

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19550

研究課題名(和文) 抗腫瘍免疫の評価系としての白血病モデルの確立とその成果に基づくヒト免疫療法の強化

研究課題名(英文) Establishment of a mouse leukemia model and the exploring the way to enhance the anti-leukemia immunity using this mouse leukemia model.

研究代表者

中田 潤 (Jun, Nakata)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：90528952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：「急性骨髄性白血病の化学療法後寛解例に対するWT1ペプチド免疫療法の第 相臨床試験」の20例において免疫動態解析を行った。WT1ワクチン前のWT1特異的CTL頻度がGood responderで有意に高くclonalityを有することを発見し論文報告した。さらにMLL/AF9遺伝子をB6マウス造血幹細胞に導入し、新たなマウス白血病モデルを確立した。微小腫瘍量およびWT1特異的CTL反応を経時的に測定可能となり、WT1ワクチン療法に対するヘルパーペプチドの併用効果を示した。一方でヘルパーペプチド併用下ではCTLは3か月内ではexhaustせずcheckpoint阻害剤との併用効果は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the immunological features of patients in Phase 2 clinical study of WT1 peptide vaccination for AML patients after chemotherapy. We found that the frequencies of WT1 specific CTLs were higher in good responders than in poor responders. Also we clarified the clonality of these CTLs and reported the results. Next, we established a new mouse leukemia model by transducing the human leukemia gene 'MLL/AF9' into the c-kit+ BM cells of B6 mice. By using this mouse leukemia model, we found that the helper WT1 peptide could enhance and prolong the anti-leukemia effect of WT1 CTL peptide vaccination and that combination peptide vaccination therapy could lead the better clinical outcome than the CTL peptide vaccination alone. WT1 specific CTLs in combination peptide vaccination were not exhausted at least within 3 months, so checkpoint blockade therapy showed no clinical benefit when we used it combined with the combination peptide vaccination therapy.

研究分野：癌免疫

キーワード：マウス白血病モデル 癌免疫 癌ワクチン WT1 併用療法 ヘルパーペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌免疫療法は手術、放射線、化学療法に続く第4の癌に対する治療法として近年注目されるようになった。これまで癌免疫療法として、癌ワクチン療法、T細胞を主とした免疫細胞の移入 (adaptive transfer)、checkpoint 阻害剤、CAR-T療法など様々な治療方法が開発されてきた。しかし、いずれの治療法も一定の治療効果を認めるが、奏功率は50%未満であり、単独療法では十分な臨床効果とはいえない。そこで現在は癌免疫療法と従来からある手術、放射線、化学療法との組み合わせ、あるいは複数の癌免疫療法の組み合わせなど個々の治療法の欠点をカバーしつつ、利点を生かす総合的な方針が模索されている。

(2) 急性骨髄性白血病は造血幹細胞移植が進歩した現在においても2年全生存率が30-40%程度と過半数が死に至る治療困難な疾患の1つである。また、近年長寿化が進むにつれ60歳以上の急性骨髄性白血病患者が増加しており、より治療関連毒性の少ない治療法が望まれている。急性骨髄性白血病に対するWT1ペプチド免疫療法は副作用が少なくこのような高齢者にも実施可能な治療法として注目されている。

### 2. 研究の目的

(1) 申請者は「急性骨髄性白血病の化学療法後寛解例に対するWT1ペプチド免疫療法の第相臨床試験 (UMIN-ID:000015870)」のプロトコル責任医師を務め、経時的な採血検体を保管している。癌免疫療法のメカニズムを理解するためには good responder と poor responder での免疫動態の差異を探索することが重要である。そこで本患者検体を用いて免疫動態解析を行う。

(2) より効果的な腫瘍免疫戦略の確立にはマウスモデルにおける研究が必須である。申請者らは Balb/c マウスにおいて、造血幹細胞にヒト MLL/ENL 白血病遺伝子を導入して白血病モデルを作成し、NK細胞における免疫監視機構を明らかにした (Nakata et al, Leukemia.2014;28:1316-25)。WT1 ワクチンや WT1 テトラマーなどツールが B6 マウス系で揃っているため、この method を用いて新たに B6 マウス系での白血病マウスモデルを作成する。

(3) 新たに作成したマウス白血病モデルを用い、WT1 ワクチンの治療効果を増強する手法の探索を行う。既知の checkpoint 阻害剤 (PD1 抗体や CTLA4 抗体) との併用効果を調べると共に、新たな増強治療法を探索する。

### 3. 研究の方法

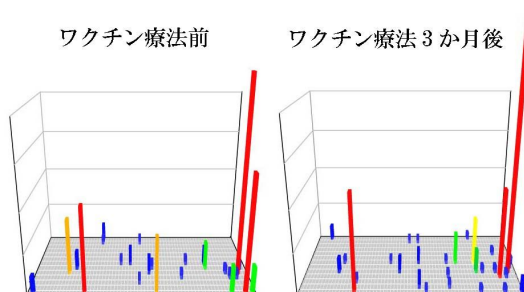
(1) 「急性骨髄性白血病の化学療法後寛解例に対する WT1 ペプチド免疫療法の第相臨床試験 (UMIN-ID:000015870)」の患者をその臨床経過に応じて good responder と poor responder に分類する。各群において末梢血中の WBC 総数、WT1 特異的 T細胞頻度、regulatory T細胞を測定した。また、WT1 特異的 T細胞が clonality を有しているか CDR3 region の解析を行った。

