

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591164

研究課題名(和文)手術不能胸部悪性腫瘍に対するWT1ペプチド免疫治療の開発とその免疫動態の解析

研究課題名(英文)Development of WT1 peptide-based immunotherapy for inoperable thoracic malignant tumors, and analysis of immunodynamics of the novel therapy

研究代表者

岡 芳弘 (OKA, Yoshihiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：20273691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子レベルで癌抗原WT1特異的免疫応答を解析するために、WT1-CTL(cytotoxic T lymphocyte)ペプチドをHLA class I拘束性に、WT1-ヘルパーペプチドをHLA class II拘束性に認識できるT細胞レセプターを、それぞれ、遺伝子クローニングした。ヘルパー活性を持つWT1特異的Th17細胞を同定した。網羅的遺伝子発現解析により、急性白血病患者末梢血のWT1特異的CTLのeffector-memory分画に、分子的に区別できる2つの細胞集団があることを示した。

胸部領域を含む悪性腫瘍に対し、WT1ペプチド免疫治療(WT1ペプチドワクチン)を継続的に行った。

研究成果の概要(英文)：In order to molecularly analyze cancer antigen WT1-specific immune response, we cloned a gene for T cell receptor that recognizes WT1-CTL(cytotoxic T lymphocyte) peptide with the restriction of HLA class I, and two distinct genes for those that recognize WT1-helper peptide with the restriction of HLA class II, respectively. We identified WT1-specific Th17 cells with helper function. Using the method for comprehensive analysis of gene expression profiles at a single cell level, we found that there are molecularly distinct two subpopulations in effector-memory subset of WT1-specific CTLs in peripheral blood mononuclear cells of acute myeloid leukemia patients.

We successively performed WT1 peptide-based immunotherapy (WT1 peptide vaccine) for patients with malignancies, including inoperable thoracic malignant tumors.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：WT1 免疫治療 悪性腫瘍 T細胞レセプター CTL ペプチドワクチン 癌抗原 Th17

1. 研究開始当初の背景

外科治療の適応とならない、あるいは、再発した肺癌や胸腺癌は難治性であり、これらを含む呼吸器内科領域(胸部領域)で扱う悪性腫瘍に対する新しい治療法の開発が望まれていた。その新しい治療法のひとつが免疫治療であった。

一方、我々は、多くの悪性腫瘍で発現している WT1 タンパクが癌免疫療法の標的抗原になり得ることを世界に先駆けて発見し、WT1 を標的とした免疫療法を開発・確立するための基礎研究成果を積み重ねてきた。また、2001年からは、肺癌などの固形癌や白血病などの造血器腫瘍患者に対して、実際に、臨床試験として WT1 ペプチドワクチンを投与し免疫治療を行ってきた。そして、ワクチン治療による WT1 特異的免疫応答の誘導やそれによると考えられる臨床反応を多く経験した。

上記のように、肺癌や胸腺癌などの胸部悪性腫瘍を含む悪性腫瘍に対する新しい治療法の開発が必要とされており、そして、我々は、その新しい治療法のひとつである癌免疫療法を発展させるための基礎研究、ならびに、臨床研究の実績を備えていた。

2. 研究の目的

早期に発見された肺癌に対しては、手術療法が第1の治療選択となる。しかしながら、手術後に再発した肺癌やもともと手術適応のない肺癌は一般に難治性である。また、その他にも手術不能の胸腺癌などの難治性胸部悪性腫瘍は存在する。前の「研究開始当初の背景」のところに記載したように、我々は、WT1 タンパクが抗腫瘍免疫療法の標的となり得ることを世界に先駆けて発見し、また、WT1 ペプチドワクチンを用いた癌治療の臨床的成果を有しているため、癌抗原 WT1 を標的とした癌免疫治療をさらに発展させ、確立し、難治性悪性腫瘍(上記の手術不能あるいは再発肺癌など)の治療に役立てることが、本研究の目的であった。そのために、癌免疫機構を細胞生物学的、ならびに、分子生物学的に詳細に解析し、その癌免疫機構を解明するための基礎データを集積することを目指した。また、悪性腫瘍に対する WT1 ペプチドワクチンを用いた免疫治療の臨床試験の続行やさらなる発展を目指した。同時に、その臨床試験から得られる臨床検体の蓄積(癌免疫治療時の免疫動態の解析などに有用と思われる)を図った。

3. 研究の方法

癌免疫機構を詳細に解析するためには、細胞レベルでの解析とともに、分子レベル、遺伝子レベルでの解析が重要である。一方、癌抗原特異的に反応し癌細胞に障害を与える上で最も主要な役割を演ずるのは、CD8 陽性の細胞障害性 T リンパ球(CTL)である。したがって、WT1 特異的 CTL が持つ T 細胞レセ

プター(TCR)の遺伝子クローニングを試みた。また、CTL だけでなく、癌抗原特異的ヘルパー T リンパ球も癌免疫応答において重要な働きを持つ。したがって、WT1 特異的ヘルパー T リンパ球が持つ TCR の遺伝子クローニングも試みた。

我々が以前に同定した WT1-332 ペプチドは、WT1 特異的 Th1 型ヘルパー T リンパ球を誘導できる WT1 ヘルパーペプチドである。その WT1-332 ペプチドが他のタイプのヘルパー T リンパ球(Th17 など)を誘導できるかどうかを検証した。

前記の CTL は細胞表面抗原の発現パターンにより、naïve、central memory、effector-memory、effector に分類される。我々は癌免疫応答で重要な役割を演じるとされる effector-memory 分画に注目し、WT1 特異的 CTL の effector-memory 分画にある細胞を詳細に解析するために、その遺伝子発現 profile を single-cell レベルで網羅的に解析した。

今まで行っていた WT1 ペプチドを用いた種々の悪性腫瘍に対する免疫治療の臨床試験をさらに継続的に行った。そして、癌免疫応答の解析のための臨床検体を集積・蓄積した。

4. 研究成果

我々は、以前に、WT1 特異的 CTL を HLA-A*24:02 拘束性に誘導できる改変型 WT1-235 ペプチド(ヒト WT1 タンパクの 235 番目から始まる 9 アミノ酸の第 2 位を改変)を同定した。ヒトの癌抗原特異的免疫応答をより詳細に分子レベルで解析するために、その改変 WT1-235 ペプチドにより誘導された CTL が持つ TCR の遺伝子クローニングを試み、それに成功した。得られた遺伝子を CD8 陽性 T リンパ球に導入し TCR を発現させ機能解析を行ったところ、その TCR を発現した CD8 陽性 T リンパ球は天然型(非改変) WT1-235 ペプチドを HLA-A*24:02 拘束性に認識し、そして、HLA-A*24:02 拘束性に WT1 発現腫瘍細胞に殺細胞作用を示した。このように、この TCR は機能的に active な TCR であることが示され、今後の研究・実験にも有用であると考えられた。

癌免疫応答が発揮されるには、CD8 陽性 CTL だけでなく、CD4 陽性ヘルパー T リンパ球の働きも重要である。我々は、以前に、種々の HLA class II 型拘束性に WT1 特異的 CD4 陽性ヘルパー T リンパ球を誘導できる WT1-332 ペプチドを同定した。今回、我々は、HLA-DPB1*05:01 拘束性に WT1-332 ペプチドを認識できる TCR の遺伝子クローニングを試み、それに成功した。その TCR 遺伝子を CD4 陽性 T リンパ球に導入したところ、その TCR 発現 CD4 陽性 T リンパ球は WT1 特異的 CTL 誘導に関してヘルパー活性を示し、得られた TCR は機能的 TCR であった。また、それは WT1 発現白血病細胞に殺細胞効果を示し、WT1 特異的

CD4 陽性 T リンパ球はヘルパー機能だけでなく、殺細胞機能も発揮し得ることが確認された。

さらに、HLA-DRB1*04:05 拘束性に WT1-332 ペプチドを認識できる TCR を遺伝子クローニングした。遺伝子導入によりその TCR を発現させた CD4 陽性 T リンパ球の機能解析を行ったところ、その TCR 発現 CD4 陽性 T リンパ球は WT1 発現白血病細胞に対して殺細胞効果を示し、WT1 特異的 CD4 陽性 T リンパ球は殺細胞機能を示し得ることがさらに確認された。

Th17 細胞も CTL やヘルパー-T リンパ球と同様に癌免疫にて重要な役割を演じていることを示す所見が蓄積されている。今回、Th1 タイプの WT1 特異的ヘルパー-T リンパ球を誘導できる WT1-332 ペプチドが WT1 特異的 Th17 細胞を誘導できるかを検証した。その結果、ヒトの末梢血を WT1-332 ペプチドで Th17-polarizing 条件において刺激することにより、WT1 特異的 Th17 細胞を誘導することができた。また、その Th17 細胞の機能解析を行ったところ、ヘルパー活性を示した。このように、癌免疫応答における Th17 細胞の役割を解析するツールを得た。

癌抗原特異的 CTL の effector-memory 分画の細胞は抗腫瘍免疫応答において重要な役割を持つと思われる。我々は、急性骨髄性白血病 (AML) 患者末梢血中の WT1 特異的 CTL の effector-memory 分画の細胞には遺伝子発現 profile により区別できる 2 種類の細胞集団が存在することを明らかにした。また、WT1 ペプチドワクチン治療により長期寛解を得た AML 患者と早期に再発した AML 患者では、ワクチン治療後に、その effector-memory 分画細胞の遺伝子発現 profile が異なった経時の変化を示していることを見出した。

呼吸器 (胸部) 領域を含む種々の悪性腫瘍に対して WT1 ペプチドワクチン治療を継続的に施行した。その結果、膵臓癌に対しての WT1 ペプチドワクチンと抗癌剤治療の有用性を示唆するデータなど、呼吸器領域悪性腫瘍の免疫治療にも応用し得る結果を得た。

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 12 件)

Nakae Y., Oka Y., Fujiki F., Morimoto S., Kamiya T., Takashima S., Nakata J., Nishida S., Nakajima H., Hosen N., Tsuboi A., Kyo T., Oji Y., Mizuguchi K., Kumanogoh A., Sugiyama H. Two distinct effector memory cell populations of WT1 (Wilms' tumor gene 1)-specific cytotoxic T lymphocytes in acute myeloid leukemia patients. 査読有、*Cancer Immunology, Immunotherapy, in press* DOI:

10.1007/s00262-015-1683-7

Katsuhara A., Fujiki F., Aoyama N., Tanii S., Morimoto S., Oka Y., Tsuboi A., Nakajima H., Kondo K., Tatsumi N., Nakata J., Nakae Y., Takashima S., Nishida S., Hosen N., Sogo S., Oji Y., Sugiyama H. Transduction of a novel HLA-DRB1*04:05-restricted WT1-specific TCR gene into human CD4⁺ T cells confers killing activity against human leukemia cells. 査読有、*Anticancer Research*, 35(3), 2015, 1251-1261. URL: <http://ar.iiarjournals.org/content/35/3/1251.short>

Hosen N., Maeda T., Hashii Y., Tsuboi A., Nishida S., Nakata J., Nakae Y., Takashima S., Oji Y., Oka Y., Kumanogoh A., Sugiyama H. Vaccination strategies to improve outcomes of hematopoietic stem cell transplant in leukemia patients: early evidence and future prospects. 査読有、*Experts Review of Hematology*, 7(5), 2014, 671-681. DOI: 10.1586/17474086.2014.953925.

の

Nishida S., Koido S., Takeda Y., Homma S., Komita H., Takahara A., Morita S., Ito T., Morimoto S., Hara K., Tsuboi A., Oka Y., Yanagisawa S., Toyama Y., Ikegami M., Kitagawa T., Eguchi H., Wada H., Nagano H., Nakata J., Nakae Y., Hosen N., Oji Y., Tanaka T., Kawase I., Kumanogoh A., Sakamoto J., Doki Y., Mori M., Ohkusa T., Tajiri H., Sugiyama H. Wilms' tumor gene 1 (WT1)-peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. 査読有、*Journal of Immunotherapy*, 37(2), 2014, 105-114. DOI: 10.1097/CJI000000000000020.

Maeda T., Hosen N., Fukushima K., Tsuboi A., Morimoto S., Matsui T., Sata H., Fujita J., Hasegawa K., Nishida S., Nakata J., Nakae Y., Takashima S., Nakajima H., Fujiki F., Tatsumi N., Kondo T., Hino M., Oji Y., Oka Y., Kanakura Y., Kumanogoh A., Sugiyama H. Maintenance of complete remission after allogeneic stem cell transplantation in leukemia patients treated with Wilms tumor 1 (WT1) peptide vaccine. 査読有、*Blood Cancer Journal*, 3, 2013, e130-133. DOI:

10.1038/bcj.2013.29

Oka Y. A vaccine for leukemia: one step closer? Cure-oriented WT1 peptide vaccination therapy is being developed. 査読無、*Clinical Investigation*, 3(5),2013,421-424. DOI: 10.4155/cli.13.27

Tachino S., Fujiki F., Oka Y., Tsuboi A., Morimoto S., Lin Y., 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. 査読有、*Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(4), 2013, 801-810. DOI: 10.1007/s00262-012-1385-3.

Lin Y., Fujiki F., Katsuhara A., Oka Y., Tsuboi A., Aoyama N., Tanii 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. 査読有、*Journal of Immunotherapy*, 36(3), 2013, 159-170. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182873581.

Miyatake T., Ueda Y., Morimoto A., Enomoto T., Nishida S., Shirakata T., Oka Y., Tsuboi A., Oji Y., Hosen N., Nakatsuka S-I., Morita S., Sakamoto J., Sugiyama H., Kimura T. WT1 peptide immunotherapy for gynecologic malignancies resistant to conventional therapies: a phase II trial. 査読有、*Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(3), 2013, 457-463. DOI: 10.1007/s00262-012-1385-3.

Anguille S., Fujiki F., Smits E.L., Oji Y., Lion E., Oka Y., Berneman Z.N., Sugiyama H. Identification of a Wilms' tumor 1 (WT1)-derived immunogenic CD4⁺ T-cell epitope that is recognized in the context of common Caucasian HLA-DR haplotypes. 査読有、*Leukemia*, 27(3), 2013, 748-750. DOI: 10.1038/leu.2012.248.

Tamanaka T., Oka Y., Fujiki F., Tsuboi

A, Katsuhara A., Nakajima H., Hosen N., Nishida S., Lin Y., Tachino S., Akatsuka Y., Kuzushima K., Oji Y., Kumanogoh A., Sugiyama H. Recognition of a natural WT1 epitope by a modified WT1 peptide-specific T-cell receptor. 査読有、*Anticancer Research*, 32(12), 2012,5201-5209. URL: <http://ar.iiarjournals.org/content/32/12/5201.full.pdf+html>

〔学会発表〕(計 33件)

岡 芳弘. WT1ペプチドを用いたがんワクチン療法. 第13回日本組織適合性学会近畿地方会(特別講演). 2105年2月7日、大阪府赤十字血液センター(大阪市)

坪井昭博、橋本直哉、香川尚己、泉本修一、岡 芳弘、尾路祐介、森本創世子、保仙直毅、西田純幸、中田 潤、中江吉希、吉峰俊樹、杉山治夫. 悪性神経膠腫に対するWT1ペプチドワクチン療法の効果増強の試み. 第27回日本バイオセラピー学会学術集会総会. 2014年12月4日、コングレコンベンションセンター(大阪市)

Hashii Y., Oka Y., Miyamura T., Oji Y., Tsuboi A., Hosen N., Watanabe A., Sakata N., Sugiyama H., Ozono K. Clinical study of WT1 peptide vaccination for pediatric leukemia after stem cell transplantation. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年10月31日、大阪国際会議場(大阪市)

Tsuboi A., Hashimoto N., Kagawa N., Izumoto S., Oka Y., Oji Y., Hosen N., Nishida S., Morimoto S., Yoshimine T., Sugiyama H. WT1 peptide-based immunotherapy combined with Temozoromide for patients with newly diagnosed glioblastoma. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月25日、パシフィコ横浜(横浜市)

西田純幸、小井戸薫雄、本間 定、武田裕、石川 剛、古倉 聡、江川新一、森本創世子、江口英利、森田智視、岡 芳弘、杉山治夫. WT1 peptide-based cancer vaccine in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer. 第18回日本がん免疫学会総会. 2014年7月31日、ひめぎんホール(松山市)

坪井昭博、橋本直哉、岡 芳弘、森本創世子、尾路祐介、保仙直毅、西田純幸、中田 潤、中江吉希、中島博子、吉峰俊樹、杉山治夫。再発悪性神経膠芽腫を対象とした WT1 キラーペプチドと WT1 ヘルパーペプチドを用いた免疫療法 第 1 相試験。第 18 回日本がん免疫学会総会。2014 年 7 月 31 日、ひめぎんホール（松山市）

藤木文博、Lin Y.、勝原晶子、岡 芳弘、坪井昭博、青山奈央、谷井里江、中島博子、森本創世子、保仙直毅、西田純幸、尾路祐介、熊ノ郷 淳、杉山治夫。HLA-DPB1*05:01 拘束性 WT1 特異的 TCR を導入された CD4+T 細胞はヘルパー活性と細胞障害活性を有する。第 17 回がん免疫学会総会。2013 年 7 月 4 日、ANA クラウンプラザホテル宇部（宇部市）

岡 芳弘、杉山治夫。がん抗原ペプチドを用いたワクチン治療の原理・現況・将来展望 - WT1 ペプチドがんワクチンをそのモデルとして -。シンポジウム（招待）第 11 回日本組織適合性学会近畿地方会。2013 年 2 月 2 日、参天製薬株式会社（大阪市）

Tachino S., Oka Y., Fujiki F., Tsuboi A., Tamanaka T., Kondo K., Hosen N., Oji Y., Kumanogoh A., Sugiyama H. Cancer antigen WT1-specific helper and suppressive Th17 derived from a single precursor cell. 第 41 回日本免疫学会学術集会。2012 年 12 月 5 日、神戸国際展示場（神戸市）

Hashii Y., Miyamura T., Matsumura R., Yoshida H., Miyashita E., Tsuboi A., Oji Y., Hosen N., Oka Y., Sugiyama H., Ozono K., WT1 peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric cancer. 第 74 回日本血液学会学術総会。2012 年 10 月 20 日、国立京都国際会館（京都市）

保仙直毅、前田哲生、福島健太郎、森本創世子、中田 潤、中江吉希、西田純幸、坪井昭博、近藤忠一、門脇則光、日野雅之、尾路祐介、岡 芳弘、熊ノ郷淳、金倉 譲、杉山治夫。再発ハイリスク同種造血幹細胞移植後患者に対する WT1 ペプチドワクチン第 1 相臨床試験。第 74 回日本血液学会学術総会。2012 年 10 月 19 日、国立京都国際会館（京都市）

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もとめて マウスモデルを基にした検討 ワークショップ（抗がんワクチン療法の原点と将来展望）。第 16 回日本がん免疫学会総会。2012 年 7 月 26 日、北海道大学 学術交流会館（札幌市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 芳弘 (OKA, Yoshihiro)
大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・特任教授
研究者番号：20273691

(2) 研究分担者

武田 吉人 (TAKEDA, Yoshito)
大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・助教
研究者番号：40452388

高橋 良 (TAKAHASHI, Ryo)
大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・助教
研究者番号：10546865

長友 泉 (NAGATOMO, Izumi)
大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・助教
研究者番号：10570583

大塚倫之 (OTSUKA, Tomoyuki)
大阪大学・医学部付属病院・特任助教
研究者番号：20730576