

令和元年5月20日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11136

研究課題名(和文) 卵巣癌に対するWT1特異的がん免疫療法の開発と抗腫瘍免疫担当細胞機能の質的解析

研究課題名(英文) Development of WT1 peptide vaccine for ovarian cancer and analyses of WT1-CTLs

研究代表者

西田 純幸(Nishida, Sumiyuki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00403189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：再発ハイリスクな進行期卵巣がん患者に対するWT1(がん抗原)を標的としたペプチドワクチン療法の臨床試験実施と治療によるWT1特異的細胞傷害性T細胞の誘導と質的な経時的変化を評価した。WT1ワクチンによりWT1-CTLが十分に誘導されることがと無増悪生存期間延長に関連性が認められた。WT1-CTLが長期に維持されかつエフェクターの誘導から記憶細胞へ分化成熟度の変化を認める症例ではより2年以上の長期無増悪生存期間を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がんは、婦人科がんの中でも最も予後不良ながんである。近年、他のがん種では免疫チェックポイント阻害治療が期待されているが、卵巣がんにおいては、これら単独療法では有効性が示されていない。がんワクチンや免疫アジュバントなど他のがん免疫療法との組合せによる相乗効果が期待される。本研究は、卵巣癌を対象にWT1を標的にしたがんワクチン療法を実施し、本治療法の臨床的効果と抗原特異的免疫誘導との関連性を明らかにした。今回の結果は、卵巣がんに対する集学的がん免疫療法の今後の開発に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I conducted the clinical study of WT1 peptide vaccine for advanced ovarian cancer and performed the time course of WT1-specific immune response induced by WT1 vaccine and their phenotypical and functional assessments.

I found the association between the prolonged disease-free survival and the induction of WT1-specific immune response. Especially, 1) a longer maintenance of WT1-CTLs 2) the effector phenotype was induced first, and then the memory phenotype emerged dominantly. Patient who had exhibited these characteristics of WT1-CTLs induced by WT1 vaccine had 2 year or longer disease free-survival.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：がん免疫療法 卵巣がん がんワクチン WT1 抗原特異的T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣がんの現状：卵巣がんは自覚症状に乏しく、進行期に発見されることが多い。婦人科がんの中でも最も予後は不良で進行期卵巣がんの5年生存率は20%程度である。死亡率改善のためには既存の治療とは異なる新たな治療戦略が必要である。その1つが「がん免疫療法」である。

(2) 我々は、汎腫瘍抗原である WT1 遺伝子の発がんに関する研究から WT1 遺伝子産物を標的とするがん免疫療法の臨床開発に取り組んできた。卵巣がんでは、WT1 遺伝子は高率に高発現し、発がん過程からがんの特性維持においてがん遺伝子的作用を発揮していると考えられる。我々は卵巣がんを含む標準治療不応となった婦人科がんを対象に WT1 ワクチン療法臨床試験を実施し、WT1 ペプチドワクチン療法は、進行婦人科がんの症例に WT1 特異的免疫の誘導が可能であること、誘導された抗腫瘍免疫により生存期間延長が期待される結果を得た。

(3) 我々は、進行卵巣がん術後寛解例を対象に、effector となる CD8 陽性 CTL 誘導のための class I ペプチドと CD4 陽性 Th 細胞を誘導できる class II ペプチドを含んだ新規 WT1 がんワクチン療法の有効性を評価する臨床試験を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣がんを対象に行った2つの臨床試験(1つは、標準治療不応進行期卵巣がんを対象に実施、1つは、完全寛解後の卵巣がんを対象に実施)の血液サンプルを用いて以下のことを明らかにし、卵巣がんに対する本治療法をより有効なものに改善することにつなげることを目的に計画した。

(1) 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL)、ヘルパー T 細胞 (Th) を含む免疫担当細胞の数的変化と分化成熟度の継時的変化を解析し、臨床効果との関連性を評価

(2) 質的に異なる WT1 特異的 T 細胞 (memory や effector など) の clonality の変化を継時的に解析し、臨床効果との関連性を評価

