

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791358

研究課題名 (和文) 悪性グリオーマに対する WT1 免疫療法における免疫応答の解析

研究課題名 (英文) Analysis of immune response in WT1 immunotherapy for malignant gliomas

研究代表者

千葉 泰良 (CHIBA YASUYOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：90533795

研究成果の概要 (和文)：当研究課題では、WT1 ペプチドワクチン療法における、免疫促進反応、抑制反応を患者脳腫瘍組織から把握することを試みた。また、WT1 ペプチドワクチン療法が悪性グリオーマに対する標準治療であるテモゾロミドとの併用が可能であるかの検討を行った。WT1 ペプチドワクチン療法後の患者脳腫瘍組織を治療前の組織と比較した結果、WT1 ペプチドワクチン療法によって、腫瘍組織の免疫逃避現象が確認された。また、テモゾロミドは WT1 特異的 CTL に大きな影響を及ぼさず、WT1 ペプチドワクチン療法との併用が可能であることが証明された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we tried to comprehend the immune accelerating or suppressive responses in patients' brain tumor tissues treated with WT1 peptide vaccination for malignant gliomas. And more, we considered whether the addition of WT1 peptide vaccination to temozolomide therapy, as an alternative treatment strategy for malignant gliomas, is feasible. The comparison between before and after WT1 peptide vaccination in brain tumor tissue showed the immune escape of tumor tissue. Temozolomide therapy did not significantly affect the frequency of WT1-specific CTLs, suggesting that the combination with WT1 peptide vaccination may be possible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：(1) 悪性グリオーマ (2) WT1 ペプチドワクチン療法 (3) 免疫療法 (4) 腫瘍浸潤リンパ球 (5) 免疫逃避 (6) テモゾロミド (7) 制御性 T 細胞 (8) HLA class1

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の研究グループは、Wilms tumor 1 (WT1) を標的とした、癌ワクチン療法の開発を進めており、第 I / II 相試験を行い、十分な安全性と有効性があることを明らかにし

た。脳腫瘍領域では、グリオブラストーマ (GBM) の再発症例に対して WT1 免疫療法の第 II 相試験を行い、平均無増大期間が 20.0 週、6 ヶ月後無増大生存率が 33.3% と、化学療法で報告されてきた治療成績よりも有意に優

れていることを明らかにした。

癌ワクチン療法において抗腫瘍免疫反応の主体となるのは CD8 陽性 CTL で、CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th) や CD4 陽性 CD25 陽性 regulatory T 細胞 (Treg) の関与も示唆されている。しかし、免疫療法でこれらのリンパ球がどのように脳腫瘍内に浸潤し、脳腫瘍組織への攻撃に関わっているのかは未だに不明な点が多い。

(2) 現時点で、悪性グリオーマ初発症例の標準治療は放射線療法とテモゾロミド (TMZ) 併用である。しかし、WT1 免疫療法の有効性が示されつつあり、放射線療法と TMZ の併用でも効果に限界があることから、初発症例に対して、放射線療法と TMZ 内服に加え、WT1 免疫療法の併用を目指したい。しかし、現在のところ TMZ が抗腫瘍免疫反応、特に WT1 免疫療法に与える修飾効果は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、悪性グリオーマに対する WT1 ペプチドワクチン療法が脳腫瘍組織に対する抗腫瘍効果にどのように関わっているのかを解明し、TMZ との併用が可能であるかどうかの判断を行うことを目的とする。具体的には、

(1) 担脳腫瘍マウスモデルに対して WT1 ペプチドワクチン療法を施行し、脳腫瘍組織に対する免疫作用を解明するとともに、TMZ を併用して TMZ が抗腫瘍免疫作用にどのように影響するかを解明する。

(2) TMZ が投与されている実際の患者血液を採取して免疫担当細胞 (特に WT1 特異的 CTL) の動態を経時的に解析する。

(3) WT1 ペプチドワクチン療法が施行された実際の患者脳腫瘍組織を採取して、治療前の組織と比較することで、WT1 ペプチドワクチン療法を行うことで、脳腫瘍組織、腫瘍浸潤免疫細胞がどのように変化するかを解析する。

3. 研究の方法

(1) WT1 発現マウスグリオーマ細胞株 (203G) をマウス (C57BL/6) 脳内に移植し、無治療群、WT1 ペプチドワクチン療法群に分けて、生存曲線を比較すると同時に、腫瘍細胞を組織学的に比較した。

(2) 悪性グリオーマの初回手術後に放射線療法と TMZ を開始する予定の患者を対象とし、末梢血 20ml から単核球 (PBMCs) を分離した。放射線療法と TMZ 療法を 6 週間施行した後も採血した。一部の患者に対してはそれ以後の TMZ 維持療法中にも 4-8 週間隔を毎日に採血した。得られた PBMCs を CD3, CD4, CD8, CD25, NKG2D, WT1 テトラマーなどの抗体で染色し、FACS を用いて WT1 特異的 CD8 陽性 CTL や Treg, NK cell といったリンパ球の数や活

性化状態を解析した。

(3) WT1 免疫療法の施行前後に治療目的で手術された患者 14 名から脳腫瘍組織を得た。ホルマリン固定された脳腫瘍組織を CD3, CD4, CD8, CD79 α , FOXP3, Ki-67, WT1, HLA class I-ABC, TGF β の抗体で染色した。その上で、WT1 免疫療法の施行前後でリンパ球の浸潤度合い、浸潤リンパ球 (T 細胞、B 細胞、制御性 T 細胞) の種類や数の変化、腫瘍組織の変化 (MIB-1 index や、WT1, HLA class I, TGF β , FOXP3 の発現) を解析した。

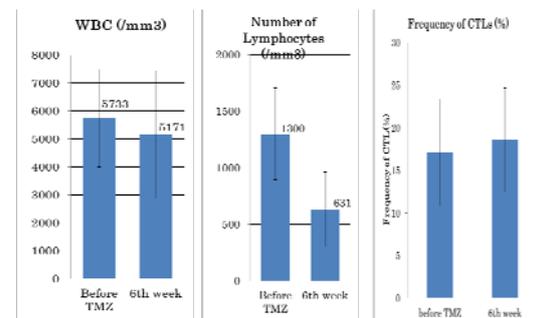
4. 研究成果

(1) WT1 発現マウスグリオーマ細胞株 (203G) をマウス (C57BL/6) 脳内に移植し、担脳腫瘍マウスモデルの作成を試みた。しかし、安定して腫瘍がマウス脳内に生着しないため、新たにマウスグリオーマ細胞株: GL261 を導入した。mRNA での WT1 発現を確認し、担脳腫瘍マウスモデルの作成が安定して可能になった後、免疫染色にて WT1 タンパクの発現を確認すると、ヒト脳腫瘍で見られるほどの発現量ではなかった。過去のデータより、WT1 ペプチドワクチン療法の効果は、WT1 タンパクの発現量と相関している事が分かっているため、過剰発現モデルを作成するため、GL261 細胞に WT1 タンパク過剰発現遺伝子を導入した。WT1 過剰発現マウスグリオーマ細胞株 GL261 をマウス脳内に移植し、免疫染色でも十分な発現量が認められ、担脳腫瘍マウスモデルも安定的に作成できる段階に達した。

(2) 初発悪性グリオーマ患者に対する TMZ 投与が末梢血中の免疫担当細胞にどのような影響を及ぼすかにおいて、以下の検討を行った。

① 白血球、リンパ球、CTL に対する影響。

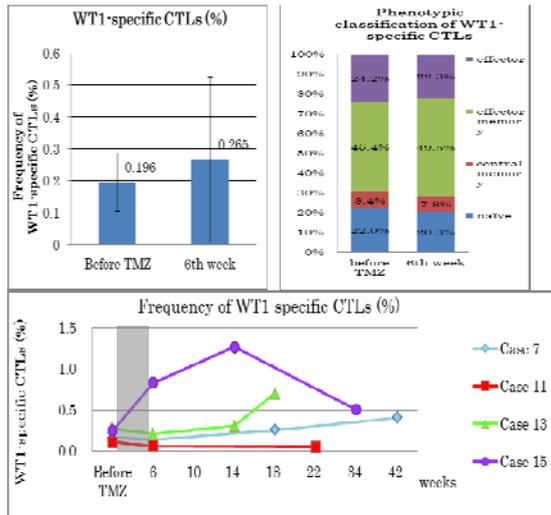
白血球の数は有意に変化せず、リンパ球は割合、数が有意に減少、CTL は割合は変化しなかったが、リンパ球の減少に伴い、その数が有意に減少した。



② WT1 特異的 CTL に対する影響

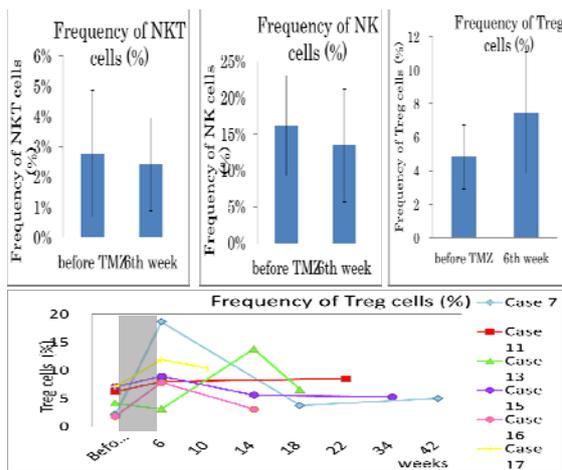
WT1 特異的 CTL の割合は変化しなかったが、リンパ球の減少に伴い、その数が有意に減少した。また、WT1 特異的 CTL の各分画も有意な変化を認めなかった。TMZ 初期治療終了後、維持療法中に測定した 4 例では、2 例で徐々

に WT1 特異的 CTL の割合が増加した。



③ ナチュラキラー (NK) 細胞、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞、制御性 T (Treg) 細胞に対する影響

NK 細胞、NKT 細胞の割合は、変化しなかったが、Treg 細胞は割合が有意に増加した。しかし、TMZ 維持療法中は 6 例中 4 例で減少した。



以上のデータは悪性グリオーマに対する標準治療である TMZ 療法が、WT1 特異的 CTL や NK 細胞、NKT 細胞の割合に大きな影響を及ぼさない事を示している。また、TMZ 初期治療終了後は WT1 特異的 CTL の割合が増加する可能性を示唆している。このことは、WT1 ペプチドワクチン療法は TMZ 療法と併用可能であると考えられるだけでなく、併用する場合は、TMZ 初期治療終了後に開始するのが望ましいことを示している。

このデータを基に、大阪大学では、2010 年より初発悪性グリオーマに対する TMZ/WT1 併用療法の第 1 相臨床試験を開始している。

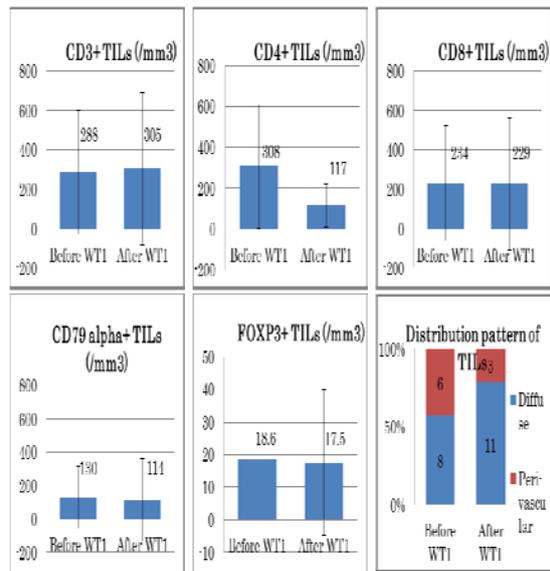
なお、本研究結果は 2010 年の Jpn J Clin Oncol に発表している。

(3) 実際に WT1 ペプチドワクチン療法が施行された患者脳腫瘍組織において、免疫担当細胞や、脳腫瘍組織がどのような影響を受け

るかについて、WT1 ペプチドワクチン療法前後の脳腫瘍組織を免疫組織学的に比較し、以下の検討を行った。

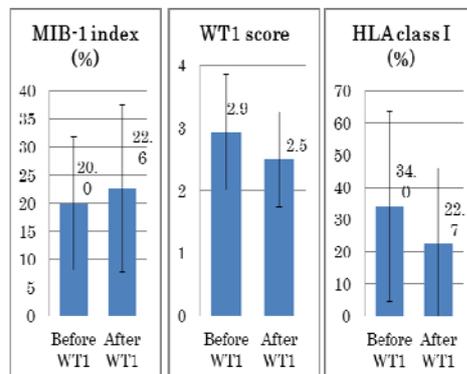
① 腫瘍内浸潤リンパ球の変化

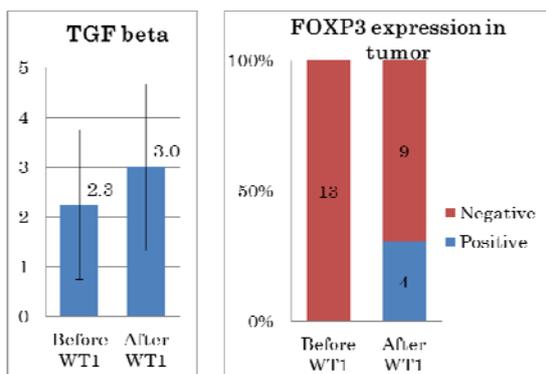
腫瘍内に浸潤しているリンパ球の数を比較すると、CD3 陽性細胞 (T 細胞)、CD8 陽性細胞、CD79 陽性細胞 (B 細胞)、FOXP3 陽性細胞 (Treg 細胞) は有意な変化を認めなかったが、CD4 陽性細胞は WT1 ペプチドワクチン療法後、有意に減少した。また、浸潤リンパ球の分布パターンの比較では、WT1 ペプチドワクチン療法後、血管周囲パターンからびまん性パターンに変化するものが見られたが、有意な差ではなかった。



② 腫瘍組織自体の変化

腫瘍細胞自体の変化を比較すると、MIB-1 index (腫瘍の増殖能) は有意な変化を認めなかったが、WT1 タンパクの発現量、HLA-class I の発現量は、有意に減少し、TGF β の発現は有意に増加した。また、腫瘍細胞自体における FOXP3 発現に対する検討では、WT1 ペプチドワクチン療法施行前の組織では全例で発現が見られなかったが、治療後は発現している組織が増加した (有意差なし)。





この研究で集められた腫瘍組織は、WT1 ペプチドワクチン療法が行われたにも関わらず、腫瘍が増大し、治療目的で手術がなされた症例である。したがって、WT1 ペプチドワクチン療法が無効であった症例が大半である。したがって、今回のデータは、WT1 ペプチドワクチン療法における平均的な腫瘍組織内の反応というよりは、無効例における腫瘍組織内の反応を反映したデータである可能性が高い。そこから見えてくる反応としては、WT1 ペプチドワクチン療法を行うと、CD8 陽性リンパ球の浸潤が増加すると思われるが、腫瘍組織が、ターゲットである WT1 タンパク、および抗原の認識に必要な HLA class I の発現を低下、さらには、免疫反応を低下させる TGF β などのサイトカインを産生して免疫から逃避しようとする。それにより、CD8 陽性リンパ球などの抗腫瘍免疫細胞の浸潤が増加することが出来ず、結果として腫瘍が増大してしまうという機序が考えられる。

WT1 ペプチドワクチン療法は平均で見ると有効であると考えられるが、明らかに無効な症例も存在する。無効な症例では、ここで見られるような免疫逃避機構が働いていると思われる。腫瘍の免疫逃避機構に関しては以前より指摘されており、免疫療法でもそれが問題になると考えられていたが、この研究は、脳腫瘍における免疫療法でこのような免疫逃避機構が起きていることを証明した初めての研究であり、今後、免疫逃避機構を解除する手段を開発する上で大変有意義なデータである。

なお、本研究結果は、2010 年の脳神経外科学会総会でその一部を発表し、現在、論文執筆中である。

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 2 件)

- ① Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Oka Y, Murao A, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Hosen N, Nishida S, Sugiyama H, Yoshimine T: Effects of concomitant

temozolomide and radiation therapies on WT1-specific T-cells in malignant glioma. Jpn J Clin Oncol. 2010 May;40(5):395-403. 査読あり

- ② Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Rabo C, Oka Y, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T: Prognostic value of WT1 protein expression level and MIB-1 staining index as predictor of response to WT1 immunotherapy in glioblastoma patients. Brain Tumor Pathol. 2010 Apr;27(1):29-34. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① 千葉泰良、WT1 免疫療法の効果判定における ^{11}C -methionine PET の新たな解析法、2010 年 11 月 28 日、第 28 回日本脳腫瘍学会、長野
- ② 千葉泰良、悪性グリオーマに対する WT1 免疫療法後の浸潤リンパ球と免疫逃避、第 69 回脳神経外科学会総会、2010 年 10 月 29 日、福岡
- ③ 千葉泰良、悪性グリオーマに対する WT1 免疫療法 — 腫瘍組織内の変化と Methionine PET による効果判定 —、第 12 回 WT1 癌抗原ペプチド癌免疫療法研究会、2010 年 7 月 10 日、大阪大学
- ④ Yasuyoshi Chiba、Use of temozolomide, antiepileptic agents and steroids does not affect negatively the therapeutic impact of WT1 peptide vaccination for patients with malignant gliomas, Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) 7th Meeting、2010 年 6 月 11 日、ソウル
- ⑤ 千葉泰良、WT1 免疫療法による悪性グリオーマの組織学的変化、第 28 回脳腫瘍病理学会、2010 年 5 月 22 日、大阪
- ⑥ 千葉泰良、WT1 免疫療法における WT1 発現とリンパ球浸潤の組織学的検討、第 27 回日本脳腫瘍学会、2009 年 11 月 9 日、大阪
- ⑦ 千葉泰良、悪性グリオーマに対する WT1 免疫療法と TMZ 併用療法の可能性、第 10 回日本分子脳神経外科学会、2009 年 9 月 20 日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 泰良 (CHIBA YASUYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：90533795