

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791597

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍WT1免疫療法でのin vivoイメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of the in vivo imaging technology in WT1 peptide vaccination for malignant brain tumor.

研究代表者

千葉 泰良 (Chiba, Yasuyoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90533795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再発悪性グリオーマに対するWT1ペプチドワクチン療法の適切な画像評価法の開発を行った。通常、脳腫瘍の治療効果判定は造影MRIで行うことが多いが、本研究にて、造影MRIでの評価は生存期間を反映しないこと、メチオニンPETを用いた集積値や体積評価は比較的生存期間を反映することが判明した。最も生存期間を反映した評価法は、治療前後のメチオニンPET画像を融合し、各voxel(1mm³)ごとに集積値の変化を表したparametric response map (PRM)を用いた評価法であった。

研究成果の概要(英文)：We developed the suitable imaging evaluation method for WT1 peptide vaccination for recurrent malignant gliomas. Usually, it is although the treatment evaluation for a brain tumor is performed by MRI in many cases, it became clear that the evaluation by MRI does not reflect survival time and that the accumulation value and volume evaluation using the methionine-PET reflected survival time comparatively by this research. The appraisal method which reflected survival time most was a method using parametric response map (PRM) which united the methionine PET before and after WT1 peptide vaccination, and expressed change of the accumulation value to each voxel (1 mm³).

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 WT1 免疫療法 癌ワクチン 腫瘍浸潤リンパ球 in vivoイメージング メチオニンPET GFPマウス

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは Wilms' tumor 1 (WT1)が多くの悪性腫瘍で高発現しており、ワクチン療法の標的抗原になることから、WT1 ペプチドワクチン療法の第 Ⅰ 相試験を行い、十分な安全性と有効性があることを明らかにした。再発悪性グリオーマに対しても臨床試験を行っており、安全性と有効性を発表してきた。症例を積み重ねるに従い、効果的な症例がある一方で効果が不十分な症例もみられ、そのような症例には早期に WT1 ペプチドワクチン療法を中止し、他の治療法に移行する必要がある。その有効性の判定には造影 MRI から計測した腫瘍サイズの変化を用いてきたが、免疫療法では効果があっても腫瘍サイズの縮小までに時間がかかること、一時的な腫瘍増大が見られることがあることなどから、造影 MRI を用いた評価法で判定することは難しいと考えていた。メチオニン PET は保険適応になっていない検査であるが、神経細胞があまり取り込まないアミノ酸を用いた細胞の代謝活性を測定する方法である。血液脳関門の破綻を見ているに過ぎない造影 MRI と異なり、細胞そのものの活性を測定できるため、脳腫瘍の活動性や治療効果の判定に有効であるとされる。そのメチオニン PET を用いて WT1 ペプチドワクチン療法の治療効果を初期の段階で評価することは出来ないかと考えた。

また、WT1 ペプチドワクチン療法において、実際のその脳腫瘍組織内で実際にどのような免疫反応が起こっているのかについては不明な点が多い。In vitro では WT1 特異的 CTL が WT1 過剰発現腫瘍細胞を攻撃することが確認されているものの、生体内での確認は難しい。特に脳内での出来事を確認する古語は非常に難しくほとんど行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

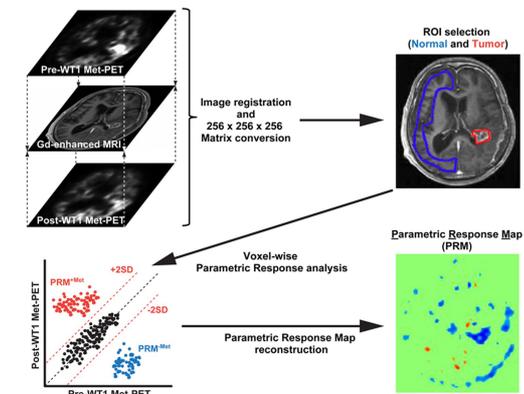
本研究の目的は、WT1 ペプチドワクチン療法の治療効果判定として、造影 MRI に代わる新たな手段を開発することであった。具体的には、メチオニン PET から得られた集積値、体積などのデータを解析して最も WT1 ペプチドワクチン療法の治療効果を早期に判定することの出来る手段を開発することである。

