

ISSN 1346-9312

# *Neuro-Oncology (Tokyo)*

*2012. vol22. No1*

第43回 ニューロ・オンコロジーの会(2012,4)機関誌

共催：ニューロ・オンコロジーの会  
M S D 株式会社

# *Neuro-Oncology (Tokyo)*

2012. vol22. No. 1

## 主題

“若手脳腫瘍研究者の息吹を感じる萌芽的研究”

“診断・治療・手術に苦慮した症例、珍しい症例など”

第43回 ニューロ・オンコロジーの会(2012,4)機関誌

# 目 次

Poly(I:C) と IL-10 siRNA をアジュバントとして用いた悪性神経膠腫に対する樹状細胞免疫療法……………1	
東京慈恵会医科大学葛飾医療センター 脳神経外科 赤崎 安晴 ほか	
初発膠芽腫患者に対する臨床多施設共同試験:	
手術、放射線、テモゾロマイド、ワクチンの4者併用療法……………6	
筑波大学 人間総合科学研究科 脳神経外科 石川 栄一 ほか	

# Poly(I:C) と IL-10 siRNA をアジュバントとして用いた 悪性神経膠腫に対する樹状細胞免疫療法

## Adjuvanticity of Poly(I:C) and IL-10 siRNA in dendritic cell based immunotherapy against malignant glioma

東京慈恵会医科大学脳神経外科<sup>1)</sup>、  
東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所悪性腫瘍治療研究部<sup>2)</sup>

○赤崎 安晴<sup>1)</sup>、菊池 哲郎<sup>2)</sup>、山本 洋平<sup>1)</sup>、荒井 隆雄<sup>1)</sup>、  
田中 俊英<sup>1)</sup>、常喜 達裕<sup>1)</sup>、阿部 俊昭<sup>1)</sup>

Department of Neurosurgery, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan<sup>1)</sup>

Department of Oncology, Institute of DNA Medicine, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan<sup>2)</sup>

Yasuharu Akasaki<sup>1)</sup>, Tetsuro Kikuchi<sup>2)</sup>, Yohei Yamamoto<sup>1)</sup>, Takao Arai<sup>1)</sup>, Toshihide Tanaka<sup>1)</sup>,  
Tatsuhiko Joki<sup>1)</sup>, and Toshiaki Abe<sup>1)</sup>

**Abstract:** Apart from generating T-helper (Th) effector responses, dendritic cells (DCs) are capable of initiating tolerance against the inciting antigens. Therefore, successful DC-based immunotherapy against malignant tumors requires an additional strategy to activate antigen-processing DCs. We studied the antitumor immune responses conferred by fusions of DCs and glioma cells in vitro. Fusion cells (FCs) were stimulated with polyriboinosinic polyribocytidylic acid [Poly(I:C)] and/or small interference RNA (siRNA) of IL-10 (IL-10-siRNA). Increased IFN- $\beta$  expression induced by Poly(I:C) transfection was accompanied by enhanced production of IL-10 and IL-12p70 in the FCs. We also found that the ability of Poly(I:C)-transfected FCs to produce IL-12p70, but not IFN- $\beta$ , was preserved when endogenous IL-10 was suppressed by IL-10-siRNA. To analyze the antigen-presenting function further, DCs, glioma cells, and peripheral lymphocytes were established from patients newly diagnosed with glioma. In this experiment, peripheral lymphocytes were stimulated with autologous FCs and restimulated with autologous glioma cells. CD4+ T cells isolated from the stimulated lymphocytes were subjected to the ELISPOT and WST-1 assays, which revealed that the IL-10-siRNA/Poly(I:C)-cotransfected FCs elicit an efficient tumorspecific Th1 response. These findings support the relevance of using Poly(I:C) and IL-10-siRNA in clinical immunotherapy protocols with an FC-based vaccine for patients with malignant glioma as a means of promoting Th1-induced tumor antigen presentation.

**Key words:** dendritic cell, glioma, Th1, immunotherapy

### 【要旨】

樹状細胞 (dendritic cell; DC) と glioma 細胞との融合細胞 (fusion cell; FC) を用いた免疫療法は、未知の抗原を含むあらゆる腫瘍特異抗原に対して細胞性免疫を誘導することができる治療である。今回我々は、悪性神経膠腫症例の細胞を用いて、FC のサイトカイン分泌能および細胞性免疫誘導能に関する *in vitro* の研究を行ったので報告する。Poly(I:C) にて FC を刺激したところ、未刺激の FC に比べて IL-10、IL-12p70、IFN- $\beta$  の分泌が有意に増加していた。

Poly(I:C) 刺激で増幅した FC の IL-12p70 分泌能は、内因性 IL-10 の作用によって急速に減弱することが確認されたが、IL-10-siRNA を用いて FC からの IL-10 分泌を抑制すると IL-12p70 の分泌は、48 時間後も高い状態が維持されていた。FC と自家末梢血リンパ球とを混合培養した後、CD4+T 細胞だけを分離して ELISPOT および WST-1 assay を行ったところ、IL-10-siRNA/Poly(I:C) で共同刺激した FC 群において有意な 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) 反応の誘導が確認された。以上の結果は、悪性神経膠腫に対する FC

免疫療法におけるアジュバントとして Poly(I:C) と IL-10-siRNA を用いることの有用性を示しているものと考えた。

### 【はじめに】

細胞障害性 T 細胞 (CTL) やヘルパー T 細胞 (Th) に対する効果的な腫瘍抗原の提示は、腫瘍細胞に対する細胞性免疫反応の誘導と維持にとって極めて重要なステップであり、抗原提示能を有する種々の細胞の中でその能力が最も高いと考えられているものが DC である<sup>1)</sup>。DC は、CTL や Th1 反応を強力に誘導する一方、処理した抗原に対して免疫学的寛容状態を誘導する能力も有していることが知られている<sup>2)</sup>。従って、悪性腫瘍に対する DC を基調とした免疫療法においては、免疫寛容誘導型 DC から細胞性免疫誘導型 DC へ強制的にシフトさせるための何らかの操作を加える必要がある。我々はこれまでに、悪性神経膠腫に対する FC 免疫療法において、recombinant IL-12 併用療法の有用性を報告してきた<sup>3,4)</sup>。IL-12p70 は、強力な Th1 反応誘導因子であり<sup>5)</sup>、悪性腫瘍に対する免疫療法をより効果的なものにするためには必要不可欠な存在と考える。そして更に、FC 免疫療法をより効果的なものにするためには、FC 自身からの内因性 IL-12 の分泌を増強させることが最も効果的なのではないかと考えている。

自然免疫機構において中心的な役割をなすことで知られる toll-like receptor (TLR) は、LPS や double-stranded RNA (dsRNA) に代表される pathogen associated molecular patterns (PAMPs) を認識し、病原微生物に対する免疫反応を誘導する<sup>6,7)</sup>。一方 TLR は、DC においても発現されていることから、PAMPs の刺激は、DC を介した獲得免疫の活性化にも関与することが知られてきている。中でも dsRNA 合成アナログである Poly(I:C) は、TLR3 を介した刺激で myeloid 系 DC を活性化し、細胞性免疫を誘導することが報告された<sup>8)</sup>。これらの報告を基に我々は、この Poly(I:C) が FC 免疫療法におけるアジュバントとして利用できるのではないかと考え、今回の実験を行った。

### 【対象・方法】

**腫瘍細胞：**当施設で新たに GBM と診断された手術摘出組織から primary culture glioma 細胞 (JMG-260, JMG-414, JMG-43A) を誘導した。Human glioma cell line として LN-18 を用いた。

**DC と末梢血リンパ球の準備：**Human PBMC を AIM-V medium に suspend し、24-well plate にて 37°C 2 時間培養した後、浮遊細胞を回収した。この浮遊細胞は、末梢血リンパ球としてその後の実験に用いるために凍結保存した。Plate に付着した細胞は、

自己血清 (1%)、GM-CSF (10ng/ml)、IL-4 (10ng/ml)、TNF- $\alpha$  (10ng/ml) 入りの AIM-V medium で 7 日間培養し、浮遊してきた細胞および半付着細胞を DC として用いた。

**FC の準備：**DC と 300Gy の放射線照射を施した glioma 細胞とを 2:1 の比率で混合し、ポリエチレングリコールを用いて過去の報告のごとく両者の FC を作製した<sup>3,4)</sup>。融合した後 FC は、25cm<sup>2</sup> flask にて 24~48 時間培養した。

**RNA および RNA transfection：**Poly(I:C) は Sigma より購入した。IL-10 silencing をターゲットにした ON-TARGETplus SMARTpool siRNA of IL-10 (IL-10-siRNA) および ON-TARGETplus siCONTROL (control-siRNA) を Dharmacon より購入した。

Transfection 試薬として Invitrogen より購入した Lipofectamine RNAiMAX を用いた。Poly(I:C)、IL-10-siRNA、control-siRNA の各 RNA と Lipofectamine との混合液を製造元プロトコールに基づいて作成し、融合直後の FC 培養液内に投入した。

**Cell isolation：**FITC-conjugated antihuman CD11c (BioSource)、microbead-conjugated antihuman CD4 antibody および microbead-conjugated anti-FITC antibody (Miltenyi Biotec) を用いて、CD4+ T細胞と CD11c+ DC を isolation した。

**ELISA：**IL-10、IL-12p70 および IFN- $\beta$  ELISA kit を R&D System より購入し、実験に用いた。それぞれの最低検出域は、IL-10 と IL-12p70 が 7.8pg/ml、IFN- $\beta$  が 31.3pg/ml。

**ELISPOT：**6-well plate にて FC ( $1 \times 10^5$  cells/well) と自家末梢血リンパ球 ( $5 \times 10^6$  cells/well) とを 5 日間混合培養した。続いてそこに放射線照射後の自家 glioma 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/well) を投入し、2 日間培養した。混合培養された細胞から CD4+ T細胞を分離・回収し、ELISPOT assay 用のサンプルとして用いた。IL-10 および IFN- $\gamma$  ELISPOT kit を Mabtech より購入し、本実験に用いた。

**T cell proliferation assay：**6-well plate にてリンパ球混合培養細胞から分離・回収した CD4+ T細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/well) と無刺激の自家末梢血リンパ球 ( $4 \times 10^6$  cells/well) とを rIL-2 (10ng/ml) と共に 24 時間混合培養し、WST-1 (Roche) を用いて、cell proliferation assay を行った。

**統計：**Student T 検定にて統計学的検討を行った。

### 【結果】

#### FC に対する IL-10-siRNA transfection の影響

IL-10-siRNA による FC からの IL-10 分泌抑制が、IL-12p70 や IFN- $\beta$  の分泌にどう影響するかを確認した。本実験では、healthy donor から誘導した DC と LN-18 との FC を作製し、その培養上清を ELISA の

サンプルとした。その結果、IL-10-siRNA による FC からの IL-10 分泌抑制は確認できたが、いずれの群においても IFN- $\beta$  の分泌に変化は、認められなかった (Fig. 1)。また、いずれの条件においても IL-12p70 は検出されなかった (データ非提示)。

### FC に対する Poly (I:C) transfection の影響

次に、FC に対する Poly (I:C) 刺激の及ぼす影響を確認した。本実験も、healthy donor PBMC から誘導した DC と LN-18 との FC を作製し、その培養上清を用いて ELISA を行った。結果は、Poly (I:C) の刺激によって、IL-10, IL-12p70, IFN- $\beta$  すべての分泌が有意に増加した (Fig. 2)。

更なる実験として我々は、IL-10-siRNA と Poly (I:C) の両方で FC を刺激した場合、サイトカイン分泌にどのような変化が起こるかを 24 時間後と 48 時間後の培養上清において確認した。その結果、24 時間後には Poly (I:C) 刺激によって上昇した IL-10 分泌が IL-10-siRNA によって抑制されることが確認されたが、IL-12p70 や IFN- $\beta$  の分泌には有意差を認めなかった (Fig. 3A)。ところが、48 時間後では、IL-10-siRNA 非使用群で IL-10 分泌が上昇し、それに伴って IL-12p70 分泌が著明に減弱していた (Fig. 3B)。

一方、IL-10-siRNA/Poly (I:C) 共同刺激群の 48 時間後は、IL-10 分泌の抑制状態が持続しており、それに伴って IL-12p70 分泌も有意に高い状態が維持されていた (Fig. 3B)。IFN- $\beta$  分泌は、24 時間後に比べて 48 時間後には著明に減弱していたが、IL-10-siRNA 非使用群と使用群間の有意差は認めなかった (Fig. 3A, B)。

### Autologous Model による FC の機能解析

FC の抗原提示能の解析を目的に、GBM 症例から primary culture glioma 細胞、DC および末梢血リンパ球をそれぞれ誘導した。そして、primary culture glioma 細胞の JMG-260 (Fig. 4A), JMG-414 (Fig. 4B), JMG-43A (Fig. 4C) とそれぞれの自家 DC との FC を作製し、IL-10-siRNA や Poly (I:C) で刺激した後、48 時間後の培養上清中のサイトカインを測定した。結果は、healthy donor model と同様に、IL-10-siRNA 非使用群では、IL-10 分泌が上昇し、それに伴って IL-12p70 分泌が著明に減弱していた (Fig. 4A-C)。一方、IL-10-siRNA/Poly (I:C) 共同刺激群では、IL-10 分泌が抑制され、IL-12p70 分泌が有意に高い状態であった (Fig. 4A-C)。IFN- $\beta$  の分泌に関しては、両群に有意差を認めなかった (Fig. 4A-C)。

Fig. 1

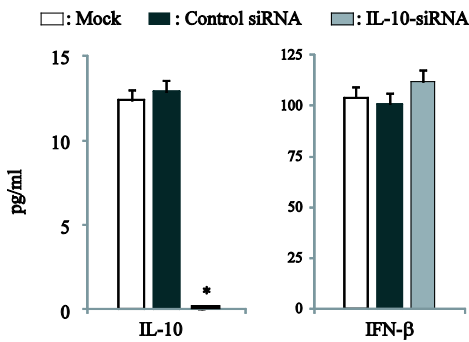


Fig. 3

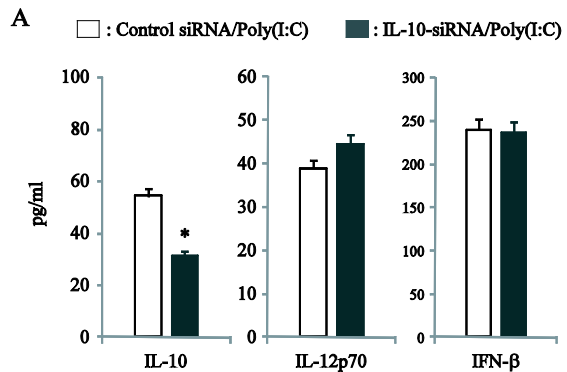
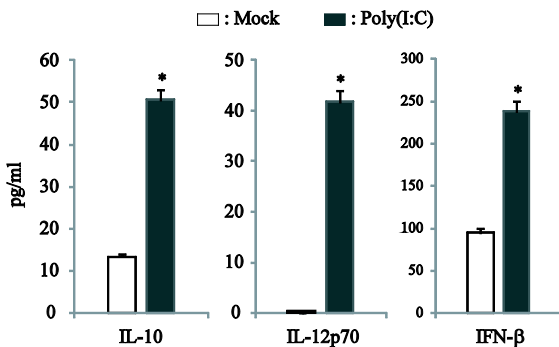


Fig. 2



B

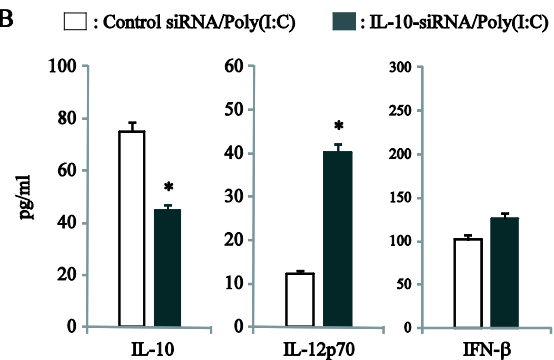


Fig. 4

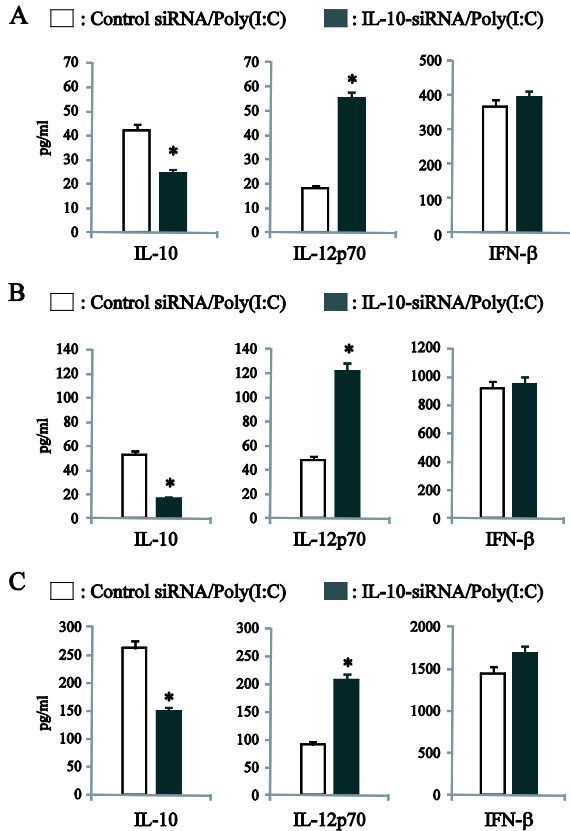
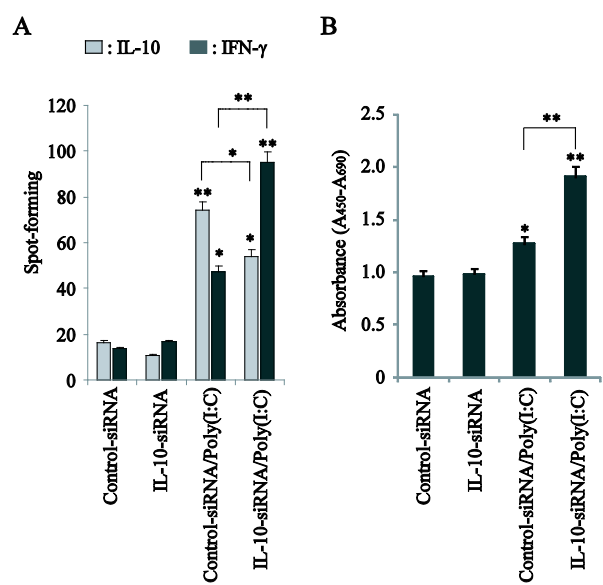


Fig. 5



これらの観察の後、IL-10-siRNA/Poly(I:C)にて共同刺激された FC が Th1 反応を効率的に誘導できるかどうかの実験を行った。末梢血リンパ球は、まず自家 FC と 5 日間混合培養され、それに引き続いて自家 glioma 細胞と 2 日間混合培養された。この混合細胞群の中から CD4+ T 細胞のみを分離・回収し、ELISPOT assay 用のサンプルとして用いた。Figure 5A に示す通り、control FC や IL-10-siRNA 単独刺激の FC は、CD4+ T 細胞に対する活性化能をほとんど有していなかったのに対して、Poly(I:C) 単独刺激の FC は、IFN-γ 分泌性 CD4+ T 細胞を誘導したのと同時に IL-10 分泌性 T 細胞も著明に誘導していた (Fig. 5A)。一方、IL-10-siRNA/Poly(I:C) 共同刺激の FC は、他群と比較しても IFN-γ 分泌性 CD4+ T 細胞を有意に誘導していた (Fig. 5A)。

更に Figure 5A で確認された、IFN-γ 分泌性 CD4+ T 細胞が Th1 としての機能を有するかどうかを確認するために、各群から分離・回収した CD4+ T 細胞と無刺激の自家末梢血リンパ球とを 24 時間混合培養し、WST-1 による cell proliferation assay を行った。この実験では、Figure 5B に示すように、IL-10-siRNA/Poly(I:C) FC にて誘導された IFN-γ 分泌性 CD4+ T

細胞は、自家末梢血リンパ球に対して有意な細胞増殖誘導能を有していることが確認され、IL-10-siRNA/Poly(I:C) FC が効率的に Th1 反応を誘導したことを示していた。

【考察】

本研究において我々は、Poly(I:C) の刺激によって FC の IL-12p70 分泌能が増強され、それと同時に Th1 反応が効率的に誘導されることを示した。IL-12p70 は、強力な Th1 免疫反応の誘導因子であることが知られており、Butterfield らは、DC を基調とした免疫療法において DC の IL-12p70 分泌能を評価することの重要性を訴えている<sup>9)</sup>。すなわち本研究結果は、悪性神経腫瘍に対する FC 免疫療法において Poly(I:C) をアジュバントとして用いることの妥当性を示したものと考えられる。

我々はまた、FC からの IL-10 分泌も、IL-12p70 と同様、Poly(I:C) 刺激によって増加することを示した。IL-10 は、proinflammatory signal に対する強力な抑制因子として知られている<sup>10)</sup>。また内因性 IL-10 は、DC に作用して DC 自体の抗原提示能を減弱させる働きも持っている<sup>11)</sup>。そこで我々は、Poly(I:C) 刺激によって上昇した IL-10 分泌を少しでも抑制することができれば FC の抗原提示能をより高めることが

できると考え、IL-10-siRNA/Poly(I:C)の共同刺激をFCに対して試みた。すると、FCからのIL-10分泌は抑制され、それと同時にIL-12p70の増幅状態が長時間維持されることを突き止めた。さらに興味深いことに、IL-10-siRNA/Poly(I:C) FC群においては、Poly(I:C)単独群に比べて、Th1反応誘導能が有意に高いことが確認された。これは、FC免疫療法におけるアジュバントとしてPoly(I:C)とIL-10-siRNAの両方を用いることの有用性を強く示唆するものであると考える。

本研究では、Poly(I:C)刺激によるIL-10やIL-12p70の分泌増強のメカニズムに関する解析は行わなかった。しかしながら、それはPoly(I:C)-TLR3 interactionによるIFN- $\beta$ 分泌増強が関与しているものと推察している。IFN- $\beta$ に代表される1型IFNのDCに対するautocrine loopおよびparacrine loopのシグナルがTLRを介したIL-12p70分泌増強に関与していることが示されたからである<sup>12)</sup>。Poly(I:C)-TLR3 interactionによるIFN- $\beta$ 分泌誘導は、過去の報告でその明確なシグナル伝達系が既に示されており<sup>13)</sup>、実際本研究においてもPoly(I:C)刺激によるFCからのIFN- $\beta$ 分泌増強が確認されている。そして、IL-12p70やIFN- $\beta$ が共にIL-10の強力な誘導因子であることは、周知の事実である<sup>14)</sup>。すなわちこれらをまとめると、Poly(I:C)-TLR3 interactionによりFCからのIFN- $\beta$ 分泌が誘導され、それが引き金となってIL-12p70そしてIL-10の分泌が誘導されたものと考えられる。

#### 【結語】

IL-10-siRNAおよびPoly(I:C)にてFCを刺激したところIL-12p70分泌の著明な増強を認め、効率的にTh1免疫反応を誘導することが確認された。この結果は、悪性神経膠腫に対するFC免疫療法におけるアジュバントとしてPoly(I:C)とIL-10-siRNAを用いることの有用性を示唆したものと考えた。

#### 【文献】

- 1) Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392: 245-252.
- 2) Steinman R, Hawiger D, Nussenzweig M. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:685-711.
- 3) Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S, et al. Antitumor effect of immunizations with fusions of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model. *J Immunother*. 2001;24:106-113.
- 4) Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, et al. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother*. 2004; 27:452-459.
- 5) Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 133-146.
- 6) Medzhitov R, Janeway CJ. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97.
- 7) Verdeil G, Marquardt K, Surh C, et al. Adjuvants targeting innate and adaptive immunity synergize to enhance tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:16683-16688.
- 8) Verdijk R, Mutis T, Esendam B, et al. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly(I:C)] induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol*. 1999;163:57-61.
- 9) Butterfield L, Gooding W, Whiteside T. Development of a potency assay for human dendritic cells: IL-12p70 production. *J Immunother*. 2008;31:89-100.
- 10) Moore K, de Waal Malefyt R, Coffman R, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683-765.
- 11) Akasaki Y, Liu G, Chung N, et al. Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol*. 2004;173:4352-4359.
- 12) Gautier G, Humbert M, Deauvieau F, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med*. 2005; 201:1435-1446.
- 13) Matsumoto M, Seya T. TLR3: interferon induction by doublestranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60: 805-812.
- 14) Gately M, Renzetti L, Magram J, et al. The interleukin-12/ interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 495-521.



# 初発膠芽腫患者に対する臨床多施設共同試験: 手術、放射線、テモゾロマイド、ワクチンの4者併用療法

## Combination therapy using surgery, radiation, temozolomide and autologous tumor vaccine for treatment of patients with initially diagnosed glioblastoma

筑波大学人間総合科学研究科脳神経外科<sup>1)</sup>、同大学陽子線医学利用研究センター<sup>2)</sup>、東京女子医科大学脳神経外科<sup>3)</sup>、筑波大学 CREIL センター<sup>4)</sup>、セルメディシン株式会社<sup>5)</sup>、都立駒込病院放射線診療科<sup>6)</sup>、埼玉医科大学脳神経外科<sup>7)</sup>、大分大学脳神経外科<sup>8)</sup>

