

性差による中枢神経系免疫の違いが脳腫瘍免疫療法に与える影響の解明

The Impact of Sex Differences in Central Nervous System Immunity on Brain Tumor Immunotherapy

岡山大学学術研究院医歯薬学域 脳神経外科 研究准教授 大谷 理浩
(前：岡山大学病院 脳神経外科 助教)

要 約

膠芽腫は最も頻度の高い悪性脳腫瘍の一つであり、標準治療を行っても生存期間中央値は2年未満と極めて予後不良である。特に再発例に対する有効な治療法が確立されておらず、新規治療の開発が急務である。ウイルス・遺伝子製剤を用いた治療は、新たな治療戦略として注目されており、膠芽腫に対してもその有効性が示唆されている。我々はアデノウイルスベクターにがん抑制遺伝子REIC/Dkk-3を搭載したAd-SGE-REIC製剤を開発し、基礎研究および臨床試験を実施してきた。近年、膠芽腫における性差と治療予後の関連が注目されているが、その詳細なメカニズムは十分に解明されていない。本研究では、膠芽腫の性差が腫瘍微小環境や免疫療法に与える影響を明らかにすることを目的とし、Surveillance, Epidemiology, and End Results (以下SEERと略す) データベースによる疫学解析、および遺伝子発現データを用いた解析を行った。SEERデータを解析した結果、膠芽腫の年齢調整発症率および年齢調整死亡率は男性で有意に高く、特に長期生存例(3年以上生存)において女性の死亡罹患比率が有意に低いことが示された。膠芽腫の遺伝子発現解析では、免疫関連経路に性差が存在し、特にCytokine-cytokine receptor interactionなどの免疫応答に関与する経路が変動していた。さらに腫瘍微小環境におけるM2マクロファージや $\gamma\delta$ T細胞、NKT細胞などの免疫細胞に性差が認められた。以上の結果から、膠芽腫における性差は腫瘍微小環境や免疫細胞浸潤に影響を与え、免疫治療の応答性にも関与する可能性が示唆された。我々はAd-SGE-REIC製剤の第I/IIa相医師主導治験を実施しており、本試験で採取された検体を用いたシングルセル解析を進めている。今後、性差を考慮した治療の確立が、膠芽腫に対する免疫療法の最適化に寄与する可能性が考えられる。

諸 言

脳腫瘍は小児から高齢者まで幅広い年代で発症する疾患ではあるが、希少癌でもあり、診断、治療ともに困難な例が多い。膠芽腫(glioblastoma)は最も頻度の高い脳腫瘍の1つであるが、標準治療である外科的切除(maximal safe resection)、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年未満であり、過去40年間で数か月程度しか予後が延長していない。特に再発膠芽腫に対して予後を延長する標準治療は確立しておらず、新規治療開発は急務である。たとえば、近年、様々な癌に対して効果を示してきた免疫チェックポイント阻害薬であるが、膠芽腫においてその効果は示されていない。その理由として、我々は膠芽腫が中枢神経系免疫という躯幹と

異なる免疫環境に発生すること、さらに膠芽腫細胞が腫瘍微小環境に存在する免疫細胞と相互作用し免疫抑制型腫瘍微小環境を形成することを報告してきた¹。

ウイルス・遺伝子製剤を用いた治療は新規治療として近年着目されており、進行悪性黒色腫に対するヘルペスウイルス製剤 (talomogene laperparepvec, T-VEC) が2015年に米国FDAで承認となった。膠芽腫に対してもヘルペスウイルス製剤であるG47 Δ が、2021年に本邦で条件及び期限付き承認となった。ウイルス・遺伝子製剤は、まず腫瘍細胞にウイルスが感染することで腫瘍細胞死を引き起こす。この過程で、ウイルス由来のRNAやDNAなどのpathogen-associated molecular patternsのほか、腫