また、脳腫瘍組織内で起こっている免疫反応を外より観察する手段を動物実験にて開発することである。

3. 研究の方法

本研究では、再発悪性グリオーマに対する WT1 ペプチドワクチン療法の第 Ⅰ 相試験に登録された患者に対して、WT1 免疫療法施行前と 12 週間施行後に MRI および MET を撮影した。造影 MRI を用いた造影領域の最長径、造影領域の体積、MET を用いた集積値(T/N比)の最大値、集積値の平均値、T/N比が 1.3 以上の腫瘍領域の体積を比較し、また、治療前後の MET を融合して各 voxel ごとに集積値の変化を解析して parametric response map (PRM)を作成した上で、集積が増大した領域の割合、集積が減少した領域の割合を解析する(図 4)。各患者の PFS、OS を比較を行い、ど

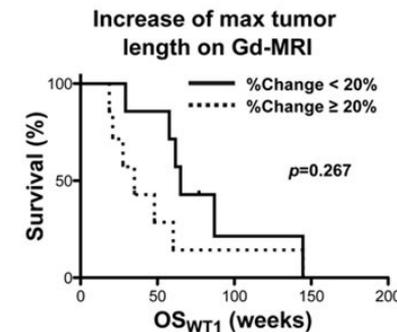
の解析法が最も治療効果と相関を示すかを解析した。



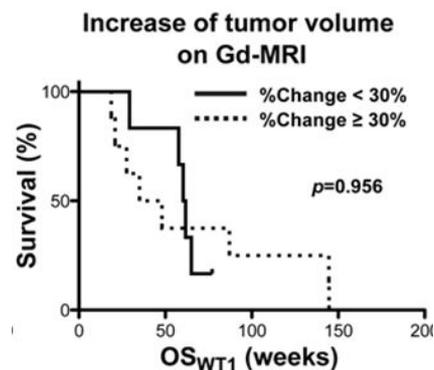
動物実験では、C57BL/6 マウスに GL261 (マウスグリオーマ細胞株) および、WT1 過剰発現 GL261 を移植した担脳腫瘍マウスモデルを作成した。そのマウスに WT1 ペプチドワクチン療法を施行して生存曲線を描いて無治療群と被殻を行った。また、治療群と無治療群の組織を病理学的に比較検討を行った。さらに、in vivo imaging を行うために、GFP マウスから得られた骨髄を移植された GFP キメラマウスの作成を行った。

4. 研究成果

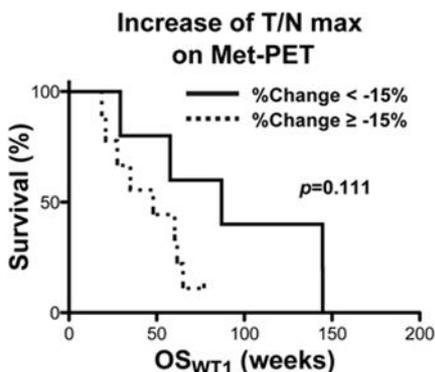
WT1 ペプチドワクチン療法の治療効果判定として、造影 MRI から計測した腫瘍最長径の変化は実際の生存期間とほとんど関連が見られなかった。



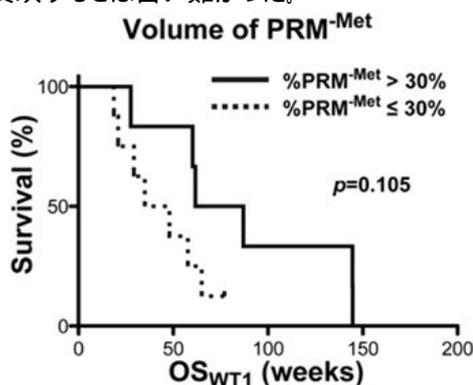
また、造影 MRI から計測した腫瘍体積の変化も実際の生存期間とほとんど関連が見られなかった。すなわち、造影 MRI は WT1 ペプチドワクチン療法の評価としては不適切であるとか判断された。



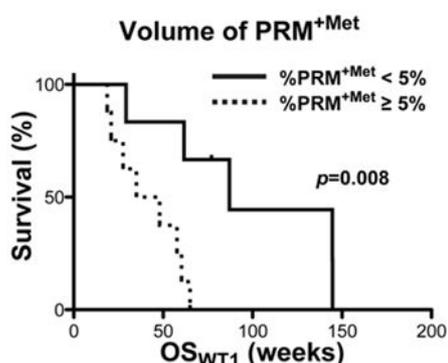
次に、メチオニン PET を用いた、集積値(T/N比)の最大値、集積値の平均値、T/N比が1.3以上の腫瘍領域の体積を測定して生存期間と比較した。その結果、造影 MRI での結果よりは生存期間を反映したものの充分とは言い難かった。