(2) CD45.1-B6 マウスの骨髄内の造血幹細胞を取り出し、ヒト白血病遺伝子 MLL/AF9 を遺伝子導入した。細胞をメチカルトによる半液体培地で培養し、顕微鏡下にコロニーをピックアップしメチカルトに蒔きなおす継代を3回行った。その上で1コロニーをピックアップし液体培地で培養し白血病細胞を作成した。

(3) 作成したマウス白血病モデルにおいて、WT1 ワクチン療法の効果を調べた。申請者らのグループにおいて従来の WT1-126 CTL peptide とは新たに、CD4 ヘルパー活性をあげることにより CD8-CTL 反応を増強する新たな WT1-35 helper peptide を同定したため、併用効果を調べた。また、本併用療法に CpG アジュバントや PD1 抗体や CTLA4 抗体を更に併用し比較した。

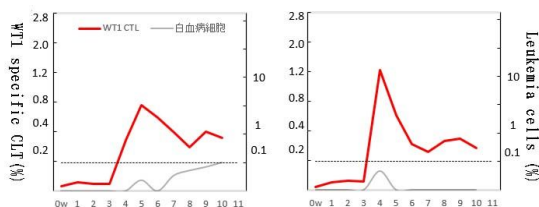
### 4. 研究成果

(1) 臨床試験の20例において中間解析を行った。2年DFSは約25%、2年OSは約40%と、再発高リスクの患者背景から考えると非常によい臨床成績と考えられた。Good responder と poor responder 間の比較では、治療前後の白血球総数や制御性T細胞頻度において差異を認めなかった。一方で、治療後のみならず WT1 ワクチン前の WT1 特異的 CTL 頻度が Good responder で有意に高いことが分かった。また、これらの CTL の CDR3 region を解析すると数個の clone が主座を占め、ワクチン後3か月まで増強あるいは維持されていることが分かった (下図)。以上の結果は化学療法中に腫瘍崩壊して誘導された WT1 特異的 CTL 反応を WT1 ワクチン療法が維持・増強し、臨床効果につながることを示唆した。申請者らは以上の結果を論文報告した (Nakata et al, Br J Haematology. in press)。



(図) TRBV/J マッピング

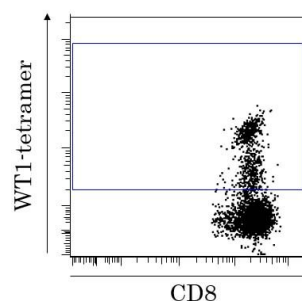
(2) CD45.1-B6 マウスの骨髓を取り出し、c-kit 陽性細胞にヒト MLL/AF9 白血病遺伝子を導入した。半液体培地で 3 回 re-plate 後より m-SCF、m-IL3、m-IL6 入り液体培地にて培養可能となった。本細胞にレトロウイルスベクターを用い WT1 遺伝子を導入したのち、single-cell から培養し、WT1 遺伝子発現した白血病細胞集団を得た。Real time PCR 法および Western blotting 法にて遺伝子導入を確認した後、NK 細胞を一時的に除去した B6 マウスに移植した。約 3-5 か月で骨髓内に 95%以上の白血病細胞を認め、本白血病細胞を WT1-leukemia 細胞と名付け凍結保存した。WT1-leukemia 細胞は CD45.2-B6 マウスに血液内投与すると放射線療法や免疫細胞除去などの前処置なしで発症することが分かった。末血を FACS にて CD45.1/CD45.2 染色することで発症初期から経時的に白血病細胞を量的にフォローアップ可能となった。また、MBL 社から発売されている、WT1 tetramer 抗体を用い高感度・高特異度で WT1 特異的 T 細胞(%)を末梢血で経時フォローできる系を確立した。WT1-leukemia 細胞を移植後に WT1 ワクチン療法を行い、週 1 回採血して一部で CD45.1/CD45.2 染色を、残りで WT1 tetramer 染色を行うことで、腫瘍特異的免疫と腫瘍量の相関を経時的に追うことが可能となった(下図:代表的 2 例の WT1-CTL(%)と白血病細胞(%)の同時解析図)。



(3) 申請者らのグループにおいて、従来の WT1-CTL peptide である 126 ペプチドとは別に、ヘルパー活性をもつ WT1-helper peptide として 35 ペプチドを同定した。126 ペプチド単独と 126 ペプチド・35 ペプチド併用を投与した後、投与後毎週採血にて WT1 特異的 CTL(%)をフォローしたところ、併用群では WT1 特異的 CTL(%)が極めて高まることが分かった。また、単独投与では 4-5 週目には投与前レベルまで反応が低下するのに対し、併用療法では 2 月以上にわたり WT1 特異的 CTL 反応が維持されることが分かった。次に実際のヒト臨床試験同様に毎週ワクチン投与して比較したところ、併用群では 3 か月以上にわたり高い WT1 特異的 CTL 頻度を保っており、exhaust しないことが明らかとなった。さらに in vivo のマウス白血病モデルにおいても併用療法による治療効果を認めた。この 35 helper peptide はマウスとヒトで同様の配列を有することが分かっており、今後ヒト臨床試験においても併用療法が期待される。本結果に関しては現在論文執筆中である。

(4) WT1-CTL ペプチドおよび WT1-helper ペプチド併用療法がマウス白血病モデルにおいて有効性を示したため、この併用療法にさらに CpG アジュバントや抗 PD1 抗体、抗 CTLA4 抗体を加えることで、さらに有用な臨床効果を得られるかを実験した。WT1-leukemia 細胞を移植し、その翌週より WT1 併用ワクチン療法 + アイソタイプ抗体、CpG アジュバント入り WT1 併用ワクチン、WT1 併用ワクチン + 抗 PD1 抗体、WT1 併用ワクチン + 抗 CTLA4 抗体の 4 群に分け、毎週採血を行い腫瘍量および WT1 特異的 CTL 頻度を経時的にフォローした。DFS, OS では、併用群がよく、併用療法では checkpoint 阻害剤併用の方が早期に発症する傾向を示した。WT1 特異的 CTL(%) 反応では抗 PD1 抗体併用によりややワクチン療法のみより 4-5 週目で高い傾向を示したが、6 週目以降はほぼ同程度となった。(3)で示したように WT1 併用ワクチン療法では WT1 特異的 CTL は 3 か月後になっても exhaust マーカーが増加しておらず、機能的にも exhaust していない。また、白血病細胞ではその他の mutation が乏しいため checkpoint 阻害剤単独では臨床効果がなく、このような条件下では WT1 併用ワクチンと組み合わせても臨床効果が得られないものと考えられた。

(5) WT1 ワクチン療法の効果の増強法として、ヘルパーペプチドを用いた併用ワクチン療法の有用性は示されたが、一方で本治療では WT1 特異的 CTL は exhaust しておらず、結果として checkpoint 阻害剤とのさらなる併用はその治療効果を増強しないことが明らかとなった。一方でマウス白血病モデルにおいて、同一遺伝子背景のマウス、同一腫瘍細胞にも関わらず治療が奏功する群と奏功しない群に分かれる。そこで奏功群と非奏功群の間にどのような差異があるのかを調べ、治療効果増強方法の探索につなげることを考えた。生理的マウス白血病モデルでは末梢血中の WT1 特異的 CTL 頻度が臨床効果と一定の相関を持つのに比し、皮下腫瘍モデルでは相関を示さなかった。一方で皮下腫瘍モデルにおける腫瘍内浸潤免疫細胞 (TIL) を解析したところ、治療奏功群において極めて高い WT1 特異的 CTL 頻度を認めた。このことはワクチン療法により誘導された CTL が腫瘍局所にうまく到達することが治療効果の鍵となることを示唆した。今後 TIL 解析により免疫細胞が腫瘍内浸潤するかを決定づける因子を探索していく予定である。



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)

Jun Nakata, Nakae Y, kawakami M et al.  
Wilms tumour 1 peptide vaccine as a cure-oriented post- chemotherapy strategy for patients with acute myeloid leukaemia at high risk of relapse. (Br J Haematol. In press)、  
査読あり  
DOI:10.1111/bjh.14768

[学会発表](計6件)

Jun Nakata, Nakajima H, Nakae Y et al.  
WT1 vaccine therapy against AML: combination strategy for the next step. Keystone symposia(C5),2018.

中田 潤、中江 吉希、川上 学ら  
急性骨髄性白血病に対する WT1 ワクチン療法  
の進捗、2017年 第9回血液疾患免疫療法学会  
学術集会

中田 潤、中江 吉希、川上 学ら  
急性骨髄性白血病に対する WT1 ペプチド  
免疫療法、2017年 第108回近畿血液学  
会地方会

中田 潤、中江 吉希、川上 学ら  
急性骨髄性白血病に対する WT1 ワクチン  
療法、2016年 第8回血液疾患免疫療法  
学会学術集会

中田 潤、中江 吉希、川上 学ら  
再発ハイリスクな急性骨髄性白血病患者  
に対する維持療法としての WT1 ワクチン  
療法、2016年 第78回日本血液学会学術  
集会

中田 潤、中江 吉希、川上 学ら  
急性骨髄性白血病に対する WT1 ワクチン  
療法、2016年 第7回血液疾患免疫療法  
学会学術集会

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中田 潤 (NAKATA, Jun)  
大阪大学医学系研究科 寄附講座助教

研究者番号：90528952

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )