

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462257

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対するWT1ペプチドワクチン療法における免疫逃避の克服

研究課題名(英文) Overcoming immune escape in WT1 peptide vaccination for malignant glioma

研究代表者

千葉 泰良 (Chiba, Yasuyoshi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・脳神経外科
・医長

研究者番号：90533795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：当研究課題では、WT1ペプチドワクチン療法における腫瘍細胞の免疫逃避機構をヒト検体、動物実験より解明することを試みた。ヒト検体を用いた研究では、WT1ペプチドワクチン療法が施行されると、腫瘍細胞はWT1やHLA class1の発現を低下させ、TGF β を分泌することで免疫による攻撃から逃れる、あるいは、このような免疫逃避機構を持った腫瘍細胞のみが生き残っている事が示唆された。動物実験では、WT1ペプチドワクチン投与群では腫瘍内にキラーT細胞が浸潤することで抗腫瘍効果を発揮して生存期間が延長し、その効果判定としてメチオニンPETが優れていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this work, we tried to elucidate the mechanism of immune escape of tumor cells in WT1 peptide vaccination from human specimens and animal experiments. In a study using a human specimen, it was suggested that when WT1 peptide vaccination is administered, tumor cells decrease the expression of WT1 and HLA class 1 and secrete TGF β , thereby escape attack by immunity. In the animal experiments, it was found that in the WT1 peptide vaccine group, killer T cells infiltrate into the tumor to exert antitumor effect and the survival time was prolonged, and methionine PET is excellent as a judgment of its effect.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：WT1 peptide vaccine immunotherapy glioma GBM HLA class 1 PD-1 PD-L1

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 1 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ることが分かってきた。他の免疫療法でも言われていることであるが、効果不十分な例では、腫瘍細胞が免疫から逃れる免疫逃避機構が働くために免疫療法によって腫瘍細胞を完全に排除できないと考えられる。具体的にはがん抗原や HLA の脱落をはじめ、がん幹細胞の TGF 高産生による Treg 誘導促進、腫瘍組織微小環境によって産生される IL-5, IL-23, TGF によって誘導される IL-17 産生 T 細胞が血管新生促進を介して腫瘍の増殖を促進するなどの機構が提唱されている。

2. 研究の目的

上記のような免疫逃避機構を克服することができれば、WT1 療法をはじめとする免疫療法の効果をさらに高めると期待できる。しかし、免疫逃避機構は多数あり、どの免疫逃避機構が最も免疫療法の効果を減弱させているか分からないし、単一の免疫逃避機構を解除しただけでは効果が低い場合ため複数の免疫逃避機構を同時に解除しなければならない可能性もある。本研究では、実際の患者で起こっている免疫逃避機構をさらに追求するとともに、動物実験でも検証し、悪性グリオーマで最も強く作用している免疫逃避機構を同定し、それを解除する単一あるいは複数の薬剤を見つけ出すことを目的とした。

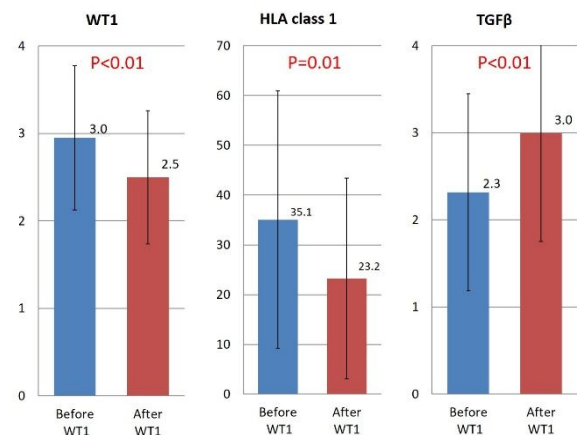
3. 研究の方法

本研究では、悪性グリオーマの免疫逃避機構を解明するために、WT1 療法を実際に施行された ヒト検体を用いた研究と、悪性脳腫瘍を持ったマウスモデルを用いた研究を行った。ヒト検体を用いた研究では、まず、WT1 ペプチドワクチン療法が施行されたのちに、治療目的で腫瘍摘出術が施行された 20 症例(ほとんどの症例が治療無効例)について腫瘍組織が WT1 ペプチドワクチン療法施行前の腫瘍組織とどのように変化しているのかを検討した。動物実験に関しては、マウスグリオーマ細胞株 (GL261 WT1 過剰発現株) をマウス脳内に移植し、Day10 に MRI 撮影を行った。MRI にて腫瘍が生着したマウスを選別し、ワクチン群とコントロール群とに分けた。ワクチン群では Day12 より週に 1 回、WT1 ペプチドワクチンを皮内に投与して Day50 まで経過観察を行った。経過中にも MRI 撮影を経時的に行って腫瘍体積の変化、また、メチオニン-PET や TSPO (Translocator Protein) -PET を撮影して集積の変化を確認すると共に、生存期間の検討、また、一部の

個体では脳腫瘍を採取して免疫組織学的検討も行った。

4. 研究成果

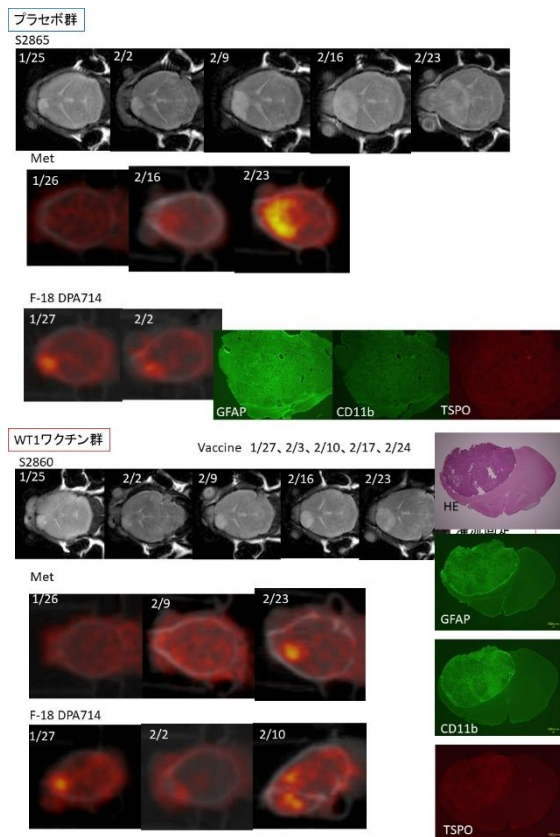
ヒト検体を用いた研究では、腫瘍組織内に浸潤しているリンパ球の数や組成については明らかな変化を認めなかったが、WT1 タンパクの発現、HLA class1 陽性細胞の割合が有意に低下しており、また、腫瘍組織内における TGF が有意に増加していることが確認された。これら 20 症例のほとんどが無効症例であったことを考慮すると、この結果は、腫瘍細胞が免疫から逃避すべく変化した結果を示していると言える。すなわち、WT1 ペプチドワクチン療法を施行すると、腫瘍細胞が WT1 や HLA class1 の発現を低下させ、TGF を分泌することで免疫による攻撃から逃れる、あるいは、このような免疫逃避機構を持った腫瘍細胞のみが生き残っていると考えられる。



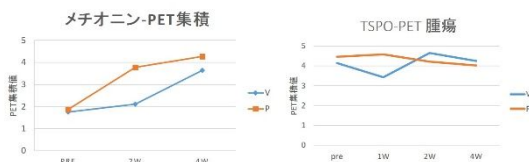
また近年、オプジーボ(一般名:ニボルマブ、抗 PD-1 抗体)を用いた腫瘍免疫療法が認可され、PD-1, PD-L1 を介した免疫逃避機構が注目を浴びている。そこで、当初予定していた TGF などの免疫抑制因子以外に、WT1 ペプチドワクチン療法における PD-1, PD-L1 の役割を解析しようと考えた。まずは予備実験として WT-1 非治療の再発・初発の悪性グリオーマ検体切片に対して PD-1, PD-L1, CTLA-4, MDSC, IDO 染色を行い、PD-1, PD-L1, CTLA-4 については全 15 症例において PD-1 positive: 5/15、PD-L1 positive : 3/15、CTLA-4 positive: 4/15 という結果となった。PD-1, PD-L1 に関しては、これまでの論文報告と比較しても陽性率は同程度であり、免疫染色の信頼性は十分であると判断した。そこで、今後、WT1 ペプチドワクチン療法が施行された患者から採取された検体を用いて PD-1, PD-L1, CTLA-4, MDSC, IDO 染色を施行する予定である。

