

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592123

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍に対するWT1ペプチドワクチン療法の予後予測因子と免疫逃避に関する研究

研究課題名(英文) Predictive/prognostic factors and escape phenomenon on WT1 peptide vaccination against malignant gliomas

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫に対するWT1ペプチドワクチン療法における予後予測因子と免疫逃避機構の解明を試み、CTLペプチドワクチン療法とヘルパーペプチド併用療法の予後予測因子として、末梢血におけるメモリーT細胞のphenotype、WT1 mRNAの高発現、DTHの早期陽転化、methionine PRM (parametric response map)を同定、確立した。WT1ペプチドワクチン療法における免疫逃避現象は、WT1分子とHLA class I分子発現の減弱、Tregの増加がその機序であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have tried to reveal the predictive or prognostic factors on WT1 peptide vaccination against malignant gliomas. As those factors, a phenotype of memory T cells in peripheral blood, high expression of WT1 mRNA, an early positive turning of DTH and methionine parametric response map (PRM) were confirmed. We have also shown that the escape phenomena from WT1 vaccination was in part due to a decrease of WT1/HLA class I molecule expression and an increase of Treg in tumor microenvironment.

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：WT1 ペプチドワクチン 悪性神経膠腫 治療反応性 予後因子 脳腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫の治療成績は極めて不良であるが、申請者らは WT1 ペプチドワクチン療法を悪性神経膠腫に適用し、再発腫瘍患者での臨床第 II 相試験の結果から、高い病勢コントロール率 (54.7%) と生存期間の延長を報告した (J Neurosurg 2008 108(5):963)。このことから WT1 CTL ペプチドワクチン療法の再発腫瘍に対する安全性と有効性が確立されており、本研究開始当初は 2 つの新規臨床試験を遂行中であった。申請者らは WT1 ペプチドワクチン療法の効果が患者によって異なることに着目し、患者固有の因子、腫瘍の生物学的因子、放射線学的因子、免疫学的因子など様々な観点から、予後や治療反応性の予測因子を検討していた。その結果、治療前の末梢血における CD4 陽性分画の central memory T cell (CM) と CD8 陽性分画の effector memory T cell (EM) の頻度が高いこと、治療前の腫瘍細胞における WT1 発現レベルが高いこと、WT1 ペプチド投与中の delayed type hypersensitivity (DTH) の陽転化、および投与開始後 12 週における methionine PET (met PET) の取り込み率低下、が強力な予後予測因子である可能性を見いだした。さらに、治療に不応であった症例のペプチドワクチン投与後の手術標本における免疫学的解析では、治療前に比して腫瘍細胞の WT1 発現レベルが低下し、HLA class I 分子の発現も減弱しており、WT1 特異的免疫からの逃避機構が存在する可能性を示していた。

2. 研究の目的

前述のごとく、WT1 CTL ペプチドワクチン療法についての研究から、治療反応性-予後予測因子の候補として末梢血 T 細胞の phenotype、腫瘍の WT1 発現、DTH 陽転化、methionine PET の取り込み率が挙げられた。治療不応例では免疫逃避機構が関与する可能性が示唆された。本研究は、新たに開発した WT1 ヘルパーペプチドワクチン療法を含めた、研究開始当初に遂行中であった複数の臨床試験において、これらの予後予測因子を新たな手法で検証し、治療不応例における免疫逃避機構を解明して、WT1 ペプチドワクチン療法の適応確立に還元することを目的とした。

3. 研究の方法

研究開始当初に遂行中であった臨床試験の患者から得られた臨床情報や検体と用い、以下 A, B, C の解析方法にて研究を遂行した。
A. CTL ペプチドワクチン療法における予後予測因子の同定と検証: 予後予測因子の候補である - について、それぞれを新たな手法で検出した。末梢血における CD4 陽性分画の CM と CD8 陽性分画の EM の高頻度、治療前の腫瘍細胞における WT1 遺伝子産物の高

発現、WT1 ペプチド投与中の delayed type hypersensitivity (DTH) 反応、治療前後の methionine PET (met PET) における評価、である。それぞれ得られた結果を生存期間や MRI による治療反応と比較検討し、予後予測因子として確定を試みた。

B. ヘルパーペプチド併用療法の予後予測因子の検索と検証: ヘルパーペプチドを併用した患者にて A の - を解析するとともに、末梢血単核球を WT1 ヘルパーペプチドで刺激し、産生される Interferon- (IFN-) を測定することで WT1 ヘルパーペプチド特異的 CD4 陽性細胞を定量化し、末梢血中の抗 WT1 IgG 抗体価を測定し、予後予測因子をなりうるか検証を試みた。

これら A, B の解析にて明らかとなる予後予測因子候補と MRI による治療効果判定、無増悪生存期間 (PFS)、全生存期間 (OS) などの関係性について、統計学的に解析を試みた。

C. WT1 ペプチドワクチン療法における免疫逃避現象の解明: 手術標本において、WT1, HLA class I 発現の治療前後の変化を免疫組織化学的に検証するとともに、腫瘍内浸潤リンパ球のサブセット解析を行い、CD3, CD4, CD8, CD79 陽性細胞群、制御性 T 細胞 (Treg)、マクロファージのうち、腫瘍に局在し、殺腫瘍細胞効果を発揮すると考えられる T 細胞の動態把握を試みた。

4. 研究成果

A. 予後予測因子の同定と検証: 末梢血における phenotype 解析: 治療前に CM や EM の頻度が増加している場合、予後が良好であることが明らかとなった。WT1 遺伝子産物の高発現: 従来の免疫組織化学による評価と同じく、WT1 mRNA が高発現している症例の予後は良好であった。DTH 反応: DTH が早期に陽転化する症例は予後が比較的良好であることが示唆された。methionine PRM (parametric response map として開発) と MRI-RECIST による評価と全生存期間の関連を検討した結果、methionine PRM の方が全生存期間とよく相関することが示され、報告した (Chiba Y et al., J Neurosurg 116 (4), 835-842, 2012)。

B. ヘルパーペプチド併用療法の予後予測因子の検索と検証: A における - の評価を同様に行った。結果は多少の差異はあるものの、A で得られたものとほぼ同等の結果であり、現在その差異について統計学的に検討を継続している。

C. WT1 ペプチドワクチン療法における免疫逃避現象の解明: 症例を 20 症例に拡大でき、WT1 ペプチドワクチン療法後で、WT1, HLA class I 発現について免疫組織化学的に検討、双方がペプチドワクチン療法後に減弱することを見いだした。腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) のサブセット解析として、CD3, CD4, CD8, CD79 陽性細胞群、制御性 T 細胞 (Treg)、マクロファージなどの細胞動態の解

析を行った。TIL は増加しているものの、Treg の増加も認められ、これらの症例は WT1 ペプチドワクチン療法に不応であったことから、WT1 と HLA class I 分子発現の減弱や Treg の増加が免疫逃避現象の機序であると考えられた。

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 19 件)

1. Kinoshita M, Sasayama T, Narita Y, Yamashita F, Kawaguchi A, Chiba Y, Kagawa N, Tanaka K, Kohmura E, Arita H, Okita Y, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Hashimoto N, Yoshimine T. Different spatial distribution between germinal center B and non-germinal center B primary central nervous system lymphoma revealed by magnetic resonance group analysis. *Neuro Oncol*.2014. Feb 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24497406.
2. Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Kinoshita M, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T. Ims' tumor 1 is involved in tumorigenicity of glioblastoma by regulating cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res*.2014. 34(1) 61-7. 査読有
3. Nomura K, Kazui H, Tokunaga H, Hirata M, Goto T, Goto Y, Hashimoto N, Yoshimine T, Takeda M. Possible roles of the dominant uncinat fasciculus in naming objects: A case report of intraoperative electrical stimulation on a patient with a brain tumour. *Behav Neurol*. 2013;27(2):229-34.doi:10.3233/BEN-110249 PubMed PMID: 23242348. 査読有
4. Lin Y, Fujiki F, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tani S, Nakajima H, Tatsumi N, Morimoto S, Tamanaka T, Tachino S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. HLA-DPB1*05:01-restricted WT1332-specific TCR-transduced CD4+ T lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a cytotoxicity against leukemia cells. *J Immunother*.2013.36(3). 159-70.DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182873581. 査読有
5. Tachino S, Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Morimoto S, Lin YH, Tamanaka T, Kondo K, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Functional human Th17 clones with WT1-specific helper activity. *Cancer Immunol Immunother*.2013.62(4):801-10.DOI: 10.1007/s00262-012-1385-3. 査読有
6. Kinoshita M, Arita H, Goto T, Okita Y, Isohashi K, Watabe T, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T. A novel PET index, 18F-FDG-11C-methionine uptake decoupling score, reflects glioma cell infiltration. *J Nucl Med*. 2012 Nov;53(11):1701-8. doi:10.2967/jnumed.112.104992. Epub 2012 Sep 21. PubMed PMID: 23000747. 査読有
7. Arita H, Kinoshita M, Okita Y, Hirayama R, Watabe T, Isohashi K, Kijima N, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T. Clinical characteristics of meningiomas assessed by (11)C-methionine and (18)F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography. *J Neurooncol*.2012 107(2): 379-386. 査読有
8. Chiba Y, Kinoshita M, Okita Y, Tsuboi A, Isohashi K, Kagawa N, Fujimoto Y, Oji Y, Oka Y, Shimosegawa E, Morita S, Hatazawa J, Sugiyama H, Hashimoto N, Yoshimine T: Use of (11)C-methionine PET parametric response map for monitoring WT1 immunotherapy response in recurrent malignant glioma. *J Neurosurg*.2012.116(4): 835-842. 査読有
9. Hashimoto N, Rabo CS, Okita Y, Kinoshita M, Kagawa N, Fujimoto Y, Morii E, Kishima H, Maruno M, Kato A, Yoshimine T: Slower growth of skull base meningiomas compared with non-skull base meningiomas based on volumetric and biological studies. *J Neurosurg*. 2012 Dec 16. 116(3): 574-580. (corresponding author) 査読有
10. Kinoshita M, Goto T, Arita H, Okita Y, Isohashi K, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Shimosegawa E, Saitoh Y, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T: Imaging ¹⁸F-fluorodeoxyglucose/¹¹C-methionine uptake decoupling for identification of tumor cell infiltration in peritumoral brain edema. *J Neurooncol*. 2012.106(2):417-25. 査読有
11. Arita H, Kinoshita M, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Hashimoto N, Yoshimine T: (11) C-methionine uptake and intraoperative 5-aminolevulinic

