

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830116

研究課題名(和文) WT1特異的細胞傷害性T細胞の長期的活性維持に関与する遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of key genes that is correlated with long-term maintenance of cytotoxic activity in WT1 specific cytotoxic T lymphocytes

研究代表者

森本 創世子 (Morimoto, Soyoko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10649023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：良好な臨床効果にはWT1特異的エフェクターメモリー(EM)-CTLが関与すると考えられる。しかし、強い抗腫瘍効果をもたらすWT1特異的EM-CTLは同定されていないため、誘導することが難しい。そこで、まずこのようなCTLを同定するために、96種類の遺伝子発現量をsingle cell levelで解析できる実験系を確立した。その結果、遺伝子発現量によってWT1特異的EM-CTLが“activated”と“quiescent”の2群に分かれることが明らかとなった。今後、これら2群の生理的意味づけを行うことで、強い抗腫瘍効果をもたらすCTLを効率よく誘導する新しい癌免疫療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：High frequency of WT1 specific effector-memory CTL involved in the appearance of good clinical response. However key genes specifying such effector-memory CTL were unknown. To find out genes specifying function of WT1 specific CTL which has cytotoxic activity for a long time, we established a method of multiple gene-expression analysis using single-cell real-time PCR. This analysis revealed that WT1 specific effector-memory CTL population from cancer patients could be divided into two groups: the “activated” and “quiescent” states. These results suggest that this unique gene expression in WT1 specific effector-memory T cell contributed to meaningful function of CTL for induction of good clinical response.

研究分野：癌免疫

キーワード：WT1特異的CTL single cell定量PCR

## 1. 研究開始当初の背景

近年、第四の癌治療法として癌免疫療法が盛んに行われている。その抗腫瘍効果は、癌の縮小や標準治療を超える長期的な生存など、確かに認められている。しかし、その効果は不十分でありさらなる治療法の改善が望まれる。そこで、抗腫瘍効果を増強するために最も重要だと考えられるのは、強い腫瘍細胞傷害活性をもつ細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を一過性ではなく長期的に誘導することであり、そのためにもまず、強い腫瘍細胞傷害活性をもつ CTL を突き止める必要がある。

しかし、これまでの実験系ではこのような CTL を突き止めることは困難であった。なぜなら、例えば癌患者末梢血中単核球 (PBMC) に含まれる腫瘍抗原特異的 CTL の存在頻度とその分化・活性化段階を癌免疫療法の前後で評価する系では、どのような分化段階の CTL が癌免疫療法によって増加したか、を評価するにとどまる。また、腫瘍抗原特異的 CTL の TCR レパトワ解析でも同様に、治療後に増加した腫瘍抗原特異的 CTL 集団はどのような TCR を持っているのかを評価するだけであるため、どの CTL が抗腫瘍効果をもたらしたのかを明らかにできない。つまり、このような実験系では解析対象が腫瘍抗原特異的 CTL という細胞集団であるため、真に腫瘍細胞傷害活性をもつ CTL を同定することはできなかった。そこで、遺伝子背景の異なる heterogenous な細胞集団を対象とするのではなく、単一細胞レベルで解析できる実験系の構築が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、長期的に腫瘍細胞傷害活性を維持している CTL を突き止め、その機能を規定している遺伝子を同定すること、さらに、同定した遺伝子による、CTL の腫瘍細胞傷害活性制御機構を活用し、CTL の機能を効率よく増強する新しい癌免疫療法を開発するこ

とを目的とした。

## 3. 研究の方法

これまでの研究結果より我々は、WT1 特異的エフェクターメモリー CTL が良好な臨床効果をもたらすのに重要であると考えた。しかし、WT1 特異的エフェクターメモリー CTL が多く存在することが必ずしも臨床効果と一致しない症例も数多く見られた。この乖離は、WT1 特異的エフェクターメモリー CTL を細胞集団として解析するため生じると考えた。そこで、WT1 特異的エフェクターメモリー CTL に含まれている真に抗腫瘍効果をもたらす CTL を同定するために、以下に焦点を当て、研究を進めた。

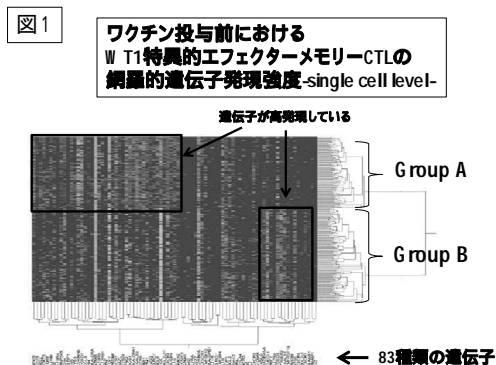
1. single cell level で細胞の遺伝子発現量を網羅的に解析する実験系の確立
2. 長期生存が認められた癌患者で特徴的な遺伝子発現パターンの解明

## 4. 研究成果

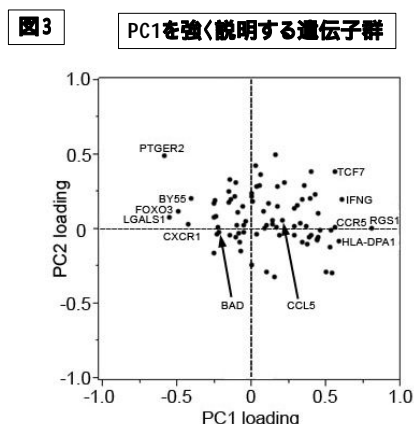
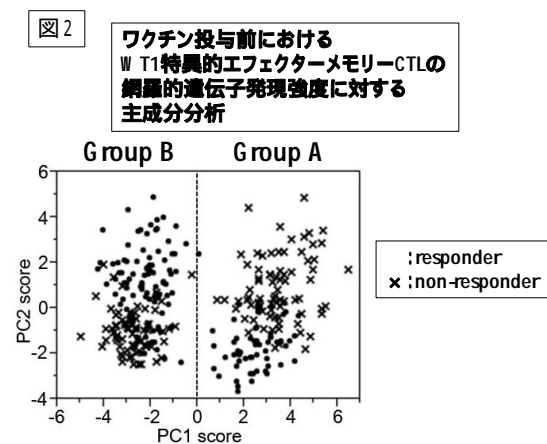
初めに、single cell sort の効率を確認するために、蛍光蛋白 GFP 発現細胞を 96 well plate (flat 底) に single cell sort 後鏡検した。その結果、80%以上の効率で 1 well に 1 細胞 sorting することが可能であった。残りの well は 2 細胞以上のものではなく、sorting された細胞を確認できなかった well である。したがって、real time RT-PCR によって解析可能であった well は必ず 1 細胞以下であることを保証することができた。

次に、解析対象の遺伝子を選出した。細胞傷害活性の付与に重要であると報告されている遺伝子や stem cell 様の機能に關与する遺伝子、寿命や老化に關与する遺伝子など 96 種類を選び、これら 96 種類の遺伝子発現量を single cell 定量 PCR 装置を用いて数名の健常人または癌患者の WT1 特異的エフェクターメモリー T 細胞を対象に網羅的に調べた。その結果、検出感度以下の遺伝子を除く 83 種類を解析対象の遺伝子とした。

上記のように選出した 83 種類の遺伝子発現強度を、WT1 ペプチドワクチン投与前の 9 名の癌患者から得た 307 個の WT1 特異的エフェクターメモリーCTL に対して調べたところ、大変興味深いことに、遺伝子の発現強度によって WT1 特異的エフェクターメモリーCTL が Group A と Group B の 2 群に分かれることが明らかになった (図 1)。



さらに、これら Group A と B について主成分分析を行ったところ、主成分 1 (PC1) によって明確に 2 群に分かれており (図 2) PC1 を強く説明する遺伝子が図 3 に示す通りであることが明らかとなった。



以上の結果から、WT1 特異的エフェクターメモリーT 細胞は遺伝子発現量の違いによって大きく二つに分かれることが明らかになった。また、Group A と B のどちらがより抗腫瘍効果に寄与するかを調べる必要がある。

そこで我々は、Group A と B の生理的な意味づけと各グループに含まれる遺伝子群が抗腫瘍効果に対してどのような意義をもたらすのかを明らかにすることを新たな目的とした。そのために、9 名の癌患者の WT1 ペプチドワクチン投与後の WT1 特異的エフェクターメモリーCTL についても同様の遺伝子発現の網羅的解析を行ない、9 名のうち、臨床効果が認められなかった Non-responder とは対照的に、臨床効果が認められた Responder の WT1 特異的エフェクターメモリーCTL が WT1 ペプチドワクチン投与前に Group A と B のどちらに位置し、さらに投与後にどのような変化を起こすかを経時的かつ視覚的に明らかにする。このような解析を行なうことで、Responder の WT1 特異的エフェクターメモリーCTL に特徴的に見られる遺伝子発現パターン、つまり抗腫瘍効果を決定づける遺伝子発現を突き止めることができるかと期待される。

## 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 6 件)

Nakae Y, Oka Y, Fujiki F, Morimoto S, et al. (他 12 名、4 番目) Two distinct effector memory cell populations of WT1 (Wilms' tumor gene 1)-specific cytotoxic T lymphocytes in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2015. (doi: 10.1007/s00262-015-1683-7)

Katsuhara A, Fujiki F, Aoyama N, Tanii S, Morimoto S, et al. (他 13 名、5 番目) 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. *Anticancer Research*, 35: 1251-1262, 2015.

(<http://ar.iiarjournals.org/content/35/3/1251.short>)

Hashimoto N, Tsuboi A, Kagawa N, Chiba Y, Izumoto S, Kinoshita M, Kijima N, Oka Y, Morimoto S, et al. (他 9 名、9 番目) Wilms tumor 1 peptide vaccination combined with temozolomide against newly diagnosed glioblastoma: safety and impact on immunological response. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2015. (doi: 10.1007/s00262-015-1674-8)

Nishida S, Koido S, Takeda Y, Homma S, Komita H, Takahara A, Morita S, Ito T, Morimoto S, et al. (他 23 名、9 番目) Wilms tumor gene (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of Immunotherapy*, 37: 105-114, 2014. (doi: 10.1097/CJI.000000000000020)

Maeda T, Hosen N, Fukushima K, Tsuboi A, Morimoto S, et al. (他 18 名、5 番目) Maintenance of complete remission after allogeneic stem cell transplantation in leukemia patients treated with Wilms tumor 1 peptide vaccine. *Blood Cancer Journal*, 3: e130, 2013. (doi: 10.1038/bcj.2013.29)

Tachino S, Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Morimoto S, et al. (他 9 名、5 番目) Functional human Th17 clones with WT1-specific helper activity. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 62:

801-810, 2013. (doi: 10.1007/s00262-012-1385-3)

〔学会発表〕(計 5 件)

Koido Shigeo, Wilms' tumor gene 1 (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer, AACR Annual Meeting, 2014 年 4 月 5 日 ~ 2014 年 4 月 9 日、「San Diego (USA)」

Morimoto Soyoko, Analysis of correlation of WT1-specific immune responses before WT1 peptide vaccination and clinical responses, The 7<sup>th</sup> International Conference on WT1 in human neoplasia, 2014 年 4 月 22 日 ~ 2014 年 4 月 23 日、「Barcelona (Spain)」  
Nishida Sumiyuki, Gemcitabine plus WT1 peptide-based cancer vaccine versus gemcitabine alone for advanced pancreatic cancer: a randomized phase II clinical study in multi-centre-interim analysis, The 7<sup>th</sup> International Conference on WT1 in human neoplasia, 2014 年 4 月 22 日 ~ 2014 年 4 月 23 日、「Barcelona (Spain)」

Hashimoto Naoya, Response assessments in WT1 peptide vaccination an long term results of combined temozolomide therapy, The 7<sup>th</sup> International Conference on WT1 in human neoplasia, 2014 年 4 月 22 日 ~ 2014 年 4 月 23 日、「Barcelona (Spain)」

Katsuhara Akiko, HLA クラス II 拘束性 WT1 由来ヘルパーペプチド特異的 TCR 遺伝子を導入された CD4+T 細胞は in vivo において anti-leukemia activity を発揮する、第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会、2014 年 9 月 6 日、「京都

大学医学部構内・芝蘭会館（京都府・京都市）」

6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者

森本 創世子 ( MORIMOTO, Soyoko )

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：10649023