

研究報告書
令和3年度：A課題

令和5年4月23日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 岡山大学病院

住所 岡山県岡山市北区鹿田町 2-5-1

研究者氏名 大谷 理浩

(研究課題)

膠芽腫に対する遺伝子治療臨床検体を用いた網羅的空間発現解析による抗腫瘍免疫獲得機序の解明

令和4年 1月 24日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

研究の背景

膠芽腫は脳腫瘍の中でも最も予後不良な疾患で、現行の標準治療である手術、放射線治療、化学療法を行った場合でも生存期間中央値は2年未満である。このため、新たな治療法の開発が急務である。免疫チェックポイント阻害薬に代表される、がんに対する免疫療法は近年非常に注目されているが、膠芽腫においては免疫チェックポイント阻害薬の有用性は示されなかった。その理由の一つとして、膠芽腫の腫瘍微小環境は、抗腫瘍免疫に寄与する腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) が少なく、抗腫瘍免疫を抑制する免疫抑制型マクロファージ (M2 マクロファージ) が多い、いわゆる immune cold な状態であることが知られている。一方、ウイルス製剤を用いた免疫療法は悪性黒色腫に対して2015年に米国FDAで承認となり、本邦でも2021年にテセルパツレブが膠芽腫に対して条件・期限付き承認となった [1]。ウイルス製剤を用いた治療には、1) 直接的な腫瘍細胞へのダメージのほか、2) 抗腫瘍免疫の誘導、3) がん抑制遺伝子などのベクターとしての機能があり、immune cold tumor を immune hot tumor に変えることが報告されている。我々もこれまでに様々なウイルスを用いて膠芽腫前臨床モデルに対する治療研究を行ってきた [2-4]。

当院では癌抑制遺伝子である Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC) を組み込んだ非増殖型アデノウイルス (Ad-SGE-REIC) を膠芽腫患者に投与する第 I / II a 相試験 (jRCT2063190013, GMP 製剤は岡山大学発バイオベンチャー桃太郎源社より供与) を行っている [5]。我々の担腫瘍マウスモデルを用いた研究では、この REIC 遺伝子治療は免疫細胞の浸潤を誘導し、抗腫瘍免疫を誘導する [6, 7]。本研究では、臨床検体を用いて、Ad-SGE-REIC 治療による immunogenic cell death と、それに引き続く抗腫瘍免疫の獲得機序を、網羅的遺伝子解析および空間マルチオミクスプロファイリングを組み合わせることで解明する。

方法

1. 免疫染色を用いた抗腫瘍免疫の評価

Ad-SGE-REIC 投与前後の生検検体を用いて、抗腫瘍免疫の誘導を確認する。とくに獲得免疫に関連するリンパ球に着目し、免疫染色を行う。

2. 網羅的トランスクリプトーム解析を用いた遺伝子発現解析

Ad-SGE-REIC 投与前後の生検検体から RNA を抽出し、RNA-sequencing (RNA-seq) を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行う。さらに投与前後で発現が変化する遺伝子経路を解析する。

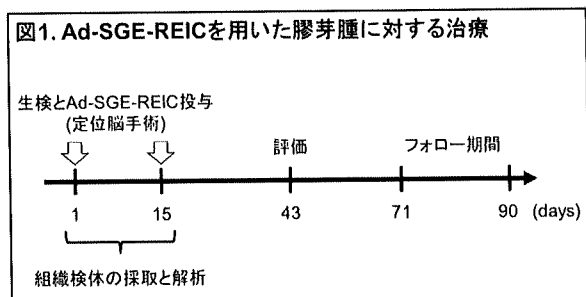
3. 空間マルチオミクス解析による抗腫瘍免疫の評価

当院へ導入されている GeoMx® Digital Spatial Profiler (DSP) を用いて解析を行う。まず、既存の膠芽腫 FFPE 検体を用いて cold run を行い、GeoMx に用いる morphology marker を選定する。次に Ad-SGE-REIC 投与前後検体を用いて空間マルチオミクス解析を行い、Ad-SGE-REIC 投与部位を中心とした空間的な遺伝子発現を解明する。

結果

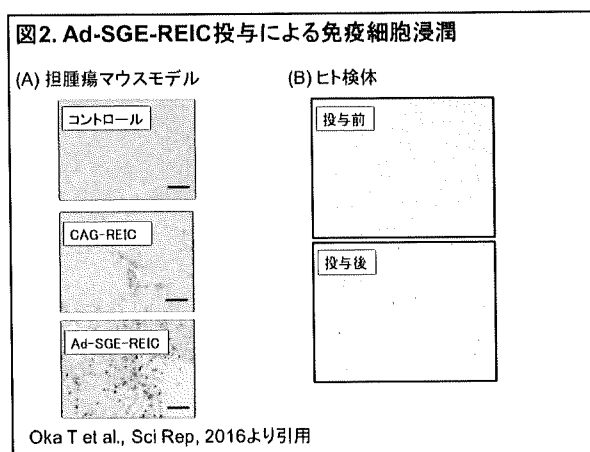
本試験は、再発もしくは進行性のテント上悪性神経膠腫に対して、定位脳手術により2週間の間隔をあけて計2回の Ad-SGE-REIC 投与を行う医師主導治験である。本研究では、1回目投与直前および2回目投与直前の2つの時点における検体を採取し、解析を行った (図1)。