- acid-induced fluorescence as separate index markers of cell density in glioma: A stereotactic image-histological analysis. *Cancer* 2012.118(6) : 1619-1627, 査読有
12. Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Nakano A, Fujimoto Y, Kinoshita M, Sugiyama H, Yoshimine T: CD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule is expressed on glioblastoma progenitor cells and involved in the regulation of tumor cell invasion. *Neuro Oncol.* 2012.14 (10), 1254-1264. 査読有
 13. Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Tanaka Y, Fujiki F, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Maruno M, 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 α -chain variable region genes of Wilms' tumor gene (WT1)-specific CD8(+) T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Sci.*2012. 103(3) : 408-414. 査読有
 14. Wakabayashi T, Kayama T, Nishikawa R, Takahashi H, Hashimoto N, Takahashi J, Aoki T, Sugiyama K, Ogura M, Natsume A, Yoshida J: A multicenter phase I trial of combination therapy with interferon- γ and temozolomide for high-grade gliomas (INTEGRA study): the final report. *J Neurooncol.* 2011 Sep;104(2):573-7. 査読有
 15. Fujimoto Y, Hashimoto N, Kinoshita M, Miyazaki Y, Tanaka S, Yakushijin T, Takehara T, Kagawa N, Yoshimine T. Hepatitis B virus reactivation associated with temozolomide for malignant glioma: a case report and recommendation for prophylaxis. *Int J Clin Oncol.* 2012 Jun;17(3):290-3. doi: 10.1007/s10147-011-0294-3. Epub 2011 Aug 3. 査読有
- [学会発表](計 144 件)
1. 橋本直哉 脳腫瘍に対するペプチドワクチン療法の現状と展望
第 61 回日本脳神経外科学会 近畿支部学術集会 2011 年 4 月 2 日大阪
 2. Hashimoto Naoya, WT1 immunotherapy for malignant glioma: recursive partitioning analyses and prognostic factors.
5th International Conference on WT1 IN Human Neoplasia 2011 年 4 月 16 日 Torino
 3. 橋本直哉 悪性グリオーマに対する WT1 ペプチドワクチン療法: Recursive partitioning analysis (RPA)と予後予測因子
第 15 回日本がん免疫学会総会 2011 年 6 月 30 日 大阪
 4. 橋本直哉 グリオーマに対するペプチドワクチン療法の現状と展望
第 6 回和歌山脳腫瘍研究会 2011 年 7 月 9 日 和歌山
 5. 橋本直哉 悪性グリオーマに対する WT1 免疫療法: Recursive partitioning analysis と予後予測因子
第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 4 日 横浜
 6. 橋本直哉 悪性グリオーマに対する集学的治療としての WT1 ペプチドワクチン療法
第 70 回日本脳神経外科学会総会 2011 年 10 月 12 日 横浜
 7. Hashimoto Naoya, WT1 immunotherapy for malignant gliomas: recursive partitioning analyses and prognostic factors.
16th Annual Scientific Meeting of Society for NeuroOncology 2011 年 11 月 18 日 California
 8. 橋本直哉 WT1 ペプチドワクチン療法を併用した集学的治療
第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会 2011 年 11 月 28 日 岐阜
 9. 橋本直哉 グリオーマの標準的治療とペプチドワクチン療法
第 2 回 JBTA 関西地区セミナー 2012 年 1 月 14 日 大阪
 10. Hashimoto Naoya, WT1 peptide vaccination for malignant gliomas as a part of multi-modal therapy.
The 9th meeting of Asian Society for Neuro-Oncology 2012 年 4 月 21 日 Taipei
 11. 橋本直哉 悪性グリオーマに対するペプチドワクチン療法の現状と展望
第 32 回日本脳神経外科コンgres総会 2012 年 5 月 13 日 横浜
 12. 橋本直哉 WT1 ペプチドワクチン療法 - グリオーマの集学的治療を目指して -
福島脳腫瘍学術講演会 2012 年 9 月 4 日 福島
 13. 橋本直哉 膠芽腫における WT1 遺伝子産物の機能的役割
第 13 回日本分子脳神経外科学会 2012 年 9 月 20 日 熊本
 14. 橋本直哉 臨床試験にかかる画像上の治療効果判定について
海馬会・京都神経外科医クラブ総会 2012 年 10 月 6 日 京都
 15. 橋本直哉 グリオーマに対する WT1 ペプチドワクチン療法を併用した集学的治療
日本癌治療学会学術集会 2012 年 10 月 26 日 横浜
 16. Hashimoto Naoya, WT1 peptide vaccination for newly diagnosed

- glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide.
SNO 17th Annual Scientific Meeting 2012年11月17日 Washinton
17. Hashimoto Naoya, WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide.
The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia 2012年11月23日 Kyoto
18. 橋本直哉 RANOによる効果判定は全生存期間と最もよく相関する-WT1 免疫療法における解析-
第30回日本脳腫瘍学会学術集会 2012年11月25日 広島
19. 橋本直哉 WT1 ペプチドワクチン療法のこれまでとこれから
第1回 Neuro-Oncology West 2012年12月8日 大阪
20. 橋本直哉 グリオーマに対する免疫療法の現状と展望
脳研セミナー 2013年1月11日 北海道
21. 橋本直哉 脳腫瘍における分子細胞遺伝子学的情報の重要性とその検査体制について
第74回大阪大学脳神経外科関連施設臨床懇話会 2013年1月13日 豊中
22. Hashimoto Naoya, WT1 peptide vaccination for malignant gliomas; basic findings and clinical trials.
The 4th Joint Neurosurgical Convention (4th JNC) 2013 2013年2月1日 Hawaii
23. 橋本直哉 グリオーマの臨床試験における画像効果判定基準について
第42回日本神経放射線学会 2013年2月15日 福岡
24. 橋本直哉 初発膠芽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17回がん免疫学会総会 2013年7月4日 山口
25. Hashimoto Naoya, WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide.
15th WFNS World Congress of Neurosurgery (WFNS2013) 2013年9月12日 Seoul
26. 橋本直哉 グリオーマに対するペプチドワクチン療法の現状と展望
脳腫瘍セミナー in Sendai 2013 2013年9月25日 宮城
27. 橋本直哉 グリオーマ臨床試験における効果判定基準の比較検討
第72回日本癌学会学術総会 2013年10月5日 横浜
28. 橋本直哉 グリオーマに対するペプチドワクチン療法の現状と展望
神奈川脳腫瘍フォーラム 2013年10月11日 横浜
29. 橋本直哉 グリオーマの臨床試験における画像効果判定基準の検証
第72回日本脳神経外科学会学術総会 2013年10月18日 横浜
30. Hashimoto Naoya, A direct comparison of response assessments in a phase II clinical trial of WT1 peptide vaccination; Macdonald, RECIST and RANO criteria.
SNO 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology 2013年11月24日 Sanfrancisco
31. 橋本直哉 グリオーマの WT1 ペプチドワクチン療法; バイオマーカーの探索と免疫的応答
第31回日本脳腫瘍学会学術集会 2013年12月9日 宮崎
32. 橋本直哉 グリオーマの治療における効果判定基準の検証
第37回日本脳神経 CI 学会総会 2014年2月28日 茨城
- 〔図書〕(計 件)
- 〔産業財産権〕
○出願状況(計 件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
- 取得状況(計 件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:
- 〔その他〕
ホームページ等
6. 研究組織
- (1)研究代表者
橋本 直哉 (HASHIMOTO, Naoya)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 90315945
- (2)研究分担者
坪井 昭博 (TSUBOI, Akihiro)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号: 10372608
- 木下 学 (KINOSHITA, Manabu)
大阪府立成人病センター・医長

研究者番号：40448064

(3)連携研究者
()

研究者番号：