瘍細胞死に伴う ATP や High Mobility Group Box 1、Heat Shock Protein など の damage-associated molecular patterns が放出される。これらは Toll-like receptor や cGAS-STING 経路等を介して自然免疫を活性化し、immunogenic cell death を引き起こす。同時に、ウイルス・遺伝子製剤に感染した腫瘍細胞は炎症性サイトカインやケモカインを放出することで T 細胞が浸潤し、抗腫瘍免疫が誘導される。これらのメカニズムによってウイルス・遺伝子製剤は膠芽腫の免疫抑制型腫瘍微小環境を改善する可能性があり、脳腫瘍に対する臨床試験において、その安全性と有効性が示唆されている。我々もアデノウイルスに、がん抑制遺伝子 REIC/Dkk-3 を搭載した Ad-SGE-REIC 製剤を用いた基礎研究を行い、2019 年から再発悪性神経膠腫に対する第 I / II a 相医師主導治験 (jRCT2063190013) を実施した²。Ad-SGE-REIC が投与された膠芽腫では、強い immunogenic cell death とそれに続く免疫細胞浸潤を認め、Ad-SGE-REIC による抗腫瘍免疫の誘導が確認された。

近年、膠芽腫における性差と治療予後などが萌芽的に研究されているが、十分には解明されていない。本研究では膠芽腫における性差の違いが腫瘍微小環境や免疫療法に与える影響を解析した。

方 法

1. Surveillance, Epidemiology, and End Results を用いた膠芽腫における性差の解析

膠芽腫の生存率における性差の意義について、Surveillance, Epidemiology, and End Results を用いて解析した。SEER は、米国の約半分の人口をカバーした大規模なデータベースである。2000 年から 2021 年にかけて膠芽腫と診断された症例を対象とし、性

別、10 万人あたりの年齢調整発症率 (age-adjusted incidence rate 以下 AAIR と略す)、10 万人あたりの年齢調整死亡率 (age-adjusted mortality rate 以下 AAMR と略す)、死亡罹患比率 (Mortality Incidence Ratio 以下 MIR と略す) について解析した。

2. 膠芽腫における遺伝子発現と性差についての解析

The Cancer Genome Atlas に登録された膠芽腫症例について解析した。網羅的発現解析データを取得し、長期生存者 (診断後 3 年以上の生存患者) と短期生存者 (診断後半年以内の死亡) を比較して、発現変動遺伝子解析および pathway 解析を iDEP 2.01 を用いて実施した。

結 果

膠芽腫における年齢調整死亡率は女性で有意に低い

対象期間に膠芽腫症例は 60615 例 (女性 25398 例 [41.9%]、男性 35217 例 [58.1%]) が登録されていた。解析可能であった 47207 例の膠芽腫症例 (女性 19527 例 [41.3%]、男性 27681 例 [58.7%]) について検討を行った。解析対象期間中の年代毎の AAIR は女性、男性ともに増加傾向であったが、女性は 2.30 から 2.58、男性は 3.76 から 4.20 であり、女性で低い傾向にあった。同様に AAMR についても女性は 0.99 から 2.25、男性は 1.73 から 3.74 であり、女性で低かった。このことから、女性は男性よりも膠芽腫特異的な死亡が低いことが分かった。また興味深いことに、膠芽腫全体では疾患特異的 MIR に性差を認めなかったが、膠芽腫長期生存例 (3 年以上生存) では女性の MIR は男性よりも有意に低かった (表 1)。

性差と免疫環境の違い

初発膠芽腫患者 143 例 (女性 49 例、男性 94 例) の網

表 1 長期生存例における年齢別の年間年齢調整死亡率

Age groups (years)	Sex	AAMR (95% CI)	Rate ratio (95% CI)	p value
0-14	Male	0.00 (0.00, 0.01)	reference	0.927
	Female	0.00 (0.00, 0.01)	1.33 (0.29, 6.70)	
15-39	Male	0.05 (0.05, 0.06)	reference	<0.001
	Female	0.03 (0.02, 0.04)	0.56 (0.43, 0.73)	
40-69	Male	0.33 (0.31, 0.35)	reference	<0.001
	Female	0.23 (0.22, 0.25)	0.70 (0.64, 0.76)	
70+	Male	0.43 (0.38, 0.48)	reference	<0.001
	Female	0.29 (0.25, 0.32)	0.67 (0.56, 0.79)	

