

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005 ～ 2009
 課題番号：17015028
 研究課題名（和文） 白血病の分子診断と分子標的治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of molecular diagnosis and molecule-targeted therapy for leukemia
 研究代表者
 杉山 治夫（SUGIYAMA HARUO）
 大阪大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：70162906

研究成果の概要（和文）：

ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 は、白血病やほとんどすべての固形癌で高発現しているため、汎腫瘍マーカーとなり、かつ WT1 タンパクは汎腫瘍抗原となる。白血病の微小残存病変を高感度に検出する WT1mRNA 定量検査を開発した。本検査は、2007 年から保険採用されている。また、WT1 ペプチドを用いたがんの免疫療法の臨床研究を 2001 年から開始し、その有用性を明らかにしてきた。本免疫療法は欧米にも広がり、製剤化に向って進んでいる。

研究成果の概要（英文）：

Wilms' tumor gene WT1 is overexpressed in leukemia and almost all types of solid tumors. Therefore, WT1 is a pan-tumor marker and pan-tumor-associated antigen. WT1 mRNA quantitative assay, which can detect minimal residual disease of leukemia at high sensitivity, has been developed and covered by national health insurance from 2007. Furthermore, clinical trials of WT1 peptide-based immunotherapy was begun in 2001 and clinical effect has been showing. This immunotherapy has been developing in Europe and USA and drug product is in progress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	26,700,000	0	26,700,000
2006 年度	27,100,000	0	27,100,000
2007 年度	27,100,000	0	27,100,000
2008 年度	24,300,000	0	24,300,000
2009 年度	24,300,000	0	24,300,000
総計	129,500,000	0	129,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：WT1、白血病、分子診断、分子標的療法、免疫療法

1. 研究開始当初の背景

ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 は、白血病やほとんどすべての種類の固形癌で高発現し、汎

腫瘍マーカーになることを見出した。WT1mRNA の定量により、白血病患者の末梢血では、正常細胞 10 万個中に 1 個の白血

病細胞を検出しうることを見出し、WT1mRNA の定量モニタリングにより、白血病の微小残存病変をリアルタイムに的確に把握でき、よって白血病治療を最適化できることを明らかにし、本 WT1mRNA 定量検査は、白血病治療に必須の検査であることを示してきた。しかし、本検査は、保険採用されていないため、普及の面で問題があった。一方、WT1 タンパクは、汎腫瘍拒絶抗原であることを見出し、WT1 ペプチドを用いたがんの免疫療法の臨床研究を 2001 年に開始し、その有用性の検証をはじめたところ、重篤な副作用もなく、本療法は、有用ながん免疫療法になりうる可能性が示唆されるようになった。

2. 研究の目的

(1) 白血病の分子診断の開発

WT1mRNA 定量検査を確立し、本検査を用いて白血病の微小残存病変をリアルタイムにモニタリングすることにより、白血病治療を個別化し、オーダーメイド医療を確立すること。

(2) 白血病の分子標的療法の開発

WT1 タンパクは、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、慢性骨髄性白血病において、高発現し、腫瘍抗原であることを見出したので、これらの疾患に対する WT1 ペプチド免疫療法を開発し、これらの疾患に対する根治療法を確立すること。

3. 研究の方法

(1) 白血病の分子診断の開発

WT1mRNA 定量検査の臨床治験を行い、その有用性を確立するとともに、本臨床検査の保険採用をめざす。

(2) 白血病の分子標的療法の開発

① WT1 ペプチド免疫療法の急性白血病患者に対する第 I/II 相臨床研究

WT1 ペプチド (改変型 CYTWNQMNL) 3.0 mg をモンタナイドアジュバントとともに、毎週 1 回、計 12 回皮内投与し、安全性と有用性を明らかにする。

② WT1 ペプチド免疫療法の骨髄異形成症候群 (MDS) に対する第 I 相臨床研究

改変型 WT1 ペプチド $5 \mu\text{g} / \text{body} \rightarrow 15 \mu\text{g} / \text{body} \rightarrow 50 \mu\text{g} / \text{body}$ と dose-up しながら、モンタナイドアジュバントとともに皮内投与する。

③ WT1 ペプチド免疫療法の慢性骨髄性白血病 (CML) に対する第 I 相臨床研究

CML の分子標的薬であるグリベック (イマチニブ) の長期投与にもかかわらず、十分な臨床効果が得られていない患者に対して、グリベックを一定量継続投与しながら、WT1 ワクチン (改変型 WT1 ペプチド 1.0 mg + モンタナイドアジュバント) を 2 週間毎に皮内投与

する。

4. 研究成果

(1) 白血病の分子診断の開発

WT1mRNA 定量検査は、コマーシャル化され、2007 年 11 月には、保険採用され、現在、白血病の必須の検査として広く普及し、欧米にも広まっている。WT1mRNA 定量検査で、白血病の微小残存病変をモニターすることにより、抗癌剤を増減したり、骨髄移植後の免疫抑制剤を増減したりする白血病治療のオーダーメイド医療が可能になってきた。

(2) 白血病の分子標的療法の開発

① 急性骨髄性白血病

2001 年開始の第 I 相臨床研究では、WT1 ワクチンを投与した 12 人の AML 患者のうち 8 人で、臨床効果の評価が可能であった。この 8 人のうち 4 人で臨床効果が見られ、分子再発であった 3 人は、現在まで、7 年 1 ヶ月 (2 人) ~ 7 年 4 ヶ月 (1 人) にわたり、WT1 ワクチンが継続投与されており、重篤な副作用もなく、完全寛解が持続しており、治癒している可能性が高い。第 II 相臨床研究では分子再発の 6 人のうち 2 人において、再発を長期にわたり抑制した。これらのデータは、本免疫療法は、分子再発の早期に開始することが、臨床効果の発揮をたかめることを示唆した。

② 骨髄異形成症候群

WT1 ペプチド $5 \mu\text{g} / \text{body}$ 、3 人 $\rightarrow 15 \mu\text{g} / \text{body}$ 、3 人 $\rightarrow 50 \mu\text{g} / \text{body}$ 、3 人の dose-up スタディを実施中。以前、WT1 ペプチドを $300 \mu\text{g} / \text{body}$ 投与した際、急激な臨床効果が出現し、顆粒球 (大部分は白血病細胞) が著減したが、WT1 ペプチドをかなり減量した本スタディでは、臨床効果がゆっくりと出現したが、 $5 \mu\text{g} / \text{body}$ でも、 $15 \mu\text{g} / \text{body}$ でも、 $50 \mu\text{g} / \text{body}$ でも臨床効果が見られ、最適量を決定できなかった。これらのデータは、本疾患では、まず少量の WT1 ペプチドを投与し、臨床効果が出ない時、dose-up をするというプロトコルがよいであろうことを示唆している。

③ 慢性骨髄性白血病

グリベック 200 mg の長期投与にもかかわらず bcr-abl mRNA が 100 コピー未満にならない症例に対して、本免疫療法を実施した。WT1 ワクチン投与後、bcr-abl mRNA が徐々に低下し、13 週目には、検出感度以下になった。その後、bcr-abl mRNA の上昇が起ったので、WT1 ワクチンの投与間隔を最適化したところ、再び bcr-abl mRNA が低下し、検出感度以下になり、そのレベルが持続した。これらのデータは、本免疫療法が、stem cell leukemia である CML に対して、MDS と同様な十分な臨床効果を出しうることを示唆した。

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 12 件) 全て査読有

- ① Tamura H, Dan K, Yokose N, Iwakiri R, Ohta M, Sakamaki H, Tohyama K, Kondo A, Hyodo H, Nakamura K, Yamashita T, Elisseeva O. A, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H, Ogata K. Prognostic Significance of WT1 mRNA and anti-WT1 Antibody Levels in Peripheral Blood in Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia Research*, in press, 2010.
- ② Murao A, Oka Y, Tsuboi A, Elisseeva OA, Harada Y, Fujiki F, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Shirakata T, Hashimoto N, Myoui A, Ueda T, Takeda Y, Osaki T, Enomoto T, Yoshikawa H, Kimura T, Oji Y, Kawase I, Sugiyama H. High frequencies of less differentiated and more proliferative WT1-specific CD8+ T cells in bone marrow (BM) in tumor-bearing patients: an important role of BM as a secondary lymphoid organ. *Cancer Science*, in press, 2010.
- ③ Tanaka-Harada Y, Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, Katagiri T, Elisseeva O, Nishida S, Shirakata T, Hosen N, Fujiki F, Murao A, Nakajima H, Oji Y, Kanda Y, Kawase I, Sugiyama H. Biased usage of BV gene families of T cell receptors of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific CD8+ T cells in patients with myeloid malignancies, *Cancer Science*, 101: 594-600, 2010.
- ④ Hashii Y, Sato E, Ohta H, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K. WT1 peptide immunotherapy for cancer in children and young adults. *Pediat Blood Cancer*, 26: 74-83, 2009.
- ⑤ Fujiki F, Oka Y, Kawakatsu M, Tsuboi A, Nakajima H, Elisseeva OA, Harada Y, Li Z, Tatsumi N, Kamino E, Shirakata T, Nishida S, Taniguchi Y, Kawase I, Oji Y, Sugiyama H. A WT1 protein-derived, naturally processed 16-mer peptide, WT1332, is a promiscuous helper peptide for induction of WT1-specific Th1-type CD4+ T cells. *Microbiol Immunol*, 52: 591-600, 2008.
- ⑥ Li Z, Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F, Harada Y, Nakajima H, Masuda T, Fukuda Y, Kawakatsu M, Morimoto S, Katagiri T, Tatsumi N, Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Kawakami Y, Udaka K, Kawase I, Oji Y, Sugiyama H. Identification of a WT1 protein-derived peptide, WT1187 as an HLA-A*0206-restricted, WT1-specific CTL epitope" is currently at the following stage of production. *Microbiol Immunol*, 52: 551-8, 2008.
- ⑦ Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, Nakajima H, Elisseeva OA, Harada Y, Ito K, Li Z, Tatsumi N, Sakaguchi N, Fujioka T, Masuda T, Yasukawa M, Udaka K, Oji Y, Sugiyama H. Identification and characterization of a WT1 (Wilms' tumor gene) protein-derived HLA-DRB1*0405-restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunother*, 30: 282-93, 2007.
- ⑧ Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, Harada Y, Elisseeva OA, Furukawa Y, Tsukaguchi M, Shirakata T, Nishida S, Nakajima H, Morita S, Sakamoto J, Kawase I, Oji Y, Sugiyama H. Clinical and immunologic responses to very low-dose vaccination with WT1 peptide (5 mug/body) in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. *Int J Hematol*, 85, 426-9, 2007.
- ⑨ Morita S, Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, Maruno M, Izumoto S, Osaki T, Taguchi T, Ueda T, Myoui A, Nishida S, Shirakata T, Ohno S, Oji Y, Aozasa K, Hatazawa J, Udaka K, Yoshikawa H, Yoshimine T, Noguchi S, Kawase I, Nakatsuka S, Sugiyama H, Sakamoto J. A phase I/II trial of a WT1 (Wilms' Tumor Gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: Safety assessment based on the phase I data. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 36: 231-236, 2006.
- ⑩ Wu F, Oka Y, Tsuboi A, Elisseeva O. A, Nakajima H, Fujiki F, Masuda T, Murakami M, Yoshihara S, Ikegame K, Hosen N, Kawakami M, Nakagawa M, Kubota T, Soma T, Yamagami T, Tsukaguchi M, Ogawa H, Oji Y, Hamaoka T, Kawase I, Sugiyama H. Th1-biased humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in the patients with hematopoietic malignancies. *Leukemia*, 19: 268-274, 2005.

- ⑪ Tsuji T, Yasukawa M, Matsuzaki J, Ohkuri T, Chamoto K, Wakita D, Azuma T, Niiya H, Miyoshi H, Kuzushima K, Oka Y, Sugiyama H, Ikeda H, Nishimura T. Generation of human tumor-specific, HLA class I-restricted Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T cell receptor genes. *Blood*, 106: 470-476, 2005.
- ⑫ Li Z, Oka Y, Tsuboi A, Masuda T, Tatsumi N, Kawakami M, Fujioka T, Sakaguchi N, Nakajima H, Fujiki F, Udaka K, Oji Y, Kawase I, Sugiyama H. WT1(235), a ninemer peptide derived from Wilms' tumor gene product, is a candidate peptide for the vaccination of HLA-A*0201-positive patients with hematopoietic malignancies. *Int J Hematol*, 82: 458-459, 2005.

[学会発表] (計 26 件)

- ① 尾路祐介, 岡芳弘, 西田純幸, 白方俊章, 保仙直毅, 坪井昭博, 中島博子, 村尾綾子, 杉山治夫: グリベックとの併用によるCMLに対するWT1 ペプチドワクチン免疫療法, 第 71 回日本血液学会学術集会, 京都, 2009 年 10 月 25 日
- ② 田村秀人, 緒方清行, 横瀬紀夫, 岩切理歌, 大田雅嗣, 坂巻壽, 遠山薫, 山下泰史, 近藤麻加, 兵働英也, 中村恭子, 尾路祐介, 杉山治夫, 壇和夫: 骨髓異形成症候群における末梢血WT1mRNA発現と抗WT1 抗体産生の臨床的意義, 第 71 回日本血液学会学術集会, 京都, 2009 年 10 月 24 日
- ③ 坪井昭博, 岡芳弘, 川上学, 尾路祐介, 保仙直毅, 西田純幸, 米谷昇, 杉山治夫: MDSに対するWT1 ワクチン療法, 第 71 回日本血液学会学術集会, 京都, 2009 年 10 月 24 日
- ④ 西田純幸, 川上学, 坪井昭博, 村尾綾子, 宮井沙緒里, 白方俊章, 保仙直毅, 尾路祐介, 塚口真知子, 岡芳弘, 杉山治夫: MDS-AML に対しHLA-A*2402 拘束性改変型WT1 ペプチドワクチン療法を行い, 長期間AML の再発なく経過している 1 例, 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 2008 年 10 月 11 日
- ⑤ 尾路祐介, 岡芳弘, 西田純幸, 白方俊章, 保仙直毅, 高橋和子, 村尾綾子, 中島博子, 坪井昭博, 杉山治夫: グリベックとの併用によるCML に対するWT1 ペプチドワクチン免疫療法, 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 2008 年 10 月 10 日
- ⑥ 尾路祐介, 白方俊章, 岡芳弘, 西田純幸, 坪井昭博, 保仙直毅, 杉山治夫: グリベックとの併用によるCMLに対するWT1 ペプチドワクチン免疫療法, 第 89 回近畿血液学地方会, 大阪, 2008 年 6 月 21 日
- ⑦ 西田純幸, 岡芳弘, 坪井昭博, 杉山治夫, 川上学, 塚口真知子: WT1 ペプチドワクチン療法を行い, 長期間AMLの再発なく経過しているMDS-AMLの1例, 第89回近畿血液学地方会, 大阪, 2008年6月21日
- ⑧ Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, Harada Y, Elisseeva OA, Furukawa Y, Hayashi T, Nishida S, Shirakata T; Hosen N, Nakajima H, Yamagami T, Soma T, Oji Y, Sugiyama H: WT1 peptide vaccination at very low-dose for myelodysplastic syndrome. 3rd International Conference on WT1 in Human Malignancies, Berlin, 2007 年 9 月 19 日
- ⑨ Nakajima H, Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, Sugiyama H: Co-administration of WT1 peptide vaccine and IFN- γ enhances tumor rejection compared to the injection of WT1 peptide vaccine alone in a mouse model. 3rd International Conference on WT1 in Human Malignancies, Berlin, 2007 年 9 月 19 日
- ⑩ 尾路祐介, 坪井昭博, 西田純幸, 白方俊章, 杉山治夫, 岡芳弘, 川上学: 分子再発後にWT1 ワクチンを投与し長期寛解を維持している急性骨髄性白血病の3例, 第 86 回近畿血液学地方会, 和歌山, 2006 年 11 月 18 日
- ⑪ 西田純幸, 坪井昭博, 岡芳弘, 川上学, 中島博子, OLGA ELISSEEVA, 許泰一, 杉山治夫: 分子再発急性骨髄性白血病に対してWT1 ペプチドワクチン療法施行し長期血液学的寛解を維持している3症例, 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会合同総会, 福岡, 2006 年 10 月 9 日
- ⑫ 岡芳弘, OLGA ELISSEEVA, 長谷浩志, 川上学, 西田純幸, 白方俊章, 原田ゆきえ, 中島博子, 李哲雨, 藤木文博, 尾路祐介, 川瀬一郎, 坪井昭博, 杉山治夫: WT1 ペプチド癌ワクチン投与患者末梢血中のWT1 特異的CTLの解析, 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会合同総会, 福岡, 2006 年 10 月 7 日
- ⑬ 川上学, 坪井昭博, 西田純幸, 白方俊章, 原田ゆきえ, 中島博子, 藤木文博, 李哲雨, OLGA ELISSEEVA, 尾路祐介, 古川佳央, 林孝昌, 岡芳弘, 杉山治夫: 骨髓異形成症候群 (MDS) に対する少量WT1 ペプチド療法, 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会合同総会, 福岡, 2006 年 10 月 7 日

