

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462195

研究課題名(和文) 転移性脳腫瘍におけるWT1ワクチン療法・分子標的治療併用新規集学的治療法の開発

研究課題名(英文) Combined WT1 vaccine immunotherapy and targeted chemotherapy against metastatic brain tumor

研究代表者

泉本 修一 (IZUMOTO, Shuichi)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：40324769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：転移性脳腫瘍に対してWT1免疫療法を行う妥当性を、動物モデル研究、ヒト免疫反応の研究を通して、治療前後の細胞性免疫反応を中心に解析した。担脳腫瘍マウスモデルでは、脳腫瘍細胞のWT1発現を確認し、限局性であったが免疫担当細胞の集簇を明らかにした。しかしながらWT1ペプチドに治療による効果発現は軽度であった。ヒトにおいて、乳癌の転移性脳腫瘍に対し分子標的治療時の免疫担当細胞の動態解析を行った。腫瘍細胞表面抗原WT1の発現は軽度でありWT1特異的キラーT細胞の変化も軽度であった。しかしながらWT1ペプチドの投与局所皮下組織においてCD4およびCD8免疫担当細胞が集簇していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：WT1 based cancer immunotherapy is a therapy, in which HLA class I-binding 9-mer WT1 peptide is administered intradermally, to induce WT1-specific cellular immune responses. We investigated the safety and immune-response of vaccine therapy of WT1 against metastatic brain tumors. Metastatic brain tumor cells in the animal model showed expression of WT1, and immune cells during vaccination were accumulated focally, but the response of WT1 vaccination was poor. In patients of metastatic brain tumors-breast cancer, accumulation of WT1-specific immune response and WT1-specific killer T cells were poor on the surface of tumor cells. Immunohistochemical analysis on skin specimens, where WT1 peptide was administered intradermally, revealed reactive proliferation of macrophages with giant cell formation and infiltration of CD4+ and CD8+ T, and CD20+ B lymphocytes in the lower dermis. These findings provide basic information about local immune responses elicited in the vaccination site.

研究分野：医歯薬

キーワード：免疫療法 WT1 転移性脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

癌患者の長期生存が向上している理由として分子標的化学療法の開発展開が上げられる。しかし癌脳転移は全身薬物治療の効果に乏しく、担癌患者の生命予後不良に至る主要因となる。分子標的薬は、ワクチン療法の免疫活性を抑制する作用はなく、また脳転移細胞を傷害し細胞表面抗原の免疫活性をあげると予想され、ワクチン療法・分子標的治療は相乗的な効果が期待される。最近の研究により、Wilms' tumor-1 (WT1)は癌抗原として認識され、ほとんどすべての臓器固形癌でWT1が発現していることが明らかになった。そのうえでWT1がワクチン療法の標的抗原となりえると考えられ、白血病および固形癌に対するWT1癌ワクチン療法の第Ⅰ相試験で十分な安全性と有効性が明らかになった。私達は悪性神経膠腫においても96%がWT1陽性であることを明らかにし、トランスレーショナルリサーチとして、悪性神経膠腫患者にWT1ワクチン療法第Ⅰ相臨床試験および第Ⅱ相試験を行った。その結果、投与したWT1ペプチドに特異的なCTLが多くの患者で誘導され、再発治療後の6ヶ月後無増大生存率33.3%と優れた成績を得た。さらに共同試験で初発膠芽腫にTMZ化学療法併用WT1ワクチン療法第Ⅰ相試験を行い、安全性が確認され、優れた治療成績を示した。すなわちリンパ組織がないとされる脳内環境において活発な免疫反応動態が確認された。さらに、固形癌での末梢血中キラーT細胞の免疫動態を明らかにし、癌の脳転移腫瘍に対しても、さまざまなチャンネルによる獲得免疫が働くと予想され、転移性脳腫瘍におけるWT1免疫療法を計画した。

2. 研究の目的

固形癌と同様に脳腫瘍でもWT1免疫獲得効果が高いこと、固形癌での末梢血中キラーT細胞の免疫動態が明らかになり、癌の脳転移に対しても、さまざまなチャンネルによる腫

瘍免疫が働くと想定される。そこで転移性脳腫瘍動物モデルおよびヒト転移性脳腫瘍において腫瘍周辺局所での免疫動態およびWT1ワクチン治療前後の免疫動態を明らかにし、原発癌に対する分子標的治療に併行して、WT1癌ワクチン療法での転移性脳腫瘍に対する抑制系および促進系免疫機序を解明し、その安全性、妥当性、および相乗効果を調べ、転移性脳腫瘍におけるWT1免疫療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

当初ラットでのモデル作成を試みたがマウス脳腫瘍モデルに変更した。そのうえでマウス転移性脳腫瘍モデルおよびヒト脳腫瘍においてWT1ワクチン治療前および後の局所での獲得性免疫動態を明らかにした。

：動物モデルWT1ペプチド治療実験は、マウスとしてC(H-2D^b)57BL/6を用い、正常マウスおよび担脳腫瘍(3LLおよびB16メラノーマ細胞由来)マウスを作成した。それらに対してマウスMHC class I拘束性(H-2Db)WT1ペプチドDb126(a.a.126-134RMFPNAPYL)を投与した。脳組織内WT1特異的免疫担当細胞の免疫反応の解析および組織反応の解析を行った。そのうえでペプチド投与後の局所免疫反応、組織反応を検討した。

：ヒトにおいて、転移性脳腫瘍の外科手術による腫瘍摘出時に採取した腫瘍組織および辺縁組織の蓄積がある。それらを用いて、腫瘍抗原に対する免疫応答の詳細な解析、とくに分子標的治療時の免疫担当細胞の動態解析を行った。脳組織内WT1特異的免疫担当細胞の免疫反応の免疫反応の解析および組織反応の解析を行った。

4. 研究成果

(1)動物モデルWT1ペプチド治療実験は、ラットから変更し、マウスとしてC(H-2D^b)57BL/6を用い、正常マウスおよび担脳腫瘍(3LLおよびB16メラノーマ細胞由来)

マウスを作成した。それらに対してマウス MHC class I 拘束性 (H-2Db) WT1 ペプチド Db126 (a.a. 126-134 RMFPNAPYL) を投与し、その免疫反応、組織反応を検討した。その結果、正常マウス脳に対してそれらの担腫瘍マウスでは、ラット・Walker 256 carcinoma 移植脳と同じく、限局性であったが免疫担当細胞の集族を明らかにした。またそれらの細胞は WT1 を発現していることを確認した。しかしながら WT1 ペプチドによる治療効果発現は軽度であり生存期間の延長は認められなかった。

(2) ヒトにおいて、膠芽腫に対し WT1 ペプチドを皮内投与したのち、発赤炎症反応を強く認め、その皮膚生検では局所皮下組織においてマクロファージの増殖と巨細胞化とともに CD4 および CD8 陽性 T 細胞の集族および CD20 陽性 B 細胞の集積がみられ免疫担当細胞が集族していることを確認した。それらはワクチン治療継続 4 年後でも維持されており、WT1 テトラマーアッセイによる WT1 特異的キラー T 細胞も認められた。長期寛解維持できた例は、WT1 特異的 CTL の effector 分画が高く長期維持され、ワクチン治療は長期治療にも有効であることが確認できた。WT1 治療時に脳腫瘍体積の大きいものは WT1 免疫皮膚反応があっても腫瘍抑制効果に乏しい傾向があった。

(3) 転移性脳腫瘍の外科手術による腫瘍摘出時に採取した腫瘍組織および辺縁組織の蓄積がある。それらに対し、a) 担癌患者の分子標的療法治療時、腫瘍抗原に対する免疫応答の解析、WT1 特異的キラー T 細胞の解析を行った。今までの検討では固形癌患者で治療前すでに血中 WT1 特異的 CTL は量的に増加しており、癌細胞表面の WT1 抗原によって体内で感作されていることを証明している。そのなかで脳転移が認められた段階で、同様に免疫応答の解析、同じく WT1 特異的キラー T 細胞の動態解析を行った。b) 乳癌の転移性脳

腫瘍に対し分子標的治療時の免疫担当細胞の動態解析を行った。しかし腫瘍細胞表面抗原 WT1 の発現は軽度であり血液中 WT1 特異的キラー T 細胞の変化も軽度であった。c) 臨床的に免疫変動因子の可能性のあるステロイド併用治療時、抗てんかん薬併用治療時の免疫担当細胞の解析を行ったが抑制的な変化は認めなかった。

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 15 件)

- (1) Oji Y, Izumoto S, Sugiyama H. (23名省略 8番目) Association of WT1 IgG antibody against WT1 peptide with prolonged survival in glioblastoma multiforme patients vaccinated with WT1 peptide. *Int J Cancer*, 査読あり、139巻、2016、1391-1401. DOI: 10.1002/ijc.30182.
- (2) Sakai K, Takeda M, Okuda T, Kato A, Nakagawa K. (6名省略 5, 6番目) Clinical outcome of node-negative oligometastatic non-small cell lung cancer. *Thoracic Cancer*, 査読あり、7巻、2016、670-675. DOI: 10.1111/1759-7714.12386.
- (3) Tasaki T, Fujita M, Okuda T, Izumoto S, Kato A. (4名省略 2,3,8,9番目) MET expressed in gliomastem cells is a potent therapeutic target for glioblastoma multiforme. *Anticancer Res*, 査読あり、36巻、2016、3571-3577. <http://ar.iiarjournals.org/content/36/7/3571.long>
- (4) Motoshima T, Fujita M, Eto M. (10名省略 5番目) CXCL10 and CCL2 mRNA expression in monocytes is inversely correlated with the HLA-DR lower fraction of monocytes in patients with renal cell carcinoma. *Oncology letters*, 査読あり、11巻、2016、1911-1916.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4774459>

(5) Arita H, Tomogane Y, Ichimura K. (50名省略 34番目) A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun*, 査読あり、4巻、2016、79-80. DOI: 10.1186/s40478-016-0351-2.

(6) 泉本修一, 友金祐介, 奥田武司, 眞田寧皓, 加藤天美. 頭蓋内血管周皮腫(SFTの亜型として)の診断、治療と長期予後、査読あり、*Neuro-Oncologyの進歩* 23巻、2016、27-34. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/neurooncology/23/1>

(7) Hashimoto N, Izumoto S, Sugiyama H. (15名省略 5番目) Wilms tumor 1 peptide vaccination combined with temozolomide against newly diagnosed glioblastoma safety and impact on immunological response. *Cancer Immunol Immunother*, 査読あり、64巻、2015、707-716. DOI:10.1007/s00262-015-1674-8.

(8) Nakano N, Kato A. (4名省略 6番目) Successful combination of pallidal and thalamic stimulation for intractable involuntary movements in patients with neuroanathosis. *World Neurosurg*, 査読あり、84巻、2015、1177-1184. DOI: 10.1016/j.wneu.2015.06.052.

(9) Otsubo D, Fujita M, Kakeji Y (5名省略 3番目) Early-phase treatment by low-dose 5-Fluorouracil or primary tumor resection inhibits MDSC-mediated lung metastasis formation. *Anticancer Research*, 査読あり、35巻、2015、4425-4431. <http://ar.iiarjournals.org/content/35/8/4425.long>

(10) Fujita M, Matsui T, Ito A. Biomedical insights into cell adhesion and migration-from a viewpoint of central nervous system tumor immunology. *Frontiers in cell and developmental biology*, 査読あり、3巻、2015、55-56. DOI: 10.3389/fcell.2015.00055.

(11) Oji Y, Izumoto S, Sugiyama H. (34名省略 25番目) The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int J Oncol*, 査読あり、44巻、2014、1461-1469. DOI: 10.3892/ijo.2014.2318.

(12) Okuda T, Fujita M, Kato A. (2名省略 1,2,5番目) Novel surgical technique to solidify cyst-type metastatic brain tumors using autologous fibrin glue for complete resection. *Surg Neurol Int*, 査読あり、25巻、2014、100-101. DOI: 10.4103/2152-7806.135304.

(13) Okuda T, Fujita M, Kato A. (3名省略 1,3,6番目) The chicken egg and skull model of endoscopic endonasal transsphenoidal surgery improves trainee drilling skills. *Acta Neurochir (Wien)*, 査読あり、156巻、2014、1403-1407. DOI:10.1007/s00701-014-2035-7.

(14) Yoshioka H, Okuda T, Fujita M, Izumoto S, kato A (2名省略 2, 3, 6, 7番目) Inhibition of ABCG2 enhances chemo-sensitivity of murine glioma stem cell-like cells to temozolomide and reduces spheroid-forming capability. *Acta Med Kindai Univ*, 査読あり、39巻、2014、105-113. http://www.med.kindai.ac.jp/medical_convention/magazine/acta.html

(15) 泉本修一 中枢神経系原発悪性リンパ腫の診断と治療 - 最近の動向 - 脳外誌、査読あり、42巻、2014、507-521.

<https://doi.org/10.11477/mf.1436102259>

〔学会発表〕(計2件)

(1) 泉本修一、友金祐介、奥田武司、加藤天美 膠芽腫における WT1 ワクチン治療の長期免疫維持と注射局所および血中の免疫反応. 第32回日本脳腫瘍学術集会 2015年11月28日 - 11月30日(京都プリンスホテル・京都・京都)

(2) Oji Y, Anguille S, Izumoto S. (28名省略 18番目) Harmonization of immunohistochemical evaluation of WT1 expression and monitoring of WT1-specific humoral immune response. The 7th International Conference of WT1 in human neoplasia 2014年4月22日 - 4月23日 (Barcelona, Spain)

〔図書〕(計2件)

(1) 泉本修一 他、日本臨床社、脳腫瘍学基礎研究と臨床研究の進歩、2016、307 - 312.

(2) 泉本修一 他、日本臨床社、神経症候群(第2版)() - その他の神経疾患を含めて -、2014、414 - 418.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉本修一 (IZUMOTO, Shuichi)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：40324769

(2) 研究分担者

友金祐介 (TOMOGANE, Yusuke)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：10412008

奥田武司 (OKUDA, Takeshi)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：10340796

藤田貢 (FUJITA, Mitsugu)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：40609997

加藤天美 (KATO, Amami)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：00233776