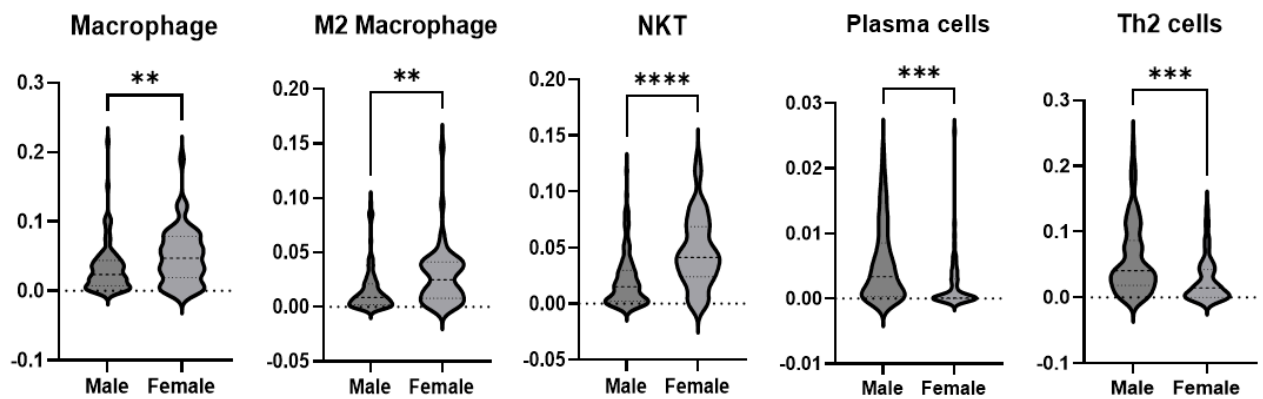


図1 性差による免疫細胞浸潤の違い

羅の発現データを用いて解析を行った。まず、全143例で性差に関して解析を行ったところ、発現変動遺伝子として女性群で上昇している遺伝子が19遺伝子、男性群で上昇している遺伝子が107遺伝子検出された。長期生存例（3年以上生存）を用いたパスウェイ解析では、microRNAs in cancer、focal adhesion、proteoglycans in cancer、Oxidative phosphorylation、viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor、Cytokine-cytokine receptor interactionなどの経路が有意に変動しており、免疫関連経路の差異を認めた。次にxCellによるdigital flowcytometryを行ったところ、Macrophage、M2 macrophage、memory B cell、NKT cell、Plasma cell、Pro B cell、 $\gamma\delta$ T cell、Th2 cellにおいて性差による差を認めた（図1）。

考 察

脳腫瘍における性差の影響は、胚細胞腫瘍などの限られた腫瘍型で報告されてきたが、まだ十分に解明されていない。膠芽腫において女性の方が、生存期間が延長するという報告がある一方、性差は影響ないとする報告もあり様々である。その要因の1つとして、過去の報告では死因などの詳細な解析が行われてこなかったことが挙げられる。我々はこれまでの解析と比較してより大規模なデータセットを用いて、膠芽腫における性差の影響を解明した。その結果、膠芽腫のAAIRは女性で低いことが分かった。さらに原疾患による死亡に絞って解析を行うと、AAMRは女性で低かった。特に長期生存例について解析すると、MIRは女性で有意に低かった。このことから、性差は膠芽腫の予後に影響することが示唆された。

次に、性差と遺伝子発現について解析を行った。

膠芽腫における予後因子のひとつにMGMT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が知られているが、女性でメチル化症例が多いことが報告されている³。今回の解析では、性差で比較した際に有意に変動する経路としてCytokine-cytokine receptor interactionなど免疫関連経路があった。実際に発現変動遺伝子として男性群で上昇している遺伝子の1つにlymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1（以下LYVE1と略す）を認めた。LYVE1はIL-6に反応して腫瘍関連マクロファージ（tumor associated macrophage、以下TAMと略す）で発現する遺伝子であるが、heme oxygenase-1（以下HMOX1と略す）の発現を誘導し、CCR5依存シグナルによって新しくLYVE1陽性TAMの分化および浸潤を誘導する。このLYVE1陽性TAMはCD8陽性T細胞の浸潤を抑制する。したがってLYVE1陽性TAMを抑制することで、腫瘍へのCD8陽性T細胞の浸潤が増加されると報告されている⁴。