○石川 栄一<sup>1)</sup>、山本 哲哉<sup>1)</sup>、中井 啓<sup>1)</sup>、高野 晋吾<sup>1)</sup>、坪井 康次<sup>1,2)</sup>、丸山 隆志<sup>3)</sup>、田中 雅彦<sup>3)</sup>、生田 聡子<sup>3)</sup>、橋本 幸一<sup>4)</sup>、原田 義則<sup>4)</sup>、上前 洋二<sup>1,5)</sup>、大野 忠夫<sup>5)</sup>、唐沢 克之<sup>6)</sup>、松谷 雅生<sup>7)</sup>、阿部 竜也<sup>8)</sup>、村垣 善浩<sup>3)</sup>、松村 明<sup>1)</sup>

### 【要旨】

【目的】現在施行中の、初発膠芽腫患者術後に対する放射線、テモゾロマイドおよび自家腫瘍ワクチンを用いた多施設共同臨床試験(UMIN1426)の中間解析について報告する。【対象・方法】登録適応基準は、16-75歳、テント上の初発膠芽腫、最大限の外科的摘出、KPS 60%以上、リンパ球数 1000 以上などとし、プライマリーエンドポイントは全生存率、目標症例数は 25 例とした。1 回目中間評価時の登録症例 17 例において、平均年齢は 50 歳で、術前の KPS 中央値は 80%、術前の腫瘍最大径は 57mm であった。【結果】登録症例のうち、解析可能登録症例 16 例において、ワクチンとの因果関係が疑われる副作用は、皮膚発赤 14 例、けいれん 1 例、発熱 1 例と軽微であった。全生存期間中央値は未到達、暫定無増悪期間中央値は 7.4 か月と前研究と同等以上であり、長期の無増悪症例が多い傾向があった。ワクチン症例 37 例(前研究+本研究)における無増悪期間の影響因子として、DTH-2 および全摘出率が有意であった。【結語】以上の結果をもとに、効果安全性評価委員会で試験は継続可能と判断され、2012 年 3 月時点で、予定登録数まで完遂に至っている。

### 【はじめに】

原発性脳腫瘍の代表格である悪性グリオーマは非常に難治性で、手術摘出・放射線治療・化学療法による標準治療でも、治療成績は未だ不十分である。当科では様々な免疫細胞療法・腫瘍ワクチン療法の研究・開発を行ってきた。これらの治療法のコンセプトは、体外あるいは体内で腫瘍を殺傷するキラーリンパ球を誘導するというものである。

今回、我々は現在施行中の、初発膠芽腫患者術後に対する放射線、テモゾロマイドおよび自家腫瘍ワクチンを用いた多施設共同臨床試験(UMIN1426)の中間解析について報告する。

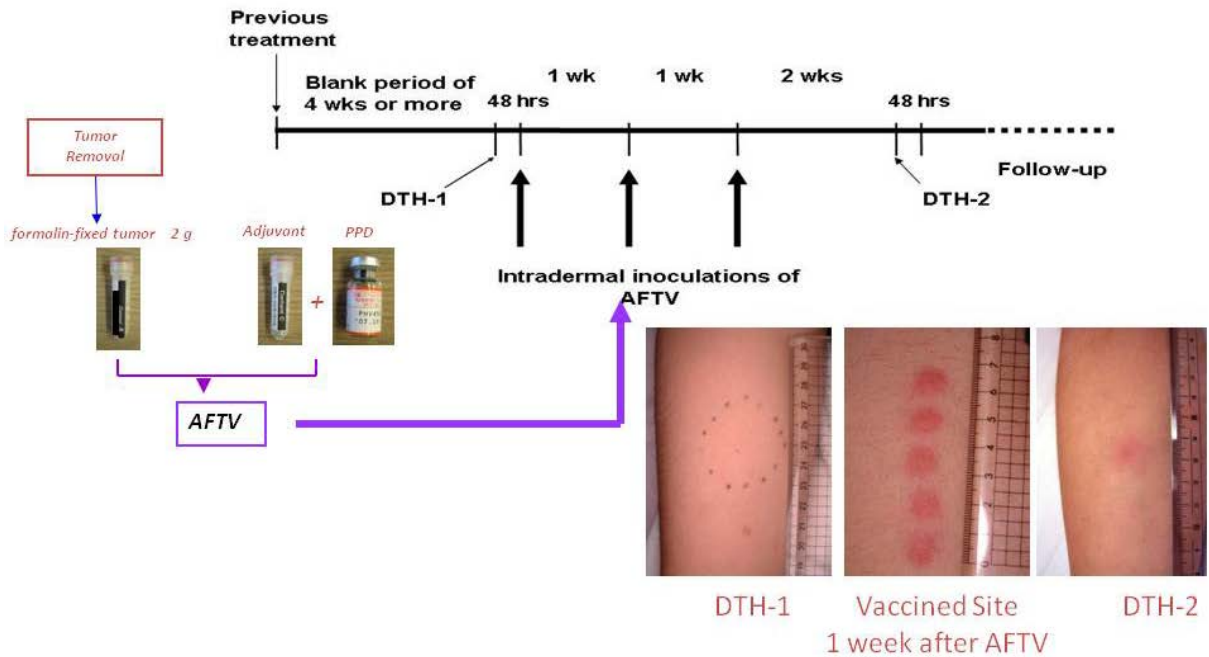
歳、テント上の初発膠芽腫、最大限の外科的摘出、KPS 60%以上、リンパ球数 1000 以上などを登録適応基準とした。

本研究に用いたワクチンは、患者腫瘍組織から得られた腫瘍断片をアジュバントとともに本人に 3 回皮下接種するという、いわゆる「自家腫瘍ワクチン」である(図 1)。プライマリーエンドポイントは全生存率とし、目標症例数は 25 例とした。また、本臨床研究にあたり、リファレンスセンターを群馬大学・中里教授に、データセンターを筑波大学 CREIL センターに依頼し、登録症例の診断・経過の客観的検討を行った。

### 【対象と方法】

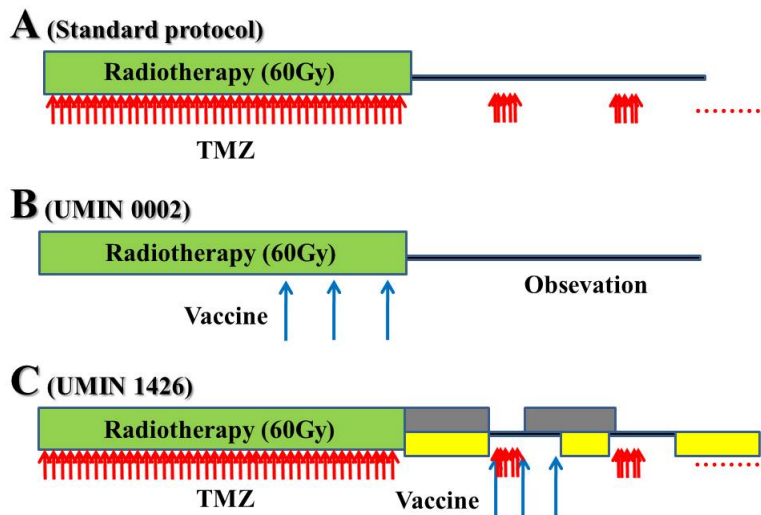
本研究の目的は、初発膠芽腫患者に対し、放射線、TMZ 併用時の自家腫瘍ワクチンの術後再発予防/残存腫瘍治療効果を明らかにすることとし、16-75

Figure 1



A protocol schedule of autologous fixed tumor vaccine, including vaccine preparation of tumor fragment obtained from a patient with glioblastoma and intradermal injection into the patient, are shown.

