

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592148

研究課題名(和文) WT1免疫療法における脳局所の抑制系・促進系免疫機序の解明と抑制克服法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the immunotherapy targeting WT1, and its promoting and inhibiting mechanism in the brain

研究代表者

泉本 修一 (IZUMOTO, SHUICHI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40324769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫に対してWT1ワクチン療法を行い、WT1免疫獲得効果が高いこと、約6割の有効群と4割の効果の乏しい群に分かれることを明らかにした。テモゾロミド化学療法下でのワクチン治療で血中リンパ球の総量は減少するが、WT1キラーT細胞の頻度はやや上昇しており、化学療法下でも免疫反応は確保されていた。組織でのT細胞は脳腫瘍組織内での集積と、血管周囲での集積に分かれ、WT1が腫瘍細胞だけでなく腫瘍新生血管内皮細胞に発現し、WT1ワクチン治療の攻撃対象となると考えられた。マウスモデル研究では、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞の出現がみられたが、Treg細胞出現やinterferon の発現に差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The frequency of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes in blood was increased during the WT-1 vaccination for the patients with brain tumors. But the clinical response was divided into 60% of effected group and 40% of ineffective group. During the combined treatment of TMZ/RT, the frequency of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes in blood was increased from 0.196% to 0.256%. Immunohistochemical analysis of the sections obtained by surgery during the WT1 vaccination revealed that WT1-immunodetected cells were both glioma cells and neo-vascular endothelial cells. Accumulation of T cells was divided into two groups. One was the group around the tumor cells and the other was the group near the neo-vascular endothelial cells, those were facilitating the immune response. In the 203G-bearing C57BL6 mouse model, CD4+ and CD8+ T cells were detected but Treg cells were not increased in the brain. In the mouse model, the accumulation of immune cells was not related well with the immune response.

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 膠芽腫 免疫療法 がんワクチン療法

### 1. 研究開始当初の背景

最近の分子生物学的研究により、多くの癌抗原(Tumor Associated Antigens; TAAs)が免疫治療の標的とされる。Wilms'tumor 1(WT1)もこのような TAA として認識され、私達は WT1 がほとんどすべての固形がん で高発現し、とくに悪性神経膠腫の 96%で発現、その発現度は腫瘍増殖度に相関することを確認した。そのうえで WT1 癌ワクチン療法の第 1 相試験、さらに第 2 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。2009 年にはこれまでに報告された癌ワクチン療法 75 種のうち、標的抗原としての研究を優先させる候補のトップにランクされた。WT1 を標的としたがん免疫療法は、ほとんどの悪性神経膠腫に適応可能と思われる。WT1 ワクチン治療の基礎および臨床試験の結果、固形がんの中でも脳腫瘍で WT1 免疫獲得効果が高いこと、しかしながら、約 6 割の有効群と 4 割の効果の乏しい群に分かれることが明らかになった。

### 2. 研究の目的

有効・無効の原因となる末梢血中の免疫動態を明らかにしたが、腫瘍への攻撃は脳組織の局所で起こっており、局所において Treg 細胞などのさまざまなチャンネルによる腫瘍免疫抑制が働くと想定される。そこでヒト脳腫瘍およびマウス脳腫瘍モデルにおいて WT1 ワクチン治療前後の局所での獲得性免疫動態を明らかにし、抑制系および促進系免疫機序の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒト脳腫瘍およびマウス脳腫瘍モデルにおいて WT1 ワクチン治療前後の局所での獲得性免疫動態を明らかにし、WT1 特異的キラー T 細胞を中心とする促進系および Treg 細胞を中心とする抑制系の免疫機序の解明をする。ヒトにおいて、血液より WT1 キラ

ー T 細胞のテトラマーアッセイおよび FCM で免疫動態を評価する。またヒトにおいて、治療中腫瘍再増大、あるいは腫瘍内出血を生じ手術した腫瘍組織および辺縁組織の蓄積がある。これらを用いて免疫組織学的解析により、腫瘍抗原に対する免疫応答の詳細な解析、とくに TMZ 治療時および WT1 ワクチン治療併用時の免疫担当細胞の動態解析を行う。正常マウス、および担脳腫瘍(神経膠腫)マウスを作成する。それらに対して脳組織内 WT1 特異的免疫担当細胞の動態解析を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト脳腫瘍研究