(3) 抗原特異的 CTL の機能維持に必要な遺伝子について、single cell level で分子生物学的手法を用いて網羅的に解析し、有効性や効果維持のバイオマーカーを探索する

3. 研究の方法

(1) 卵巣がんに対する WT1 ワクチン療法臨床試験の遂行とデータ集積

「III/IV 期卵巣がん完全寛解例に対する WT1 ペプチドワクチン免疫療法の第 Ⅱ 相臨床試験 (class I ペプチド 2 種と class II ペプチド 1 種の同時投与)」を実施し臨床データを集積した。また、既に試験終了した「WT1 ペプチドを用いた悪性固形腫瘍に対する免疫療法の第 I/II 相臨床試験 (class I ペプチドのみ投与)」のうち卵巣がん参加症例の臨床データを集積した。

(2) がん抗原 (WT1) 特異的免疫担当細胞 (T 細胞) の動態解析

WT1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (WT1-CTL) の数的評価を、テトラマー法を用いて FACS 解析で継時的に評価した。(WT1-CTL 細胞; CD3+, CD8+, WT1₁₂₆ tet+または WT1₂₃₅ tet+)

(3) がん抗原 (WT1) 特異的免疫担当細胞 (T 細胞) の質的解析

WT1-CTL の免疫学的成熟分化表現型 (naïve, central memory, effector memory, effector) について継時的評価を行った。抗 CD45RA 抗体と抗 CCR7 抗体を用いて FACS 解析した。

(4) がん抗原 (WT1) 特異的免疫グロブリン (WT1-IgG) の測定

患者血清を用い、抗原ペプチド (mp235) に対する IgG (WT1-IgG) を、ELISA 法を用いて測定した。

(5) 抗原特異的 T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析・発現遺伝子の網羅的解析

研究計画段階では、WT1-CTLs を single sort してこれらを解析する予定であったが、本研究期間内に実施・完了できなかった。

(6) 統計学的解析・検定

得られたデータを適切な統計学的手法で統計ソフト JMP を用いて、解析・検定を行った。

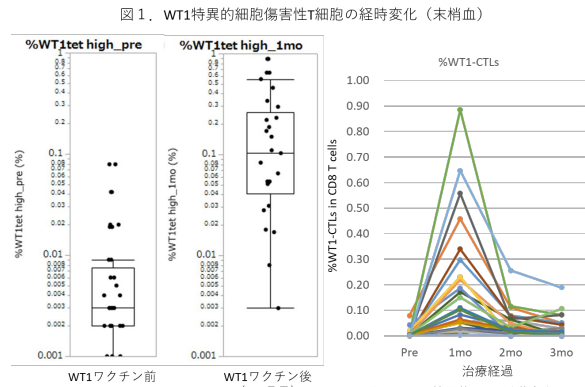
4. 研究成果

(1) 標準治療不応進行期卵巣がんに対する HLA-A*24:02 拘束性 WT1 ペプチド(mp235)ワクチン療法実施症例の抗原特異的免疫学的評価

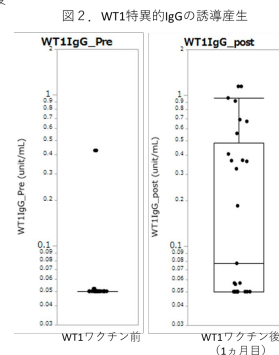
がん抗原 (WT1) 特異的免疫の動態解析 : WT1 特異的 T 細胞 (WT1-CTL) の数的評価

HLA-A*24:02 拘束性 WT1 ペプチド (mp235)

ワクチン療法を受けた標準治療不応進行期卵巣がん患者 (25 例) の血液サンプルを用いて WT1-CTL の経時的変化を評価した。WT1 ワクチン接種後 1 ヶ月 (4 回のワクチン接種あり) に、CD8 陽性 T 細胞中の WT1-CTL の割合 (%WT1-CTL) は有意に増加した [治療前 (中間値) 0.003% 治療後 (中間値) 0.103%] (図 1) 。



13 例 (52.0%) で 0.10% 以上に、その中で 6 例 (24.0%) は 0.25% 以上に %WT1-CTL が増加した。しかしながら 3 か月の経過の中でその多くが治療前のレベルに低下する傾向を認めた。



以上の結果より、進行期卵巣がん患者に対し、WT1 ワクチンによる免疫誘導は高率に認められるが、class I ペプチドのみでは、免疫維持が乏しい結果であった。

がん抗原 (WT1) 特異的免疫グロブリン (WT1-IgG) の測定

WT1 特異的 IgG の力価の経時変化を評価した。WT1 ワクチン接種前に WT1-IgG を認めた症例は 1 例のみで、他は検出感度以下であった。ワクチン接種後に 13 例 (52%) で WT1-IgG が 0.10 U/mL 以上に増加した (図 2) 。

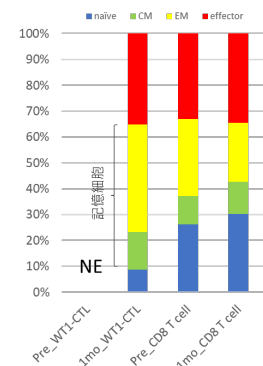
WT1-IgG の誘導増加は、WT1-CTLs の誘導と関連性が統計上有意であった。

以上より、WT1 ワクチン接種により WT1-CTLs が誘導され、その結果 WT1-IgG も誘導されたと考えられる。

抗原特異的免疫の動態解析 : WT1-CTL の質的評価

WT1-CTL の誘導かつ WT1-IgG の誘導産生が良好であった群において、WT1-CTLs の質的解析を行った。WT1-CTL が誘導され、その免疫学的成熟分化表現系は、effector memory と central memory を併せた memory 型の集団が全 CD8T 細胞のそれに比べて相対的に多くなる傾向であった (図 3) 。

図 3. WT1-CTL 免疫学的表現型の変化



(右図の症例は、WT1 ワクチン接種前の WT1-CTLs の検出は、微量で表現型評価不能であった。)

WT1 特異的 T 細胞の数的・質的解析結果と臨床効果の関連性評価

WT1 ワクチン接種後の WT1 特異的免疫誘導と臨床的效果として無増悪生存期間(PFS)との関連性を評価したところ、WT1 特異的免疫誘導 (WT1-CTL 誘導または WT1-IgG 産生) を認めた群は、誘導のない群比べ、有意な無増悪生存期間の延長を認めた (図 4)。

卵巣がんで一般に報告されている予後因子である PS と WT1 特異的免疫誘導との関連性を統計的に解析したところ、PS0 の群では、WT1 特異的免疫誘導 (WT1-CTL, WT1-IgG) による予後改善効果が有意であった。

本研究の結果をまとめると、進行期卵巣がんであっても PS が比較的良好な症例では、WT1 ワクチンにより抗原特異的免疫誘導が得られ、その後の病状進行抑制が期待できる可能性が示唆された。一方、病状の進行により免疫状態が不良な症例に対する本治療効果の増強を如何に行うかが、今後の課題である。

(2) 進行卵巣がん術後完全寛解例への WT1 ペプチドワクチン class I & class II 拘束性 WT1 ペプチド(np126, mp235, np332)ワクチン療法臨床試験の実施と免疫学的評価

「III/IV 期卵巣がん完全寛解例に対する WT1 ペプチドワクチン免疫療法の第 相臨床試験」遂行

FIGO 病期分類 III/IV 期卵巣がんで外科的切除+化学療法による先行治療によって完全寛解となった症例を対象に class I ペプチドと class II ペプチドを含む WT1 ペプチドワクチン維持免疫療法を実施した。経過中に対象の標準治療変更等もあって症例集積の遅延により、最終登録数は 8 例にとどまった。臨床的效果としては、8 例中 5 例で 1 年以上の、2 例 (いずれも 1200 日以上無再発) に 2 年以上の無増悪生存期間を認めた。再発ハイリスク卵巣がん症例における WT1 ワクチンによる無増悪生存期間延長効果が示唆された。

がん抗原 (WT1) 特異的免疫の動態解析: WT1 特異的 T 細胞 (WT1-CTL) の数的評価・機能評価

WT1-CTL の経時的変化を評価した。1 年以上の無病生存期間 (DFS 起算日は試験登録日) を認めた症例では、WT1-CTL の誘導を認めた (図 5a)。ペプチド刺激を行い、WT1-CTL の機能を評価したところ、DFS1 年以上のケースでは、その多くで刺激による機能低下を認めなかった (図 5b)。つまり、アナジー (免疫不応) 状態に陥っていないことが確かめられた。特記すべきことは、WT1-CTL の検出が 3 か月以上 (多くは 6 か月以上) 持続し、機能も維持されていたことである。Class II 拘束性ペプチドを併用した効果と考えられる。そこで、WT1 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の誘導・活性化について評価すべく、np332 ペプチド刺激によ

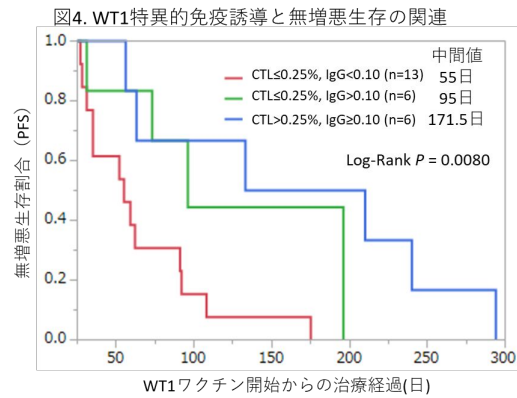


図5a. WT1-CTLの誘導と持続期間 (Ex vivo) 無病生存期間

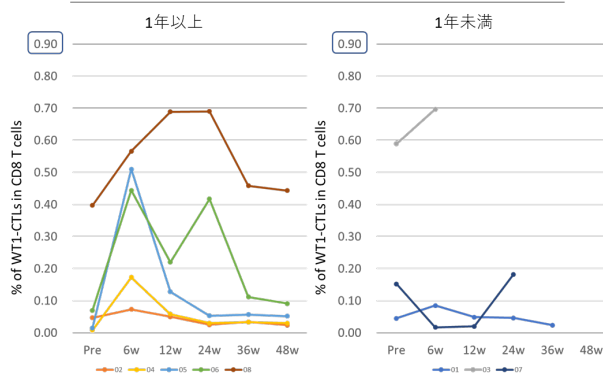
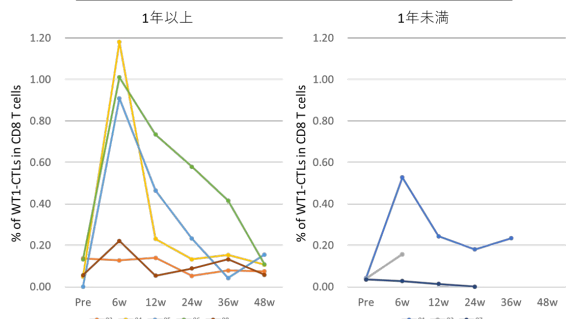


図5b. WT1-CTLの誘導と持続期間 (ペプチド刺激) 無病生存期間



る細胞内サイトカイン産生解析を行った。その結果、1年以上のDFSを認めた群ではほぼ全例でnp332に対するCD4陽性T細胞の活性化、誘導がWT1ワクチン接種開始後速やかに認められ、その後も持続する傾向を認めた(図5c)

がん抗原(WT1)特異的免疫の動態解析: WT1特異的T細胞(WT1-CTL)の質的評価

卵巣がんの中でも治療が難渋する明細胞がん

の1例で数年間に及び長期無再発生存を

認めた。本症例のWT1-CTLの経時的变化

を詳細に解析した(図6)。WT1ワクチン

接種前はほとんどWT1-CTLを検出できな

かったが、WT1ワクチン接種後6週まで

にWT1-CTLは速やかに誘導された。その

多くはエフェクター型で細胞傷害活性

も強くペプチドに対するサイトカイン

産生能は高かった。その後のWT1ワクチ

ン接種継続においてもWT1-CTLは維持さ

れていたが、約6か月の後にmemory型の集団が増加傾向を示し、維持されていた。WT1ペプチド反応性CD4陽性T細胞も同様に、WT1ワクチン接種後6週までに速やかに誘導され、かつサイトカイン産生能が認められた。今回使用したWT1ワクチンにより誘導された抗腫瘍免疫が、本症例の予後改善に寄与したと考えられた。

本研究の結果をまとめると、class Iペプチドとclass IIペプチドを含む新規WT1ワクチンを用いた再発ハイリスクな卵巣がん患者に対する維持免疫療法は、多くの症例で病状安定、更には生存期間延長に寄与しうる可能性が示唆された。

(3) 免疫誘導増強のための試み

免疫アジュバントの使用は、WT1ワクチンの効果増強が期待される。WT1ワクチンの効果をより長期に、また、有効例をより多く、を期待して新規免疫アジュバントでtolI様受容体9(TLR9)のアゴニストであるCpGODN(K3)の臨床試験(第1相試験)を行った。設定した投与量・投与方法では特記すべき重篤な治療関連毒性は認めなかった。更に一部のケモカインの誘導、自然免疫系の活性化を示唆する変化を認めた。今後、WT1ワクチンとCpGODN(K3)との併用へと発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計9件)

Nishida S, Ishikawa T, Egawa S, Koido S, et al. Combination Gemcitabine and WT1 Peptide Vaccination Improves Progression-Free Survival in Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase II Randomized Study. *Cancer Immunol Res*. 査読あり 6 (3)号, 2018年, p320-331

Morimoto S, Fujiki F, Kondo K, Nishida S, et al. Establishment of a novel platform cell line for efficient and precise evaluation of T cell receptor functional avidity.

図5c. WT1特異的CD4 T細胞の誘導(細胞内サイトカイン解析)
無病生存期間

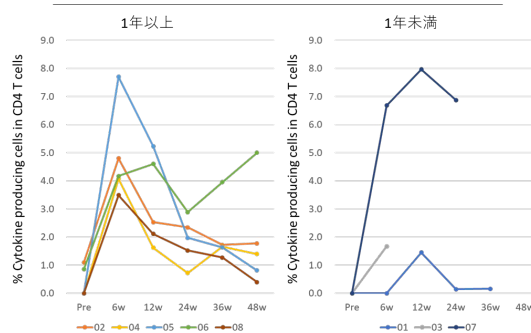
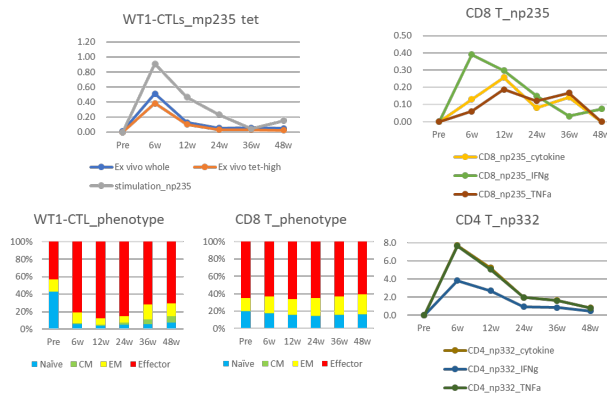


図6. 卵巣がん(明細胞癌) HLA-A*24:02 / 24:02



Oncotarget. 査読あり, 9(75)号, 2018年, p34132-34141.

Nishida S, Sugiyama H. Immunotherapy Targeting WT1: Designing a Protocol for WT1 Peptide-Based Cancer Vaccine. *Methods Mol Biol*. 査読なし, 1467号, 2016年 p221-32.

〔学会発表〕(計11件)

Tomoyuki Otsuka, Sumiyuki Nishida, et al. Phase I study of CpG ODN(K3), a novel toll-like receptor 9 agonist, for advanced lung cancer: Interim analyses of safety and immunity in subcutaneous injection cohort. *ASCO-SITC 2019 Clinical Immuno-Oncology Symposium*. 2019年

Sumiyuki Nishida, et al. Randomized phases II study of WT1 peptide vaccine plus gemcitabine for advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): Clinical efficacy and immune response. *ASCO Annual Meeting 2016* 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 森本 創世子

ローマ字氏名: Morimoto Soyoko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。