Figure 2



Standard treatment for initially diagnosed glioblastoma (A), vaccine protocol in the previous study (B), and new vaccine protocol in this study (C, UMIN1426) are shown.

## 【結果】

本研究の研究プロトコルを図2に示す。前回研究(B)では、照射中にワクチンを施行し、その後再発まで経過観察としたが、本研究では、初期治療はテモゾロマイド(TMZ)の標準治療に準拠し、1回目維持治療に合せワクチン投与を行った。

平成23年6月時点(1回目中間評価時)で、17例に登録が行われ、平成24年3月時点(2回目中間評価)で、26例の登録をもって、研究登録を終了とした。本紙面では、詳細な検討を行った1回目中間評価時のデータを元に結果を報告する。

表1に、1回目中間評価時の登録症例を示す。平均年齢は50歳(36-66)で、術前のKPS中央値は80%(60-100)、術前の腫瘍最大径は57mm(14-105)であった。RTOG/EORTCは、III、IV、Vがそれぞれ3例、6例、7例であり、前回研究より、腫瘍サイズが大きく、RTOG/EORTCが悪い症例が多い傾向にあった。

登録症例17例の中から、観察期間が6か月以上となり解析可能であった15例について結果を示す。全摘出率は、60%(9/15)(前回研究は73%)、皮内テスト陽性率は43%(6/14)(前回研究は73%)、生存期間中央値(mOS)は未到達(前回研究は、論文発表時で21.4か月、追跡終了時で、19.2か月)、暫定無増悪期

間中央値(mPFS)は7.4か月(前回研究7.1か月)であった。全摘出率はほぼ同等で、皮内テスト陽性率はやや低値となった。

図3に、PFSに関する Kaplan-Meier 曲線を示す。現時点の統計解析では、わずかに有意差を得ないものの、本研究の暫定 PFS 12 は 38.4%(前回研究 31.8%)、PFS 18 は 38.4%(前回研究 9.1%)であり、長期無再発例が非常に多い傾向にあった。

本研究の有害事象は、のべ40例以上の症例にG1以上の有害事象を呈したが、このうちワクチンとの因果関係が否定できない事象においては、皮膚発赤が14例、けいれん1例、発熱1例であり、いずれもG2以下の軽微なものであった。

前回研究22例および今回研究の中間解析可能症例15例の計37例において、PFSに影響を与える因子を解析したところ、ワクチン接種後皮内反応(DTH-2)および全摘出率が、有意な因子であった( $p < 0.05$ , Logrank test)。

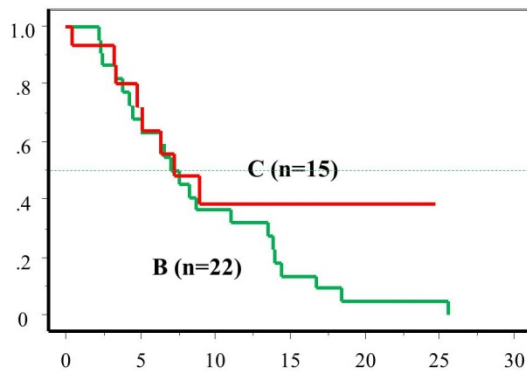
また、MIB-1 index, RPA class、患者の性別、研究のプロトコル(前回 or 本研究)も影響因子として一定の傾向を有していた。

図4にDTH-2で層別化したPFSを示す。DTH-2が10mm以上の症例は有意にmPFSが良好な結果となった。( $p = 0.0486$ , Logrank test,  $n = 36$ )

Table 1 Seventeen patients with initially diagnosed glioblastoma on the first interim appraisal (Jun, 2011)

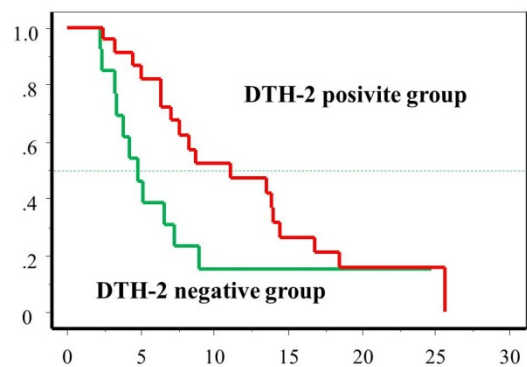
Number		Age	Sex	KPS (%)	RTOG/EORTC	Lesion	Preoperative diameter	Removal ratio	Postoperative diameter	Pathology
1	T	63	F	70	V	lt F	59	70	39	GIV
2	T	64	M	90	V	lt T	30	100	0	GIV
5	T	57	M	80	IV	rt F	64	90	10	GIV
7	T	65	F	60	V	rt O	48	100	0	GIV
8	T	42	M	60	IV	lt T	68	99	10	GIV
9	T	58	M	100	IV	rt T	58	100	0	GIV
13	T	39	F	80	IV	bil F	70	90	49	GIV
17	T	58	M	60	V	rt T	80	99	1	GIV
(3)	TW	30	M	60	IV	lt T	42	100	0	GIV
4	TW	36	M	90	III	med F	62	100	0	GIV
6	TW	41	F	90	III	T+P	14	100	0	GIV
10	TW	56	M	60	V	rt T	86	95	0	GIV
11	TW	50	M	60	V	rt P+T	40	80	25	GIV
12	TW	40	F	80	IV	lt F+T	105	100	0	GIV
14	TW	66	M	60	V	rt F+P	37	100	0	GIV
15	TW	36	M	90	III	rt T	72	100	0	GIV
16	TW	38	M	90	IV	lt P	35	100	0	GIV

Figure 3



Progression-free survival (PFS) in this vaccine study (C) and the previous vaccine study. A median PFS in B and C are 7.1 and 7.4 months.