動物実験に関しては、まずその基礎実験として、我々が用いているマウスグリオーマ細胞株 (GL261 WT1 過剰発現株) が、確実に WT1 タンパクを過剰に発現していることをウェスタンにて確認し、また、MHC class1 が発現していることを FACS にて確認した。また、WT1 tetramer を用いて、WT1 ペプチドワクチ

ンの投与にてマウスに WT1 特異的 CTL が出現すること、killing assay にて CTL が実際にマウスグリオーマ細胞株を攻撃することを証明した。それらの基礎実験を踏まえて、マウスグリオーマモデルに WT1 ペプチドワクチンを投与してその経過を MRI やメチオニン PET を用いて経時的に観察を行った。その結果、腫瘍移植 10 日目に MRI にて腫瘍の生着を確認、それを 2 群に分けて経過を見るという方法が最も良い結果を生むであろう事が確認できた。それらの基礎実験の結果を踏まえて WT1 ペプチドワクチン投与による効果を検討すると、ワクチン投与群で生存期間の優位な延長を認めた ($p=0.028$) が、MRI 上は、全例で腫瘍が増大した。メチオニン-PET においても、腫瘍の増大に伴って両群とも集積が増大したが、ワクチン群においては、プラセボ群と比較して集積値の上昇が緩徐であった。



また、TSP0-PET による解析では両群間で明らかな差は見られなかった。以上より、WT1 ペプチドワクチン療法の効果判定にはメチオニン PET が優れていることが判明した。



免疫学的検討では、ワクチン群において腫瘍内に浸潤した CD3+CD8+細胞の有意な増加を認めた ($p=0.006$)、さらに両群で PD-L1, IDO などの免疫逃避機構に参与する分子の発現

が確認された。以上の結果から、担脳腫瘍マウスモデルにおいて、WT1 ワクチンの投与は生存期間の延長に寄与することが証明された。その理由として腫瘍内にキラーT細胞が浸潤して抗腫瘍効果を発揮するものと思われるが、マクロファージやミクログリアなどの免疫細胞のレーザーである TSP0 の集積に変わりがなく、両群間にマクロファージやミクログリアの集積が変化しない可能性が示唆された。PD-L1, IDO などの免疫逃避機構に参与する分子の発現が両群共に認められることと関連している可能性が示唆された。

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 13 件)

1. Kinoshita M, Sakai M, Arita H, Shofuda T, Chiba Y, Kagawa N, Watanabe Y, Hashimoto N, Fujimoto Y, Yoshimine T, Nakanishi K, Kanemura Y: Introduction of High Throughput Magnetic Resonance T2-Weighted Image Texture Analysis for WHO Grade 2 and 3 Gliomas. PLoS One. 2016 Oct 7;11(10):e0164268. doi: 10.1371/journal.pone.0164268. 査読有
2. Nakata J, Nakae Y, Kawakami M, Morimoto S, Motooka D, Hosen N, Fujiki F, Nakajima H, Hasegawa K, Nishida S, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: Wilms tumour 1 peptide vaccine as a cure-oriented post-chemotherapy strategy for patients with acute myeloid leukaemia at high risk of relapse. Br J Haematol. 2017 May 23. doi: 10.1111/bjh.14768. 査読有
3. Hosen N, Maeda T, Hashii Y, Tsuboi A, Nishida S, Nakata J, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H: Wilms tumor 1 peptide vaccination after hematopoietic stem cell transplant in leukemia patients. Stem Cell Investig. 2016 Dec 9;3:90. doi: 10.21037/sci.2016.11.08. eCollection 2016. 査読有
4. Oji Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Murakami Y, Iwai M, Kagawa N, Chiba Y, Izumoto S, Elisseeva O, Ichinohasama R, Sakamoto J, Morita S, Nakajima H, Takashima S, Nakae Y, Nakata J, Kawakami M, Nishida S, Hosen N, Fujiki F, Morimoto S, Adachi M, Iwamoto M, Oka Y, Yoshimine T, Sugiyama H: Association of WT1 IgG antibody against WT1 peptide with prolonged survival in glioblastoma multiforme patients vaccinated with WT1 peptide. Int J Cancer. 2016 Sep 15;139(6):1391-401. doi: 10.1002/ijc.30182. 査読有

5. Kondo K, Fujiki F, Nakajima H, Yatsukawa E, Morimoto S, Tatsumi N, Nishida S, Nakata J, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H: An Essential Role of the Avidity of T-Cell Receptor in Differentiation of Self-Antigen-reactive CD8+ T Cells. *J Immunother.* 2016 Apr;39(3):127-39. doi: 10.1097/CJI.000000000000114. 査読有
 6. Nakae Y, Oka Y, Fujiki F, Morimoto S, Kamiya T, Takashima S, Nakata J, Nishida S, Nakajima H, Hosen N, Tsuboi A, Kyo T, Oji Y, Mizuguchi K, Kumanogoh A, Sugiyama H: Two distinct effector memory cell populations of WT1 (Wilms' tumor gene 1)-specific cytotoxic T lymphocytes in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 Jul;64(7):791-804. doi: 10.1007/s00262-015-1683-7. 査読有
 7. Hashimoto N, Tsuboi A, Kagawa N, Chiba Y, Izumoto S, Kinoshita M, Kijima N, Oka Y, Morimoto S, Nakajima H, Morita S, Sakamoto J, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Arita N, Yoshimine T, Sugiyama H: Wilms tumor 1 peptide vaccination combined with temozolomide against newly diagnosed glioblastoma: safety and impact on immunological response. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 Jun;64(6):707-16. doi: 10.1007/s00262-015-1674-8. 査読有
 8. Katsuhara A, Fujiki F, Aoyama N, Tanii S, Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Nakajima H, Kondo K, Tatsumi N, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Nishida S, Hosen N, Sogo S, Oji Y, Sugiyama H: Transduction of a novel HLA-DRB1*04:05-restricted, WT1-specific TCR gene into human CD4+ T cells confers killing activity against human leukemia cells. *Anticancer Res.* 2015 Mar;35(3):1251-61. 査読有
 9. Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Kinoshita M, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T: Wilms' tumor 1 is involved in tumorigenicity of glioblastoma by regulating cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res.* 2014 Jan;34(1):61-7. 査読有
 10. Nishida S, Koido S, Takeda Y, Homma S, Komita H, Takahara A, Morita S, Ito T, Morimoto S, Hara K, Tsuboi A, Oka Y, Yanagisawa S, Toyama Y, Ikegami M, Kitagawa T, Eguchi H, Wada H, Nagano H, Nakata J, Nakae Y, Hosen N, Oji Y, Tanaka T, Kawase I, Kumanogoh A, Sakamoto J, Doki Y, Mori M, Ohkusa T, Tajiri H, Sugiyama H: Wilms tumor gene (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother.* 2014 Feb-Mar;37(2):105-14. doi: 10.1097/CJI.000000000000020. 査読有
 11. Maeda T, Hosen N, Fukushima K, Tsuboi A, Morimoto S, Matsui T, Sata H, Fujita J, Hasegawa K, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Nakajima H, Fujiki F, Tatsumi N, Kondo T, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kanakura Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: Maintenance of complete remission after allogeneic stem cell transplantation in leukemia patients treated with Wilms tumor 1 peptide vaccine. *Blood Cancer J.* 2013 Aug 2;3:e130. doi: 10.1038/bcj.2013.29. 査読有
 12. Tachino S, Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Morimoto S, Lin YH, Tamanaka T, Kondo K, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: Functional human Th17 clones with WT1-specific helper activity. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 Apr;62(4):801-10. doi: 10.1007/s00262-012-1385-3. 査読有
 13. Lin Y, Fujiki F, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tanii S, Nakajima H, Tatsumi N, Morimoto S, Tamanaka T, Tachino S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: HLA-DPB1*05:01-restricted WT1332-specific TCR-transduced CD4+ T lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a cytotoxicity against leukemia cells. *J Immunother.* 2013 Apr;36(3):159-70. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182873581. 査読有
- [学会発表](計 12 件)
1. 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、2016 年 12 月 4 日、甲府
 2. 高野浩司、千葉泰良、中島博子、福永貴典、福屋章悟、永野大輔、平山龍一、有田英之、香川尚己、橋本直哉、杉山治夫、吉峰俊樹、マウスグリオーマ脳腫瘍モデルを用いた WT1 ペプチドワクチン療法の検討、第 33 回日本脳腫瘍学会、2015 年 12 月 6 日、京都
 3. Tsuboi A, Hashimoto N, Kagawa N, Chiba Y, Kinoshita M, Kijima N, Oka Y,

- Izumoto S, Arita N, Morimoto S, Fujiki F, Nakajima H, Hosen N, Oji Y, Nishida S, Morita S, Sakamoto J, Yoshimine T, Sugiyama H, New challenge of WT1 peptide vaccination for malignant glioma, The 8th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, 2015年11月19日, Kyoto
4. Oji Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Murakami Y, Iwai M, Kagawa N, Chiba Y, WT1 peptide IgG antibody as a predictive marker of WT1 peptide vaccine immunotherapy, The 8th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, 2015年11月19日, Kyoto
 5. Hashimoto N, Tsuboi A, Chiba Y, Hirayama R, Takano K, Kijima N, Oka Y, Kagawa N, Izumoto S, Sugiyama H, Yoshimine T. WT1 peptide vaccination for malignant gliomas as a part of multi-modal therapy. The International Conference on Brain Tumor Research and Therapy2014 (ICBTRT). 2014年7月22日 Lake Tahoe, CA (USA)
 6. Hashimoto N, Tsuboi A, Chiba Y, Oka Y, Morimoto S, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Kagawa N, Oji Y, Yoshimine T, Sugiyama H. Response assessments in WT1 peptide vaccination and long term results of temozolomide therapy. The 7th International Conference on WT1 in human neoplasia. 2014年4月23日 Barcelona (Spain)
 7. 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09日、宮崎
 8. Hashimoto N, Chiba Y, Tsuboi A, Kinoshita M, Hirayama R, Kagawa N, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T. A direct comparison of response assessments in a phase II clinical trial of WT1 peptide vaccination; Macdonald, RECIST and RANO criteria. The 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology in conjunction with the 18th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology (SNO). 2013年11月24日, San Francisco(USA)
 9. 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)
 10. 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、神奈川
11. 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、神奈川
 12. Hashimoto N, Chiba Y, Kijima N, Kinoshita M, Kagawa N, Tsuboi A, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T. WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide. The 15th WFNS World Congress of Neurosurgery (WFNS2013).., 2013年09月12日, Seoul(Korea)

〔図書〕(計1件)

1. Kijima N, Hashimoto N, Chiba Y, Fujimoto Y, Sugiyama H, Yoshimine T: Functional Roles of Wilms' Tumor 1 (WT1) in Malignant Brain Tumors. In: van den Heuvel-Eibrink MM, editor. Wilms Tumor [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2016 Mar. Chapter 15.

〔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)
 地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・脳神経外科・医長
 研究者番号: 90533795

(2) 研究分担者

坪井 昭博 (TSUBOI AKIHIRO)
 大阪大学・医学系研究科・寄付講座教授
 研究者番号: 10372608

橋本 直哉 (HASHIMOTO NAOYA)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研
究院)・教授
研究者番号： 90315945

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

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()