

平成30年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09173

研究課題名(和文) WT1ペプチドを用いた難治性胸部悪性腫瘍免疫治療確立を目指した癌免疫動態解析

研究課題名(英文) Analysis of immune response against cancer, which may lead to establishment of WT1 peptide-based immunotherapy for the conventional treatment-resistant malignancies in the respiratory medicine field

研究代表者

岡 芳弘 (OKA, YOSHIHIRO)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：20273691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：WT1ペプチドを用いた難治性胸部悪性腫瘍に対する免疫治療の確立を目指し、癌抗原WT1に対する免疫動態解析を行った。

マウスをWT1ペプチドで免疫することにより誘導されるWT1特異的細胞傷害性Tリンパ球が持つT細胞レセプターの遺伝子クローニングに成功し、我々のマウス実験系の分子基盤が構築された。患者末梢血単核球のSyndecan-4発現量が神経膠芽腫に対するWT1ペプチドワクチン治療の効果予測に有用である可能性を示した。WT1ペプチドワクチン接種はそのペプチド特異的な抗体産生を誘導し得ることを示した。胸腺悪性腫瘍などに対するWT1ペプチドワクチン臨床試験において有望な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Analysis of immune response against cancer, focused on cancer antigen WT1-specific immune response, was performed, aiming at the development of WT1 peptide-based immunotherapy for malignancies including those in the respiratory medicine field.

We succeeded in gene cloning of T cell receptor of mouse WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. This achievement provided the molecular basis for the mouse in vivo experiment system to analyze WT1-specific immunity, which we had established previously. Based on cDNA microarray analysis of blood samples, Syndecan-4 was shown to be a biomarker to predict clinical outcome of patients with glioblastoma multiforme treated by WT1 vaccine. It was shown that WT1 peptide vaccination induces not only WT1-specific cellular immunity but also WT1-specific antibody. Successful results of clinical studies of WT1 peptide vaccine, including those for thymic malignancies, pancreas cancer, and acute myeloid leukemia, were obtained.

研究分野：呼吸器内科学、腫瘍免疫学

キーワード：WT1 ペプチドワクチン 癌抗原 癌免疫療法 胸部悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

難治性の胸部(呼吸器領域)悪性腫瘍に対する治療には、集学的治療が必要である。その集学的治療を構成するひとつが、近年注目されている免疫療法である。我々は、独自に、また、世界に先駆けて、WT1 タンパクが癌抗原であることを見出し、その研究成果を元に、WT1 を標的とした癌免疫療法の開発を推し進めてきた。つまり、種々の悪性腫瘍患者に対してWT1 ペプチドワクチンなどの臨床試験を行ってきた。また、そのベースとなるWT1 に対する免疫応答の解析をマウスモデルやヒトの臨床検体を用いて行ってきた。

2. 研究の目的

WT1 に対する免疫反応を誘起することによりWT1 発現腫瘍を拒絶できる *in vivo* マウス実験系を我々はすでに確立している。また、今までに行ってきたWT1 ペプチドワクチン臨床試験により得られた臨床検体(末梢血単核球[PBMCs]や血清など)を保有している。これらを用いることにより、WT1 をモデルとし、生体における癌抗原に対する免疫動態を解析することを、そして、また、それにより、難治性胸部悪性腫瘍に対する新しい治療法としてのWT1 ペプチドを用いた免疫治療の確立・発展に貢献することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

我々がすでに保有している、WT1 ペプチドワクチン治療による免疫応答や臨床効果を *in vivo* で評価できるマウス実験系をさらに発展させるために、WT1 発現腫瘍に殺細胞効果を示すマウス WT1 特異的 cytotoxic T lymphocytes (CTLs) が有する T cell receptor (TCR) の遺伝子クローニングを行った。B6 マウスを Db 拘束性の WT1-126 で免疫することにより、WT1-126 特異的 CD8 陽性 CTL を樹立した。その CTL から TCR を遺伝子クローニングした。

今までのWT1 ペプチドワクチン臨床試験で集積された臨床検体を、分子生物学的あるいは免疫学的手法などを用いて解析した。

呼吸器内科領域の胸部悪性疾患を含む種々の悪性腫瘍患者にWT1 ペプチドワクチン臨床試験を継続して施行した。

4. 研究成果

WT1-126 ペプチドでB6 マウスを免疫すると、Db 拘束性にWT1 特異的 CTL を誘導することができる。また、その操作により、そのマウスに移植されたWT1 発現腫瘍細胞を拒絶することができる。今回、そのB6 マウス由来のWT1 特異的 CTL が持つ TCR を遺伝子クローニングすることを試み、成功した。この成果により、B6 マウスをWT1 ペプチド(WT1 特異的 CTL 誘導ペプチド)で免疫した時にマウスが移植腫瘍を拒絶する現象の分子基盤が構築された。癌免疫療法で悪性腫瘍患者を治療した時

に、その治療に反応した患者の特徴を同定することは重要なことである。WT1 ペプチドワクチン治療を受けた神経膠芽腫患者(glioblastoma multiforme: GBM)の治療前のPBMCsの遺伝子発現を網羅的に測定し、そして、それらの遺伝子の発現量とそのGBM患者の予後との相関を解析した。その結果、Syndecan-4(SDC-4)の発現の低い患者の方がその発現が高い患者よりも予後が良好であるという結果を得た。これにより、患者PBMCのSDC-4発現量は、GBM患者に対するWT1ペプチドワクチン治療の効果の予測に有用である可能性が示された。この結果は、同じ固形癌である胸部悪性腫瘍にWT1ペプチドワクチン治療を行うに際し、有用な情報を与えるものと考えられる。

WT1 ペプチドワクチンを悪性腫瘍患者に投与するとWT1 特異的 CTL が誘導され腫瘍増殖の抑制につながる。そのWT1 ペプチドワクチンは液性免疫を活性化しWT1 に対する抗体の産生を誘導するかを検証した。この目的のため、WT1 ペプチドワクチン(WT1-235 ペプチド)治療を受けたGBM患者のWT1-235 抗体を測定した。その結果、ワクチン治療前は患者のWT1-235 抗体は検出されなかったが、ワクチン治療後には、50.8%の患者にその抗体が検出された。つまり、WT1-235 ペプチドワクチンは、WT1-235 特異的な液性免疫も誘導することが明らかとなった。また、WT1-235 抗体の産生は、progression-free survival (PFS)ならびに overall survival (OS)と正の相関があった。さらに、WT1-235 抗体の産生とWT1-235 に対する delayed type-hypersensitivity (DTH)反応を組み合わせたものは、これらのワクチン治療を受けるGBM患者のよい予後マーカーとなった。この結果も、胸部悪性腫瘍にWT1 ペプチドワクチン治療を行うに際し、その予後予測などにおいて有用な情報を与える可能性があると考えられる。

前治療に抵抗性の胸腺悪性腫瘍(胸腺癌や浸潤性胸腺腫)に対して行った臨床試験の結果を集計し評価した。WT1 ペプチドワクチン投与後3か月間の評価で、多くの stable disease (SD)の症例が得られた。ワクチン治療開始後に画像検査にて腫瘍の縮小が観察された症例もあった。ワクチン治療開始後に病勢の安定化などがみとめられた場合は3か月以降もワクチン治療を続行し、その結果、長期間のワクチン治療を続行できた症例が存在した。また、ワクチン治療開始後、WT1 特異的な免疫反応の誘導が多くの症例でみとめられ、ワクチン治療による臨床反応誘導の科学的な裏付けが示された。このように、WT1 ペプチドワクチンは胸腺悪性腫瘍の治療に有用であることを強く示唆する結果を得た。

また、胸部・呼吸器内科領域悪性腫瘍のWT1 ペプチドを用いた免疫治療につながる可能性のある成果として、以下の臨床研究

の成果を得た。

膵臓癌は、代表的な難治性固形癌の一つである。手術適応のない膵臓癌患者を「標準治療であるジェムザール(GEM)+WT1ペプチドワクチン」群と「GEM単独投与」群の2群に分けて行ったWT1ペプチドワクチンの第2相臨床試験の結果を集計した。その結果、stage IVの患者において、GEM単独群に比べてワクチン併用群の progression-free survival (PFS)が有意に良好であった。これは、固形癌を治療群と対照群の2群に分けて施行しペプチドワクチンの優位性を示した初めての臨床試験である。

血液学的に完全寛解(CR)にあるが再発ハイリスクの急性骨髄性白血病(AML)にWT1ペプチドワクチンを継続的に投与した臨床試験の結果を集計・解析することにより、WT1ペプチドワクチンはAMLの再発率を低下させることができる可能性を示した。これは、腫瘍量が少ない時にWT1ペプチドワクチン治療を開始すれば悪性腫瘍患者を治癒に導くことができる可能性を示す結果であった。

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 8件)

1. Oji Y., Inoue M., Takeda Y., Hosen N., Shintani Y., Kawakami M., Harada T., Murakami Y., Iwai M., Fukuda M., Nishida S., Nakata J., Nakae Y., Takashima S., Shirakata T., Nakajima H., Hasegawa K., Kida H., Kijima T., Morimoto S., Fujiki F., Tsuboi A., Morii E., Morita S., Sakamoto J., Kumanogoh A., Oka Y., Okumura M., Sugiyama H. WT1 peptide-based immunotherapy for advanced thymic epithelial malignancies. *International Journal of Cancer*, 142: 2375-2382, 2018. DOI: 10.1002/ijc.31253 (査読あり)
2. Nishida S., Ishikawa T., Egawa S., Koido S., Yanagimoto H., Ishii J., Kanno Y., Kokura S., Tasuda H., Oba M.S., Sato M., Morimoto S., Fujiki F., Eguchi H., Nagano H., Kumanogoh A., Unno M., Shimada H., Ito K., Homma S., Oka Y., Morita S., Sugiyama H. Combination gemcitabine and WT1 peptide vaccination improves progression-free survival in advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: A phase II randomized study. *Cancer Immunology Research*, 6: 320-331, 2018. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0386 (査読あり)
3. Oka Y., Tsuboi A., Nakata J., Nishida S., Hosen N., Kumanogoh A., Oji Y., Sugiyama H. Wilms' tumor gene 1 (WT1) peptide vaccine therapy for hematological malignancies: from CTL epitope identification to recent progress in the clinical studies including a cure-oriented strategy. *Oncology Research and Treatment*, 40:682-690, 2017. DOI: 10.1159/000481353 (査読あり)
4. 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 tumor 1 peptide vaccine as a cure-oriented post-chemotherapy strategy for patients with acute myeloid leukaemia at high risk of relapse. *British Journal of Haematology*, 2017. DOI: 10.1111/bjh.14768 (査読あり)
5. 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 transplant in leukemia patients. *Stem Cell Investigation*, 3:90, 2016. DOI: 10.21037/sci.2016.11.08 (査読あり)
6. Oji Y., Hashimoto N., Tsuboi A., Murakami Y., Iwai M., Kagawa N., Chiba Y., Izumoto S., Elisseeva O., Ichinohazama 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 antibody against WT1 peptide with prolonged survival in glioblastoma multiforme patients vaccinated with WT1 peptide. *International Journal of Cancer*, 139: 1391-1401, 2016. DOI: 10.1002/ijc.30182 (査読あり)
7. Takashima S., Oka Y., Fujiki F., Morimoto S., Nakajima H., Nakae Y., Nakata J., Nishida S., Hosen N., Tatsumi N., Mizuguchi K., Hashimoto N., Oji Y., Tsuboi A., Kumanogoh A., Sugiyama H. Syndyca-4 as a biomarker to predict clinical outcome for glioblastoma multiforme treated with WT1 peptide vaccine. *Future*

Science OA, 2: FS096, 2016. DOI: 10.4155/fsoa-2015-0008 (査読あり)

8. 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. *Journal of Immunotherapy*, 39: 127-139, 2016. DOI: 10.1097/CJI.000000000000114 (査読あり)

[学会発表](計 13件)

1. 中田 潤、中江吉希、川上 学、森本創世子、元岡大祐、水谷 陽、保仙直毅、藤木文博、中島博子、長谷川加奈、西田純幸、坪井昭博、尾路祐介、岡 芳弘、杉山治夫. 急性骨髄性白血病に対する WT1 ワクチン療法の進捗. 第 9 回血液疾患免疫療法学会学術集会. (2017年9月30日、一橋大学一橋講堂、東京都)
2. 森本創世子、西田純幸、小井戸薫雄、江川新一、石川 剛、石井 淳、菅野良秀、柳本泰明、江口英利、中田 潤、保仙直毅、坪井昭博、長谷川加奈、中島博子、藤木文博、尾路祐介、熊ノ郷 淳、岡 芳弘、杉山治夫. 切除不能進行膵臓癌に対するゲムシタピン併用 HLA 拘束性 WT1 ペプチドワクチン療法で誘導された WT1 特異的 CTL の免疫学的機能解. 第 21 回日本がん免疫学会学術総会. (2017年6月29日、幕張メッセ国際会議場、千葉市)
3. Nakata J., Nakae Y., Kawakami M., Morimoto S., Fujiki F., Nakajima H., Nishida S., Hosen N., Tsuboi A., Oji Y., Oka Y., Sugiyama H. WT1 peptide vaccination could be a maintenance therapy for AML patients with high risk of relapse. 第 78 回日本血液学会学術総会. (2016年10月14日、パシフィコ横浜、横浜市)
4. Ishikawa T., Nishida S., Egawa S., Koido S., Ishii J., Kanno Y., Yanagimoto H., Kokura S., Morimoto S., Oba M.S., Oka Y., Sugiyama H. An open-label phase II randomized trial of WT1 peptide vaccine plus gemcitabine for advanced pancreatic cancer. 第 75 回日本癌学会学術総会. (2016年10月6日、パシフィコ横浜、横浜市)
5. 保仙直毅、前田哲夫、森本創世子、高島聡士、中田 潤、西田純幸、坪井昭博、日野雅之、尾路祐介、岡 芳弘、熊ノ郷 淳、金倉 謙、杉山治夫. 再発ハイリスク同種造血幹細胞移植後患者に対する WT1 ペプチドワクチン第 II 相臨床試験 (Phase II clinical trial of WT1 peptide vaccination post allo HSCT in patients with high risk for relapse). 第 8 回血液疾患免疫療法学会学術集会. (2016年9月3日、北海道大学医学部学友会館「フラテ」、札幌市)
6. 中田 潤、中江吉希、川上 学、森本創世子、藤木文博、中島博子、西田純幸、保仙直毅、坪井昭博、尾路祐介、岡 芳弘、杉山治夫. 急性骨髄性白血病に対する WT1 ワクチン療法(WT1 vaccination therapy against acute myeloid leukemia). 第 8 回血液疾患免疫療法学会学術集会. (2016年9月3日、北海道大学医学部学友会館「フラテ」、札幌市)
7. 西田純幸、石川 剛、江川新一、小井戸薫雄、森本創世子、石井 淳、菅野良秀、柳本泰明、大庭真梨、古倉 聡、本間 定、島田英昭、森田智視、岡 芳弘、杉山治夫. 進行膵癌に対するゲムシタピン併用 WT1 ワクチン療法ランダム化第 II 相臨床試験: 臨床効果と抗原特異的免疫反応の評価. 第 20 回日本がん免疫学会総会. (2016年7月29日、大阪国際交流センター、大阪市)
8. Nakae Y., Oka Y., Fujiki F., Morimoto S., Takashima S., Nakata J., Nishida S., Nakajima H., Hosen N., Tsuboi A., Kyo T., Oji Y., Mizuguchi K., Kumanogoh A., Sugiyama H. Two molecularly distinct effector memory cell populations of WT1-specific CTLs in AML patients. 第 77 回日本血液学会学術集会 (2015年10月17日、ANA クラウンプラザホテル金沢、金沢市)
9. 橋本直哉、坪井昭博、千葉泰良、香川尚己、有田英之、森本創世子、岡 芳弘、尾路祐介、吉峰俊樹、杉山治夫. WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide. 第 74 回日本癌学会学術集会 (2015年10月10日、名古屋国際会議場、名古屋市)
10. 岩井美樹、尾路祐介、村上由衣、橋本直哉、坪井昭博、保仙直毅、西田純幸、中田 潤、中島博子、岡 芳弘、吉峰俊樹、杉山治夫. WT1 peptide IgG

autoantibody: a predictive marker for WT1 peptide-based immunotherapy for glioblastoma. 第 74 回日本癌学会学術集会 (2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場、名古屋市)

- 1 1 . Tsuboi A., Hashimoto N., Chiba Y., Oka Y., Oji Y., Hosen N., Nishida S., Nakajima H., Fujiki H., Morimoto S., Yoshimine T., Sugiyama H. WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide. 第 19 回日本がん免疫学会総会. (2015 年 7 月 9 日、東京大学伊藤国際学術センター、東京都)
- 1 2 . 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 molecularly distinct effector memory cell populations of WT1-specific CTLs in AML patients. 第 19 回日本がん免疫学会総会. (2015 年 7 月 9 日、東京大学伊藤国際学術センター、東京都)
- 1 3 . Hashii Y., Oka Y., Oji Y., Tsuboi A., Sugiyama H., Ozono K. WT1 vaccination in pediatric rhabdomyosarcoma. 第 19 回日本がん免疫学会総会. (2015 年 7 月 9 日、東京大学伊藤国際学術センター、東京都)

〔図書〕(計 1 件)

- 1 . Oka Y., Tsuboi A., Nakajima H., Fujiki F., Nishida S., Morimoto S., Nakata J., Nakae Y., Takashima S., Tatsumi N., Hosen N., Oji Y., Sugiyama H. WT1 peptide vaccine for the treatment of malignancies: Its development, recent progress, and future perspectives. *Immunotherapy of Cancer, Yamaguchi Y. (ed), Springer, P.159-185, 2016.*

〔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

岡 芳弘 (OKA Yoshihiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・
寄附講座教授
研究者番号 : 20273691

(2) 研究分担者

武田 吉人 (TAKEDA Yoshito)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 40452388

大塚 倫之 (OTSUKA Tomoyuki)
大阪大学・医学部付属病院・特任助教 (常勤)
研究者番号 : 20730576

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()