

Title	悪性神経膠腫および腫瘍新生血管に対する複合的ペプチドワクチン療法の評価法開発
Sub Title	Biomarkers for evaluation of clinical activity of VEGFR-targeted vaccines against malignant glioma patients
Author	植田, 良(Ueda, Ryo) 戸田, 正博( Toda, Masahiro)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では, 申請者らが併行して実施している悪性神経膠腫および腫瘍新生血管に対するペプチドワクチン療法臨床試験(計3試験)被験者検体を用いて, 免疫応答関連細胞・因子, また脳腫瘍血管新生および浸潤性関連因子について解析し, 臨床的有効性との関連性を検証した。その結果, 同ワクチン療法による臨床的有効性を認めた患者検体では, ワクチン療法後にVEGFR発現細胞反応性細胞傷害性T細胞の高頻度検出, 血清中のsVEGFR2値の低下, 血漿中のIL-8値の低下を認めており, これらは同ワクチン療法バイオマーカーとして治療効果評価や治療反応性予測に応用しうると考えられた。</p> <p>Evaluation of immunological biomarkers may lead to better understanding of the critical immune response indicators that may help to predict clinical responses of cancer immunotherapy. We characterized status of immune cells, cytokines, chemokines, and other immunosuppressive molecules in malignant glioma patients who received vaccinations of VEGF receptor (VEGFR)-derived peptides. Peripheral blood samples from patients who demonstrated positive radiologic response or stable disease revealed superior VEGFR-specific CTL reactivity and lower level of serum VEGF compared to samples from other patients with progressing malignant glioma. Plasma IL-8 level was negatively correlated with overall survival. These data indicate that these parameters may be potential immune-biomarkers for evaluation of clinical activity of VEGFR-targeted vaccines.</p>
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2015 ~ 2017 課題番号 : 15K10344 研究分野 : 脳神経外科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K10344seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K10344seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10344

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫および腫瘍新生血管に対する複合的ペプチドワクチン療法の評価法開発

研究課題名(英文) Biomarkers for evaluation of clinical activity of VEGFR-targeted vaccines against malignant glioma patients

研究代表者

植田 良 (UEDA, RYO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：30317143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが併行して実施している悪性神経膠腫および腫瘍新生血管に対するペプチドワクチン療法臨床試験(計3試験)被験者検体を用いて、免疫応答関連細胞・因子、また脳腫瘍血管新生および浸潤性関連因子について解析し、臨床的有効性との関連性を検証した。その結果、同ワクチン療法による臨床的有効性を認めた患者検体では、ワクチン療法後にVEGFR発現細胞反応性細胞傷害性T細胞の高頻度検出、血清中のsVEGFR2値の低下、血漿中のIL-8値の低下を認めており、これらは同ワクチン療法バイオマーカーとして治療効果評価や治療反応性予測に応用しうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Evaluation of immunological biomarkers may lead to better understanding of the critical immune response indicators that may help to predict clinical responses of cancer immunotherapy. We characterized status of immune cells, cytokines, chemokines, and other immunosuppressive molecules in malignant glioma patients who received vaccinations of VEGF receptor (VEGFR)-derived peptides. Peripheral blood samples from patients who demonstrated positive radiologic response or stable disease revealed superior VEGFR-specific CTL reactivity and lower level of serum VEGF compared to samples from other patients with progressing malignant glioma. Plasma IL-8 level was negatively correlated with overall survival. These data indicate that these parameters may be potential immune-biomarkers for evaluation of clinical activity of VEGFR-targeted vaccines.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫 腫瘍抗原ペプチドワクチン 脳腫瘍血管新生 脳腫瘍 免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫の治療成績はこの40年間ほとんど改善をみない。また、これまでに腫瘍再発時に有効な治療法として確立されたものはない。現在、悪性神経膠腫に対して集学的治療が行われるものの、依然として難治性であり、治療成績改善のためには新たな治療法・より強力な集学的治療法の開発が不可欠と考えられる。そこで研究代表者らは、悪性神経膠腫に対する免疫療法の開発を目指し、腫瘍抗原の同定、および免疫療法のさらなる改良に向けて、特にがん細胞による免疫抑制・抵抗性の分子機構の解明と克服法の開発の研究を行ってきた。そしてこれまでに、脳腫瘍幹細胞の維持に必要な微小環境(脳腫瘍幹細胞ニッチ)の構築において重要な腫瘍新生血管に高発現するVascular Endothelial Growth Factor Receptor1 (VEGFR1)とVEGFR2ペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験(「進行あるいは再発神経膠芽腫に対する腫瘍新生血管関連遺伝子VEGFR1およびVEGFR2ペプチドを用いたがんワクチン療法の第I/II相臨床試験」)(平成23年2月8日慶應義塾大学医学部倫理委員会承認、承認番号:2010-218、UMIN臨床試験登録番号:UMIN000005545)を実施した。さらに、VEGFRペプチドに加えて悪性神経膠腫細胞に発現する複数のがん抗原ペプチドを混合するカクテルワクチン療法の臨床試験「進行あるいは再発悪性神経膠腫に対するがんペプチドカクテルワクチン療法の第I/II相臨床試験」(平成25年11月14日慶應義塾大学医学部倫理委員会承認、承認番号:2013-0294、UMIN臨床試験登録番号:UMIN000012774)を開始し、悪性神経膠腫細胞自身のみならず、その微小環境を構成する腫瘍新生血管を治療標的としたペプチドワクチン療法の確立を目指し、その安全性および臨床的有効性を解析している。また、近年施行された膵がん患者等に対するがんワクチン療法では免疫療法と化学療法剤を併用した治療法の有効性が示唆されたことから、初発悪性神経膠腫に対して化学療法剤を併用したペプチドワクチンプロトコルでの臨床試験「初発悪性神経膠腫に対するがんペプチドワクチン療法の第I/II相臨床試験」UMIN臨床試験登録番号:UMIN000013381を計画、実施している。

近年がん免疫療法の臨床試験が実施・評価され、担がん生体の免疫抑制状態の解除などの免疫制御法の改良により、がん免疫療法の大規模な治療効果増強の可能性があると示された(Rosenberg et al. Nat Med. 2004)。それゆえ、がん免疫療法臨床試験における患者の免疫動態の評価には、これまでのT細胞

誘導などの「正」の能動性免疫解析のみならず、がん細胞が直接産生する多様な免疫抑制分子(TGF- $\beta$ などの分泌型抑制分子、PD-L1などの細胞膜型分子、IDOなどの細胞内分子など)や、がん細胞が誘導する多様な免疫抑制性細胞(制御性T細胞、骨髄系抑制細胞、制御性樹状細胞など)等による免疫抑制状態、すなわち「負」の免疫動態を把握することが重要である。これまでに正・負の免疫動態を総合的に測定する免疫評価法は存在しないが、研究代表者らによる、担がん生体で産生され、強力な免疫抑制作用をもつTGF- $\beta$ や、癌細胞が高発現するmicroRNAを介した腫瘍免疫抵抗性機構解明の研究結果(Ueda R et al. Clin Cancer Res. 2009, Ueda R et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)等を基盤に、本研究において患者の正・負の免疫動態を評価し、臨床効果との関連性を検討することで、担がん生体の免疫抑制状態の解除などの免疫制御法の改良(複合がんワクチンの戦略的開発)および免疫療法が有効な患者の選択に応用し、本治療の効果増強を目指す。

一方、脳腫瘍に対する腫瘍新生血管(VEGF-VEGFR系)を標的とした治療法(Bevacizumabを用いた抗VEGFモノクローナル抗体療法や、VEGFキナーゼ阻害薬(Vatalanib、Cediranib等)を用いた治療)の有効性が示され、抗体は国内でも臨床試験進行中である。国外の抗腫瘍新生血管療法臨床試験では、その治療効果判定に血管新生因子であるbFGFやSDF1の血中レベルが有効であるとされている。本研究により、既存の抗腫瘍新生血管療法とは異なる細胞傷害機序であるペプチドワクチン療法において、これらの血清中血管新生因子・浸潤性因子のバイオマーカーとしての新たな意義を検証することは、抗腫瘍新生血管療法の治療効果向上に貢献できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが実施済みおよび実施中である悪性脳腫瘍新生血管を治療標的としたペプチドワクチン療法臨床試験(計3試験)被験者検体を用いて、血管新生抑制療法に対する反応性および抵抗性を示す腫瘍血管新生・浸潤性関連因子バイオマーカーや、抗腫瘍免疫ネットワークにおける正と負の調節細胞や分子について解析し、同治療の臨床的有効性との関連性を評価する。この結果に基づいて、同治療の治療効果の科学的根拠を構築するとともに、血管新生抑制療法およびがんワクチン免疫療法の反応性・抵抗性を評価する新たな方法の開発、さらに治療反応性予測を可能にして適切な患者選択を行うこと、新規改良法の提案を行うことで、同治療成績の向上に貢献すること

を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、研究代表者らが実施済みおよび実施中である悪性脳腫瘍新生血管を治療標的としたペプチドワクチン療法臨床試験（計3試験）において得られた被験者検体を用いて、脳腫瘍血管新生および浸潤性関連因子、また免疫応答関連細胞・因子について解析し、臨床的有効性との関連性を検証して、これらが本治療の効果判定因子として有用となる可能性を検討する。

具体的には、研究代表者所属機関で標準的治療が施され、試料および臨床情報提供に同意した神経膠腫患者の検体（腫瘍組織・血清・血漿・末梢血リンパ球、臨床情報）さらに上記臨床試験を受けた悪性神経膠腫被験者検体を用いて、脳腫瘍血管新生および浸潤性関連因子（血清 VEGF、血清 sVEGFR1/2、血清 bFGF、血清 SDF1、血清 microRNA (miR-126, miR-222)）、および免疫応答関連細胞・因子（末梢血リンパ球中の VEGFR 反応性 T 細胞・FoxP3 陽性制御性 T 細胞、血清中の IL10 や TGF- $\beta$  などの免疫抑制性サイトカイン等）について解析する。脳腫瘍血管新生および浸潤性関連因子とされる VEGF、sVEGFR1/2、bFGF、SDF1 の血清での発現を ELISA 法により検出、し得ることを確認した。神経膠腫患者および健常人末梢血リンパ球中の腫瘍抗原反応性 T 細胞の頻度をフローサイトメトリー解析により評価、免疫促進性（IFN- $\gamma$ 、IL2、IL12 等）・免疫抑制性（TGF- $\beta$ 、IL10、IL6、IL13、IL4、MCP-1、VEGF、PGE2、arginase 等）分泌型分子の血清中レベル測定を Bio-Plex™ (Bio-Plex 社) ビーズアレイ法により施行する。

### 4. 研究成果

(1) 被験者検体を用いた脳腫瘍血管新生・浸潤性関連因子、および免疫応答関連細胞・因子についての解析の実施と、(2) 解析した脳腫瘍血管新生・浸潤性関連因子、および免疫応答関連細胞・因子の動態と、臨床的有効性との関連性の評価を行った。

脳腫瘍血管新生性関連因子であり、抗腫瘍免疫応答抑制性因子である VEGF や VEGFR (sVEGFR1/2) の被験者血清レベルを解析した。また、同検体を用いて VEGFR 発現細胞反応性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を検出し、VEGFR ワクチン療法により、それらの頻度がワクチン回数に比例して被験者体内に誘導されることを明らかにした。

本ワクチン療法はこれまでに 8 例の再発悪性神経膠腫被験者に対し施行され、重篤な有害事象なく 2 例の不変 (stable disease: SD) が得られ、新規病変の発生を抑制する可能性が示唆されている。こ

の 2 患者体内では、VEGFR 発現細胞反応性 CTL が高頻度に検出され、VEGFR ペプチドに対する免疫応答が臨床的有効性を予測する指標となる可能性が示された。さらに、血清中の sVEGFR2 値、および血漿 IL-8 値は、それぞれ VEGFR ペプチドワクチン後に低下することが判明し、今後臨床的有効性との関連性を検討することで治療効果評価や治療反応性予測に応用しうると考えられた。

がんペプチドワクチン療法は、全く新しいアプローチによる新規治療としての期待から、国内外において様々ながん種を対象として臨床試験が展開されているが、他のがんに比べて脳腫瘍を対象とした抗原ペプチドワクチン療法の臨床試験はほとんど施行されていない。実際に、腫瘍血管新生抑制療法とがんワクチン免疫療法という 2 つの治療要素を併せ持つ悪性脳腫瘍に対する治療はこれまでに行われておらず、本研究により、脳腫瘍微小環境の免疫学的解析や脳腫瘍患者での免疫応答、脳腫瘍血管新生機構の解明など、これまでのがん治療の臨床試験では検証されていなかった知見を、がん免疫療法や腫瘍血管新生抑制療法の改良・開発に向けた基礎研究にフィードバックし得る。また、基礎研究では判明しなかった現象が、臨床試験において初めて明らかにされることもある。これらの情報は、今後の免疫的治療法・血管新生抑制療法開発にとって欠かすことができない重要な指針となり、がん医療の発展に寄与する可能性がある。

### 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 1 件)

Shibao S, Ueda R, Saito K, Kikuchi R, Nagashima H, Kojima A, Kagami H, Pareira ES, Sasaki H, Noji S, Kawakami Y, Yoshida K, Toda M., A pilot study of peptide vaccines for VEGF receptor 1 and 2 in patients with recurrent/progressive high grade glioma. *Oncotarget*. 2018 Apr 20;9(30). 査読有、DOI: 10.18632/oncotarget.25131.

〔学会発表〕(計 2 件)

菊地亮吾、戸田正博、田村亮太、長島秀明、柴尾俊輔、齋藤克也、植田良、佐々木光、吉田一成、再発悪性神経膠腫に対するカクテルペプチドワクチン療法第 1/2 相臨床試、第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、2016 年

菊地亮吾、戸田正博、長島秀明、柴尾俊介、齋藤克也、植田良、サンペトラ オ

ルテア、佐谷秀行、佐々木光、吉田一成、  
悪性神経膠腫に対するペプチドワクチン  
療法の臨床試験および新規標的抗原  
DEPDC1 の解析、第 33 回日本脳腫瘍学会  
学術集会、2015 年

〔図書〕(計 1 件)

戸田 正博、中外医学社、Annual Review  
神経 2017 3. 脳腫瘍 1 脳腫瘍の免疫  
療法、2017 年、5

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

戸田 正博 (TODA, MASAHIRO)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：20217508