

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860797

研究課題名(和文) 小児悪性神経膠腫再発例に対するWT1カクテルワクチンを用いた免疫療法の開発

研究課題名(英文) Wilms tumor 1 peptide vaccination against relapsed or recurrence glioblastoma: safety and impact on immunological response

研究代表者

齊藤 広幸 (Saitou, Hiroyuki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00723909

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)：これらの当科の研究結果が企業へ技術移管されWT1カクテルワクチンとして小児悪性神経膠腫に対する企業治験が開始された。このため本研究では将来の免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の開発や小児悪性神経膠腫の免疫状態を検討することとした。方法：5例中4例の接種開始後3-6月後の末梢血中の免疫制御因子の発現をフローサイトメトリー法により検討した。結果：リンパ球上のPD-1は2～4%、再発例と寛解例では差異がなかった。全リンパ球中の割合は再発例で高い傾向にあった。このことからWT1ワクチンとこれらの免疫チェックポイント阻害剤の併用療法が期待できる治療法であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Result of our department was transferred to company and it induced the clinical trial by company. So we studied the expression of PD-1 on the lymphocyte of these patients, and the proportion of the regulatory T cells in these patients. We clarified the high expression of PD-1 was found on lymphocytes of patients with relapse. These findings suggested that the immunocombined therapy consisting with WT1 and immunocheckpoint inhibitors is hopeful treatment for these patient with very intractable of brain tumor.

研究分野：小児腫瘍

キーワード：悪性神経膠腫 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

小児悪性脳腫瘍は小児がんにおいて白血病に次いで頻度が高い。なかでも悪性神経膠腫は脳幹原発である脳幹グリオーマと大脳原発である高悪性度グリオーマ(組織学的には神経膠芽腫、退形成性星細胞腫など)がある。全体で小児脳腫瘍の約10%をしめる。これらに対する治療はこの20年間でほとんど向上がみられていない。有害事象がみられないことから成人神経膠芽腫で行われる放射線照射とテモゾロミド内服投与、セカンドラインとしてペバシズマブ投与が一般的に行われている。しかしながら成人ほど有効性が報告されておらず、初発例でさえ生存期間の中央値は12カ月で再発例の6カ月生存率は0%である。このように絶対予後不良な悪性神経膠腫再発例に対しては従来の化学療法や抗体療法は効果が期待できないため第4の治療としてWT1ワクチンを用いた免疫療法の開発が必要と考えられた。WT1キラーペプチドにヘルパーペプチドを加えたカクテルワクチンを開発する。

2. 研究の目的

小児悪性神経膠腫再発例に対するキラーペプチドとヘルパーペプチドからなるWT1カクテルワクチンを用いた免疫療法を開発することである。さらに接種後のWT1特異的免疫反応をモニタリングすることによりよい効果の高い免疫療法の開発につなげることとした。しかしカクテルワクチンを用いた企業治験が2016年4月より開始されることをうけ、自主臨床試験は中止し、キラーペプチド単剤での免疫モニタリング解析をさらにすすめ、免疫チェックポイント阻害剤との併用など免疫複合療法を見据えた研究を開始した。

3. 研究の方法

小児悪性神経膠腫例(脳幹グリオーマ、高悪性度神経膠腫)を対象とする臨床試験を計画し開始する予定であった。計画を練る一方、探索的試験であったキラーペプチド単剤ワクチンの結果が期待できるものであったため、PMDA個別面談をうけ製剤化への道筋を探ることとなった。同時にH26年度後半に企業から製剤化の意向が伝えられ、H27年度に本研究が技術移管されH28年度4月からWT1カクテルワクチンを用いた企業治験が開始された。これをうけて本研究では今後のWT1ペプチドワクチンを用いた免疫療法の開発のためにキラーペプチドワクチンを用いた臨床試験参加症例の5例の解析をおこなうこととした。

4. 研究成果

I. 悪性神経膠腫5例の長期予後の検討をおこなった。MRIをRANO(response assessment in neuro-oncology)評価により再評価をおこなった。

II. 免疫モニタリングとして以下の検討をおこなった。

- 1) WT1 特異的キラーT細胞の検出およびそのフェノタイプの検討
- 2) 末梢血リンパ球上のPD-1の発現および制御性T細胞の割合、特にeffector 制御性T細胞割合

