

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16384

研究課題名（和文）脳腫瘍に対するWT1経口がんワクチンの効果と腫瘍内浸潤リンパ球の検討

研究課題名（英文）The efficacy of WT1 protein oral cancer vaccine on the brain tumor and the analysis of tumor-infiltrating lymphocytes

研究代表者

皆川 光 (Minagawa, Hikaru)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60792132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膠芽腫細胞をマウスの頭蓋内に接種し、血液脳関門を破壊する目的で放射線照射を施行した。そのからWT1経口がんワクチンを内服させた。生存率としては7匹中6匹が死亡し、1匹は腫瘍が治癒した。死亡したマウスでも生存期間の有意な改善と腫瘍量抑制傾向を認めた。マウス末梢血中の細胞障害性Tリンパ球に占めるWT1特異的CTLの割合はWT1ワクチン投与群で増加した。腫瘍増大が抑制された個体で腫瘍内浸潤リンパ球の検討を行ったところ、放射線照射なしの経口ワクチン群（N=6）ではWT1特異的CTLの割合は約0.3%であり、放射線照射併用では約0.7%であったが、目標としていた1-2%には届かなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

WT1蛋白は種々の腫瘍で発現している汎腫瘍抗原である。WT1経口がんワクチンは投与方法が簡便で、腸管組織を介して全身性の免疫応答が期待できることから、がん治療の様々な場面での活躍が期待される。今回マウス脳腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果を検討した。脳は血液脳関門に守られた部位であり、他の腫瘍と比べ化学療法や免疫療法による治療が難しい。本ワクチンでも、末梢血中のWT1特異的CTLは増加し、放射線照射を併用することで一定の効果も認めたものの、腫瘍内浸潤リンパ球の割合は十分高いとは言えなかった。今後は他の治療法との併用、特にヘルパー機能を介した免疫賦活効果に注目し、治療効果を高めていくことを考えている。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma cells were inoculated intracranially into the mice and irradiated to disrupt the blood-brain barrier. The mice were then given oral WT1 cancer vaccine. The survival rate was 6 out of 7 mice died, and one had a healed tumor. Even in the mice that died, there was a significant improvement in survival and a trend toward tumor volume suppression. The percentage of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in CD3+CD8+ CTLs in the peripheral blood of mice was increased in the WT1 oral vaccine group. In individuals with suppressed tumor growth, the percentage of tumor-infiltrating lymphocytes was about 0.3% in the oral vaccine group without irradiation (N=6) and about 0.7% in the group with irradiation, but did not reach the target of 1-2%.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がんワクチン 腫瘍免疫 腸内細菌 ビフィズス菌 WT1 脳腫瘍 血液脳関門 腫瘍内浸潤リンパ球

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は小児悪性神経膠腫(膠芽腫を含む)患者に対し WT1 蛋白を標的とするペプチドワクチン注射を用いた臨床試験を行い、有効性を報告した。その知見は企業に導出され、現在企業治験が行われている。また我々はこれまでに WT1 経口がんワクチン *B. longum* 420 (図 1) が白血病マウスモデルにおいて抗腫瘍効果があることを確認している。一方、脳腫瘍は頭蓋内が血液脳関門に守られた特殊な環境であるため、他の癌腫と比較してがん免疫療法の働きが異なることが予想される。本研究では臨床試験で得られた知見をもとに、マウスモデルにおいて悪性神経膠腫(膠芽腫)に対する *B. longum* 420 の有効性と免疫応答を解析し、将来の臨床応用に向けて基礎的背景を構築する。

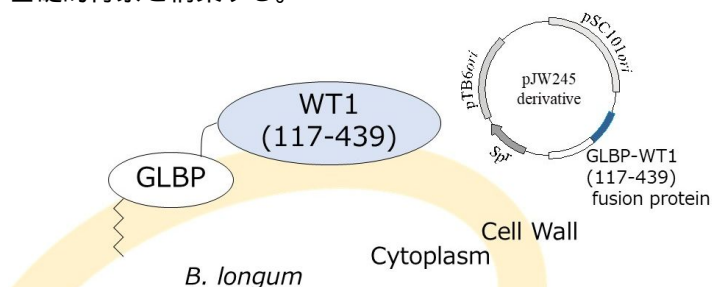


図 1 WT1 経口がんワクチン *B. longum* 420 の構造

ビフィズス菌 *B. longum* を基盤として、GLBP 蛋白を介して WT1 蛋白を結合させている。WT1 蛋白は 449 アミノ酸からなる蛋白であるが、このうち 117-439 番目のアミノ酸を結合させることができた。これにより様々な抗原エпитープが期待できる。

### 2. 研究の目的

マウス膠芽腫モデルにおいて WT1 蛋白発現ビフィズス菌を用いた経口がんワクチン *B. longum* 420 の投薬を行い、その抗腫瘍効果と免疫学的メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

抗腫瘍効果の実験として膠芽腫マウスモデルに対して *B. longum* 420 の投与を行い、生存率と腫瘍量変化を観察した。WT1 蛋白とルシフェラーゼを強制発現させた膠芽腫細胞株(GL261-WT1-Luc) をマウスの右視床に  $3 \times 10^5$  cells 接種し生着させた。脳は血液脳関門に守られているが、ヒトの脳腫瘍においては腫瘍の増大に伴い血液脳関門が破壊されて腫瘍環境が変化している。腫瘍を外部から接種するマウス頭蓋内接種モデルにおいても同様の環境を作り出すために、マウス頭部への 2Gy の放射線照射を行った。腫瘍量は Xenogen IVIS Lumina II (IVIS) を用いて発光量として評価した。腫瘍移植後 day5 で腫瘍の生着確認を行い腫瘍の生着が確認されたマウスに *B. longum* 420 を投薬した。投薬は、 $2.0 \times 10^9$  CFU/PBS 100uL を 5 日投薬して 2 日休薬するのを 1 サイクルとし、計 4 サイクル投薬した。週 1 回 IVIS で腫瘍量の評価を行い、死亡するまで、あるいは動物愛護の観点から 10% の体重減少起こるまで観察を行った。

また、同様のマウスモデルにおいて末梢血中の WT1 特異的細胞障害性 T 細胞 (WT1 特異的 CTL) を経時的に測定した。1 週間に 1 回尾静脈から採血を行い、WT1 特異的 CTL が  $CD3^+ CD8^+$  リンパ球の中に占める割合をフローサイトメトリーで測定した。さらに、腫瘍内浸潤リンパ球をフローサイトメトリー法を用いて検出を試みた。

### 4. 研究成果

生存率に関しては 7 匹中 6 匹が死亡し、1 匹は腫瘍が治癒した。6 匹の死亡したマウスに関して、体重減少による安楽死はなく、生存期間の有意な改善を認めた。IVIS による腫瘍量の経時の変化に関しても、腫瘍量の増大速度が抑制される傾向が認められた(図 2-1, 2)。

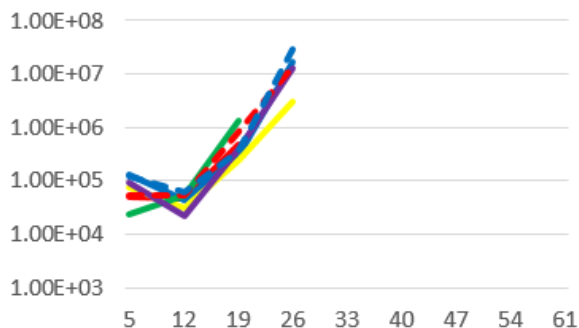


図 2-1 頭蓋内接種したマウスに PBS を内服させた場合の腫瘍量の変化

1 本の線がマウス 1 匹を表している。陰性コントロールとしての実験データ。

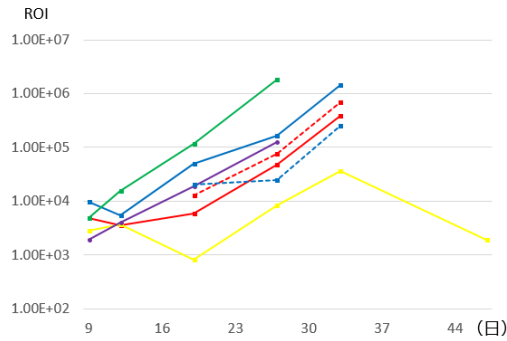


図 2-2 頭蓋内接種したマウスに放射線照射と *B. longum* 420 を内服させた場合の腫瘍量の変化  
 図 2-1 と比較して腫瘍量 (ROI) の増大が抑制されていることが分かる。黄線の個体は腫瘍が治癒したと考えられた。

マウスの末梢血で細胞障害性 T リンパ球 (CTL) 中の WT1 特異的 CTL の割合を検討したところ、*B. longum* 420 投与群においてその割合が増加した。このことは、投薬により腸管免疫を介して末梢血中の WT1 特異的 CTL が増えたことを意味しており、抗腫瘍効果の改善を示唆する一つの証拠である。さらに、同様のマウスモデルにおいて腫瘍増大が抑制された個体に関して、腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) の検討を行った。放射線照射をしていない場合の経口ワクチン群 (N=6) では WT1 特異的 CTL の割合は約 0.3% であった。放射線照射を併用することで約 0.7% まで増加したが、目標としていた 1-2% には届かなかった (図 3)。

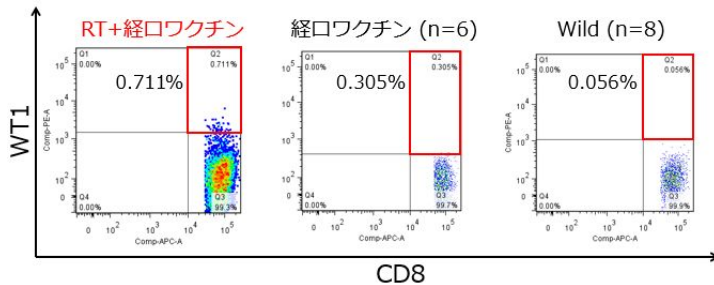


図 3 腫瘍内浸潤リンパ球における WT1 特異的 CTL の割合  
*B. longum* Wild Type の投薬と比較して、RT+ *B. longum* 420 では WT1 特異的 CTL の割合が軽度上昇した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hikaru Minagawa, Yoshiko Hashii, Hiroko Nakajima, Fumihiro Fujiki, Soyoko Morimoto, Jun Nakata, Toshiro Shirakawa, Takane Katayama, Akihiro Tsuboi, Keiichi Ozono	4. 巻 23(1)
2. 論文標題 Enhanced antitumor activity of a novel, oral, helper epitope-containing WT1 protein vaccine in a model of murine leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-023-10547-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------