- ⑭ Olga Elisseeva, Yoshihiro Oka, Akihiro Tsuboi, Hiroshi Hase, Hiroko Nakajima, Yukie Harada, Manabu Kawakami, Fumihiro Fujiki, Sumiyuki Nishida, Toshiaki Shirakata, Satoshi Oono, Ichirou Kawase, Yusuke Oji and Haruo Sugiyama: WT1 peptide specific CTLs in WT1 peptide vaccine-treated patients, The Second International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, 2005年10月22日
- ⑮ Manabu Kawakami, Yoshihiro Oka, Akihiro Tsuboi, Hiroko Nakajima, Olga A. Elisseeva, Hiroshi Hase, Yukie Harada, Fumihiro Fujiki, Zheyu LI, Tatsumi, Sumiyuki Nishida, Satoshi Ohno, Toshiaki Shirakata, Ichiro Kawase, Yusuke Oji, Haruo Sugiyama: WT1-peptide vaccination for acute myeloid leukemia, The Second International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, 2005年10月22日
- ⑯ Fumihiro Fujiki, Yoshihiro Oka, Akihiro Tsuboi, Manabu Kawakami, Mai Kawakatsu, Hiroko Nakajima, Olga A. Elisseeva, Yukie Harada, Ken Ito, Zheyu Li, Naoya Tatsumi, Nao Sakaguchi, Tatsuya Fujioka, Tomoki Masuda, Masaki Yasukawa, Keiko Udaka, Yusuke Oji, and Haruo Sugiyama: Identification and characterization of a WT1 (Wilms' tumor gene) protein-derived HLA-DRB1*0405-restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes, The Second International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, 2005年10月21日
- ⑰ Sugiyama H: WT1 (Wilms' tumor Gene) Peptide-Based Cancer Immunotherapy, 10th JAPANESE-GERMAN WORKSHOP, Essen, 2005年10月1日
- ⑱ エリセーバ・オリガ, 長谷浩志, 坪井昭博, 岡芳弘, 杉山治夫: WT1 ワクチンによる特異的細胞傷害性T細胞の解析, 第64回日本癌学会学術総会, 札幌, 2005年9月16日
- ⑲ 藤木文博, 岡芳弘, 坪井昭博, 川上学, 川勝真衣, 中島博子, オリガ・エリセーバ, 原田ゆきえ, 李哲雨, 伊藤憲, 宇高恵子, 尾路祐介, 杉山治夫: WT1 特異的 CD4⁺ ヘルパー T 細胞を誘導できる HLA-class II 拘束性ペプチドの同定, 第64回日本癌学会学術総会, 札幌, 2005年9月16日
- ⑳ 杉山治夫: WT1 ペプチドを用いた免疫療法: 第9回基盤的癌免疫研究会総会, 東京, 2005年7月15日
- ㉑ エリセーバ・オリガ, 長谷浩志, 坪井昭博, 岡芳弘, 杉山治夫: Increase in numbers of antigen-experienced CD45RA⁺CD⁺CCR7⁺WT1-specific CTLs correlate with clinical response to WT1 vaccine, : 第9回基盤的癌免疫研究会総会, 東京, 2005年7月15日
- ㉒ 川上学, 坪井昭博, 原田ゆきえ, 中島博子, 白方俊章, 大野智, 藤木文博, 李哲雨, エリセーバ・オリガ, 尾路祐介, 古川佳央, 岡芳弘, 杉山治夫: 骨髄異形成症候群 (MDS) に対する少量WT1 ペプチド療法, 第9回基盤的癌免疫研究会総会, 東京, 2005年7月15日
- ㉓ 川上学, 坪井昭博, 西田純幸, 白方俊章, 岡芳弘, 尾路祐介, 杉山治夫, 古川佳央: 少量WT1 ペプチド療法により慢性骨髄単球性白血病 (CMML) の進行が抑制された1例: 第83回近畿血液学地方会, 大阪, 2005年6月11日
- ㉔ 坪井昭博, 川上学, 西田純幸, 中島博子, 岡芳弘, 白方俊章, 大野智, 尾路祐介, 杉山治夫: WT1 ペプチドワクチン療法が奏効した多発性骨髄腫の1例: 第83回近畿血液学地方会, 大阪, 2005年6月11日
- ㉕ Haruo Sugiyama, Akihiro Tsuboi, Manabu Kawakami Yusuke Oji, Yoshihiro Oka: WT1 (Wilms' tumor gene) peptide-based immunotherapy for myelodysplastic syndrome: 8th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes MDS 2005, 長崎, 2005年5月14日
- [その他]
ホームページ等
<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~hmtonc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 治夫 (SUGIYAMA HARUO)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70162906

(2) 研究分担者

岡 芳弘 (OKA YOSHIHIRO)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 20273691

尾路 祐介(OJI YUSUKE)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号：20294100

保仙 直毅(HOSEN NAOKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10456923

藤木 文博(FUJIKI FUMIHIRO)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号：40456926

(3)連携研究者
なし