次に、PRM を解析し、メチオニン PET の集積値が減少した領域の割合がどのように変化したかと生存期間との関連を検討した。その結果、ある程度関連は見られたものの十分に治療効果を反映するとは言い難かった。



最後に、PRM を解析し、メチオニン PET の集積値が増加した領域の割合がどのように変化したかと生存期間との関連を検討した。その結果、これらの解析の中で最も生存期間との関連性が強く、増加した領域が 5%以上か 5%未満かで群に分けると有意に生存期間に差が出た (p=0.008)。



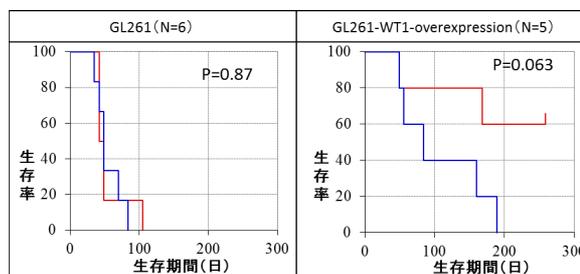
今回の研究では、造影 MRI で計測した腫瘍の長径と体積は WT1 療法開始からの生存期間と関連を示さなかったが、このことは、造影 MRI は WT1 免疫療法の臨床反応を評価するのに適し

ていないことを示している。化学療法や放射線療法と異なり、免疫療法は腫瘍内部の炎症反応によって腫瘍細胞を死滅させる。したがって造影効果が、腫瘍の活動性ではなく免疫反応を反映している可能性がある。一方、メチオニン PET は腫瘍の代謝活性度合いを見ることが出来る。過去の研究では、メチオニン PET の T/N max は予後と相関することを示しているものもある。しかし、グリオーマはもともと不均一な組織で、メチオニン集積も不均一である。したがって、腫瘍内のメチオニン集積の全体的な変化を解明するためには、腫瘍内の異なった部分を比較していることになる T/N max の解析よりも、解剖学的に同一である各 voxel の変化を解析することがよりふさわしいと考えられた。この要求を満たすために、voxel 単位での PRM 解析を今回の研究で用いた。この手法を用いた解析は、メチオニン PET における T/N max の変化よりも WT1 ペプチドワクチン療法開始からの生存期間と深い関連を認めたと。このことは、voxel 単位での PRM 解析がグリオーマに対する WT1 ペプチドワクチン療法の効果を評価するのに最もふさわしい手法であることを示している。さらに、解析患者数は少ないものの、PRM+Met 領域の割合が 5%以上かどうか、WT1 療法の最も良い予後予測因子となると考えられた。

動物実験では、まず GL261 または WT1 過剰発現 GL261 を皮下に移植して、WT1 ペプチドワクチン療法またはアジュバントのみの治療の 2 群に分けて生存曲線を描いた。



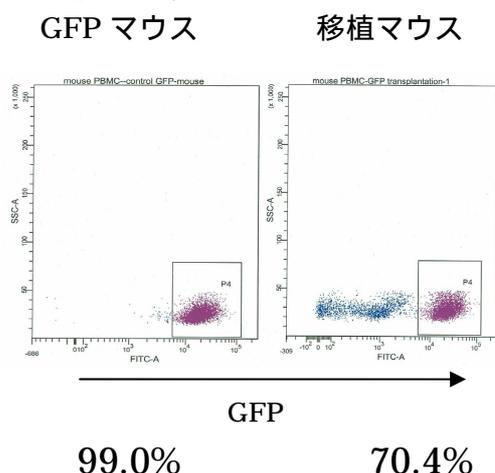
その結果、GL261 移植群では、WT1 ペプチドワクチン療法を行おうが行うまいが、生存曲線はほとんど一致したが、WT1 を過剰発現した GL261 を移植すると、WT1 ペプチドワクチン療法を行った群で長期生存する傾向が見られた。



次に WT1 過剰発現 GL261 をマウス脳内に移植し、WT1 ペプチドワクチン療法またはアジュバントのみの治療の 2 群に分けて生存曲線を描いたが、有意な差が得られなかった。この原因は、アジュバントのみの治療でも約半数が生存してしまったことによる。脳内移植は移植細胞数が少ないので皮下移植と比較して排除されやすい傾向にある。WT1 を過剰発現していない GL261 を