Figure 4



Progression-free survival (PFS) in DTH-1 positive group ( $\geq 10\text{mm}$ ) and negative group ( $< 10\text{mm}$ ). Median PFSs in 2 groups are 11.1 and 4.8 months.

**【結果のまとめ】**

本研究(初発膠芽腫患者術後に対する放射線、テモゾロマイドおよび自家腫瘍ワクチンを用いた臨床研究)の中間解析のまとめは以下の通りである。

1. 解析可能登録症例は 16 例であった。
2. ワクチンとの因果関係が疑われる副作用は、皮膚発赤 14 例、けいれん 1 例、発熱 1 例と軽微であった。
3. mOS は未到達、暫定 mPFS は 7.4 か月と前研究と同等以上であった。
4. 長期の無増悪症例が多い傾向があり、今後の解析結果が期待される。
5. ワクチン症例 37 例(前研究+本研究)における PFS の影響因子として、DTH-2 および全摘出率が有意であった。

以上の結果をもとに、埼玉医科大学の松谷雅生教授を委員長とする効果安全性評価委員会にて、試験

は継続可能と判断され、2012 年 3 月時点で、予定登録数まで完遂に至っている。

**【考察】**

**1. 当院における免疫療法に関する歩み**

筑波大学脳神経外科において、腫瘍特異的キラーリンパ球 (CTL) の大量培養および臨床投与を行おうという試みが、理化学研究所との共同研究として 1990 年台前半より始まった。悪性脳腫瘍の患者本人の血球を通常採血で取り出し、その単核球成分を同じく患者本人の培養腫瘍細胞と各種サイトカインを用い得られた  $10^8$  個オーダーの CTL を患者本人に戻すと、半数以上で画像上の腫瘍縮小を得られることが確認された<sup>1)</sup>。

一方で、この CTL 療法には、半数以上で画像上の腫瘍縮小は期待できるが、効果の持続性に乏しい点、培養が非常に煩雑で、大変なコストがかかる点などいくつかの欠点があることも判明した。そこで、我々は 2000 年頃よりナチュラルキラー (NK) 細胞を免疫細胞療法として用いる研究に着手した。当時の技術では、純度の高い NK 細胞を大量に培養することは

非常に困難であるという考えが主流であったが、理化学研究所の大野忠夫らは、NK細胞の誘導能に優れた HFWT という細胞株を培養に使用することで、純度の高い NK 細胞を培養できることを発見した。我々は、この NK 細胞療法を患者に大量投与し、安全性が高いことはもちろんのこと、比較的培養が容易なため反復投与しやすく、結果的に効果を持続させやすいことを報告した<sup>2)</sup>。その後、筑波大学学内プロジェクトとしてフェーズ I/IIa 研究に移行している<sup>3)</sup>。

これらの免疫細胞療法の研究・開発と並行して、理化学研究所および当科では 2002 年頃より、悪性脳腫瘍に対する自家腫瘍ワクチン療法の開発に乗り出した。その数年前より、理化学研究所は既にホルマリン固定標本を用いた CTL の誘導に成功し、肝癌について患者癌組織を加工しワクチン化して患者本人の皮内に戻し抗腫瘍効果を期待しようという試みを始めていた。これまでの ex-vivo で培養して体内にリンパ球を戻す免疫細胞療法とは異なり、体内で CTL を誘導してあげようという発想であった。

本ワクチン療法は、脳腫瘍については基礎研究が不十分であったことから、我々は再び動物実験に立ち返って悪性脳腫瘍に対する自家腫瘍ワクチン療法の研究を開始した<sup>4)</sup>。その後、2004 年までに膠芽腫の術後再発悪性脳腫瘍症例 12 例に自家腫瘍ワクチンを投与し、重篤な副作用はなく、1 例に完全寛解 (CR)、1 例に長期に渡る部分縮小効果 (PR) を認めたとする報告をした<sup>5-7)</sup>。また、皮内 (DTH) テスト陽性例、画像的縮小を認める例、p53 陰性例、MHC-1 高発現例は予後が良好である可能性を示唆した。

## 2. 他施設共同臨床研究の経過と考察

2005 年 9 月より東京女子医科大学との共同研究としての、初発膠芽腫に対する術後放射線および自家腫瘍ワクチンの併用療法のフェーズ I/IIa 研究 (UMIN0002) を開始した。この研究は 2007 年 10 月末までに患者登録を終了し、全生存期間中央値が 21 か月という良い成績を残した<sup>8)</sup>。また、この良好な成績は結果的に、ex-vivo で CTL と放射線とに一定の併用効果があったとした先行基礎研究<sup>9)</sup>を裏付ける結果となった。

本研究 (UMIN1426) は、臨床試験 (UMIN0002) の続きとなる研究であり、膠芽腫に用いられる化学療法剤である TMZ を、更に付加したフェーズ I/IIa 研究となっている。まだ中間解析のため、断定的なことは言えないが、前回研究より若干重症度の高い症例が登録されたにも関わらず、mPFS については 7.4 か月と良い傾向があった。また、本研究の暫定 PFS 12 は 38.4%、PFS 18 は 38.4% (前回研究 9.1%) であり、長期無再発例が非常に多いと言える。元来、化学療

法剤と免疫療法との相性は非常に悪い、あるいは併用禁忌とされていたが、近年は基礎的研究により、むしろ併用効果があるとする報告もある。本研究も、中間解析の段階ではあるが、上記の如く無増悪期間が延長した症例が多い傾向を得ているため、この併用効果に関する研究の結果に期待したい。

本研究においても、ワクチン療法の副作用は軽微であった。免疫療法全般に言えることではあるが、副作用が少ない代わりに手術や化学療法薬のような「キレ」も目立たず、多くの症例において、単剤での使用を迫及していけるような治療法ではないことも事実である。やはり、本研究のように、一定の切れを有する手術・放射線や化学療法薬等との併用、あるいは他の新規療法との併用を目指していく方向性が現実的と考えている。