1. 研究成果

I. WT1キラーペプチド単剤投与例は5例であった。症例の詳細と予後は以下のとおりである。

UPN	Age/ Gender	原発部位	転帰	PFS* (m)	OS* (m)
P-11	15/M	GBM 第三脳室	PR	51	51
TTP-20	16/F	GBM 前頭葉	CR	51	51
P-07	10/F	GBM 側頭葉	PD†	5	5
P-12	7/M	DIPG	PR PD†	15	18
P-09	13/M	DIPG	SD PD†	7	8

RANO 評価による再評価

	RANO 評価				
	T1	T2F	ステロイド	最良評価	最終評価
P-11	10%	PR	-	PR	SD
TTP-20	-	CR	-	CR	CR
P-07		PD	増量	PD	PD †
P-12		PD	減量	SD	PD †
P-09		PD	減量	SD	PD †

GBM:glioblastoma multiforme

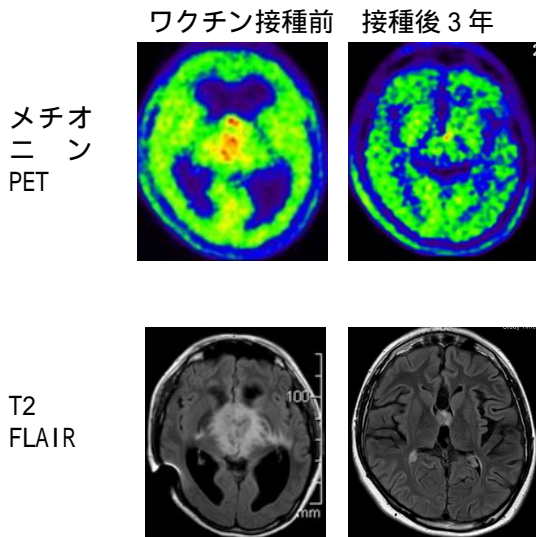
DIPG:diffuse intrinsic pontine glioma

*:再発後時間(月)

GBM3例中2例がPR,CRを得、再発後4年経過している。P-11はMRI上、残存腫瘍を認めるがPET-CTでは取り込みを認めず、腫瘍の活動性は低いと考える。また臨床症状においても意識レベルは来院時低下していたが現在は罹患前と何ら遜色がない。TTP-20はWT1ペプチドワクチン開始後、8週後に局所再発したが手術により摘出後、放射線照射し現在寛解維持し神経学的な異常所見はみられていない。

DIPGの2例では再発後ステロイドの減量が可能となり自立歩行が可能となり登校することができた。最終的には腫瘍の進行により死亡したがQOLの改善が得られた。これらのきわめて少数ではあるが、WT1キラーペプチド単剤での高悪性度神経膠腫に対する長期にわたる有効性が期待できる結果であった。また有害事象は接種部位の皮膚反応のみであり、長期にわたり観察したが重篤な有害事象は認められず安全であることが確認された。これらの当院での探索的研究の結果をうけて本キラーペプチド単剤の試験の結果が技

術移管されヘルパーペプチドを加えたカクテルワクチンの企業治験が計画されることとなり 2016年4月から患者登録がなされている。以下に P-11 の画像所見を添付する。



II 免疫モニタリング

1) WT1 特異的キラーT 細胞とそのフェノタイプを長期に渡り検討した。

		WT1CTL		WT1CTL 中の割合(%)			
		(%/CD8cells)	N	CM	EM	E	
P-11	pre	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	post	0.07	23.7	31.6	26.3	18.4	
TTP-20	pre	0.057	22.6	3.2	45.2	29	
	post	0.052	0	14.3	28.6	57.1	
P-7	pre	0.99	50.7	2.7	13.7	32.9	
	post	0.06	86.7	0	2.4	10.8	
P-12	pre	0.13	6	1.2	21.4	71.4	
	post	0.16	70.2	1.2	0	28.6	

5 例中 4 例で検討をおこなった。WT1 特異的キラー T 細胞を HLA-A*24:02 WT1 (mutant) Tetramer を用いて検出した。またそのフェノタイプを CD45RA+CCR7+:N(Naive), CD45RA-CCR7+;CM (central memory), CD45RA-CCR7-;EM (effector memory), CD45RA+CCR7-;E (effector) に分けて各々 WT1 特異的キラー T 細胞における割合を検討した。P-11 ではワクチン接種前には見られなかった WT1 特異的キラー T 細胞が検出された。また抗腫瘍効果の持続に必要な CM は PD であった p-7 を除き、長期にわたり検出された。このことはこの効果が WT1 特異的キラー T 細胞によるものであることを示している。

2-1) 患者末梢血中の制御性 T 細胞を検討した。制御性 T 細胞は CD45RA+FOXP3lowCD4+ (ナイーブ Treg)、CD45RA-FOXP3highCD4+ (エフェクター Treg)、CD45RA-FOXP3lowCD4+ (non-Treg) がありマルチカラーフローサイトメトリー法を用いて解析した。DIPG の 3 例はワクチン投与後 12 週時、HGG の 2 例は 6 か月時の検体を用いた。また Effector Treg における CCR4 の発現性を検討した。

結果

UPN	Treg			
	total	naïve	effector	non-T
P-11	10.3	1.2	2.6	6.5
TTP-20	13.1	2.8	1	9.3
P-07	ND	ND	ND	ND
P-12	14.4	2.2	3.2	9
P-09	11.1	1.1	2.7	7.3

正常人の末梢血中 Treg は CD4 陽性細胞の約 10%程度とされ、検討した 4 症例とも増加はみられなかった。ナイーブ Treg は正常人では 2%前後であり、増加はみられなかった。エフェクター Treg であるが 2%以下であるのくれば 4 例中 3 例でやや高い傾向がみられた。Non-Treg は正常人では 5%未満で活動時の自己免疫性疾患では 10%程度とされており、やや高い傾向がみられた。WT1 ワクチン接種後の予後とは症例数がすくなく不明である。CCR4 は全例でエフェクター Treg 上に強発現していた。本疾患において、腫瘍発生部位が脳幹であることなどから腫瘍局所の免疫反応を検討することはできなかった。大腸がんや悪性黒色腫では腫瘍局所に存在するがん抗原によりナイーブ Treg が活性化されたエフェクター Treg となるとされ腫瘍局所のエフェクター Treg が増加する。WT1 ワクチン接種後には接種によってナイーブ Treg が活性化し、エフェクター Treg が若干活性化していることを表している可能性がある。

2-2) 末梢血リンパ球上の免疫制御因子である PD-1 の発現を抗 PD-1 抗体を用いてフローサイトメトリー法で解析した。陽性コントロールは IFN- γ で活性化したヒト末梢血を用いた。P-11 と TTP-20 はワクチン接種後 6 か月時、P-12 と P-9 はワクチン接種開始後 3 か月時点の末梢血を用いた。

UPN	PD-1	
	CD4	CD8
P-11	3	8.4
TTP-20	2.3	2.6
P-07	ND	ND
P-12	3.7	4.4
P-09	3.1	5

検出しえた 4 例ではいずれも CD4,CD8 上に PD-1 を検出しえた。これは WT1 ワクチンによって CD4 および CD8T リンパ球が活性化し発現したものと考えられる。

今回、WT1 キラーペプチド単独接種にても WT1 特異的キラーT 細胞が出現し、長期にわたり central memoryT 細胞が維持されていたことが長期寛解に寄与したと考えられる。また末梢血中のエフェクターTreg が若干の増加がみられた。今後、悪性神経膠腫に対する免疫療法は WT1 ワクチンと免疫制御抗体すなわち抗 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) や抗 PD-1 抗体 (ニボルマブ) との併用が期待され、本研究はその開発の礎となると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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 :

出願年月日 :

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

齊藤 広幸 (SAITOU HIROYUKI)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 00723909

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :