

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461592

研究課題名(和文) 同種造血幹細胞移植後のWT1ペプチドワクチン療法における分子機構の解明とその制御

研究課題名(英文) Elucidation and control of molecular mechanism in WT1 peptide vaccine therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

橋井 佳子 (Hashii, Yoshiko)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60343258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：WT1蛋白を標的とするWT1 ペプチドワクチンが開発され臨床研究として「WT1 ワクチンを用いた難治性小児血液腫瘍患者に対する同種移植後免疫療法 第2 相試験」をおこなった。登録例18例の解析をおこなった。このうち非寛解期移植群では7例中4例が寛解維持しており小児血液悪性疾患において有効であることを明らかにしたWT1特異的キラーT細胞が接種は有意に増加しており、その増加率は寛解生存例で高いことを見出し、バイオマーカーとして有用であること明らかにした。またレパトア解析、マウスモデルも作成しえた。「造血細胞移植後のWT1ワクチン接種による維持療法」という新たな概念を創ることができた。

研究成果の概要(英文)：A WT1 peptide vaccine targeting the WT1 protein was developed and clinical research was carried out "Allogeneic Immunotherapy Postoperative Phase 2 Study on Patients With Intractable Pediatric Blood Tumors Using WT1 Vaccine". Registration example 18 cases were analyzed. Among them, 4 out of 7 patients remained in remission in non remission phase transplant group and revealed that it is effective in pediatric hematologic malignancy. We found that WT1 - specific killer T cells were significantly increased by flow cytometry compared with that before inoculation, and that the rate of increase was high in remission surviving cases, and it was clarified that it is useful as a biomarker. I could create a new concept of "maintenance therapy by WT1 vaccination after hematopoietic cell transplantation".

研究分野：がん免疫

キーワード：小児がん 同種造血細胞移植後 WT1 ペプチドワクチン

1. 研究開始当初の背景

「WT1 ワクチンを用いた難治性小児血液疾患患者に対する同種移植後免疫療法 第II相試験」を計画し、平成から平成25年に予定登録数である20例に到達した。不適格例は2例であった。実施計画書の統計学的事項としてワクチン接種開始後1年時に50%以上生存している場合、本治療法が有効であると定義している。短期予後は18例のうち12例で中止に至る有害事象を発症することなく寛解生存していることが明らかになった。この結果から同種造血細胞移植 (allo-SCT) 後にWT1ペプチドワクチン接種をおこなうことは難治性白血病に対して有効な治療法につながる可能性がある。また、バイオマーカーの探索により将来の患者選択に有効である。

Allo-SCT後にWT1ペプチドワクチンを接種することの有効性は以下に示される。

WT1ペプチドワクチンによって誘導された①WT1特異的キラーT細胞は白血病幹細胞に対しても抗腫瘍効果が報告されており根治が期待できる。allo-SCT後は残存腫瘍が最も少なく免疫機構が働きやすい、②リンパ球が極度に少ない状態であるため、リンパ球の回復時のhomeostatic expansionが生じ、WT1ペプチドワクチンの接種により効率よくWT1特異的CTLが誘導される、③種々のサイトカインの産生によりWT1特異的CTLの活性化がおりやすい④allo-SCT後は前処置や移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD)の発症により炎症性サイトカインが産生されており樹状細胞が活性化しやすい、など免疫的効果が期待されやすい環境である。

2. 研究の目的

「WT1 ワクチンを用いた難治性小児血液疾患患者に対する同種移植後免疫療法 第II相試験」において本臨床試験参加症例の試料を用いてバイオマーカーの探索と有効性を発揮するメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

「WT1 ワクチンを用いた難治性小児血液疾患患者に対する同種移植後免疫療法 第II相試験」を計画、IRBの承認を取得した。2008年8月より登録を開始した。同意が得られた症例より末梢血、骨髄試料を取得し免疫反応に関する解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 登録症例 症例詳細

「WT1 ワクチンを用いた難治性小児血液疾患患者に対する同種移植後免疫療法 第II相試験」には20例登録され2例が不適格例であった。18例が適格例であり11例で寛解生存が得られている。(1例は因果関係のない有害事象による死亡)観察期間 中央値59ヵ月(44~103ヵ月)である。登録症例はALL9例(うち1例はNHL)、AML9例であった。

同種移植回数は2例が2回、1例が3回であった。第1もしくは第二寛解期に移植した症例(低リスク群)は11例、第三寛解期以降および非寛解期移植症例(高リスク群)は7例であった。

(2) 治療成績

これらの成績と日本造血細胞移植データセンター造血細胞移植全国集計 (TRUMP) データと比較した。2年非再発生存率は66.7%、2年全生存率は77.8%であった。低リスク群では2年非再発生存率は67%。全生存率は77.8%とヒストリカルコントロールと比較して上乘せ効果は少なかった。しかしながら高リスク群では2年非再発生存率は57.1%で2年全生存率は71%であった。ヒストリカルコントロールと比較すると2年ではほぼ非再発生存率25%程度と報告されていることから高リスク群でこそ、効果があると考えられる。またワクチン接種時の骨髄中の微小残存病変 (minimal residual disease:MRD)の有無で予後を検討した。MRD陰性例の3年無再発率は70%、陽性例は62.5%とMRDの有無には関連がなかった。また一般にWT1mRNA高値症例は予後不良とされている。本研究において初診時もしくは再発時のWT1mRNA値を測定した。WT1mRNA高値群と低値群で再発率を比較した。WT1mRNA高値群では3年再発率20%、WT1mRNA低値群では40%と有意差はみられなかった。これらのことからWT1mRNAは従来の移植後再発リスクには当てはまらない有効性を発揮する。またワクチン接種時のMRD残存例やWT1mRNA高値例で有効性がみとめられ、接種時の残存病変があるほうが、また従来の薬剤では高リスクとなる症例のほうがより有効性が期待される。

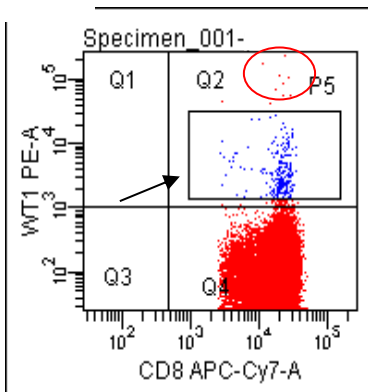
(3) 有害事象

臨床症状および血液検査においてCTC-AEによるGrade4は見られなかった。局所反応として全例に発赤が認められた。3例に膿瘍が、1例に潰瘍が認められた。1例ではじんまじんがみられた。感染症としては腸炎、咽頭炎、ヘルペス脳炎が1例ずつ認められG3であったが通常感染症治療で改善した。これらの感染症による有害事象はいずれも因果関係がないと効果安全評価委員会に評価された。1例で急性GVHDのグレードが上昇したためWT1ペプチドワクチン接種を中止し、ステロイドを開始したところ、膵炎を発症した。効果安全評価委員会の判断としてはステロイドによる膵炎と判断された。他のGVHDの増悪は2例にみられたが治療を要せずに改善した。

(4) WT1特異的キラーT細胞の経時的測定 末梢血および骨髄中のWT1特異的キラーT細胞を経時的に測定した。末梢血は12週までは1週ごと、それ以降は3か月ごと、骨髄は3か月ごとにWT1特異的キラーT細胞数およ

びそのフェノタイプの絶対数、割合を検討した。WT1 特異的キラーT細胞は末梢

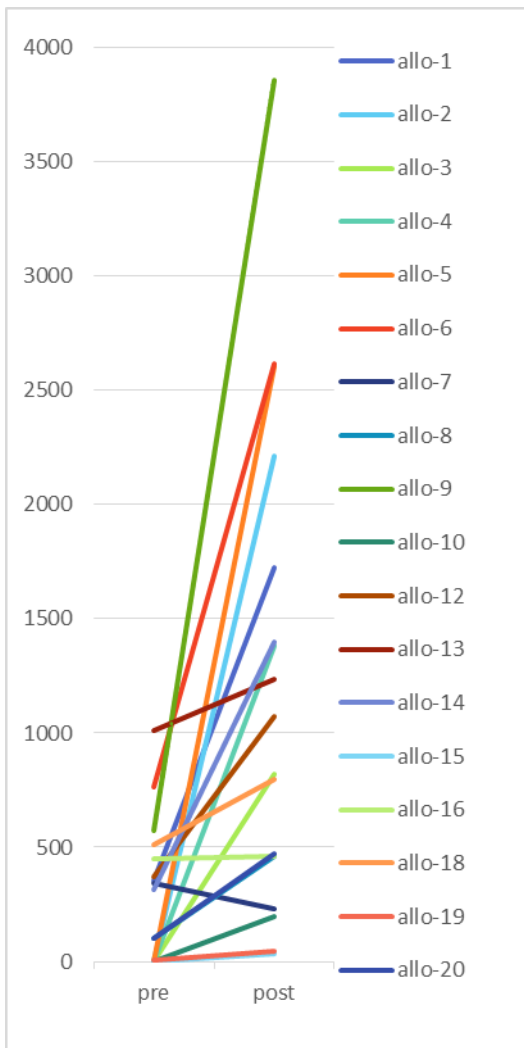
図 1



キラーT細胞とした。

図 2

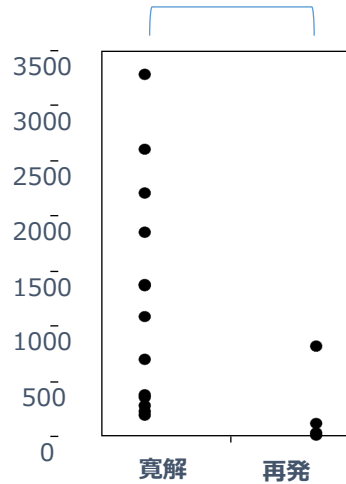
図 2 は全症例の末梢血 1mL 中の WT1 特異的



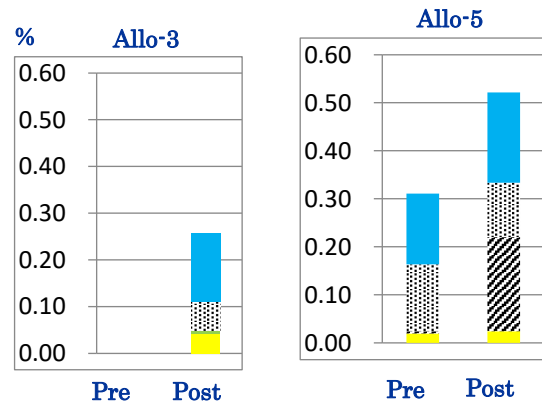
キラーT細胞絶対数である。左が WT1 ペプチドワクチン接種前、右がワクチン接種後である。全例でワクチン接種前に比べて接種後では末梢血中の WT1 特異的キラーT細胞数が増加している。

血もしくは骨髓試料から単核球を分離し、抗 CD3 抗体、抗 CD8 抗体、WT1 テトラマーを用いて染色し、フローサイトメトリー法で検出した。図 1 → の分画を WT1 特異的

次に WT1 特異的キラーT細胞の増加率を算出し、寛解例と非寛解例で比較した。図 3 のごとく寛解例では再発例と比較して有意に寛解例で増加率が高かった。



また WT1 ワクチン開始時に免疫抑制剤を併用の有無で検討したところ、併用例と非併用例では有意差がなかった。さらに WT1 特異的キラーT細胞が高発現している細胞群(図 1 の○)を各症例で同定したところ、寛解例 13 例中 11 例で検出可能であった。再発例 5 例では 1 例のみで検出可能であった。骨髓中の WT1 特異的キラーT細胞の検出を行った。そのうちの 2 例を下に示す。



点 ; effector memory
横線 : central memory

ワクチン接種前に比べ接種後では WT1 特異的キラーT細胞割合が増加しているのみならず、セントラルメモリー、エフェクターメモリーT細胞が出現していた。再発例では WT1 特異的キラーT細胞の出現は認められなかった。

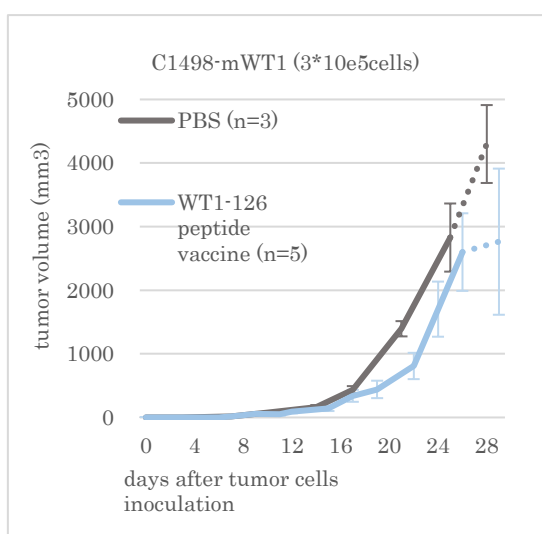
(5) TCR レパトア解析

WT1 ペプチドワクチン接種前後で次世代シーケンシングを用いて TCR レパトアの推移に関する解析をおこなった。細胞数の多い症例で

こなつた。
ワクチン接種前はクロナリティが低く造血細胞移植の免疫回復期にみられる一般的な状況であった。ワクチン接種後6か月後ではCD3+、CD8+細胞全体ではクロナリティが高く移植後の経時的な通常の回復経過を示すものであった。しかしながら WT1 テトラマー陽性 CD3+CD8T 細胞分画をソーティング氏、レパトアを検討したところ、オリコグロナルであり WT1 ペプチドワクチンによって特異的なクロナリティをもつ細胞クローンが増殖していることが明らかとなった。

(6) モデルマウスによる解析

C57BL/6 マウスに C1498mWT1 陽性マウス白血病細胞 (C1498) を皮下に接種し WT1₁₂₆ ペプチドワクチンを1週間に1回接種したところ以下のように腫瘍抑制効果を認めた。



またマウス脾臓より取り出したリンパ球を用いて RMA-S 細胞に対するキリングアッセイをおこなったところ、細胞比依存性に細胞障害が認められた。さらにこのリンパ球を WT1 テトラマーを用いてフローサイトメトリー法にて検出することができた。このことからこの腫瘍縮小効果は WT1 ペプチドワクチンによってもたらされたものであることが明らかになった。今後、このモデルマウスを用いてより免疫力の高いワクチンの開発を進めていくことが可能となった。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 橋井 佳子 小児がんに対する WT1 ペプチドワクチン治療 - 難治性造血器・固形腫瘍の新たな治療戦略 小児血液・がん学会雑誌, 51 (5) : 412-417, 2014
- ② 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 outcome of hematopoietic stem cell transplant in leukemia patients: early evidence and future prospect. Expert Rev Hematol, 7 : 671-681, 2014. doi: 10.21037/sci.2016.11.08.

- ③ Hosen N, Maeda T, Hashii Y, Tsuboi A, Nishida S, Nakata J, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H. Wilms tumor 1 peptide vaccination after hematopoietic stem cell transplant in leukemia patients. Stem Cell Investig. 2016 Dec 9;3:90. doi: 10.1586/17474086.2014.953925.

[学会発表] (計 23 件)

1) 橋井 佳子

造血細胞移植後の維持療法としての癌ワクチン

京都造血幹細胞移植研究会

2017.5.2. 京都

2) Yoshiko Hashii

Immunotherapy Targeting Wilms' Tumor 1 for Pediatric Cancer

2016 the Korean Society of Pediatric Hematology-Oncology Fall Symposium
2016.10.7. ソウル

3) 橋井 佳子

小児がんにおける免疫療法の現状と今後の展望～免疫制御抗体の先を見据えて～

第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会
2015.11.28. 山梨

4) Yoshiko Hashii

Phase I/II clinical study of WT1 peptide vaccination in pediatric leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation
The 8th International Conference on WT1 in Human Neoplasia

2015.11.19. Kyoto

5) Yoshiko Hashii

WT1vaccination for pediatric malignancies
First Sino-US-Japan Pediatric Translational Medicine Forum and Third International Pediatric Hematology and Oncology

2015.11.14. 上海

6) 橋井 佳子

小児がんに対する WT1 ペプチドワクチンを用いた免疫療法:新しい集学的治療の開発

日本癌治療学会

2015.10.30. 京都

7) 橋井 佳子

WT1 ワクチンを用いた難治性小児血液腫瘍患者に対する同種移植後免疫療法 臨床試験：再発例の解析

血液疾患免疫療法学会

2015.9.26. 東京

8) 橋井 佳子

WT1 vaccination in Pediatric Rhabdomyosarcoma

日本がん免疫学会

2015.7.9. 東京

9) 橋井 佳子

小児がん領域における新薬・新規治療法の開発 小児がん免疫療法開発の現状と展望

日本小児科学会学術集会 2015(分野別シンポジウム)

2015.4.19. 大阪

10) Yoshiko Hashii, Yoshihiro Oka, Takako Miyamura, Yusuke Oji, Naoki Hosen, Akihiro Tsuboi, Haruo Sugiyama, Keiichi Ozono

Phase II clinical study of WT1 peptide vaccination in pediatric leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation – clinical efficacy and immunological monitoring

American Society of Hematology

2014.12.6. サンフランシスコ

11) 橋井 佳子

WT1 peptide based immunotherapy for pediatric patients with malignant glioma

バイオセラピー学会

2014.12.4. 大阪

12) 橋井 佳子

小児白血病に対する免疫療法：がんワクチンはこどもの“未来”を作るくすりです

第16回さくら造血細胞セミナー

2014.11.13. 東京

13) 橋井 佳子、岡 芳弘、坪井 昭博、尾路 祐介、保仙 直毅、宮村 能子、渡辺 新、坂田 尚己、杉山 治夫、大藺 恵一

WT1 ペプチドワクチンを用いた小児血液腫瘍に対する移植後免疫療法第 I/II 相臨床試験

日本血液学会

2014.10.31. 大阪

14) 橋井 佳子

同種造血幹細胞移植後の WT1 ペプチドワクチンによる小児血液悪性腫瘍に対する免疫療法

バイオセラピー学会

2013/12.13. 盛岡

15) 橋井 佳子

「教えて！小児がんの最新治療」こどもの

治る力を引き出す治療～WT1 ペプチドワクチン療法

がんの子どもを守る会公開シンポジウム

2013.12.1. 福岡

16) 橋井 佳子

小児がんに対する WT1 ペプチドワクチン治療：難治性造血器・固形腫瘍の新たな治療戦略のシンポジウム

第55回日本小児血液・がん学会学術集会／第11回日本小児がん看護学会"

2013.11.29. 福岡

17) 橋井 佳子、岡 芳弘、坪井 昭博、尾路 祐介、保仙 直毅、宮村 能子、渡辺 新、坂田 尚己、大藺 恵一、杉山 治夫

WT1 ペプチドワクチンを用いた難治性小児血液腫瘍患者に対する同種造血幹細胞移植後免疫療法

第 I I 相試験

日本血液学会

2013.10.12. 札幌

18) 橋井 佳子、岡 芳弘、香川 尚己、宮村 能子、細谷 要介、尾路 祐介、坪井 昭博、大藺 恵一、杉山 治夫

WT1 based immunotherapy for pediatric patient with solid malignant tumor: Phase I/II clinical trial

日本がん学会

2013.10.4. 横浜

19) Yoshiko Hashii Yoshihiro Oka, Takako Miyamura Yousuke Hosoya

Atsushi Manabe Naoko Tsuji Shuichirou Uehara Takaharu Ohue Yusuke Oji Keiichi Ozono Haruo Sugiyama

Tumor immunotherapy targeting WT1 (Wilms' tumor gene) peptide for pediatric rare tumors.

The International Society of Paediatric Oncology

2013.9.2. 香港

20) Yoshiko Hashii Yoshihiro Oka, Takako Miyamura Yousuke Hosoya

Atsushi Manabe Naoko Tsuji Shuichirou Uehara Takaharu Ohue Yusuke Oji Keiichi Ozono Haruo Sugiyama

Clinical effects of Wilms tumor protein (WT)1 peptide vaccination in pediatric patients with rhabdomyosarcoma

The International Society of Paediatric Oncology

2013.9.26. 香港

21) 橋井 佳子

子どもの治る力を引き出す治療：WT1 ワクチン療法

東京小児がん研究セミナー

2013.7.20. 東京

22) 橋井 佳子
小児白血病を「本当に治る病気」にするため
に
九州山口小児血液・腫瘍研究会
2013.6.15. 福岡

23) 橋井 佳子
再発高悪性度グリオーマに対する WT1 ペ
プチドワクチンを用いた免疫療法
小児脳腫瘍治療研究会
2013.6.29. 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/ped/www/Welcome-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋井 佳子 (Yoshiko, Hashii)
大阪大学大学院医学系研究科小児科・講師
研究者番号：60343258

(2) 研究分担者

岡 芳弘 (Yoshihiro Oka)
大阪大学大学院医学系研究科癌免疫学講
座・特任教授 (常勤)
研究者番号：20273691

宮村 能子 (Takako Miyamura)
大阪大学大学院医学系研究科小児科・助教
研究者番号：20379796

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし
()