## 【文献】

- 1) Tsuboi K, Saijo K, Ishikawa E, Tsurushima H, Takano S, Morishita Y, Ohno T. Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas. *Clin Cancer Res*. 9: 3294-3302, 2003.
- 2) Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, Harada H, Takano S, Nose T, Ohno T. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res*. 24: 1861-1871, 2004.
- 3) Ishikawa E, Takano S, Ohno T, Tsuboi K. Adoptive cell transfer therapy for malignant gliomas. *Adv Exp Med Biol*. 746: 109-120, 2012.
- 4) Ishikawa E, Tsuboi K, Takano S, Uchimura E, Nose T, Ohno T. Intratumoral injection of IL-2-activated NK cells enhances the antitumor effect of intradermally injected paraformaldehyde-fixed tumor vaccine in a rat intracranial brain tumor model. *Cancer Sci*. 95: 98-103, 2004.
- 5) 佐藤允之、坪井康次、石川栄一、高野晋吾、松村 明、大野忠夫：悪性神経膠腫に対する自家腫瘍ワクチンの効果、*Neuro-Oncology* 13: 37-41, 2004.
- 6) 坪井康次、石川栄一、松村明：悪性脳腫瘍に対する特異的免疫療法、特に自家腫瘍ワクチン療法を中心に、*脳神経外科速報* 17: 600-609, 2007.
- 7) Ishikawa E, Tsuboi K, Yamamoto T, Muroi A, Takano S, Enomoto T, Matsumura A, Ohno T. Clinical trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for glioblastoma multiforme patients. *Cancer Sci*. 98: 1226-1233, 2007.
- 8) Muragaki Y, Maruyama T, Iseki H, Tanaka M, Shinohara C, Takakura K, Tsuboi K, Yamamoto T,

Matsumura A, Matsutani M, Karasawa K, Shimada K, Yamaguchi N, Nakazato Y, Sato K, Uemae Y, Ohno T, Okada Y, Hori T. Phase I/IIa trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine concomitant with fractionated radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg.* 115: 248-255, 2011.

9) Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, Takano S, Ohno T. X-irradiation to human malignant glioma cells enhances the cytotoxicity of autologous killer lymphocytes under specific conditions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 59: 1505-1512, 2004.

## 第43回 ニューロ・オンコロジーの会

当番世話人 東京慈恵会医科大学 脳神経外科  
常喜 達裕

- 主 題 1) 若手脳腫瘍研究者の息吹を感じる萌芽的研究  
2) 診断・治療・手術に苦慮した症例、珍しい症例など
- 日 時 : 平成24年4月7日(土) 14:00~17:00
- 場 所 : 東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設 (TWIns)  
2階ラウンジ
- 住 所 : 東京都新宿区若松町 2-2  
当日連絡先 : 東京女子医科大学 03-3353-8111 (代表)

### プログラム

第I部 若手脳腫瘍研究者の息吹を感じる萌芽的研究 (発表6分、討論4分) 14:00~15:00

座長 荒井 隆雄 先生 (慈恵医大葛飾医療センター 脳神経外科)

1. Poly(I:C)とIL-10 siRNAをアジュバントとして用いた悪性神経膠腫に対する樹状細胞免疫療法  
赤崎 安晴 先生 (東京慈恵会医科大学葛飾医療センター 脳神経外科)
2. 再発悪性グリオーマに対するBevacizumabを用いた分子標的治療の治療成績  
新田 雅之 先生 (東京女子医科大学 脳神経外科)
3. グリオブラストーマに対するインターフェロンベータ搭載腫瘍融解型センダイウイルスベクター  
BioKnife-IFN $\beta$ の効果  
長谷川 祐三 先生 (千葉県がんセンター 脳神経外科)
4. 初発膠芽腫患者に対する臨床多施設共同試験: 手術、放射線、テモゾロマイド、ワクチンの  
4者併用療法  
石川 栄一 先生 (筑波大学 人間総合科学研究科 脳神経外科)

= Coffee Break =

第II部 特別講演 15:00~16:00

座長 常喜 達裕 先生 (東京慈恵会医科大学 脳神経外科)

### 『CHALLENGE: 乳幼児脳腫瘍に対する治療の進歩』

埼玉医科大学国際医療センター 包括的がんセンター 脳脊髄腫瘍科 小児脳脊髄腫瘍部門  
部門長 柳澤 隆昭 先生

= Coffee Break =



第三部 診断・治療・手術に苦慮した症例、珍しい症例など（発表5分、討論3分） 16:00~17:00

座長 赤崎 安晴 先生（慈恵医大葛飾医療センター 脳神経外科）

1. くも膜下出血で発症した膠芽腫の一例  
山本 洋平 先生（東京慈恵会医科大学 脳神経外科）
2. 悪性神経膠腫における家族内発症例の検討  
岡本 沙織 先生（東京女子医大 脳神経外科）
3. 新生児、乳児 後頭蓋窩腫瘍の2例  
伊藤 進 先生（神奈川県立こども医療センター 脳神経外科）
4. 側頭部の炎症にて発症した幼児 Extradural epidermoid の一例  
根本 匡章 先生（東邦大学医療センター大森病院 脳神経外科）
5. 5年以上の経過で髄液播種を来した、non-VHL 小脳血管芽腫の2例  
秋元 治朗 先生（東京医科大学 脳神経外科）



- \*参加費として、受付で2,000円頂きます
- \*ご参加の先生方は、日本脳神経外科専門医クレジット（3点）を取得できます
- \*本会におきましては、規則により弊社による旅費の負担ができませんことをご了承下さい。
- \*本会終了後、意見交換会をご予定しております。

共催：ニューロ・オンコロジーの会  
MSD株式会社

都営地下鉄大江戸線 若松河田駅下車、徒歩5分  
牛込柳町駅下車、徒歩5分



## 世話人一覧

平成 22 年 12 月

### 世話人

秋元 治朗 (会計)  
足立 好司  
井内 俊彦  
泉山 仁  
岡 秀宏  
篠田 宗次  
渋谷 壮一郎  
常喜 達裕  
周郷 延雄  
高野 晋吾  
永根 基雄  
苗代 弘  
西川 亮  
林 明宗  
菱井 誠人  
藤巻 高光  
松野 彰  
丸山 隆志  
水本 斉志  
村垣 善浩 (代表世話人)  
佐々木 光  
吉野 篤緒  
武笠 晃丈

### 施設

東京医科大学付属病院  
日本医科大学武蔵小杉病院  
千葉県がんセンター  
昭和大学藤が丘病院  
北里大学医学部脳神経外科  
古河赤十字病院  
国立がん研究センター中央病院  
東京慈恵会医科大学 脳神経外科  
東邦大学医療センター大森病院  
筑波大学附属病院  
杏林大学医学部脳神経外科  
防衛医科大学校病院脳神経外科  
埼玉医科大学国際医療センター  
神奈川県立がんセンター  
順天堂大学医学部附属練馬病院  
埼玉医科大学病院  
帝京大学ちば総合医療センター  
東京女子医科大学病院  
筑波大学附属病院  
東京女子医科大学病院  
慶應義塾大学病院  
駿河台日本大学病院  
東京大学脳神経外科

### 事務局

前林 勝也  
新田 雅之

東京女子医科大学病院  
東京女子医科大学病院