎データは限られている。例えば、PD-1抗体療法と放射線療法とに併用効果があることが動物実験で示された。また、PD-1抗体療法とCTLA-4抗体療法とに

併用効果があることも、脳腫瘍モデルで示されている。このように、免疫チェックポイント阻害薬に関する研究は、最近のトピックスであり研究結果は今後の悪性グリオーマおよび他の癌腫の治療にとって大変なインパクトを有していることが推察される。

2. 研究の目的

私は上記事項をもとに、悪性グリオーマの再発(特に免疫療法後)には免疫チェックポイント機構が働いているという仮説と、再発グリオーマにおいて免疫チェックポイント阻害薬であるPD-1・抗体療法は腫瘍増殖抑制効果をもたらすという仮説を立てた。

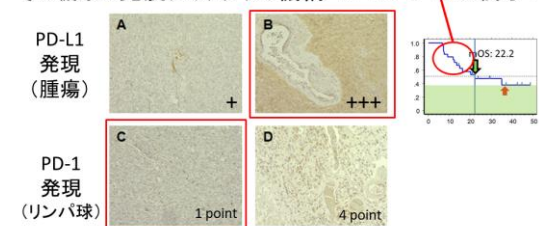
3. 研究の方法

まず我々は、膠芽腫に対する標準療法あるいは腫瘍ワクチンの併用療法において、早期の再発例は予後不良となることが多いという事実に着目し、16例の膠芽腫症例に対し、初回時と再発時の腫瘍組織切片を免疫染色などの方法により解析を行った。(図1)

図1

ワクチン療法後の再発とPD-1発現

✓ワクチン症例の数割に早期再発≡予後不良あり。
その機序に免疫チェックポイント機構PD-1/PD-L1が関与？



→膠芽腫例の大多数でPD-L1は50%以上陽性(+++)
初回手術時は大多数でPD-1陽性細胞は少ない

次に、*vitro* でマウス人工グリオーマ幹細胞やマウスグリオーマ細胞に化学療法剤(テモゾロマイド)やインターフェロン γ 投与を行う研究、*vivo*の研究においては、化学療法耐性のマウス人工グリオーマ幹細胞をマウスに移植し、PD-L1発現の上昇などを調べた。

4. 研究成果

臨床サンプルの研究結果として、初回と再発時の CD45RO、CD20 などの陽性細胞スコアに関しては有意差を認めないのに対し、CD3、CD8、PD-1 陽性細胞は再発時に有意な上昇を認めた。(表1, 2)

表1

初発時と再発時における
免疫関連分子の発現変化(1)

Table 2. Alteration of indices, staining scores and grades based on IHC staining of TILs and tumor cells obtained from initial and secondary resected specimens.

	1 st op.	2 nd op.	p value**
Case number	16	16	
Ki-67 (% , median)	24.1	15.2	0.178
TP53 (% , median)	4.4	5.7	>0.2
MGMT-Methylation specific PCR (unmethylated / Methylated)*	11 / 3	10 / 4	>0.2
ATRX (negative / positive)	3 / 13	4 / 12	>0.2
IDH1R123H (negative / positive)	14 / 2	14 / 2	>0.2
PD-L1 (-, +, ++, +++, median)	++	+++	0.187
HLA-ABC (-, +, ++, +++, median)	+++	+++	>0.2
HLA-DR (-, +, ++, +++, median)	++	++	>0.2
CD3 (score, median)	5.5	7.0	0.033
CD8 (score, median)	5.0	6.0	0.009
CD20 (score, median)	4.5	4.0	>0.2

*2 patients were unavailable.

**For comparison of IHC score and grade between 1st versus 2nd specimens, Wilcoxon test was used. Values of P < 0.05 were considered statistically significant.

表2

初発時と再発時における
免疫関連分子の発現変化(2)

Table 3. Alteration of indices, staining scores and grades based on IHC staining of TILs and tumor cells obtained from initial and secondary resected specimens.

	1 st removal	2 nd removal	p value**
Case number	16	16	
CD45RO (score, median)	6.0	7.0	0.148
GRZB (score, median)	5.0	5.0	>0.2
PD-1 (score, median)	5.0	7.0	0.036

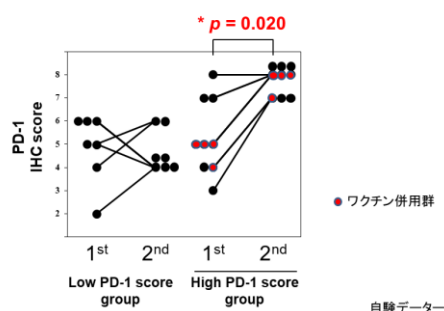
*2 patients were unavailable.

**For comparison of IHC score and grade between 1st versus 2nd specimens, Wilcoxon test was used. Values of P < 0.05 were considered statistically significant.

