

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18390

研究課題名(和文) 小児悪性脳腫瘍に対するWT1ペプチドワクチンを中心とした複合免疫療法の検証

研究課題名(英文) The study of combination immunotherapy of Wilms' Tumor 1 (WT1) peptide vaccine in pediatric brain tumor

研究代表者

横田 千里 (Yokota, Chisato)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10771909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍である膠芽腫に対して、がんワクチン療法の一つであるWT1ペプチドワクチン療法と、免疫チェックポイント阻害療法の一つである抗PD-1抗体療法の併用療法を行い、その有効性と各治療が腫瘍内免疫細胞に及ぼす効果について解析を行った。結果、併用療法は各単独治療より有意に生存期間を延長した。また、WT1ペプチドワクチンは腫瘍を特異的に攻撃する免疫細胞を腫瘍内に増加させる効果を認め、一方、抗PD-1抗体は細胞障害性T細胞の不活化抑制効果を認めた。これらの治療は、一般に抗腫瘍免疫サイクルと呼ばれる一連のがん免疫応答のうち異なる機序に作用しており、併用することで相乗的な効果増強を得られることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、膠芽腫に対するWT1ペプチドワクチンと抗PD-1抗体の併用の有効性について初めて報告し、またこれらの治療が腫瘍内免疫環境に及ぼす効果の一端を明らかにした。膠芽腫は現在まで有効な根治治療がなく、既存の治療では十分な治療効果が得られていないため、複合免疫療法は今後膠芽腫の治療の膠芽腫の新たな治療法を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We established a mouse glioblastoma model in which tumor cells doubly expressed WT1 and PD-L1, and tumor infiltrating immune cells was analyzed in each therapy. We found that WT1 vaccine and anti PD-1 antibody therapies work in the different steps of Cancer-Immunity Cycle, and that their combination could work synergistically against glioblastoma. We clearly demonstrated the distinct difference mechanism in intratumoral immunity between cancer vaccine and immune checkpoint inhibitor under the same condition. Our results could provide us with the clear evidence for the combination of immunotherapies, and therefore the manuscript will be cited for future attempts of the combination immunotherapy.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：がんペプチドワクチン WT1 膠芽腫 免疫チェックポイント PD-1 複合免疫療法

1. 研究開始当初の背景

わが国において小児脳腫瘍は小児がん全体の 20-25%を占め、頻度は白血病に次ぐ 2 位、死亡率は 1 位と小児の死亡原因として重要な位置を占めている。特に、悪性とされる WHO グレード 3 以上の神経膠腫(グリオーマ) 上衣腫、非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍(AT/RT) その他胎児性腫瘍については 1 年生存率 50%以下と予後不良である上、若年ゆえ放射線治療ができない症例や、放射線や化学療法など治療による有害事象や晩期合併症も問題となる。

現在、悪性神経膠腫に対する新しい治療法として免疫療法の開発が進んでおり、現在海外でも様々ながん抗原に対するペプチドワクチンを使った治験が行われている。その中でも WT1 は最も有望ながん抗原と考えられ注目されている¹⁾。我々の研究グループでは、これまで成人の再発性及び初発悪性神経膠腫に対して WT1 蛋白を標的とした WT1 療法を行い、その安全性と有効性を報告してきた^{2) 3)}。加えて、成人の WT1 療法前後における腫瘍組織を免疫組織学的に比較解析した結果、従来報告されてきた神経膠腫の初発・再発時の組織比較の結果と異なり、様々な免疫逃避反応が治療反応性かつ複合的に起こっていることを明らかにした。この結果より、従来の WT1 療法に免疫チェックポイント阻害剤をはじめ他の治療を組み合わせる複合免疫療法の有効性が示唆された。

近年、組織学的には同じ神経膠腫であっても、成人と小児では異なった遺伝子プロファイルをもつことが明らかになり、成人と小児の神経膠腫では異なった生物学的性質を持つことが示唆された。故に小児悪性神経膠腫に関しては成人とは分けて治療効果を基礎的、また臨床的に再検証する必要があると考えられた。

これまで臨床検体の免疫学的解析は成人悪性神経膠腫を中心に行われてきており、小児脳腫瘍組織において免疫学的にどのような変化が起こっているか報告は少ない。加えて、小児悪性脳腫瘍に対する複合免疫療法の有効性は臨床的にも動物モデルにおいても検証されていなかった。しかし神経膠腫以外的小児悪性脳腫瘍についても、我々の研究からは後述するように腫瘍細胞が比較的高率に WT1 蛋白を発現しており、WT1 療法を中心とした複合免疫療法は有効な治療がない他の小児悪性脳腫瘍にも適応拡大が可能ではないかと考えられた。

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

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍に対する Wilms tumor 1 (WT1) 抗原を標的とした WT1 ペプチドワクチン療法(以下 WT1 療法)に加えて免疫チェックポイント阻害剤などを併用する複合免疫療法(以下 WT1 複合免疫療法)について、臨床検体および動物モデルを用いた基礎研究を実施し、その有効性と安全性を検証する。第一に既存の臨床検体を免疫学的に解析することにより、悪性脳腫瘍の臨床検体における免疫応答を解析する。さらに動物モデルを用いて悪性脳腫瘍に対する複合免疫療法の安全性及び有効性を検討することにより、WT1 複合免疫療法の臨床試験に向けての基礎的背景を構築し、適応拡大の可能性を探索する。

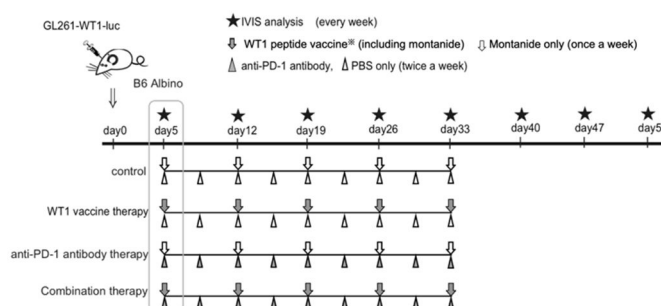
3. 研究の方法

(1) 脳腫瘍動物モデル(同系がん移植モデル)の作成

遺伝子組み換えによりマウスグリオーマ細胞である GL261 細胞に WT1 とルシフェラーゼ遺伝子を導入し、WT1 および PD-L1 を共発現していることを確認した。この GL261-WT1-luc 細胞を B6 Albino マウスの脳に移植し脳腫瘍モデルを作成した。

(2) WT1 ワクチン + 抗 PD-1 抗体併用療法の有効性の評価

GL261-WT1-luc 細胞をマウス脳内に移植後、Day5 に IVIS で腫瘍発光を測定し、腫瘍の生着を確認した上で抗 PD-1 抗体および WT1 ワクチン投与をそれぞれ単独治療群、併用療法群、コントロール群に分けて治療開始した。WT1 ワクチン療法群において、WT1 ワクチンは週 WT1 ヘルパーペプチドお



よび WT1 キラーペプチドの混合ワクチンを週 1 回皮下投与し、抗 PD-1 抗体療法群には抗 PD-1 抗体を週 2 回、腹腔内投与した。併用群は各単独治療群を組み合わせ同様に治療を行った。比較対象として、ワクチンを投与しないマウスにはモンタナイド (WT1 ワクチン アジュバント) のみを週 1 回、抗 PD-1 抗体を投与しないマウスには溶解液の PBS のみを週 2 回投与した。

これらの治療は IVIS 観察を週 1 回実施しながら day33 まで継続し、腫瘍体積の推移は IVIS イメージングシステムを用いて週 1 回追跡した。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 抗体群に分けて生存率を測定した。

(3) WT1 ワクチン療法、抗 PD-1 抗体療法および併用療法による腫瘍内免疫応答の測定

腫瘍移植後、Day19-33 の期間内で IVIS 測定を行い、腫瘍が目視できる大きさの閾値を超えた個体のみを選択して解析を行った。腫瘍を移植した半球ごと摘出した上で、細胞を dissociation し、CD45 で positive selection を行った。selection 後の細胞液は、腫瘍内免疫細胞 (Tumor infiltration immune cells; TIIs) としてフローサイトメトリで解析を行った。

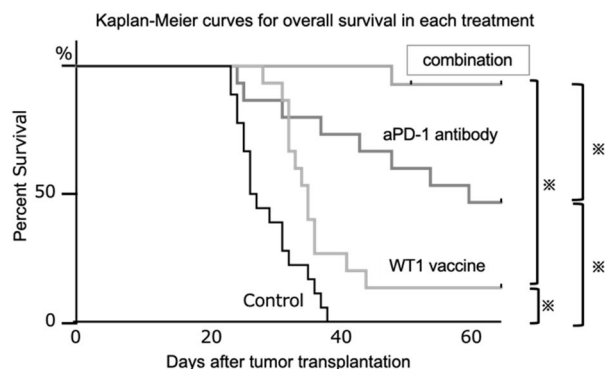
4. 研究成果

(1) 脳腫瘍動物モデル (同系がん移植モデル) の作成

WT1 を安定して発現し、同時に PD-L1 およびホタルルシフェラーゼを共発現するマウスグリオーマ細胞株を樹立し、これを視床に定位的に移植した。移植した腫瘍細胞は脳内で腫瘍塊を形成し、WT1 ペプチドワクチンおよび抗 PD-1 抗体、またその併用により腫瘍の退縮がみられた。

