

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 22日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590991

研究課題名（和文） 肺癌に対する、癌抗原 WT1 を標的としたペプチドワクチン療法

研究課題名（英文） Cancer antigen WT1-targeting peptide vaccine therapy for lung cancer

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：WT1 ペプチドワクチン治療肺癌症例を蓄積した。非小細胞肺癌患者の WT1 抗体解析により、その肺癌の WT1 蛋白に免疫系が反応していることを示した。骨髄の WT1 特異的 CTL 解析により、骨髄が癌抗原特異的免疫反応においてリンパ節様機能を持つ可能性を示した。CD4⁺T細胞の WT1 ヘルパーペプチド特異的応答を解析し、癌抗原特異的ヘルパーT細胞の反応の重要性を示唆する結果を得た。マウス実験で IFN-β 併用 WT1 ペプチドワクチンは有望な癌治療法である可能性を示した。WT1 特異的 CTL の TCR の BV gene family 使用頻度は癌患者、健常人ともに偏りがあることを示した。

研究成果の概要（英文）：We accumulated cases with lung cancer treated by WT1 peptide vaccine. We analyzed anti-WT1 antibody in nonsmall cell lung cancer patients, which showed the existence of immune response against WT1 protein in the lung cancer. We analyzed WT1-specific CTLs in bone marrow (BM) of cancer-bearing patients, which indicated the possibility that BM had a role as a secondary lymphoid organ in cancer immunity. We analyzed WT1 helper peptide-specific response of CD4⁺ T cells, which suggested an important role of Th response in cancer immunity. We demonstrated, using a mice model, that co-administration of WT1 peptide vaccine and IFN-β was a promising novel therapy for cancer. Biased usage of TCR BV gene families of WT1-specific CD8⁺ T cells in patients with solid tumors and healthy donors was shown.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：WT1、肺癌、癌免疫療法、ペプチドワクチン

1. 研究開始当の背景

肺癌に対しての従来からの治療法としては、手術療法、化学療法、放射線療法があり、また、最近では分子標的薬剤も登場してきたが、肺癌は依然として難治性固形癌の代表のひとつであり、新しい治療法の開発が望まれていた。その新しい治療法には、前述の分子標的薬剤や免疫療法などがあるが、その肺癌に対する免疫療法に関しては未だ確立されたものはなかった。

一方、最近の免疫学や分子生物学の進歩に基づき、癌細胞に対する免疫反応の解析・解明が進み、癌に対する免疫療法が注目を浴びるようになった。我々は、我々独自に WT1 タンパクが癌抗原であることを見出し、それを標的とした癌免疫療法、つまり、WT1 ペプチドワクチンを開発しつつあった。

2. 研究の目的

我々は、我々自身の研究結果をもとにして、癌に対する新しい治療法として WT1 ペプチドワクチン療法を独自に開発してきた。そして、それを、肺癌を含む種々の固形癌や造血器腫瘍に応用するための努力をしてきた。

本研究の目的は、癌免疫に関する基礎的研究や臨床研究をさらに積み重ねることにより、WT1 ペプチドワクチンを「臨床的に確立された肺癌の治療法」に少しでも近づけることであった。そのために、(i) 現在続行中の肺癌やその他の胸部悪性腫瘍に対する WT1 ペプチドワクチン臨床試験においてのさらなる症例の蓄積を行うこと、(ii) 肺癌を含む種々の悪性腫瘍患者における癌抗原(特に WT1 タンパク)に対する免疫応答の詳細な解析をし、癌免疫の観点からの癌患者のより深い病態解析をすること、(iii) WT1 特異的 CTL の活性化を増強あるいは制御するのに重要である CD4 陽性 T 細胞(特に WT1 特異的

CD4⁺T 細胞に注目する)のさらに詳細な解析を行うこと、そして、(iv) WT1 ペプチドワクチンと併用しその効果を増強できる他の薬剤(サイトカインや化学療法剤など)を選定するための基礎実験を行うこと、を、研究の目的・目標の中心に置いた。

3. 研究の方法

肺癌や胸腺癌患者に対する WT1 ペプチドワクチン療法を継続的に行い、それらの患者集積を行った。その患者から、経時的に免疫解析用の末梢血検体を採取した。

肺癌患者における WT1 に対する免疫状態を解析するために、多くの肺癌患者からの血清を集積し、WT1 に対する抗体価を測定し、予後との相関を解析した。

固形癌患者での癌免疫における骨髄の役割を解析するために、種々の固形癌患者の末梢血単核球と骨髄単核球を得、それぞれに含まれる WT1 特異的 CTL の細胞表面形質や機能を解析した。

癌免疫反応における癌抗原特異的なヘルパー T 細胞の重要性を検証するために、WT1 ペプチドワクチン(WT1-CTL epitope)を投与された癌患者末梢血の WT1 特異的 Th レスポンスを解析した。つまり、それらの患者末梢血から得られた CD4 陽性 T 細胞の WT1₃₃₂ ヘルパーペプチドに対する反応を IFN- γ mRNA と IL-10 mRNA を指標に解析した。

WT1 ペプチドワクチンと併用することによりその効果を増強できるアジュバントやサイトカイン類を、マウスモデルを用いて検証した。そのマウスモデル実験系としては、C57BL/6 マウスに C57BL/6 マウス由来腫瘍細胞を移植する系を用いた。今回は、そこに、WT1 ペプチドワクチンとタイプ I インター

フェロンであるインターフェロン- β を投与し、腫瘍拒絶率やそのマウスの免疫動態を解析した。

固形癌患者の WT1 特異的 CTL に関するさらに詳細な情報を得、がん免疫動態の理解を深めるために、それらの患者末梢血中の WT1 特異的 CTL が有する TCR の BV gene family を、それらの CTL を single cell-sort しその TCR を sequence することにより解析した。

4. 研究成果

進行期肺癌、つまり、手術不能で多くは他薬剤に耐性の肺癌を有する患者に対する WT1 ペプチドワクチン療法を継続的に行い、その患者の蓄積を行うことができた。また、肺癌と同じく胸部悪性疾患のひとつである胸腺悪性腫瘍（胸腺癌など）の手術不能例に対する WT1 ペプチドワクチン療法も施行し、患者集積することができた。

肺癌患者における癌抗原 WT1 に対する免疫応答を解析する目的で、非小細胞肺癌患者血清中の WT1 タンパクに対する抗体を測定した。その結果、多くの患者の血清で健常人に比べて高力価の抗 WT1 抗体が検出された。また、高力値の抗 WT1 抗体の検出は、良好な disease-free survival との有意な相関を示した。これらの結果は、肺癌細胞が有する WT1 蛋白に患者の免疫系が反応していることを示すものであり、肺癌において WT1 タンパクを標的とした免疫療法を施行することの rationale を得ることができた。

固形癌患者でのがん抗原に対する免疫反応における骨髄の役割を解析した。そのために、固形癌患者の末梢血と骨髄中の WT1 特異的 CD8⁺T 細胞の頻度、phenotype、機能などの解析を行い、そして、さらに、末梢血中のものと骨髄中のものとの比較を行った。その結果、固形癌患者の骨髄中には末梢血に比較し

て WT1 特異的 CD8⁺T 細胞がより高頻度かつ未熟な状態で存在することが明らかとなった。この結果により、癌抗原特異的な免疫反応において骨髄がリンパ節様の働きを有することが示唆された。

ペプチド癌ワクチン投与時の臨床反応誘導における、がん抗原特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞の重要性を検証した。WT1 ペプチドワクチンの投与を受けた癌患者においては、CD4 陽性 T 細胞の WT1₃₃₂ ヘルパーペプチド刺激におけるサイトカイン産生能が、ワクチン投与による臨床反応出現と相関した。この結果により、癌免疫反応において、癌抗原特異的な Th 反応が重要な役割をはたしていることが示唆された。

マウスに腫瘍を移植するモデルを用いて、WT1 ペプチドワクチンと IFN- β の併用療法は、WT1 ペプチドワクチン単独療法や IFN- β 単独療法よりも高率に腫瘍を拒絶することを示した。その効果増強メカニズムとして、WT1 特異的 CTL 活性の増強や NK 活性の増強の関与が示唆された。この結果により、この併用療法が臨床の場でも癌に対するすぐれた免疫療法になる可能性が示された。

担癌患者（種々の固形癌）の末梢血中の WT1 特異的 CTL が有する TCR の BV gene family と健常人のそれを、それらの CTL を single cell-sort しその TCR を sequence することにより解析・比較した。その結果、担癌患者の末梢血中に存在する WT1 特異的 CTL の TCR それぞれの BV gene family の使用頻度には偏

りがあるが、その使用頻度のパターンは健常人におけるそれを反映していた。この結果は、ある特定の BV gene family を持つ CTL が健常人における癌の発生に対する免疫監視時、ならびに、癌が臨床的に形成された後の免疫的攻撃の両方の場面において一定の役割を果たしている可能性を示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Morimoto S., Oka Y., Tsuboi A., Tanaka Y., Fujiki F., Nakajima H., Hosen N., Nishida S., Nakata J., Nakae Y., Murao A., Myoui A., Enomoto T., Izumoto S., Sekimoto M., Kagawa N., Hashimoto N., Yoshimine T., Oji Y., Kumanogoh A., Sugiyama H. Biased usage of T cell receptor β -chain variable region genes of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific CD8⁺ T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Science*, 103: 408-414, 2012.(査読有)
2. Nakajima H., Oka Y., Tsuboi A., Tatsumi N., Yamamoto Y., Fujiki F., Li Z., Murao A., Morimoto S., Hosen N., Shirakata T., Nishida S., Kawase I., Isaka Y., Oji Y., Sugiyama H. Enhanced tumor immunity of WT1 peptide vaccination by interferon- β administration. *Vaccine*, 30: 722-729, 2012. (査読有)
3. Fujiki F., Oka Y., Kawakatsu M., Tsuboi A., Harada Y., Hosen N., Nishida S., Shirakata T., Nakajima H., Tatsumi N., Hashimoto N., Taguchi T., Ueda S., Nonomura N., Takeda Y., Ito T., Myoui A., Izumoto S., Maruno M., Yoshimine T., Noguchi S., Okuyama A., Kawase I., Oji Y., Sugiyama H. A clear correlation between WT1-specific Th response and clinical response in WT1 CTL epitope vaccination. *Anticancer Research*, 30: 2247-2254, 2010.(査読有)
4. Murao A., Oka Y., Tsuboi A., Elisseeva O.A., 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 in tumor-bearing patients: an important role of bone marrow as a secondary lymphoid organ. *Cancer Science*, 101: 848-854, 2010 (査読有)
5. Oka Y., Tsuboi A., Fujiki F., Li Z., Nakajima H., Hosen N., Shirakata T., Nishida S., Oji Y., Kawase I., Sugiyama H. WT1 peptide vaccine as a paradigm for "cancer antigen-derived peptide"-based immunotherapy for malignancies: Successful induction of ant-cancer effect by vaccination with a single kind of WT1 peptide. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9: 787-797, 2009. (査読有)
6. Oji Y., Kitamura Y., Kamino E., Kitano A., Sawabata N., Inoue M., Mori M., Nakatsuka S-I., Sakaguchi N., Miyazaki K., Nakamura M., Fukuda I., Nakamura J., Tatsumi N., Takakuwa T., Nishida S., Shirakata T., Hosen N., Tsuboi A., Nezu R., Maeda H., Oka Y., Kawase I., Aozasa K., Okumura M., Miyoshi S., Sugiyama H. WT1 IgG antibody for early detection of non-small cell lung cancer and as its prognostic factor. *International Journal of Cancer*, 125: 381-387, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1. Tachino S, Fujiki F., Oka Y., Tsuboi A., Nakajima H., Hosen N., Oji Y., Kumanogoh A., Sugiyama H. 腫瘍抗原 WT1 特異的ヒト Th17 細胞クローンの樹立と機能解析/ Establishment and characterization of tumor antigen WT1-specific human Th17 clone. 第 40 回日本免疫学会学術総会 2011 年 11 月 28 日 (千葉)
2. Nakajima H., Oka Y., Tsuboi A., Tatsumi N., Fujiki F., Morimoto S., Hosen N., Shirakata T., Nishida S., Oji Y., Sugiyama H. WT1 peptide vaccination combined with IFN- β enhances tumor rejection in a mice model. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 4 日(名古屋)
3. Oka Y., Sugiyama H. WT1 peptide vaccine for the treatment of malignancies. Symposium 1 (Cancer Immunotherapy: Current Status and Future Prospects) 第 72 回日本血液学会学術集会 (招待) 2010 年 9 月 24 日 (横浜)
4. Oka Y., Sugiyama H. WT1 peptide vaccine for the treatment of solid and hematological malignancies. Symposium 10 (Cancer and Immunity) 第 69 回日本癌学会学術総会 (招待) 2010 年 9 月 22 日 (大阪)
5. 岡 芳弘, 村尾綾子, 坪井昭博, 田中ゆきえ, 藤木文博, 中島博子, 西田純幸, 保仙直毅, 尾路祐介, 杉山治夫. 担癌患者の骨髄中には末梢血に比較して癌抗原 WT1 特異的 CD8⁺T 細胞がより高頻度かつ未熟な状態で存在する. 第 14 回日本がん免疫学会総会 2010 年 7 月 22 日 (熊本)
6. 岡 芳弘. ペプチドワクチン-WT1 ペ

プチド癌ワクチンをモデルとして- シンポジウム (「臓器移植の将来の展望 - HLA の医療への関与-」 第 8 回日本組織適合性学会近畿地方会 (招待) 2010 年 2 月 6 日 (大阪)

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・講師

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