

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：萌芽研究  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19659366  
 研究課題名（和文） WT1 免疫療法における CD4 陽性ヘルパーT 細胞の解析と機能増強法の探索  
 研究課題名（英文） Induction and characterization of WT1-specific Th1-type CD4(+) T cells to develop WT1 immunotherapy against malignant gliomas.  
 研究代表者  
 泉本 修一 (IZUMOTO SHUICHI)  
 兵庫医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：40324769

## 研究成果の概要：

WT1ワクチン療法を展開するうえでCD8陽性CTLのみならずWT1腫瘍抗原特異的CD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞（Th））の役割を明らかにした。すなわち（1）MHC class II拘束性にマウスWT1特異的CD4陽性T細胞を誘導できるマウスWT1エピトープを同定し、in vivoで、class II拘束性WT1特異CD4陽性T細胞によるWT1特異的CTLの誘導活性化に対する影響、およびそのメカニズム解析を行った。（2）ヒトWT1<sub>332</sub>ペプチドにより、HLA-DRB1\*0405のタイプのみならずHLA-DRB1\*1501、HLA-DRB1\*1502、HLA-DRB1\*0901のタイプに対しても特異的CD4陽性T細胞の反応が誘導された。WT1<sub>332</sub>2ペプチドが“promiscuous”に反応するWT1特異的ヘルパーエピトープであり、今後HLA-class I拘束性のWT1ペプチドと組み合わせ、さまざまなHLA-class IIタイプでWT1特異的ヘルパーペプチドとしてのがんワクチン療法の相乗効果が考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,300,000	0	1,300,000
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性グリオーマ、膠芽腫、WT1、免疫療法、ヘルパーT細胞

## 1. 研究開始当初の背景

WT1 が悪性グリオーマを含めてほとんどすべての種類の固形癌で高発現することを明らかにした。また、ヒトの WT1 特異的細胞障害性 T リンパ球 (CTL) を誘導する

CTL エピトープを同定した。さらに WT1 ペプチドワクチン第 I 相臨床試験を行い、投与した WT1 ペプチド特異的な CTL が多くの患者で安全に誘導された。その結果をもとに私たちは再発膠芽腫に対する WT1 ワクチン

ン療法第Ⅱ相臨床試験を行い、再発後治療開始からの6ヶ月後無増大生存率33.3%が得られた。これは化学療法に比べて有意に優れており、WT1免疫療法の今後の発展が期待できる。しかしながら完全治癒に至った症例はなく、治療初期の段階でより強力な免疫反応が働く環境を設定することが望ましいことがわかった。

## 2. 研究の目的

がんワクチン療法において抗腫瘍免疫反応の主体となるのはCD8陽性CTLであるが、その効果的な活性化や作用にはCD4陽性のヘルパーT細胞(Th)の関与が重要である。その詳細な機能解析と機能増強法の追求がより強力なWT1免疫療法を展開する上で必須と考えられ、WT1に対して腫瘍抗原特異的CD4陽性T細胞の役割を明らかにする。

すなわち (1) マウスWT1特異的CD4陽性T細胞のin vivoでの機能解析さらにMHC class II拘束性WT1ペプチドの同定 (2) in vivoで、class II拘束性WT1特異的CD4陽性T細胞によるWT1特異的CTLの誘導活性化に対する影響、およびそのメカニズム解析 (3) WT1特異的CTLの活性化を増強するヒトWT1特異的CD4陽性T細胞の機能解析 (4) 同時にヒトWT1特異的CD4陽性T細胞を誘導できるWT1ペプチド同定、を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウスを用いたWT1特異的CD4陽性T細胞のin vivo機能解析

① WT1特異的CD4陽性T細胞を誘導できるMHC class II拘束性マウスWT1ペプチドをアンカーモチーフから解析し、候補を選択し同定する。

② MHC class II拘束性のWT1特異的CD4陽性T細胞株、ついでクローンを樹立する。クローン樹立後、まず最初にそのクローンがTh1タイプかTh2タイプかを検討し、つ