Ad-SGE-REIC 投与前後検体を用いて免疫染色を行うと、投与後検体においてリンパ球の増多を認めた。特に細胞傷害性 T 細胞である CD8 陽性 T 細胞の強い浸潤を認め、これは我々が担腫瘍マウスモデルを用いて確認した結果と同様であった (図2)。



次に、Ad-SGE-REIC 投与前後の needle biopsy 検体から RNA の抽出を行い、RNA-seq による網羅的トランスクリプトーム解析を行った。Pathway 解析を行うと、投与後検体において上昇する上位 10 経路のうち 8 経路が免疫に関連するものであり、強い抗腫瘍免疫の誘導が確認された。

最後に空間マルチオミクス解析を実施した。まず既存の膠芽腫検体を用いて morphology marker 抗体リストの中から候補となる抗体を選出し、免疫染色を実施した。この結果、morphology marker として CD45、CD3、Ki67 を同定し、膠芽腫検体を用いた cold run を実施した。現在、Ad-SGE-REIC 投与検体を用い GeoMx によるデータ解析を予定している。



考察

膠芽腫に対するウイルス製剤を用いた治療は新規治療法として非常に期待されており、特に本邦が世界をリードする分野である。Ad-SGE-REIC はアデノウイルスにがん抑制遺伝子遺伝子である REIC 遺伝子を搭載しており、腫瘍細胞が死滅する際に放出される damage-associated molecular patterns などを通じて強力な抗腫瘍免疫を誘導する機序が考えられる。我々も膠芽腫前臨床モデルにおいて Ad-SGE-REIC 投与による抗腫瘍免疫の誘導を報告してきたが、今回の研究でも強い抗腫瘍免疫の誘導が確認された。膠芽腫における免疫細胞浸潤とウイルス製剤の効果が関連することが報告されており [8]、Ad-SGE-REIC による強い抗腫瘍免疫の誘導も治療効果に関連することが期待される。

本臨床試験の症例登録は 2022 年に完了し、現在は全症例のデータ固定後に、Ad-SGE-REIC による治療効果と抗腫瘍免疫の関連性を評価する予定である。さらに、今回の解析によって TILs の関与が示唆されたが、single cell RNA-sequencing 等の一細胞解析データと組み合わせることで TILs を含む腫瘍微小環境の詳細な変化を解明していく予定である。膠芽腫に対するウイルス製剤を用いた免疫療法において、上述のような詳細な解析を行った報告はなく、今回の結果は膠芽腫に対する免疫療法の機序解明や新規治療の開発に役立つと考えられる。

参考文献

1. Todo T, Ito H, Ino Y, et al. (2022) Intratumoral oncolytic herpes virus G47Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial. *Nat Med* 28: 1630-1639 doi:10.1038/s41591-022-01897-x
2. Otani Y, Yoo JY, Chao S, et al. (2020) Oncolytic HSV-Infected Glioma Cells Activate NOTCH in Adjacent Tumor Cells Sensitizing Tumors to Gamma Secretase Inhibition. *Clin Cancer Res* 26: 2381-2392 doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3420
3. Otani Y, Yoo JY, Lewis CT, et al. (2022) NOTCH-Induced MDSC Recruitment after oHSV Virotherapy in CNS Cancer Models Modulates Antitumor Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 28: 1460-1473 doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-2347
4. Otani Y, Yoo JY, Shimizu T, et al. (2022) Implications of immune cells in oncolytic herpes simplex virotherapy for glioma. *Brain Tumor Pathol* doi:10.1007/s10014-022-00431-8
5. Kurozumi K, Fujii K, Shimazu Y, et al. (2020) Study protocol of a Phase I/IIa clinical trial of Ad-SGE-REIC for treatment of recurrent malignant glioma. *Future Oncol* 16: 151-159 doi:10.2217/fon-2019-0743
6. Oka T, Kurozumi K, Shimazu Y, et al. (2016) A super gene expression system enhances the anti-glioma effects of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy. *Sci Rep* 6: 33319 doi:10.1038/srep33319

7. Hattori Y, Kurozumi K, Otani Y, et al. (2022) Combination of Ad-SGE-REIC and bevacizumab modulates glioma progression by suppressing tumor invasion and angiogenesis. PLoS One 17: e0273242 doi:10.1371/journal.pone.0273242
8. Miller KE, Cassady KA, Roth JC, et al. (2022) Immune Activity and Response Differences of Oncolytic Viral Therapy in Recurrent Glioblastoma: Gene Expression Analyses of a Phase IB Study. Clin Cancer Res 28: 498-506 doi:10.1158/1078-0432.Ccr-21-2636

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 がん研究振興財団に深謝いたします。