

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09006

研究課題名(和文) AML/MDSへの免疫チェックポイント阻害薬の応用に向けた腫瘍免疫評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of evaluation method of tumor immunity for application of immune checkpoint inhibitor to AML/MDS

研究代表者

柴崎 康彦 (Shibasaki, Yasuhiko)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：50568540

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)： 骨髄異形成症候群(MDS)および、骨髄異形成変化を伴う急性骨髄性白血病(AML-MRC)を対象として、混合リンパ球ペプチド培養(MLPC)法によりWT1ペプチド特異的に増幅したWT1特異的細胞障害性T細胞(CTL)クローンを評価した。  
約2/3の患者で機能的なWT1特異的CTLが骨髄に存在し、CD8陽性T細胞に占める比率が末梢血よりも約10倍多いことを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

混合リンパ球ペプチド培養法は、WT1ペプチドワクチンや免疫チェックポイント阻害薬などによる腫瘍免疫療法が有効な患者群を抽出する検査法として、有用であることを明らかにした。

WT1をターゲットとした腫瘍免疫の場は主として骨髄であり、WT1ペプチドワクチンや免疫チェックポイント阻害薬による腫瘍免疫療法が有効な症例群が、従来示唆されていた以上に存在する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： We recruited patients of myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia with myelodysplastic changes (AML-MRC) in this study. Using paired samples of bone marrow (BM) and peripheral blood (PB), we detected WT1-specific cytotoxic T cell (CTL) clones which were amplified specifically for the WT1 peptide antigen by the MLPC method, and the amount of these clones was evaluated.

Sixty-seven percent of MDS/AML-MRC patients had functional WT1-specific CTL clones in BM. The ratio of CTL clones in BM was about 10 times higher than that in PB. These results show that the site of tumor immunity targeting WT1 is mainly in BM, and there are more patients than previously suggested who might be effective for tumor immunotherapy with WT1 peptide vaccines and immune checkpoint inhibitors.

研究分野：血液学

キーワード：腫瘍免疫療法 MLPC法 WT1特異的細胞傷害性T細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬が発売されて以降、がん免疫療法はがんに対する第 4 の治療として脚光を浴びている。同種造血細胞移植は難治性造血器悪性腫瘍の根治的治療法として確立しており、免疫療法が造血器悪性腫瘍に有用であることを明確に示している。免疫チェックポイント阻害薬の有効性は、患者の HLA に結合して T 細胞エピトープとなる可能性の高い DNA 突然変異数と正に相関することが知られている。しかしながら、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia: AML)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes: MDS)患者では DNA 突然変異数が少なくこれらに対する抗腫瘍 T 細胞がほとんど誘導されていないため、免疫チェックポイント阻害薬を AML/MDS 患者の治療に応用する上での課題となっている。

WT1 遺伝子は、染色体異常の種類や病型にかかわらず AML/MDS に高発現しているがん遺伝子である。そのため、WT1 特異的細胞障害性 T 細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)を誘導することで、免疫チェックポイント阻害薬の効果を高めることが期待できる。また、強い細胞障害活性を持つ CTL の T 細胞受容体の配列を同定できれば、遺伝子改変 T 細胞移入療法にも応用できる。

免疫チェックポイント阻害薬はその薬価の高さより、有用な患者を選択して治療することが医療経済上も重要である。患者中のがん抗原に対する CTL を確認する手法が確立されれば、患者選択のための重要な情報を得ることができる。我々は、従来の方法では検出不可能だった極めて少ない CTL を検出出来る、混合リンパ球ペプチド培養法 (Mixed lymphocyte peptide culture: MLPC) を確立し、WT1 ペプチド療法を受けた慢性骨髄性白血病患者において WT1 特異的 CTL を検出し、得られた CTL が WT1 を高発現している cell line に対する細胞傷害活性を持つことを報告した。この方法により検出される CTL は患者中の抗腫瘍 CTL 全体のサロゲートマーカーとして用いることができると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、免疫チェックポイント阻害薬と WT1 ペプチドワクチンによる複合免疫療法を AML/MDS に応用する際の対象患者群を明らかにする検査法を確立することである。そのため、AML/MDS 患者における WT1 特異的 CTL について、以下の項目について検討した。

- ・ MLPC を用いて、WT1 特異的 CTL の存在を確認する。
- ・ 骨髄及び末梢血を同時に調べることで、生体内における CTL の分布を明らかにする。
- ・ MLPC により確認された CTL の細胞表面抗原の特徴を明らかにする。

### 3. 研究の方法

免疫療法を受けていない、MDS および骨髄異形成に関連した異常を伴う AML (AML with myelodysplasia-related changes: AML-MRC) 患者のうち、HLA-A24 陽性であった 34 人を対象とした。診断は WHO 分類 2016 年版に従い、MDS のリスク分類は改訂国際予後スコアリングシステム(Revised International Prognostic Scoring System: IPSS-R)を用いて行い、intermediate リスク以上を高リスク群とした。患者の年齢中央値は 72(40-87)歳、AML-MRC5 例、低リスク MDS10 例、高リスク MDS19 例であった。

各患者から末梢血および骨髄液を採取しそれぞれ単核球分離を行った後、一部を用いて WT1 テトラマー陽性 CD8+T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した(MLPC 前評価)。残検体中の細胞数に応じて、単核球数を  $1-3 \times 10^5$  /well で 96 ウェルプレートに症例ごとに均一に撒き、改変型 WT1 ペプチド(CYTWNQMNL)、5%自己血清加培養液、IL-2 を加え 2 週間後共培養後、各 well について WT1 テトラマー陽性 CD8+T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。各ウェル中の WT1 テトラマー陽性 CD8+T 細胞が 1%以上存在するウェルを MLPC 陽性とした。WT1 特異的 CD8+T 細胞数は、MLPC 陽性ウェル / (総解析ウェル × ウェル中の細胞数 × MLPC 前の CD8+T 細胞率)の推定式を用いて評価した。

本研究は新潟大学医歯学総合病院の倫理委員会による承認を得て実施した。

### 4. 研究成果

#### (1). MLPC による WT1 特異的 CD8+T 細胞の検出

WT1 特異的 CD8+T 細胞は、MLPC により末梢血で 9 例(26%)、骨髄液で 23 例(67%)の患者で検出され、骨髄液で有意に検出率が高かった。WT1 特異的 CD8+T 細胞が末梢血から検出された症例は全例、骨髄液からも WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出された。これらの患者における骨髄液中の WT1 特異的 CD8+T 細胞の推定頻度は、末梢血中より約 10 倍高かった(末梢血: 3.0, 骨髄液: 36.1 cells/ $10^6$  CD8+T 細胞)。このことは、多くの AML-MRC 及び MDS 患者において、免疫療法を受けていない状態でも、WT1 ペプチドに应答して増加する機能的な WT1 特異的 CD8+T 細胞が存在している

こと、腫瘍免疫の主座が骨髄であることを示していると考えられた。

MLPC により WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出された症例の疾患別内訳は以下の通りであり、高リスク MDS で陽性率が高い傾向が見られた。AML-MRC: 未検出 2 例、骨髄液のみ検出 2 例、末梢血・骨髄液ともに陽性 1 例。低リスク MDS: 未検出 5 例、骨髄液のみ検出 4 例、末梢血・骨髄液ともに陽性 1 例。高リスク MDS: 未検出 4 例、骨髄液のみ検出 8 例、末梢血・骨髄液ともに陽性 7 例。

## (2). MLPC 前と MLPC による WT1 特異的 CD8+T 細胞の検出状況

MLPC 前の評価で WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出された症例は、末梢血・骨髄液ともに検出された症例が 1 例、末梢血のみが 3 例、骨髄のみが 10 例であった。このうち半数の 7 例は MLPC では WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出されなかった。このことは、WT1 ペプチドによる刺激を与えても増殖しない WT1 特異的 CD8+T 細胞が存在する例があることを示しており、免疫寛容や T 細胞の疲弊等が影響している可能性が考えられた。一方で、MLPC で WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出されることは、WT1 ペプチドに反応し増殖出来る WT1 特異的 CD8+T 細胞が存在することを示しており、MLPC は WT1 ペプチドワクチンによる複合免疫療法が適している集団を選択するうえで、有用な手法であると考えられた。

## (3). WT1 特異的 CD8+T 細胞の細胞表面抗原の特徴

MLPC により検出された末梢血の WT1 特異的 CD8+T 細胞は、83.4% が CD39 及び CD103 のいずれも発現しておらず、CD39 単独陽性細胞が 13.1%、CD103 単独陽性 2.4%、共陽性 1.0% であった。一方、骨髄液では、いずれも陰性の細胞が 26.4%、CD39 単独陽性 68.0%、CD103 単独陽性 2.7%、共陽性が 2.7% であり、CD39 単独陽性細胞率は骨髄液で有意に高かった。CD39 と CXCR4 を共発現していた WT1 特異的 CD8+T 細胞は、末梢血では 33% だった。一方、骨髄液では 95% が共発現しており、WT1 陰性 CD8+T 細胞に比べ有意に高い比率であった。

CD8+T 細胞上の CD39 発現は、慢性的な T 細胞受容体への刺激によって引き起こされるため、AML-MRC 及び MDS 患者では、骨髄微小環境において WT1 に対する持続的な免疫反応が存在しており、その影響は MLPC における 2 週間の培養期間中も持続していると考えられた。CD103 は、組織内に存在するメモリー T 細胞に発現している抗原であるが、今回の解析では発現している WT1 陽性 CD8+T 細胞は少なく、CD39 と共発現している細胞は 3% 未満であった。一方で、骨髄では CD39 と CXCR4 が共発現している WT1 陽性 CD8+T 細胞が多く見られた。CXCR4 は T 細胞が骨髄へ移行する際に必須の受容体であるが、MDS における WT1 陽性 CD8+T 細胞の保持にも重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 諏訪部達也、柴崎康彦、佐藤廣幸、田村秀、片桐隆幸、布施香子、曾根博仁、成田美和子、増子正義
2. 発表標題 MLPC法はMDS患者の末梢血および骨髄血に存在するWT1特異的CD8陽性T細胞の検出に有用である
3. 学会等名 第81回日本血液内科学会学術集会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suwabe T, Ogawa S, Goto W, Sato H, Fuse K, Shibasaki Y, Sone H, Masuko M, Narita M.
2. 発表標題 Monitoring of Persistent CTLs over 10 Years Using MLPC after WT1 Peptide Vaccine in a CML Patient.
3. 学会等名 The 10th JSH International Symposium. (国際学会)
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
研究分担者	成田 美和子  (Miwako Narita)  (30281009)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	
研究分担者	増子 正義  (Masayoshi Masuko)  (70397115)	新潟大学・医歯学総合病院・准教授    (13101)	