

令和元年5月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20008

研究課題名（和文）神経膠腫に対するWT1ペプチドワクチン・免疫チェックポイント阻害剤併用療法の確立

研究課題名（英文）The development of combination therapy of WT1 peptide vaccine with immune checkpoint inhibitors against glioma

研究代表者

高野 浩司 (Takano, Koji)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90649203

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：WT1療法の臨床試験で得られた神経膠腫の検体を用いた解析で、WT1やHLA class 1の発現量の低下、腫瘍内CD4陽性細胞の減少がWT1療法に対する腫瘍の耐性化に関与している可能性が考えられた。マウスグリオーマモデルを用いた実験では、WT1ワクチン・抗PD-1抗体併用群はコントロール群、WT1ワクチン単独群、抗PD-1抗体単独群と比較して生存期間の有意な延長を認めた。さらにFACSを用いた解析により、WT1ワクチンが腫瘍内免疫細胞浸潤の増加およびMDSCの低下といった腫瘍免疫環境の変化をもたらすことで抗PD-1抗体療法の効果を増強していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経膠腫は他のがんと比較しても予後不良な疾患であり、有効な治療法が乏しい。しかも他のがんに比し若年者に多く、早期から麻痺や高次脳機能障害による生活自立度の低下が認められるため、社会的な影響も大きい疾患である。本研究を通して、動物実験レベルではあるが、神経膠腫に対するWT1ペプチドワクチン・免疫チェックポイント阻害剤併用療法の有効性を示し、その作用機序の一端を明らかにすることができた。臨床試験などさらなる研究が必要ではあるが、今後、神経膠腫に対する新たな有効な治療法の確立が期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed specimens taken from the clinical trial for WT1 peptide vaccine against glioma. The down regulation of WT1 gene product and HLA class 1 as well as the reduction of tumor-infiltrating CD4+ cells were thought to be involved in tumor tolerance against WT1 peptide vaccine.

In the animal experimentation with mouse glioma model, the combination group treated with WT1 peptide vaccine and anti PD-1 antibody showed significantly prolonged survival time comparing with the control group, WT1 peptide vaccine group or anti PD-1 antibody group.

FACS analysis revealed that WT1 peptide vaccine enhanced the effect of anti PD-1 antibody through changing tumor microenvironment such as increment of tumor infiltrating lymphocyte and decrement of MDSC.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：WT1 ペプチドワクチン 免疫療法 免疫チェックポイント阻害剤 神経膠腫 免疫逃避 PD-1 PD-L1

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

1. 研究開始当初の背景

免疫療法は悪性神経膠腫に対する有望な治療法の1つと考えられており、中でも Wilms tumor 1(WT1)は最も有望な癌抗原と考えられていた⁽¹⁾。我々の研究グループはこれまでに再発悪性神経膠腫に対する WT1 ペプチドワクチン療法 (WT1 療法) の第 Ⅰ 相臨床試験を行い、他の文献報告と比較して有意に優れている事を示した⁽²⁾。しかしながら Response Rate は 9.5%、Disease control rate は 57.1%に過ぎず、十分に満足できる結果ではない。そこで、現在の標準治療である化学放射線療法(Temozolomide/RT)と WT1 療法を組み合わせ、初発悪性神経膠腫に対する第 Ⅰ 相臨床試験を行い、その有効性と安全性を示した⁽³⁾。さらに、これまでの WT1 CTL ペプチドワクチンに加え、WT1 特異的なヘルパーTリンパ球を誘導可能な WT1 ヘルパーペプチドワクチンを開発し、これらを併用する再発悪性神経膠腫に対する第 Ⅰ 相臨床試験も行った。

一方、近年腫瘍の免疫逃避機構に注目が集まっており、PD-1(programmed death-1)、PD-L1(programmed death-ligand 1)、CTLA-4(Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4)、IDO(Indoleamine 2,3-dioxygenase)などの免疫調節因子に対する阻害剤は基礎研究・臨床研究で有望な成績が報告され、すでに一部の悪性疾患においては本邦でも保険承認が得られていた。

上述の通り悪性神経膠腫に対する WT1 療法の有効性を示してきたが、治癒に至ったと考えられる症例は一部に限られていた。その原因として腫瘍の WT1 療法に対する耐性化が考えられ、その機序として腫瘍の免疫逃避機構の関与が考えられた。そこで、マウスグリオーマモデルを用いて WT1 療法の効果と腫瘍の免疫逃避機構を解析してきた。その結果、WT1 治療群ではプラセボ群と比較して有意に生存期間の延長が得られたが、WT1 治療群の多くで最終的に腫瘍の再増大が認められた。この再増大した腫瘍組織を免疫組織学的に解析したところ、WT1 療法群ではプラセボ群と比較して腫瘍内に浸潤した CD8⁺細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の数が有意に増加していたが、同時に PD-L1 の発現が亢進している個体が散見された。メラノーマでは、腫瘍内に浸潤したリンパ球数 (TIL) と腫瘍の PD-L1 の発現には相関があり⁽⁴⁾、また、BRAF 阻害剤に対する耐性が認められた症例では PD-L1 の発現が亢進していた⁽⁵⁾、と報告されている。悪性神経膠腫においても同様に、WT1 療法によって CTL が腫瘍内に浸潤することで、腫瘍の PD-L1 発現亢進などを介する免疫逃避機構の結果、腫瘍が WT1 療法に対する耐性を獲得している可能性が高いと考えられる。

以上より、WT1 ペプチドワクチンと免疫チェックポイント阻害剤の併用療法は悪性神経膠腫に対する有望な治療法になり得ると考えられた。また、作用機序の観点からも、腫瘍に対する免疫細胞の攻撃力を高める WT-1 ペプチドワクチンと、腫瘍の免疫細胞に対する防御力を落とす免疫チェックポイント阻害剤の組み合わせはシナジー効果を生むと推測された。さらに、免疫チェックポイント阻害剤でしばしば問題となる副作用である自己免疫疾患が WT1 療法ではこれまでに認められていない点からも、認容性の観点から本併用療法が有望であると推測された。

参考文献

- (1) Cheever et al., Clin Cancer Res. 2009; 15: 5323-37
- (2) Izumoto et al., J Neurosurg. 2008; 108: 963-71
- (3) Hashimoto et al., Cancer Immunol Immunother. 2015; 64: 707-16
- (4) Gowrishankar et al., PLoS One 2015 Apr 6; 10(4): e0123410
- (5) Jiang et al., Clin Cancer Res. 2013; 19: 598-609

2. 研究の目的

本研究ではマウスグリオーマモデルを用いて WT1 ペプチドワクチン療法と免疫チェックポイント阻害剤 (Immune Checkpoint 阻害剤) の併用療法の有効性を検証し、さらに治療による脳内免疫環境の変化について探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)臨床サンプルでの腫瘍内免疫応答の確認

WT1 療法の臨床試験で、WT1 治療開始後に腫瘍摘出術が施行された症例 (WT1 療法無効例、もしくは耐性化獲得例と考えられる) の腫瘍組織を用いて腫瘍内免疫応答を解析した。WT1 療法開始前の検体と開始後の検体を用いて免疫組織染色を行い、腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の数、WT1・HLA・PD-L1 の発現量、IL-10・TGF- β などのサイトカイン分泌を分析した。さらに、これらの染色結果と生存期間の間の相関性を解析した。

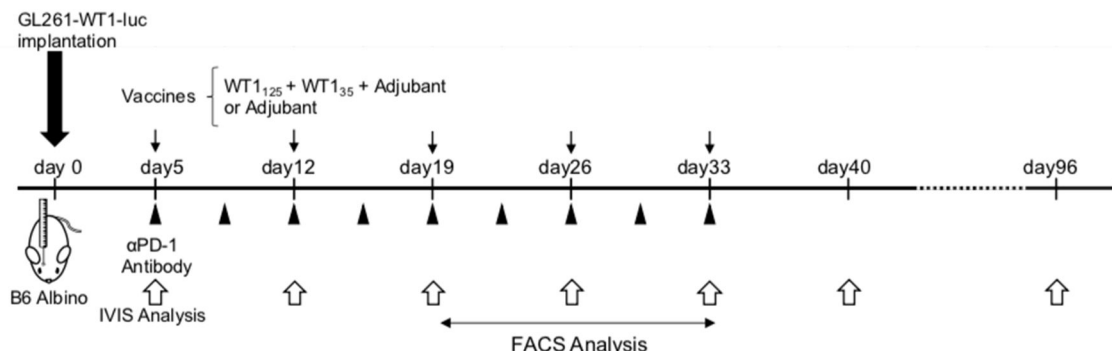
(2)動物実験モデルを用いた WT1 ペプチドワクチン・免疫チェックポイント阻害剤併用療法の有効性の検討

細胞株としては、マウスグリオーマ細胞株である GL261 に WT1 遺伝子とホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入し、安定的に発現する株 (GL261-WT1-Luc) を作成した。マウスは C57BL/6 のアルビノ系統である B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrI (B6 Albino) を用いた。マウスの頭部に小切開・穿頭を置き、脳表から 3mm の深さに GL261-WT1-Luc を 3×10^5 個移植し、Day5 に Xenogen IVIS Lumina II (IVIS) で撮影し腫瘍の生着を確認した。コントロール群、WT1 ワクチン単独群、抗 PD-1 抗体単独群、WT1 ワクチン・抗 PD-1 抗体併用群の 4 群に分け、Day5 より WT1 ワクチンおよび抗 PD-1 抗体投与を開始した。WT1 ワクチンは WT1 CTL ペプチドワクチンと WT1 ヘルパーペプチドワクチンの混合ワクチンを週 1 回皮内投与した。PD-1 抗体は 1 回 200 μ g/匹を週 2 回腹腔内投与した。

腫瘍体積の推移を IVIS で追跡した。

(3)各治療群における腫瘍内免疫応答の検討

上記(2)と同様の実験を行い、Day19-33 に脳を採取し、FACS を用いて TIL の数や分画比率、MDSC の数を測定した。



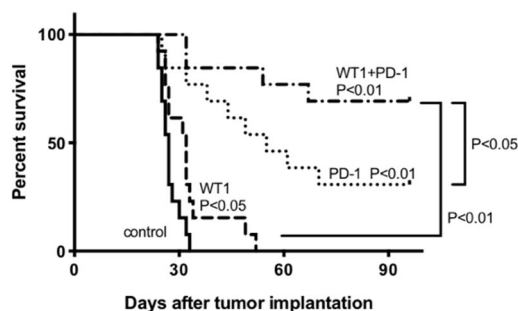
4. 研究成果

(1)臨床サンプルでの腫瘍内免疫応答の確認

WT1 療法の前後両方の腫瘍摘出検体が入手できた 20 症例で解析を行った。WT1 療法の前後で比較すると、WT1 療法後の検体では WT1 と HLA class 1 の発現量が有意に低下していた(それぞれ $p=0.012$, $p=0.008$)。さらに TGF- β の有意な上昇を認めた($p=0.014$)。一方で PD-L1 の発現量には有意差を認めなかった。TIL については CD3, CD8, CD79, Foxp3, PD-1 陽性細胞については有意差を認めなかったが、CD4 陽性細胞は WT1 療法後の検体で有意に減少していた($p=0.018$)。一方、生存期間の解析では、WT1 療法開始前の WT1 高発現、HLA class 1 高発現、及び、高 CD4+/CD8+ 比が予後良好因子であった。以上の結果より、WT1 療法に対する腫瘍の耐性化の機序として、WT1, HLA class 1 の発現量の低下や腫瘍内 CD4 陽性細胞の減少が関与している可能性が考えられた。また、WT1 療法の前後で PD-1/PD-L1 に変化がなかったことから、WT1 療法と PD-1/PD-L1 をターゲットとした免疫チェックポイント阻害剤の併用が有効である可能性が示唆された。

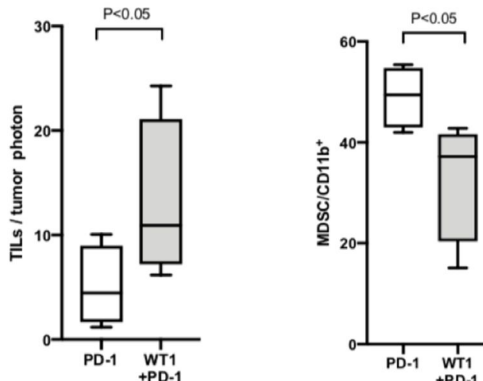
(2)動物実験モデルを用いた WT1 ペプチドワクチン・免疫チェックポイント阻害剤併用療法の有効性の検討

WT1 ワクチン・抗 PD-1 抗体併用群はコントロール群および各単独治療群と比べて生存期間の有意な延長を認めた。特に抗 PD-1 抗体単独群、WT1 ワクチン・抗 PD-1 抗体併用群では 100 日間以上の長期生存が確認された。これらの個体では IVIS 測定値も低値で維持された。これらの個体に対して対側の脳に再度 GL261-WT1-Luc を 3×10^5 個移植したところ、6 例中 5 例で腫瘍は生着しなかった。以上の結果から、WT1 ペプチドワクチン療法と抗 PD-1 抗体療法の併用療法はグリオーマに対して有効であると考えられた。



(3)各治療群における腫瘍内免疫応答の検討

WT1 ワクチン単独群ではコントロール群と比較して CD4+/CD8+ 比の有意な上昇が認められた($p<0.05$)。しかし予想に反して腫瘍内に浸潤した WT1 特異的 CTL の増加は確認できなかった。一方、抗 PD-1 抗体単独群では腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞の PD-1 発現は低下しており、PD-1 抗体が CD8 陽性 T 細胞上に結合していることが確認された。しかし、コントロール群と比較して CD4, CD8, CD11b 陽性細胞や NK 細胞の数に変化を認めなかった。そこで、抗 PD-1 抗体治療開始後早期に腫瘍が再増大した個体と腫瘍縮小が維持された個体と比較したところ、後者では MDSC が有意に少なかった($p<0.05$)。さらに、WT1 ワクチン・抗 PD-1 抗体併用群では抗 PD-1 抗体単独群と比較して腫瘍体積あたりの TIL の増加と MDSC の減少が確認された(右図、それぞれ $p<0.05$, $p<0.05$)。以上の結果から、WT1 ワクチンが腫瘍内免疫細胞浸潤の増加および MDSC の低下といった腫瘍免疫環境の変化をもたらすことで抗 PD-1 抗体療法の効果を増強していることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Takano K, Kinoshita M, Arita H, Okita Y, Chiba Y, Kagawa N, Watanabe Y, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Fujimoto Y, Kishima H: Influence of region-of-interest designs on quantitative measurement of multimodal imaging of MR non-enhancing gliomas. *Oncology Letters* 2018 May;15(5):7934-7940. DOI: 10.3892/ol.2018.8319 査読有
2. 西尾雅実、矢野喜寛、高野浩司、江村拓人：CAS 導入後の CEA 治療成績 *脳卒中の外科* 2018;46(6):411-415. DOI: 10.2335/scs.46.411 査読有
3. Takano K, Kinoshita M, Takagaki M, Sakai M, Tateishi S, Achiha T, Hirayama R, Nishino K, Uchida J, Kumagai T, Okami J, Kawaguchi A, Hashimoto N, Nakanishi K, Imamura F, Higashiyama M, Yoshimine T: Different spatial distributions of brain metastases from lung cancer by histological subtype and mutation status of epidermal growth factor receptor. *Neuro-Oncology* 2016 May;18(5):716-24. DOI: 10.1093/neuonc/nov266 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 高野浩司、大上拓海、後藤哲、西尾雅実：「中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する治療成績と高齢者における課題」第 36 回日本脳腫瘍学会学術集会 2018 年 12 月 神奈川
2. 高野浩司、江村拓人、矢野喜寛、後藤哲、西尾雅実：「鍼治療後にくも膜下出血・遅発性脳梗塞を発症した一例」第 43 回日本脳卒中学会学術集会 2018 年 3 月 福岡
3. 高野浩司、木下学、有田英之、沖田典子、千葉泰良、香川尚己、渡邊嘉之、下瀬川恵久、畑澤順、藤本康倫、橋本直哉、貴島晴彦：「非造影グリオーマに対するマルチモーダル画像解析における関心領域(ROI)設定法の影響」第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会 2017 年 11 月 香川
4. 高野浩司、石橋愛、渡部直史、中島博子、千葉泰良、阿知波孝宗、横田千里、福永貴典、福屋章悟、永野大輔、有田英之、香川尚己、藤本康倫、畑澤順、杉山治夫、橋本直哉、吉峰俊樹：「WT1 ペプチドワクチン療法の治療効果判定：18F-DPA-714 PET の有用性」第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会 2016 年 12 月 山梨

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横田 千里

ローマ字氏名：Yokota Chisato