再発時に PD-1 陽性細胞スコアが高値となった症例群とならなかった症例群に群分けすると、ワクチン投与後早期再発例の全例が前者に含まれた。(図2)

図2

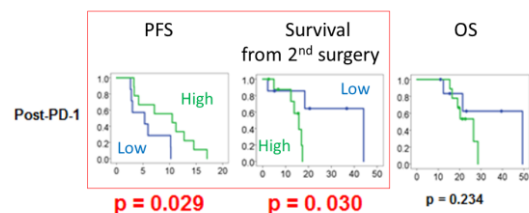
しかしながらワクチン群を含む一部の症例では、再発時にPD-1発現上昇！



また、再発時 PD-1 陽性細胞スコア高値群は再発までの期間が延長する傾向を有するとともに、再発からの予後が有意に不良であった。再発時に PD-1 陽性細胞スコアが高値となる症例は、再発からの予後不良因子であることが示唆された。(図3) また、PDL-1 についても有意差は認めないものの同様の傾向を認めた。

図3

膠芽腫における再発時のPD-1と予後



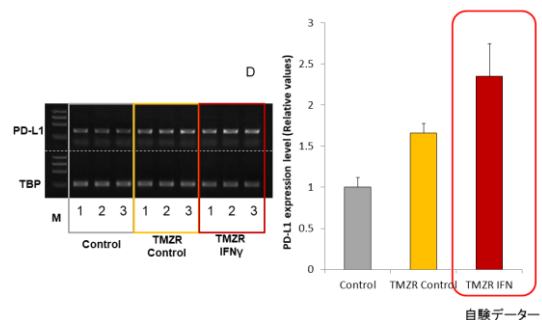
➡再発時(放射線化学療法±ワクチン後)のPD-1と予後とは関係

Miyazaki T, Ishikawa E, et al. Assessment of PD-1 positive cells on initial and secondary resected tumor specimens of newly diagnosed glioblastoma and its implications on patient outcome. *J Neurooncol.* 2017 Apr 26. [Epub ahead of print]

上記の臨床データを参考に、vitro でマウス人工グリオーマ幹細胞やマウスグリオーマ細胞に化学療法剤(テモゾロマイド)やインターフェロンγ投与を行ったところ、PDL-1 発現は両者とも上昇傾向を認め、両者の併用により有意な上昇を認めた。また、vivo の研究において、化学療法耐性のマウス人工グリオーマ幹細胞は通常のものと比較し、PD-L1 の発現が上昇していた。これらの結果は、特に再発時のグリオーマにおいて、免疫チェックポイント機構が関与していることを示唆するものであった。(図4)

図4

TMZと免疫療法 (IFN-γ) の併用で、グリオーマ幹細胞のPD-L1発現は上昇



自験データ

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 4件)

1. Miyazaki T, Ishikawa E, Matsuda M, Tsuboi K, et al.: Assessment of PD-1 positive cells on initial and secondary resected tumor specimens of newly diagnosed glioblastoma and its implications on patient outcome. 133(2): 277-285, 2017. doi: 10.1007/s11060-017-2451-7
2. Miyazaki T, Uemae Y, Ishikawa E: CXCL12/CXCR4 signaling in glioma stem cells; prospects for therapeutic intervention. Translational Cancer Research 6 (Suppl. 2): 434-437, 2017. doi: 10.21037/tcr.2017.03.63
3. Miyazaki T, Aiyama H, Ishikawa E: CAR-T cell in vivo tracking method using PET scan with the reporter gene and new investigational tracer [18F] FHBG. Translational Cancer Research. 6 (Suppl. 6): 1003-1005, 2017. doi: 10.21037/tcr.2017.06.50
4. Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A: Prospect of Immunotherapy for Glioblastoma: Tumor Vaccine, Immune Checkpoint Inhibitors and Combination Therapy. Neurol Med Chir (Tokyo) 57(7): 321-330, 2017. doi: 10.2176/nmc.nmc.ra.2016-0334.

[学会発表] (計4件)

1. 石川栄一、他: 膠芽腫に対する腫瘍ワクチン療法の経過と PD-1 抗体療法併用の可能性。第 76 回日本脳神経外科学会総会, 2017
2. 石川栄一、他: 再発膠芽腫における PD-1 発現上昇と再発後の予後。第 35 回日本脳腫瘍学会, 2017

3. 石川栄一: 悪性神経膠腫に対する治療～免疫療法のトピックスも含め～。脳腫瘍治療セミナー2017(招待講演), 2017

4. Muragaki Y, Maruyama T, Ishikawa E, et al.: Multicenter randomized placebo-controlled trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for newly-diagnosed glioblastomas. SNO2017(国際学会), 2017

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 栄一(Ishikawa Eiichi)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 30510169

(2)研究分担者

松田 真秀 (Matsuda Masahide)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 30614333

(3) 研究分担者

坪井 康次(Tsuboi Koji)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 90188615