ぎにそのクローンがWT1特異的CTL誘導にどのような影響をおよぼすか検討する。

(2) ヒトWT1特異的CD4陽性T細胞の解析

① 日本人にもっとも多いHLA class IIのひとつであるHLA-DRB1\*0405拘束性のWT1ペプチドの同定を行う。アンカーモチーフから解析し候補を選択し同定する。

② ①で同定したWT1ペプチドを用いて、HLA-DRB1\*0405拘束性のWT1特異的CD4陽性T細胞株、ついでクローンを樹立する。クローン樹立後、そのクローンがTh1タイプかTh2タイプかを検討し、またそのクローン自体が細胞障害活性を持つかどうかとも検討する。

③ ①で同定したWT1ペプチドがDRB1\*0405以外のどのようなHLA class II型でWT1特異的CD4陽性T細胞を誘導できるか、すなわち“promiscuous性”を検討する。

④ ①で同定したclass II拘束性のWT1ペプチド特異的な免疫応答が、悪性グリオーマ患者中および健常人中でどの程度生じているかを比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) WT1特異的CD4陽性T細胞を誘導できるMHC class II拘束性マウスWT1ペプチドを同定した。すなわちマウスWT1のアンカーモチーフからコンピュータ解析し、2種類の候補を選択し、MHC class II拘束性にマウスWT1特異的CD4陽性T細胞を誘導できる15merのマウスWT1エピートプを同定した。

(2) マウス(C57BL/6)と同系統由来であるマウスグリオーマ細胞203Gを培養し、そのグリオーマ細胞がWT1を発現していることを、WT1抗体による免疫組織化学的検討により明らかにした。また同じく、MHC class IIが発現していることを抗class II抗体を用いた免疫組織学的染色に

より明らかにした。

(3) マウスグリオーマ細胞 203G を定位的に脳内移植する手法を確立するため、マウス(C57BL/6)を麻酔後、固定装置に装着、穿頭し基底核部に細胞を  $1 \times 10^7$  個注入、担脳腫瘍マウスモデルとして可能なことを確認した。また、麻酔後に大後頭孔より大槽内に腫瘍細胞を注入し、安定して簡便な担脳腫瘍モデルとして可能なことを確認した。

(4) MHC class II 拘束性の WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞をフリーサイトメトリーで分離し培養株を樹立、さらにそのクローン樹立を行った。

(5) WT1<sub>332</sub> により、HLA-DRB1\*0405 のタイプのみならず HLA-DRB1\*1501、HLA-DRB1\*1502、HLA-DRB1\*0901 のタイプに対しても特異的 CD4 陽性 T 細胞の反応が誘導された。

(6) これらの HLA class II 拘束性 WT1<sub>332</sub> 特異的 CD4 陽性 T 細胞を株化することに成功し、培養上で WT1<sub>332</sub> 特異的 CD4 陽性 T 細胞株は、WT1<sub>332</sub> の刺激によりサイトカインのうち INF- $\gamma$  を産生したが、IL-4 や IL-10 は誘導されなかった。すなわち Th-1 タイプのプロファイルであることがわかった。

(7) さらに HLA-DRB1\*1501、HLA-DRB1\*1502 とともに WT1<sub>332</sub> 特異的 CD4 陽性 T 細胞は WT1 発現細胞に反応することを同定し、WT1<sub>332</sub> ペプチドが免疫応答に関与していることを確認した。すなわち WT1<sub>332</sub> ペプチドが“promiscuous”に反応する WT1 特異的ヘルパーエピトープであり、今後 HLA-class I 拘束性の WT1 ペプチドと組み合わせて、さまざまな HLA-class II タイプで WT1 特異的ヘルパーペプチドとしてのがんワクチン療法の相乗効果が考えられた。

(8) 年度内に予定していたアジュバントの選定作業および健常人での HLA class II 拘束性 WT1 特異的免疫応答の解析は年度内にデ

ータは得られなかった。

## 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 23 件)

(1) Hashiba T, Hashimoto N, Izumoto S, (5 名省略) Serial volumetric assessment of the natural history and growth pattern of incidentally discovered meningiomas. J Neurosurg 査読あり 110(2009):675-684.

(2) 泉本修一. Glioma の免疫療法—WT1 ペプチドワクチン療法を中心に. 脳神経外科速報 査読あり 19(2009):170-177.

(3) Izumoto S, Tsuboi A, Oka Y, (17 名省略) Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. J Neurosurg 査読あり 108(2008):963-971.

(4) Kinoshita M, Hashimoto N, Kishima H, Izumoto S (5 名省略) Fractional anisotropy and tumor cell density of the tumor core show positive correlation in diffusion tensor magnetic resonance imaging of malignant brain tumors. Neuroimage 査読あり 43(2008):29-35.

(5) Kinoshita M, Izumoto S, Hashimoto N, Kishima H, (4 名省略) Immunohistochemical analysis of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in malignant CNS lymphomas: a study comparing primary CNS malignant and CNS intravascular lymphomas. Brain Tumor Pathol 査読あり 25(2008):73-78.

(6) Wakabayashi T, Kayama T, Hashimoto N, (8 名省略) A multicenter phase I trial of interfero- $\beta$  and temozolomide combination therapy for high-grade gliomas (INTEGRA Study). Jpn J Clin Oncol 査読あり

38(2008):715-718.

(7)Fujiki F, Oka Y, Kawakatsu M, Tsuboi A, (8名省略) A WT1 protein-derived, naturally processed 16-mer peptide, WT1(332), is a promiscuous helper peptide for induction of WT1-specific Th1-type CD4(+) T cells. Microbiol Immunol 査読あり

52(2008):591-600.

(8)Li Z, Oka Y, Tsuboi A, (16名省略) Identification of a WT1 protein-derived peptide, WT1, as a HLA-A 0206-restricted, WT1-specific CTL epitope. Microbiol Immunol 査読あり 52(2008):551-558.

(9)Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F (8名省略) "Cancer antigen WT1 protein-derived peptide"-based treatment of cancer -toward the further development. Curr Med Chem 査読あり 15(2008):3052-3061.

(10)Oka Y, Tsuboi A, (4名省略) WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. Curr Opin Immunol 査読あり 20(2008):211-220.

(11)Tatsumi N, Oji Y, Tsuboi A, (15名省略) Wilms' tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors 査読あり 32(2008):701-711.

(12)泉本修一. グリオーマに対する最新の免疫療法; Current orgqn topis: 脳腫瘍—グリオーマ. 癌と化学療法 査読あり 35(2008):926-930.

(13)Hashiba T, Izumoto S, Kagawa N, (4名省略) Expression of WT1 protein and correlation with cellular proliferation in glial tumors. Neurol Med Chir (Tokyo) 査読あり 47(2007):165-170.

(14)Morita S, Otsuki M, Izumoto S, (3名省略) Reduced epinephrine reserve in response to insulin-induced hypoglycemia

in patients with pituitary adenoma. Eur J Endocrinol 査読あり 157(2007):265-270.

(15)Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, (15名省略) Identification and characterization of a WT1 (Wilms Tumor Gene) protein-derived HLA-DRB1\*0405-restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. J Immunother 査読あり 30(2007):282-293.

(16)Hosen N, Shirakata T, Tsuboi A (7名省略) The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. Leukemia 査読あり 21(2007):1783-1791.

(17)Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, (11名省略) Clinical and immunologic responses to very low-dose vaccination with WT1 peptide (5 microg/body) in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. Int J Hematol 査読あり 85(2007):426-429.

(18)Iiyama T, Udaka K, Tsuboi A (10名省略) WT1 (Wilms' tumor 1) peptide immunotherapy for renal cell carcinoma. Microbiol Immunol 査読あり 51(2007):519-530.

(19)Oka Y, Tsuboi A, Elisseeva OA, (9名省略) WT1 peptide cancer vaccine for patients with hematopoietic malignancies and solid cancers. Scientific World Journal 査読あり 29(2007):649-665.

(20)Tsuboi A, Oka Y, Nakajima H, (18名省略) Wilms tumor gene WT1 peptide-based immunotherapy induced a minimal response in a patient with advanced therapy resistant multiple myeloma. Int J Hematol 査読あり 86(2007):414-417.

(21) 泉本修一、吉峰俊樹：悪性グリオーマの標準治療。脳神経外科速報 査読あり  
17(2007):66-73.

(22) 泉本修一、吉峰俊樹。悪性グリオーマの標準治療と新しい治療。Neuro-oncology の進歩 査読あり 26(2007):27-33.

(23) 泉本修一。悪性グリオーマにおける WT1 発現解析に基づいた至適 WT1 ペプチド免疫療法の検討。がん治療のあゆみ 査読なし  
26(2007):1-8.

〔学会発表〕(計 12 件)

(1) 泉本修一。悪性リンパ腫に対する HD-MTX 療法の長期治療成績と問題点—多施設共同臨床研究から。第 26 回日本脳腫瘍学会。平成 20 年 12 月 1 日 松山

(2) 橋本直哉。再発悪性神経膠腫に対する WT1 ペプチドワクチン療法—臨床第 2 相試験。第 67 回日本癌学会学術総会。平成 20 年 10 月 28 日 名古屋

(3) 泉本修一。前頭蓋窩巨大髄膜腫の摘出と前頭葉症候群の改善。第 67 回日本脳神経外科学会学術総会。平成 20 年 10 月 2 日 盛岡

(4) 泉本修一。悪性グリオーマの免疫療法—これまでの流れと最新の治療—脳腫瘍レビュー’08。平成 20 年 6 月 14 日 東京

(5) Izumoto S. WT1 (Wilms tumor gene) peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma. 17th Conference of Brain Tumor Research and Therapy. 平成 20 年 6 月 11 日 函館・日本

(6) 泉本修一。悪性神経膠腫における WT1 タンパクの発現とその免疫応答。第 25 回日本脳腫瘍学会。平成 19 年 12 月 10 日 東京

(7) Izumoto S. Phase II clinical trial of WT1 (Wilms tumor gene) peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma. 5th Asian Society for Neuro-Oncology. 平成 19 年 11 月 3 日 イスタンブール・トルコ

(8) 泉本修一。悪性神経膠腫における WT1 タンパクの発現とその免疫応答。第 45 回日本癌治療学会。平成 19 年 10 月 24 日 京都

(9) Izumoto S. Phase II clinical trial of WT1 (Wilms tumor gene) peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma. 3rd International Conference on WT1 in Human Neoplasia 平成 19 年 10 月 23 日 ベルリン・ドイツ

(10) 泉本修一。Low grade glioma の長期治療成績と遅発性後遺症からみた治療方針の検討。第 66 回日本脳神経外科学会総会。平成 19 年 10 月 3 日 東京

(11) 泉本修一。悪性神経膠腫に対する WT1 免疫応答の検討。第 8 回日本分子脳神経外科学会。平成 19 年 9 月 1 日 兵庫

(12) 千葉泰良。悪性神経膠腫に対する WT1 ペプチドワクチン免疫療法の治療効果に影響を及ぼす因子。第 9 回日本分子脳神経外科学会。平成 20 年 8 月 30 日 京都

〔図書〕(計 1 件)

泉本修一 (黒岩敏彦編)：WT1 ペプチドを標的とした膠芽腫に対する免疫療法。脳腫瘍の外科、合併症のない脳腫瘍の治療の外科を目指して、231-236、メディカ出版、2007

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

泉本 修一 (IZUMOTO SHUICHI)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40324769

### (2) 研究分担者

橋本 直哉 (HASHIMOTO NAOYA)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90315945

貴島 晴彦 (KISHIMA HARUHIKO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10332743

坪井 昭博 (TSUBOI AKIHIRO)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授  
研究者番号：10372608