近年、膠芽腫の腫瘍微小環境と性差の関連が注目されている。骨髄由来免疫抑制細胞（myeloid derived suppressor cell、以下MDSCと略す）は単球MDSC（monocytic MDSC）と顆粒球MDSC（granulocytic MDSC）に分類されるが、担腫瘍マウスモデルを用いた解析ではオスではmMDSCが、メスではgMDSCが有意である⁵。さらにオスでは疲弊型T細胞が増加していた。メスではX染色体不活性化が起こるが、エスケープ遺伝子である*Kdm6a*が疲弊型T細胞で発現上昇しており、サイトカイン発現に寄与していたと報告されている⁶。

以上より性差は膠芽腫症例の生存率だけではなく、脳腫瘍微小環境、特に腫瘍への免疫細胞浸潤を介して免疫治療の反応性にも影響を与える可能性が示唆された。我々は、再発悪性神経膠腫に対するAd-

SGE-REIC 製剤を用いた第 I / II a 相医師主導治験 (jRCT2063190013) を実施した。本研究では、Ad-SGE-REIC 製剤投与前後に検体が採取されており、これらを用いてシングルセル解析による腫瘍微小環境解析を実施しており、性差の影響についても検証している。

近年、脳腫瘍に対する免疫療法の効果が期待されているが、本研究結果から、性差による腫瘍微小環境の違いについても検討する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、支援いただきました神澤医学研究振興財団に感謝申し上げます。

引用文献

1. Otani Y, Yoo JY, Lewis CT et al. NOTCH-Induced MDSC

Recruitment after oHSV Virotherapy in CNS Cancer Models Modulates Antitumor Immunotherapy. Clin Cancer Res 2022 28: 1460-1473 ;

2. Kurozumi K, Fujii K, Shimazu Y et al. Study protocol of a Phase I/IIa clinical trial of Ad-SGE-REIC for treatment of recurrent malignant glioma. Future Oncol 2020 16: 151-159
3. Ostrom QT, Rubin JB, Lathia JD et al. Females have the survival advantage in glioblastoma. Neuro Oncol 2018 20: 576-577
4. Anstee JE, Feehan KT, Opzommer JW et al. LYVE-1(+) macrophages form a collaborative CCR5-dependent perivascular niche that influences chemotherapy responses in murine breast cancer. Dev Cell 2023 58: 1548-1561.e1510
5. Bayik D, Zhou Y, Park C et al. Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets Drive Glioblastoma Growth in a Sex-Specific Manner. Cancer Discov 2020 10: 1210-1225
6. Lee J, Nicosia M, Hong ES et al. Sex-Biased T-cell Exhaustion Drives Differential Immune Responses in Glioblastoma. Cancer Discov 2023 13: 2090-2105

Abstract

Glioblastoma (GBM) is one of the most common malignant brain tumors, with a median survival of less than two years despite standard treatment. In particular, there is no standard treatment for recurrent cases, highlighting the urgent need for novel therapeutic strategies. Virus- and gene-based therapies have garnered attention as emerging treatment approaches, with promising efficacy suggested in GBM. We have developed the Ad-SGE-REIC agent, an adenoviral vector carrying the tumor suppressor gene REIC/Dkk-3, and have conducted both basic and clinical research. Recently, the relationship between sex differences and treatment outcomes in GBM has attracted attention; however, the underlying mechanisms remain largely unknown. This study aimed to elucidate the impact of sex differences on the tumor microenvironment and immunotherapy response in GBM. We performed epidemiological analyses using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database, as well as gene expression analyses. The SEER data analysis revealed that the age-adjusted incidence rate and age-adjusted mortality rate of GBM were significantly higher in males, and in long-term survivors (≥ 3 years), the mortality-to-incidence ratio was significantly lower in females. Gene expression analyses of GBM indicated sex differences in immune-related pathways, particularly in immune response pathways such as cytokine-cytokine receptor interaction. Additionally, digital flow cytometry analysis showed sex-based differences in immune cell populations within the tumor microenvironment, including M2 macrophages, $\gamma\delta$ T cells, and NKT cells. These findings suggest that sex differences in GBM influence the tumor microenvironment, immune cell infiltration, and potentially the response to immunotherapy. We are currently conducting a physician-initiated phase I/IIa clinical trial of Ad-SGE-REIC and performing single-cell analyses using patient samples obtained from this trial. Moving forward, the establishment of sex-specific therapeutic strategies may contribute to the optimization of immunotherapy for GBM.