(2) WT1 ワクチン + 抗 PD-1 抗体併用療法の有効性の評価

各治療群における生存期間の中央値は、コントロールマウスが 27.5 日、WT1 ワクチン投与マウスが 36.0 日、抗 PD-1 抗体投与マウスが、61.0 日で、WT1 ワクチン療法、抗 PD-1 抗体療法の単独治療は、コントロールと比較して有意に生存期間を延長した ($P < 0.05$)。また WT1 ワクチンと抗 PD-1 抗体の併用療法を行ったマウスは 1 匹を除き全てのマウスが 66 日以上生存し、併用は各単独治療よりも有意に優れた治療効果を示した ($P < 0.01$)。



(3) WT1 ワクチン療法、抗 PD-1 抗体療法および併用療法による腫瘍内免疫応答の測定

発症したマウスの脳組織を採取し、腫瘍内の免疫環境を比較した。WT1 ペプチドワクチンを投与したマウスでは、CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、NK 細胞、WT1 特異的 CD8+ T 細胞および CD4+ T 細胞が腫瘍内に大量に浸潤したが、抗 PD-1 抗体を投与したマウスでは、無治療マウスの TIIs と同程度であった。また抗 PD-1 抗体投与マウスでは、抗 PD-1 抗体が腫瘍浸潤 CD8+ T 細胞表面に検出され、PD-1 分子の発現は腫瘍浸潤 CD8+ T 細胞の大部分で減少した。併用療法群ではこれら単独治療時の免疫状態の双方の特徴を認めており、TIIs の総数の増加に加えて CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞の比率の増加を認め、相乗的な抗腫瘍免疫環境が構築されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokota Chisato, Nakata Jun, Takano Koji, Nakajima Hiroko, Hayashibara Hiromu, Minagawa Hikaru, Chiba Yasuyoshi, Hirayama Ryuichi, Kijima Noriyuki, Kinoshita Manabu, Hashii Yoshiko, Tsuboi Akihiro, Oka Yoshihiro, Oji Yusuke, Kumanogoh Atsushi, Sugiyama Haruo, Kagawa Naoki, Kishima Haruhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Distinct difference in tumor-infiltrating immune cells between Wilms' tumor gene 1 peptide vaccine and anti-programmed cell death-1 antibody therapies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdab091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Chisato, Kagawa Naoki, Takano Koji, Chiba Yasuyoshi, Kinoshita Manabu, Kijima Noriyuki, Oji Yusuke, Oka Yoshihiro, Sugiyama Haruo, Tsuboi Akihiro, Izumoto Shuichi, Kishima Haruhiko, Hashimoto Naoya	4. 巻 71
2. 論文標題 Maintenance of WT1 expression in tumor cells is associated with a good prognosis in malignant glioma patients treated with WT1 peptide vaccine immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 189 ~ 201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-02954-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Chisato, Kagawa Naoki, Bamba Yohei, Tazuke Yuko, Kitabatake Yasuji, Nakagawa Tomoyoshi, Hirayama Ryuichi, Okuyama Hiroomi, Kishima Haruhiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Successful neurosurgical separation of conjoined spinal cords in pygopus twins: illustrative cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/CASE218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林原弘武
2. 発表標題 マウス神経腫瘍モデルにおけるWT1ワクチン療法と抗PD-1抗体療法の併用による抗腫瘍効果の増強
3. 学会等名 日本がん免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田千里、高野浩司、中田潤、皆川光、中島博子、林原 弘武、磯川和希、中川智義、平山龍一、木嶋教行、木下学、香川尚己、貴島晴彦
2. 発表標題 マウスグリオーマモデルに対するWT1ペプチドワクチン・抗PD-1抗体併用療法の検討
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横田千里、高野浩司、中田潤、皆川光、中島博子、林原 弘武、磯川和希、中川智義、平山龍一、木嶋教行、木下学、香川尚己、貴島晴彦
2. 発表標題 マウスグリオーマモデルに対するWT1ペプチドワクチン・抗PD-1抗体併用療法の検討
3. 学会等名 一般社団法人日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中田 潤 (Nakata jun)		
研究協力者	中島 博子 (Nakajima Hiroko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------