

Title	悪性神経膠腫に対する革新的ワクチン療法の開発
Sub Title	Development of novel vaccine immunotherapy for malignant glioma
Author	戸田, 正博(Toda, Masahiro)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>マウスグリオーマ細胞株で同定したNeoantigenを標的とするエピトープペプチドと抗PD-1抗体を組み合わせた複合免疫療法に、VEGFR1/VEGFR2を標的とするエピトープペプチドを上乗せすることで、腫瘍細胞、血管内皮、さらに免疫抑制性の制御性T細胞を統合的に標的とし、著明な生存期間の延長に成功した。さらにマウスBTSC株には特にVEGFR2が高発現することを見出し、同様の複合免疫療法で生存期間は延長した。また得られた治療後の組織変化を、実際にVEGFRsワクチン療法が為された悪性神経膠腫患者検体でも確認し、本複合免疫療法の治療効果の根拠を確立することができた。</p> <p>In the present study, we established a novel combinational immunotherapy using epitope peptide targeting glioma neoantigen and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)1/2, and anti-programmed cell death (PD)-1. Induced cytotoxic T lymphocytes could kill not only tumor vessel cells but also tumor cells and immunosuppressive regulatory T cells (Tregs) expressing VEGFRs. Remarkable prolonged survival was achieved in the glioma mouse model. Furthermore, we revealed that VEGFR2 is highly expressed in the glioma stem cells (GSCs). This approach could inhibit the proliferation of GSCs in an orthotopic mouse model. The histopathological findings of pre- and post-VEGFRs vaccination glioblastoma specimens demonstrated that more apoptosis was detected in tumor cells, and the number of Foxp3-positive cells decreased after vaccination. This novel immunotherapy targeting a large variety of cells has the possibility to show higher treatment efficacy for the patients with malignant glioma.</p>
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2017～2019 課題番号：17H04306 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_17H04306seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17H04306seika</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.

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04306

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対する革新的ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Vaccine Immunotherapy for Malignant Glioma

研究代表者

戸田 正博(Toda, Masahiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：20217508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスグリオーマ細胞株で同定したNeoantigenを標的とするエピトープペプチドと抗PD-1抗体を組み合わせた複合免疫療法に、VEGFR1/VEGFR2を標的とするエピトープペプチドを上乗せすることで、腫瘍細胞、血管内皮、さらに免疫抑制性の制御性T細胞を統合的に標的とし、著明な生存期間の延長に成功した。さらにマウスBTSC株には特にVEGFR2が高発現することを見出し、同様の複合免疫療法で生存期間は延長した。また得られた治療後の組織変化を、実際にVEGFRsワクチン療法が為された悪性神経膠腫患者検体でも確認し、本複合免疫療法の治療効果の根拠を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマ細胞におけるNeoantigenを標的とするエピトープペプチドと抗PD-1抗体を組み合わせた複合免疫療法に、さらにVEGFR1/VEGFR2を標的とするエピトープペプチドを上乗せすることで、腫瘍細胞のみならず、腫瘍血管内皮細胞や免疫抑制性の制御性T細胞といった腫瘍関連微小環境をも統合的に標的可能であった。さらにBTSCには特にVEGFR2が高発現するため、BTSCを標的とする治療にも応用可能であった。腫瘍の増大には、腫瘍細胞のみならず周囲微小環境が重要な役割を果たすため、本複合免疫療法は新たな治療戦略となり得る。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we established a novel combinational immunotherapy using epitope peptide targeting glioma neoantigen and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)1/2, and anti-programmed cell death (PD)-1. Induced cytotoxic T lymphocytes could kill not only tumor vessel cells but also tumor cells and immunosuppressive regulatory T cells (Tregs) expressing VEGFRs. Remarkable prolonged survival was achieved in the glioma mouse model. Furthermore, we revealed that VEGFR2 is highly expressed in the glioma stem cells (GSCs). This approach could inhibit the proliferation of GSCs in an orthotopic mouse model. The histopathological findings of pre- and post-VEGFRs vaccination glioblastoma specimens demonstrated that more apoptosis was detected in tumor cells, and the number of Foxp3-positive cells decreased after vaccination. This novel immunotherapy targeting a large variety of cells has the possibility to show higher treatment efficacy for the patients with malignant glioma.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫 免疫チェックポイント PD-1 VEGFR ネオアンチゲン

