

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591609  
 研究課題名（和文） 悪性神経膠腫に対する WT1 ペプチドワクチン療法の抗腫瘍効果を  
 増強する治療法の開発  
 研究課題名（英文） Enhancement of effects of WT1 peptide-based immunotherapy  
 for malignant glioma.  
 研究代表者 坪井 昭博 (TSUBOI AKIHIRO)  
 大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
 研究者番号：10372608

研究成果の概要（和文）：悪性神経膠腫に対する WT1-CTL ペプチドワクチン療法の抗腫瘍効果を増強する治療法の開発のため 2010 年より、I. 初発悪性神経膠腫に対するテモゾロミド併用 WT1-CTL ペプチドワクチン療法および II. 再発悪性神経膠腫を対象とした WT1 ヘルパーペプチドと WT1-CTL ペプチド併用療法 の 2 つの第 I 相臨床試験を行った。両療法とも忍容性がありかつ WT1-CTL ペプチド単独療法より強い抗腫瘍効果を有する事を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We previously showed that WT1 immunotherapy is effective for recurrent malignant gliomas on the phase II clinical trial (J Neurosurg, 108(5):963-71, 2008). In this study we examined safety and efficacy of combination therapy with WT1 immunotherapy and Temozolomide (TMZ) for newly diagnosed malignant gliomas on phase I clinical trial and combination therapy of WT1-CTL peptide and WT1-helper peptide for recurrent gliomas. Both treatments were well tolerated and showed promising clinical outcomes.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：がんワクチン、脳腫瘍、悪性神経膠腫、WT1、癌免疫療法

### 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は悪性度の高い腫瘍であり、標準治療とされている治療法でも 2 年全生存率は 25% と低いのが現状であり、新しい有効な治療法が望まれている。

我々は腫瘍細胞で高発現している WT1 を標的とした癌特異的免疫療法の開発を行っている。標準療法後に再発した悪性神経膠腫を対象として WT1 ペプチド(WT1 CTL ペプチド)を用いた癌免疫療法を行い、高い病勢コ

ントロール率と無増悪期間の延長を得た。また一部の症例で治癒例も経験している。しかし治癒例に至る症例は10%程度と満足できる所には達していない。さらなる効果増強法の開発が必要である。そこで以下の2つの臨床試験を計画した

#### (1)初発悪性神経膠腫に対するテモゾロミド併用WT1ペプチドワクチン療法 :

テモゾロミドは一価アルキル化薬であり、生理的pH条件下で非酵素的にメチルジアゾニウムイオンとなり、DNAをメチル化することにより抗腫瘍作用を示す。2007年9月日本において再発ならびに新規発生悪性神経膠腫の治療薬として認可され現時点で標準治療として位置づけられている。多くの化学療法剤は、腫瘍細胞のみならず増殖期にある正常細胞にも非特異的に影響を与え、抗原刺激によって増殖、活性化したリンパ球も同様に影響を受けるため、化学療法を受けた患者の免疫系は抑制されると考えられ、化学療法に免疫療法を同時に併用することに関して、化学療法剤による細胞傷害性T細胞へのマイナス面の影響、つまり癌細胞への殺細胞効果と同時に細胞傷害性T細胞に対する同様の作用が懸念されていた。テモゾロミドによる免疫細胞に与える影響について検討はまだ十分行われたとは言えない状況であるが、マウスin vivoの研究ではテモゾロミドと腫瘍ワクチンを併用した場合、腫瘍ワクチン単独より抗腫瘍免疫反応が増強し治療効果も増強されるという報告がある。またヒトの系ではEGFRvIII mutationを標的としたペプチドワクチン療法とテモゾロミドを併用した臨床試験が行われており、テモゾロミド単独のヒストリカルコントロールと比較して有意な無増悪生存を得ており、テモゾロミド投与と抗腫瘍免疫療法の併用療法は期待される治療法と考えられた。

#### (2)再発悪性神経膠腫を対象とした WT1 ヘルパーペプチドと WT1-CTL ペプチド併用療法 :

腫瘍免疫における最も重要なエフェクター細胞はHLA class I 拘束性 CD8 陽性 CTL (つまり、キラーT リンパ球) である。しかしながら、CTL ペプチドによる腫瘍抗原特異的 CTL の活性化だけでは十分な抗腫瘍効果が得られないことも明らかになりつつある。より強い CTL の誘導やその活性の維持における HLA class II 拘束性 CD4 陽性ヘルパーT リンパ球の重要性を示す研究結果が蓄積されている。

我々をはじめいくつかの研究室において、HLA class II 拘束性に WT1 タンパク特異的な CD4 陽性ヘルパーT リンパ球を誘導できる WT1 ヘルパーペプチドが同定された。WT1 ヘルパーペプチドにより誘導されたヘルパーT リンパ球は腫瘍免疫増強作用のある Th1 サイトカインを産生し、また、WT1 ヘルパーペプチドの刺激により WT1 特異的 CTL の誘導や活性化

を増強することを in vitro 実験において示している。

また、一般に、ヘルパーペプチドの HLA class II 拘束性は、CTL ペプチドの HLA class I 拘束性に比べて厳密でなく多種類の HLA class II 分子に結合できる。我々が同定した WT1<sub>332</sub> ヘルパーペプチドは HLA class II 型の HLA-DRB1\*04:05、15:01、15:02、08:03 および HLA-DPB1\*09:01、05:01 に結合する事を明らかにしている。それぞれの HLA を有する日本人の割合は 27%、12%、23%、20%、20% および 50% で、いずれかの HLA を有する割合は約 95% となりほとんどの日本人に適応可能である。

担癌マウスを用いた in vivo 実験では WT1-CTL ペプチドと WT1 ヘルパーペプチドを併用した場合、WT1-CTL ペプチド単独に比べ抗腫瘍効果の有意な増強を認めている。したがって、HLA-A\*24:02 のように WT1-CTL ペプチドが同定されている場合、WT1-CTL ペプチドと WT1 ヘルパーペプチドの併用療法は WT1-CTL ペプチド単独より抗腫瘍効果を期待できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2つの臨床試験を行い、臨床評価(安全性、臨床効果)と免疫学的反応(WT1 特異的免疫反応含む)の詳細な検討により有用性について明らかにする事である。

(1) 初発悪性神経膠腫に対するテモゾロミド併用 WT1 ペプチドワクチン療法と、(2) 再発悪性神経膠腫を対象とした WT1 ヘルパーペプチドと WT1-CTL ペプチド併用療法である。

## 3. 研究の方法

「初発悪性神経膠腫に対するテモゾロミド併用 WT1 ペプチドワクチン療法第 I 相臨床試験」と「WT1 ヘルパーペプチドを用いた再発悪性神経膠腫に対する免疫療法の第 I 相臨床試験」の両プロトコールは大阪大学医学部倫理委員会により平成22年3月認可され、平成22年4月より実施している。

(1) 初発悪性神経膠腫に対するテモゾロミド併用 WT1 ペプチドワクチン療法第 I 相臨床試験の対象は16歳以上80歳未満の HLA-A\*2402 を有する初発悪性神経膠腫の患者で、術後補助療法として放射線療法とテモゾロミドによる放射線化学療法を終了しているものとする。試験薬の投与量と投与方法については WT1-CTL ペプチド(改変型 mp235-243) は 3mg/body とし、モンタナイドアジュバントとエマルジョンを作成し皮内投与する。テモゾ

ロミドの投与法は標準的治療に準じ最大24クール目までとする。WT1 ペプチドワクチンの投与間隔は1週毎で開始し6週目以降は2週毎投与とした。

(2) 再発悪性神経膠腫を対象としたWT1ヘルパーペプチドとWT1 CTL ペプチド併用療法第I相臨床試験対象は16歳以上80歳未満のHLA-A\*2402を有する再発悪性神経膠腫で、テモゾロミド投与中に再発した症例もしくはテモゾロミドが副作用のため投与続行できない患者とする。WT1 ペプチドの投与量と投与方法 WT1-CTL ペプチド(改変型mp235-243)は3mg/bodyで固定とする。WT1ヘルパーペプチドは0.75mg、1.5mg、3mgでdose escalationを行う。WT1 ペプチドはモンタノイドアジュバントとエマルジョンを作成し皮下投与する。WT1 ペプチド投与のスケジュールWT1 CTL ペプチドは1週毎に計12回、WT1 ヘルパーペプチドは2週間毎に計6回投与を行う。

安全性評価ならびに推奨用量を決めるためWT1ヘルパーペプチド0.75mg、1.5mg、3mgそれぞれの群で3症例(～6症例)行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 初発悪性神経膠腫に対するテモゾロミド併用WT1ペプチドワクチン療法

2010年より初発悪性神経膠腫に対し放射線/テモゾロミド療法後のアジュバント療法としてテモゾロミド併用改変型WT1ペプチド(mp235-243)ワクチンを併用する化学免疫療法の第I相臨床試験を行い安全性に問題ない事が明らかとなった。現時点(2013年5月28日)で参加6例中5例が無再発生存を維持しており、その期間はそれぞれ、38、35、34、33、25ヵ月で初発悪性神経膠腫の標準治療の24ヵ月全生存率が約25%である事を考慮するとテモゾロミド併用WT1ペプチドワクチン療法は期待の持てる治療である事が明らかになった。

(2) 再発悪性神経膠腫を対象としたWT1ヘルパーペプチドとWT1-CTLペプチド併用療法：第I相臨床試験を2010年から大阪大学で行っている。12例の患者さんが参加されたが、ワクチン投与部位の発赤以外の有害事象を認めなかった。効果についてはWT1-CTLペプチドとWT1ヘルパーペプチドの併用群で参加12例中5例が12週目の評価でStable disease (SD)で、1年以上無増悪生存であったのが4例であった。内現在2名が無増悪生存を維持している。またWT1ヘルパーペプチドを併用した場合のWT1特異的CTLの誘導能はWT1-CTLペプチド単独ワクチン療法と比べ有意に亢進していた。WT1ヘルパー

ペプチドとWT1-CTLペプチド併用療法は期待の持てる治療である事を明らかになった。

#### 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)

[学会発表](計6件)

- ① 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、杉山治夫：WT1ペプチドワクチン効果増強を求めて-マウスモデルを基にした検討-、第16回日本がん免疫学会総会、2012年7月26日、ロイトン札幌
- ② 坪井昭博、橋本直哉、香川尚己、千葉泰良、岡芳弘、尾路祐介、保仙直毅、西田純幸、吉峰俊樹、杉山治夫：初発悪性神経膠腫を対象としたテモゾロミド併用WT1ペプチドワクチン第I相臨床試験、第16回日本がん免疫学会総会、2012年7月28日、ロイトン札幌
- ③ 橋井佳子、坪井昭博、西田純幸、尾路祐介、岡芳弘、杉山治夫：WT1ペプチドワクチンを用いた小児固形がんに対する免疫療法、第16回日本がん免疫学会総会、2012年7月28日、ロイトン札幌
- ④ 坪井昭博、橋本直哉、岡芳弘、香川尚己、木下学、木嶋教行、千葉泰良、尾路祐介、保仙直毅、西田純幸、吉峰俊樹、杉山治夫：初発悪性神経膠腫を対象としたテモゾロミド併用WT1ペプチドワクチン第I相臨床試験、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、ロイトン札幌
- ⑤ 木嶋教行、保仙直毅、香川尚己、木下学、橋本直哉、杉山治夫、吉峰俊樹：グリオブラストーマにおけるWT1(Wilm's tumor 1)の機能的役割、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、ロイトン札幌
- ⑥ 尾路祐介、福田茉莉、森井英一、辰巳直也、北條望、村上由依、斎藤千紗恵、鈴木望友、川田紗世、澄川美穂子、坪井昭博、岡芳弘、杉山治夫：固形癌におけるWT1発現の免疫組織化学法による評価、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、ロイトン札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 昭博 (TSUBOI AKIHIRO)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号：10372608

(2) 研究分担者

橋本 直哉 (HASHIMOTO NAOYA)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号：90315945