悪性神経膠腫患者における WT1 特異的 T 細胞の割合と数が、テモゾロミド・放射線治療(TMZ/RT 併用療法)によりどのように変化するかを調べた。すなわち、初発悪性神経膠腫患者 22 名を対象に、TMZ/RT 併用療法開始前と 6 週終了後に末梢血リンパ球中 CD8 陽性 T 細胞、制御性 T(Treg)細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラー T(NKT)細胞の割合と数を測定した。WT1 免疫治療患者 12 名には、WT1 特異的 T 細胞の割合と数、その中の 4 分画(ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、エフェクターメモリー細胞、エフェクター細胞)の割合も測定した。結果、リンパ球数は、WT1 療法前の  $1300\text{cells}/\text{mm}^3$  が、TMZ/RT 併用療法 6 週終了後に  $631\text{cells}/\text{mm}^3$  と有意に減少した。CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞の割合は変化を認めなかったが、絶対数が有意に減少した。Treg 細胞の割合は WT1 療法前が 4.83%から TMZ/RT 併用療法 6 週終了後には 7.50%と増加したが、絶対数は有意な変化を示さなかった。WT1 特異的 T 細胞は治療前 0.196%が、TMZ/RT 併用療法 6 週終了後に 0.256%と上昇傾向を示した。WT1 特異的 T 細胞の中の 4 分画の割合に変化は認

めなかった。結論として、Treg 細胞は TMZ/RT 併用療法によって割合が増加するという所見が得られた。WT1 特異的 T 細胞は TMZ/RT 併用療法によって、数は有意に減少したが割合は増加傾向を示し、その後の TMZ 維持療法中、一部の患者で増加した。TMZ 維持療法中に WT1 免疫療法を行うことにより効果的に抗腫瘍効果が誘導される可能性が考えられた。

「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の第 相臨床多施設共同研究」を平成 22 年 5 月から実施し、7 名に対してその安全性・有効性を検討した。TMZ/RT 初期治療終了後に TMZ5 日間連続投与を 1 カ月ごとに繰り返し、その間に WT1 を毎週計 7 回投与し、安全性を評価、有効群はその後も継続して 2 週間に 1 度投与を繰り返した。結果、安全性は確保され、併用による有意なリンパ球総数の減少は見られなかった。

WT1 ペプチド投与による有効性と WT1 特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞の免疫応答との関係を解析した。すなわち WT1 CTL epitope 投与によって反応した WT1 特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞からの IFN- $\gamma$ 、IL-10 の発現量を RT-PCR により評価した。結果、WT1 ペプチドワクチン療法有効群はワクチン投与 4 週間後から投与終了後にかけて IL-10 type のヘルパー T 細胞の反応から IFN- $\gamma$  type のヘルパー T 細胞の反応にシフトしていた。

総括すると、WT1 特異的 T 細胞は TMZ/RT 併用療法によって、数は有意に減少したが割合は増加傾向を示し、その後の TMZ 維持療法中、一部の患者で増加した。TMZ 維持療法中に WT1 免疫療法を行うことにより効果的に抗腫瘍効果が誘導される可能性が考えられた。

初発治療での血液中獲得免疫を評価するため WT1 キラー T 細胞のテトラマーアッセイ

および FCM で評価したところ、テモゾロミド 癌化学療法下でのワクチン治療で血中リンパ球の総量は減少しているにもかかわらず、WT1 キラー T 細胞の頻度は不変であり、化学療法下でも WT1 ワクチン治療免疫反応は確保されていることがわかった。組織での T 細胞の集積は脳腫瘍組織内で集積するものと、血管周囲に集積するものとに分かれることが明らかになった。WT1 が腫瘍細胞だけでなく、腫瘍新生血管内皮細胞に発現し、患者ごとに分別し治療反応と比較すると、血管周囲に WT1 が発現するものに成績が良い傾向があり、血管内皮細胞が WT1 ワクチン治療の攻撃対象となる可能性が示唆された。(2) マウスモデル研究では、マウスグリオーマ細胞 203G が WT1 を発現していることを免疫染色で確認した。正常マウス (C57BL/6) および同系 203G マウスグリオーマ細胞を移植した担脳腫瘍マウスを作成し、個体レベルで WT1 特異的 CTL は誘導され上昇していた。脳内には、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞の免疫担当細胞の出現がみられた。しかし Treg 細胞の出現を検討したが大幅な免疫担当細胞の変更はみられなかった。Treg 細胞に強い作用をもつ interferon  $\gamma$  の発現度に差はみられなかった。マウスモデルで WT1 ワクチン治療において有効無効の明らかな差は確認できなかった。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) Hori M, Oji Y, Izumoto S (26 名省略)  
Comparison of Gwet 's AC1 with Fleiss 's kappa as an index for inter-examiner reliability of diagnosis in immunohistochemical evaluation of WT1 expression in tumors. Japanese Journal of IT Healthcare (査読あり) (in press).
- (2) Oji Y, Izumoto S, Sugiyama H (25 名

省略) The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. Int J Oncol(査読あり)

44:1461-1469, 2014.

(3) 上田順二、友金祐介、泉本修一(4名省略) 頭頂葉腫瘍症例におけるGerstmann症候の検討. 兵医大医会誌(査読あり)38:89-96, 2014.

(4) Yamamoto A, Mori K, Arita N(3名省略) Steroid responsive anti-Hu-associated paraneoplastic encephalitis with bilateral frontal lobe lesions. Clinical neurology (査読あり)53:273-277, 2013.

(5) Tomokane Y, Mori K, Izumoto S(7名省略) Usefulness of PRESTO-MRI study for the differentiation between schwannoma and meningioma in the cerebellopontine angle. Neurol Med Chir (Tokyo) (査読あり) 53:482-489, 2013.

(6) Morimoto S, Oka Y, Izumoto S(18名省略) Biased usage of T cell receptor-chain variable region genes of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific CD8(+) T cells in patients with solid tumors and healthy donors. Cancer Sci (査読有) 103:408-414, 2012.

(7) Izumoto S. Peptide vaccine. Review Adv Exp Med Biol (査読有) 746: 166-177, 2012.

(8) 泉本修一、森鑑二、藤田重一(4名省略) 高次機能障害の観点からみた高齢者に対する髄膜腫の手術治療 Geriatric Neurosurgery (査読無) 24: 15-20, 2012.

[学会発表](計10件)

(1) Oji Y, Izumoto S, Sugiyama H(28名省略) Harmonization of immunohistochemical evaluation of WT1 expression and monitoring of

WT1-specific humoral immune response. The 7<sup>th</sup> International Conference on WT1 in human neoplasia 2013年4月22-23日, Barcelona, Spain

(2) 橋本直哉, 坪井昭博, 泉本修一(7名省略) 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回日本がん免疫学会総会 2013年7月13-15日 山口

(3) 友金祐介, 森鑑二, 泉本修一(4名省略) 髄膜腫と神経鞘腫の鑑別にMRI磁化率強調画像(PRESTO法)は有用である. 第72回日本脳神経外科学会第72回学術総会 2013年10月16-18日 横浜

(4) 友金祐介, 森鑑二, 泉本修一(5名省略) 小脳橋角部髄膜腫と神経鞘腫の鑑別にMRI磁化率強調画像(PRESTO法)は有用である. 第31回日本脳腫瘍病理学会 2013年5月24-25日 東京

(5) 若田ゆき, 森鑑二, 有田憲生, 池田譲太, 森川努(6名省略) 悪性リンパ腫の治療前後でのPRESTO信号の変化. 第72回日本医学放射線学会総会 2013年4月11-14日 横浜

(6) Izumoto S, Hashimoto N, Arita N(4名省略) Clinical and immunological evaluation of WT1(Wilms tumor gene 1) peptide vaccination for patients with recurrent adult PNET and glioblastoma. 19th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, 2012年6月21-24日 Niagara Falls, Canada

(7) Arita N, Uchida K, Izumoto S, Tomogane Y(3名省略) Late radiation injury evaluated by MR susceptibility weighted images in long-term survivors of intracranial germ cell tumors. 19th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, 2012年6月21-24日 Niagara Falls, Canada

(8)Oji Y, Berneman, Izumoto S (14名省略) International Harmonization on Evaluation of WT1 Positivity in Solid Cancers. 6th international conference on WT1 in human neoplasia. 2012年11月22-23日 Kyoto, Japan

(9)泉本修一、森鑑二、友金祐介(1名省略) 悪性脳腫瘍における組織 WT1 タンパク発現形式の検討とワクチン治療効果 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会 2012 年 11 月 25 日-27 日 広島

(10) 橋本 直哉, 坪井 昭博, 泉本 修一 (7 名省略) 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. 第 50 回日本癌治療学会 2012 年 10 月 25 - 27 日横浜

[図書](計1件)

(1)Izumoto S. Peptide Vaccine In; Glioma: Immunotherapeutic Approach. chapter.13(ed. Yamanaka R) pp166-177 April 23, 2012. Landes Bioscience, Austin, TX.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

泉本 修一 (IZUMOTO, SHUICHI)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40324769

### (2)研究分担者

森 鑑二 (MORI, KANJI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50360269  
友金 祐介 (TOMOGANE, YUSUKE)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10412008  
有田 憲生 (ARITA, NORIO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80159508