## 1. 研究開始当初の背景

免疫抑制性 checkpoint 阻害剤 PD-1 抗体による様々な癌に対する著明な治療効果が明らかになり、免疫療法に大きな注目が集められている。がん患者では、腫瘍細胞の発現する PD-L1 が T 細胞の PD-1 に結合し、T 細胞機能が抑制されているため、この checkpoint を阻害すると、T 細胞が再活性化され、がん細胞が消失することが明らかになった。一方、特殊な免疫環境に発生する悪性グリオーマに対して、免疫 checkpoint 阻害剤単独の効果は限定的である。理論的に、腫瘍の免疫原性が低い場合、免疫療法において最も重要な腫瘍特異的 T 細胞が十分に誘導されないため、免疫 checkpoint 阻害剤単独では有効でないと考えられる。

一方、最近のゲノム解析技術の進歩に伴い、網羅的遺伝子解析が可能となり、がん遺伝子変異に伴う neoantigen (腫瘍特異的な変異抗原) が腫瘍拒絶に重要であることが明らかになった。実際に、がんゲノム情報から予測された neoantigen が、がん患者の腫瘍浸潤リンパ球の標的抗原となることが証明された。現在まで、悪性グリオーマにおける neoantigen の報告はほとんどなく、さらに killer/helper epitope long peptide は同定されていない。

これまで我々は、グリオーマ抗原の同定、BTSC 解析を先駆的に行なっており、SEREX 法、RLGS 法など様々な技術を駆使して、10 種類以上のグリオーマ抗原を同定している。またマウスグリオーマモデルを用いて、neoantigen の同定に成功し、さらにグリオーマ抗原ペプチドにより誘導された T 細胞が脳腫瘍幹細胞 (BTSC) を破壊しうることを証明した。現在、これらの基礎研究成果に基づき、悪性グリオーマに対するペプチドワクチンの臨床試験を施行している。また、共同研究者らがヒト神経膠芽腫の組織学的・生物学的特徴を再現しうるマウス誘導 BTSC を開発し、マウスモデルを用いて BTSC による脳内の特殊な免疫学的解析や免疫治療解析が可能となった。

そこで、本研究では、腫瘍抗原特異的な T 細胞を強力に誘導する革新的ワクチンの開発を目的として、グリオーマの neoantigen および killer/helper epitope long peptide を同定する。さらにマウス BTSC モデルを用いて、革新的ワクチンと免疫 checkpoint 阻害の複合的免疫療法の有効性を検証し、臨床応用を目指す。

## 2. 研究の目的

免疫 checkpoint 阻害剤の著明な治療効果が明らかになり、癌の免疫療法が注目されているが、特殊な免疫学的環境に発生した悪性グリオーマに対する治療効果は限定的であり、その要因の究明と打開策が求められている。理論的に、腫瘍の免疫原性が低い場合、腫瘍特異的 T 細胞の誘導が不十分であるため、免疫 checkpoint 阻害剤単独では有効でないと考えられる。

我々は、腫瘍抗原特異的な T 細胞を強力に誘導する革新的ワクチンの開発を目的として、グリオーマの neoantigen と killer/helper epitope long peptide を同定し、免疫 checkpoint 阻害剤との併用療法の臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳腫瘍 neoantigen の免疫反応解析

脳腫瘍 neoantigen の解析を行い、候補分子を同定する。同定された neoantigen の予測アミノ酸配列から、HLA 結合性予測プログラム (BIMAS) とプロテアソーム切断予測プログラム (PAProC) を用いて HLA-A24 および HLA-A2 結合性エピートープペプチドを推測し、結合性の高い候補ペプチドを合成する。健常人からリンパ球を分離し、合成した CTL エピートープペプチドを用いて in vitro で刺激後、グリオーマ特異的な CTL 誘導能を解析して、ワクチンに有効な HLA-A24 および HLA-A2 結合性ペプチドを同定する。また、同定されたペプチドによる免疫誘導能を定量的に評価するために、同定ペプチドを用いてテトラマーおよび ELISPOT 解析法を確立し、誘導された CTL との結合性、検出度を解析する。

### (2) 腫瘍抗原ワクチンと免疫 checkpoint 阻害による複合免疫療法の治療解析

マウス脳腫瘍幹細胞 (BTSC) およびマウスグリオーマモデルを用いて、これまで我々が同定した脳腫瘍抗原および同定された neoantigen と免疫 checkpoint 阻害剤との複合免疫療法の有効性を検証する。まず、同定された腫瘍抗原投与方法の最適化を行うため、腫瘍抗原ペプチドと各種アジュバントの組み合わせによるワクチンを投与後、一定期間後に CTL 解析を行い、最も有効なワクチンの投与方法を決定する。次にマウス BTSC モデルを用いて、上記で最適化されたワクチン投与と免疫 checkpoint 阻害剤併用療法を行い、同様に CTL 解析、IVIS imaging system を利用した in vivo 腫瘍イメージングおよび生存期間を評価し、治療効果を検証する。

## 4. 研究成果

本研究は、特殊な免疫学的環境に発生する悪性神経膠腫に対して、腫瘍抗原特異的な T 細胞を誘導するワクチンと免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせ、相乗効果を生み出す革新的治療戦略の樹立を目指すものである。

まず、我々は、患者グリオーマ組織検体及びマウスグリオーマの組織検体を病理組織学的に評価し、腫瘍血管内皮細胞のみならず、腫瘍細胞自身、及び免疫抑制性の制御性 T 細胞に VEGFR1 や VEGFR2 が発現することを同定した。そこで、マウスグリオーマ細胞株 GL261 で同定された

Neoantigen (GARC-1) を標的するエピトープペプチドと抗 PD-1 抗体を組み合わせた複合免疫療法に、さらに VEGFR1/VEGFR2 を標的とするエピトープペプチドを組み合わせることで、腫瘍細胞及び周囲の微妙環境をも統合的に治療する戦略を立てた。その結果、単独治療に比して著明な生存期間の延長を認めた。また、抗 PD-1 抗体投与の最適なタイミングを同定した結果、複合免疫療法群では、腫瘍内に CD8(+)PD-1(+)細胞が良好に動員されていることも確認した。さらに、腫瘍血管内皮だけでなく、制御性 T 細胞を殺傷していることを組織学的に、また遺伝子発現レベルで確認し、この治療戦略が腫瘍の増大に寄与する多種の細胞を統合的に標的とすることを見出した。さらに、マウス BTSC 株には特に VEGFR2 が強発現する事を確認し、BTSC モデルマウスに対しても同治療戦略を行い、生存期間は同様に延長する傾向を示し、VEGFR2 を標的とする治療が BTSC も標的にし得ることを確認した。

一方、ヒト悪性神経膠腫患者を対象とした VEGFR ワクチン療法の臨床試験で得た貴重なワクチン投与前後の同一患者検体を解析したところ、動物モデル同様に、腫瘍関連微小環境を標的とすることを証明することができた。さらに、腫瘍血管内皮細胞ではなく、腫瘍細胞自身に発現する VEGFR を定量的に評価し、その発現率が、本治療の有効な治療効果予測バイオマーカーになり得ることを報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakagawa Y, Sasaki H, Ohara K, Ezaki T, Toda M, Ohira T, Kawase T, Yoshida K.	4. 巻 106
2. 論文標題 Clinical and molecular prognostic factors for long-term survival of the patients with glioblastomas in a single institutional consecutive cohort.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World Neurosurg.	6. 最初と最後の頁 165-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.wneu.2017.06.126. Epub 2017 Jun 27.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura R, Ohara K, Sasaki H, Morimoto Y, Yoshida K, Toda M.	4. 巻 136
2. 論文標題 Histopathological vascular investigation of the peritumoral brain zone of glioblastomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurooncol.	6. 最初と最後の頁 233-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-017-2648-9. Epub 2017 Nov 29.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibao Shunsuke, Ueda Ryo, Saito Katsuya, Kikuchi Ryogo, Nagashima Hideaki, Kojima Atsuhiko, Kagami Hiroshi, Pareira Eriel Sandika, Sasaki Hikaru, Noji Shinobu, Kawakami Yutaka, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 A pilot study of peptide vaccines for VEGF receptor 1 and 2 in patients with recurrent/progressive high grade glioma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 21569 ~ 21579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tamura Ryota, Ohara Kentaro, Sasaki Hikaru, Morimoto Yukina, Kosugi Kenzo, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 120
2. 論文標題 Difference in Immunosuppressive Cells Between Peritumoral Area and Tumor Core in Glioblastoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e601 ~ e610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.wneu.2018.08.133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Ryogo, Ueda Ryo, Saito Katsuya, Shibao Shunsuke, Nagashima Hideaki, Tamura Ryota, Morimoto Yukina, Sasaki Hikaru, Noji Shinobu, Kawakami Yutaka, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 A Pilot Study of Vaccine Therapy with Multiple Glioma Oncoantigen/Glioma Angiogenesis-Associated Antigen Peptides for Patients with Recurrent/Progressive High-Grade Glioma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 263 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8020263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kosugi Kenzo, Tamura Ryota, Ohara Kentaro, Morimoto Yukina, Kuranari Yuki, Oishi Yumiko, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Immunological and vascular characteristics in cavernous sinus meningioma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 198 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2019.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Mizuto, Tamura Ryota, Tamura Haruka, Mase Taro, Kosugi Kenzo, Morimoto Yukina, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Analysis of Tumor Angiogenesis and Immune Microenvironment in Non-Functional Pituitary Endocrine Tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 695 ~ 695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8050695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Ryota, Miyoshi Hiroyuki, Sampetrea Oltea, Shinozaki Munehisa, Morimoto Yukina, Iwasawa Chizuru, Fukaya Raita, Mine Yutaka, Masuda Hirotaka, Maruyama Tetsuo, Narita Minoru, Saya Hideyuki, Yoshida Kazunari, Okano Hideyuki, Toda Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Visualization of spatiotemporal dynamics of human glioma stem cell invasion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-019-0462-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Yukina, Tamura Ryota, Ohara Kentaro, Kosugi Kenzo, Oishi Yumiko, Kuranari Yuki, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 144
2. 論文標題 Prognostic significance of VEGF receptors expression on the tumor cells in skull base chordoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03221-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Ryota, Sato Mizuto, Morimoto Yukina, Ohara Kentaro, Kosugi Kenzo, Oishi Yumiko, Kuranari Yuki, Murase Makoto, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 114
2. 論文標題 Quantitative assessment and clinical relevance of VEGFRs-positive tumor cells in refractory brain tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Pathology	6. 最初と最後の頁 104408 ~ 104408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexmp.2020.104408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Ryota, Morimoto Yukina, Kosugi Kenzo, Sato Mizuto, Oishi Yumiko, Ueda Ryo, Kikuchi Ryogo, Nagashima Hideaki, Hikichi Tetsuro, Noji Shinobu, Kawakami Yutaka, Sasaki Hikaru, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Correction to: Clinical and histopathological analyses of VEGF receptors peptide vaccine in patients with primary glioblastoma - a case series	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-06783-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Ryota, Fujioka Masato, Morimoto Yukina, Ohara Kentaro, Kosugi Kenzo, Oishi Yumiko, Sato Mizuto, Ueda Ryo, Fujiwara Hirokazu, Hikichi Tetsuro, Noji Shinobu, Oishi Naoki, Ogawa Kaoru, Kawakami Yutaka, Ohira Takayuki, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 A VEGF receptor vaccine demonstrates preliminary efficacy in neurofibromatosis type 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13640-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本佑紀奈、戸田正博、田村亮太、谷口智恵、河上裕、吉田一成
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対するVEGFR2ワクチンと抗PD-1抗体併用療法の有効性の検討
3. 学会等名 第36回 日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本佑紀奈、戸田正博、田村亮太、谷口智恵、河上裕、吉田一成
2. 発表標題 マウスグリオーマモデルを用いた腫瘍抗原/VEGF receptorワクチンと抗PD-1抗体併用療法の有効性の検討
3. 学会等名 第77回 日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 神経線維腫症 型患者に発生する腫瘍に対するペプチドワクチン及びペプチドワクチン組成物	発明者 戸田正博、田村亮太	権利者 慶應義塾
産業財産権の種類、番号 特許、2017-100361	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

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