脳内に移植すると治療の有無にかかわらずほとんどが生着して腫瘍死することから、WT1 過剰発現細胞は生体の免疫細胞の標的になると考えられる。腫瘍が自然発生する生体内では腫瘍が WT1 の発現を増加させると同時に免疫逃避も行うために腫瘍は排除されないと考えられるが、移植ではいきなり免疫細胞の攻撃対象となるがん抗原が進入するために攻撃を受けやすいと考えられた。

最後に、GFP マウスの骨髄を移植された GFP キメラマウスの作成については、キメラマウスの末梢血を flow cytometry にて検査すると、約 70% が GFP マウス由来の白血球遠き代わっていることが確認された。



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 2 件)

1. Chiba Y, Kinoshita M, Okita Y, Tsuboi A, Isohashi K, Kagawa N, Fujimoto Y, Oji Y, Oka Y, Shimosegawa E, Morita S, Hatazawa J, Sugiyama H, Hashimoto N, Yoshimine T: Use of (11)C-methionine PET parametric response map for monitoring WT1 immunotherapy response in recurrent malignant glioma. *J Neurosurg* 116(4): 835-842, 2012 DOI: 10.3171/2011.12.JNS111255 査読有
2. Yamamoto F, Hashimoto N, Kagawa N, Okita Y, Chiba Y, Kijima N, Kinoshita M, Yoshizu K, Fujimoto Y, Hirai K, Yoshimine T: A survey of disclosure of diagnosis to patients with glioma in Japan. *Int J Clin Oncol* 16 (3): 230-237, 2011 DOI: 10.1007/s10147-010-0152-8 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. 千葉泰良, WT1 ペプチドワクチン療法にお

ける MRI を用いた画像評価法の検討、第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、2013 年 12 月 9 日、宮崎

2. Yasuyoshi Chiba, Immune escape in human malignant gliomas after WT1 peptide vaccination. SNO 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology. 2013 年 11 月 23 日、San Francisco, USA
3. 千葉泰良, 再発悪性グリオーマに対する WT1 ペプチドワクチン療法後の免疫逃避機構、第 72 回日本脳神経外科学会学術総会、2013 年 10 月 18 日、横浜
4. 千葉泰良, 再発悪性グリオーマに対する WT1 ペプチドワクチン療法後の腫瘍浸潤リンパ球と免疫逃避、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、横浜
5. Yasuyoshi Chiba, Tumor-infiltrating lymphocytes and immune escape in patients with recurrent malignant glioma after WT1 Peptide Vaccination. The 10th Annual Meeting of the Asian Society for Neuro-oncology (ASNO), 2013 年 3 月 23 日、Mumbai, India
6. 千葉泰良, グリオーマにおける 1p19q 共欠失と -internexin 発現との関連、第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会、2012 年 11 月 26 日、広島
7. Yasuyoshi Chiba, Tumor-infiltrating lymphocytes and immune escape in patients with malignant glioma receiving WT1 Peptide Vaccination. The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, 2012 年 11 月 23 日、Kyoto, Japan
8. Yasuyoshi Chiba, Tumor-infiltrating lymphocytes and immune escape in patients with malignant glioma receiving WT1 Peptide Vaccination. SNO 17th Annual Scientific Meeting, 2012 年 11 月 17 日、Washington DC, USA
9. 千葉泰良, WT1 ワクチン療法における画像と免疫学的指標を用いた治療効果評価、第 71 回日本脳神経外科学会学術総会、2012 年 10 月 18 日、大阪
10. 千葉泰良, 11 C-methionine PET を用いた parametric response map による WT1 療法の効果判定、第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、岐阜
11. Yasuyoshi Chiba, Voxel-wise functional 11C-methionine positron emission tomography analysis but not conventional MRI corresponds to treatment response of WT1 immunotherapy for recurrent high-grade glioma. 16th Annual Scientific Meeting of Society for NeuroOncology, 2011 年 11 月 18 日、California, USA

12. 千葉 泰良、悪性グリオーマに対する WT1 ペプチドワクチン療法後の浸潤リンパ球と免疫逃避、第 15 回日本がん免疫学会総会、2011 年 6 月 30 日、大阪
13. 千葉 泰良、再発 GBM に対する WT1 ペプチド療法における HLA class 発現と予後との関連、第 69 回日本脳腫瘍病理学会学術集会、2011 年 5 月 21 日、東京

(図書)(計 件)

(産業財産権)

出願状況(計 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 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

千葉 泰良(CHIBA YASUYOSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号:90533795

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: