

厚生科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

分担研究報告書

WT1 エピトープの同定

分担研究者 安川 正貴 愛媛大学 血液内科 教授

研究要旨: 新たな WT1 エピトープの同定と、WT1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 由来 T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子導入による免疫遺伝子治療の開発を目的に研究を遂行し、下記の成果が得られた。1) HLA-DP5 拘束性 WT1 ペプチド特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンを樹立し、これが、白血病細胞を直接認識することを明らかにした。2) WT1 特異的 CTL より TCR- α および TCR- β をクローニングし、発現ベクターを構築した。この TCR 遺伝子導入によって、WT1 特異性が獲得されることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、造血幹細胞移植などの導入によって白血病などの造血器腫瘍に対する治療成績は向上しているが、いまだ治療に至る症例は限られており、新たな視点からの治療戦略が必要である。本研究では、造血器腫瘍に対する新たな細胞免疫療法を確立する目的で、新規 WT1 エピトープの同定ならびに白血病特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 由来 T 細胞レセプター遺伝子導入による免疫遺伝子療法の開発を行った。

B. 研究方法

WT1 のアミノ酸配列から全長をカバーするように、10 アミノ酸が重複する 20 アミノ酸からなるペプチドを 43 種類合成した。ヒト末梢血単核球をこれらのペプチドで繰り返し刺激し、WT1 ペプチドに特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞クローンを樹立した。さらに、T 細胞クローンの機能を解析した。

WT1 特異的 HLA-A24 拘束性 CTL クローン TAK-1 から TCR- α および TCR- β 遺伝子を単離し、レンチウイルス発現ベクターを作製した。健康人末梢血 CD4 および CD8 陽性 T 細胞に遺伝子導入し、TCR 遺伝子リンパ球の高原特異性と機能を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究実施にあたっては、すでに愛媛大学医学部臨床倫理委員会からの承認を受けており、倫理面に関しては十分に配慮しており、問題点はない。

C. 研究結果

WT1 ペプチドに特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞クローン NIK-1 を樹立した。NIK-1 が認識するペプチドの最小単位は 11 アミノ酸であった。NIK-1 は HLA-DP5 拘束性に Th1 タイプのサイトカインを産生し、WT1 発現白血病細胞をパーフォリン依存性経路に HLA-DP5 拘束性に直接傷害した。

WT1 特異的 CTL クローン TAK-1 由来 TCR 遺伝子を、健康人末梢血 CD4 および

CD8 陽性 T 細胞に遺伝子導入したところ、60~80%に TAK-1 由来 TCR の発現が確認された。TCR 遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞は、HLA-A24 拘束性に白血病細胞や骨髄腫細胞に対して細胞傷害性を示した。他方、CD4 陽性 T 細胞も HLA-A24 拘束性に Th1 サイトカインを産生したが、この反応には白血病細胞に HLA クラス II の発現が必要であることが示唆された。

D. 考察

抗腫瘍免疫を効率よく誘導するためには、ヘルパー T 細胞の働きが重要であることが知られている。今回新たに同定した WT1 特異的 CD4 陽性 T 細胞が認識するエピトープペプチドを従来の CTL エピトープペプチドと併用することによって、抗腫瘍効果の相乗効果が期待できる。また、high affinity を有する CTL 由来 TCR 遺伝子導入によって、CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞も HLA クラス I 拘束性ががん特異性を獲得することが明らかとなった。ほとんどの白血病細胞は HLA クラス II 陽性であることを考えると、白血病に対する効果的な免疫遺伝子治療法となることが考えられる。

E. 結論

WT1 特異的ヘルパー T 細胞認識エピトープを同定した。また、WT1 特異的 CTL 由来 TCR 遺伝子導入による新たな免疫遺伝子療法の基本開発を行った。

F. 健康危険情報

G. 研究発表 論文発表

1. Tsuji, T., Yasukawa, M., Matsuzaki, J., Ohkuri, T., Chamoto, K., Wakita, D., Azuma, T., Niiya, H., Miyoshi, H., Kuzushima, K., Oka, Y., Sugiyama, H., Ikeda, H. and Nishimura, T.: Generation of human tumor-specific, HLA class I-restricted Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T cell receptor genes. *Blood* 106:470-476,2005.
2. Guo, Y., Niiya, H., Azuma, T., Uchida, N., Yakushijin, Y., Sakai, I., Hato, T., Takahashi, M., Senju, S., Nishimura, Y. and Yasukawa, M.: Direct recognition and lysis of leukemia cells by WT1-specific CD4⁺ T lymphocytes in an HLA class II-restricted manner. *Blood* 106:1415-1418,2005.
3. Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., Yoshiimoto, G., Watanabe, T., Akashi, K., Shultz, L.D. and Harada, M.: Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain^{null} mice. *Blood* 106:1565-1573,2005.
4. Niiya, H., Sakai, I., Lei, J., Azuma, T., Uchida, N., Yakushijin, Y., Hato, T., Fujita, S. and Yasukawa, M.: Differential regulation of perforin expression in CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Exp. Hematol.* 33:811-818,2005.
5. Kawano, N., Ishikawa, F., Shimoda, K., Yasukawa, M., Nagafuji, K., Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Yamasaki, S., Gondo, H., Otsuka, T., Ohshima, K., Shultz, L.D., Akashi, K. and Harada, M.: Efficient engraftment of primary adult T-cell leukemia cells in newborn NOD/SCID/ β 2-microglobulin^{null} mice. *Leukemia* 19:1384-1390,2005.
6. Sakai, I., Tamura, T., Narumi, H., Uchida, N., Yakushijin, Y., Hato, T., Fujita, S. and Yasukawa, M.: Novel *AML1-MEL1* fusion transcripts in a patient with acute myeloid leukemia showing t(1;21)(p36;q22). *Gene Chromosome Cancer* 44:265-270,2005.
7. Hasegawa, H., Inoue, A., Kohno, M,

Muraoka, M., Miyazaki, T., Terada, M., Nakayama, T., Yoshie, O., Nose, M. and Yasukawa, M.: Antagonist of interferon-inducible protein 10/CXCL10 ameliorates the progression of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 54:1174-1183,2006.

8. Niiya, H., Lei, J., Guo, Y., Azuma, T., Yakushijin, Y., Sakai, I., Hato, T., Tohyama, M., Hashimoto, K. and Yasukawa, M.: Human herpesvirus 6 impairs differentiation of monocytes to dendritic cells. *Exp. Hematol.* 34:642-653,2006.
9. Muraoka, M., Hasegawa, H., Kohno, M., Inoue, A., Miyazaki, T., Terada, M., Nose, M. and Yasukawa, M.: IK cytokine ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 54:3591-3600, 2006.
10. Fujiki, F., Oka, Y., Tsuboi, A., Kawakami, M., Kawakatsu, M., Nakajima, H., Elisseeva, O.A., Harada, Y., Ito, K., Li, Z., Tatsumi, N., Sakaguchi, N., Fujioka, T., Masuda, T., Yasukawa, M., Udaka, K., Kawase, I., Oji, Y. and Sugiyama, H.: Identification and characterization of a WT1 (Wilms' tumor gene) protein-derived HLA-DRB1*0405-restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunother.* in press.

「改変標的化T細胞の製造方法及び医薬」

出願番号：特願：2003-425009

平成15年12月22日出願

平成16年12月22日PCT国際出願（北海道ティー・エル・オー株式会社）

出願番号：PCT/JP2004/019714

「HLAクラスII拘束性WT1抗原ペプチド」

出願番号：特願：2005-107588

発明者氏名：安川正貴

平成17年4月4日出願

2. 実用新案登録

3. その他

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「ヒト由来免疫担当細胞の製造方法」

出願番号：特願 2003-171420

平成15年6月16日出願

平成16年6月16日PCT国際出願（株式会社産学連携機構九州）

出願番号：PCT/JP2004/008784

厚生科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

分担研究報告書

脳腫瘍に対する免疫療法

分担研究者 大西丘倫 愛媛大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨:悪性グリオーマに対する放射線増強と免疫療法併用療法の効果を検討するため、今回、Ku70 の発現制御による放射線増強作用について解析した。Ku70 の抑制はグリオーマ細胞の放射線増強効果を示し、腫瘍移植モデルでも腫瘍縮小効果を示した。

A. 研究目的

WT1 免疫療法と放射線感受性増強効果による悪性グリオーマの新規治療法の確立をめざす。

B. 研究方法

まず、放射線感受性増強効果を得るために Ku70 に対する siRNA を作成し、HVJ-E ベクターを用いて in vitro、in vivo 実験を行った。

(倫理面への配慮)

今回はまだ動物実験の段階のため、倫理委員会の審査は不要。

C. 研究結果

Ku70 の発現抑制により、グリオーマ細胞で放射線感受性の増強が得られ、また、皮下腫瘍モデルでは腫瘍縮小効果がみられた。

D. 考察

新しい放射線感受性増強療法の可能性が得られ、今後免疫療法との併用について検討する。

E. 結論

悪性グリオーマに対して DNA 修復遺伝子 Ku70 は放射線感受性を増強させた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 65 回日本脳神経外科学会総会
第 24 回日本脳腫瘍学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

分担研究報告書

悪性腫瘍に対する免疫療法

分担研究者 宇高 恵子 高知大学医学部 教授

研究要旨:今年度は、腎盂尿管癌1例(11週で中止、PD)、前立腺癌2例(SDで終了と投与中)に対して、FIA に懸濁した WT1 ペプチドを投与した。今後、抗腫瘍効果を高める免疫方法の工夫が必要であろう。

A. 研究目的

WT1,235Y ペプチドを FIA に懸濁して固形腫瘍患者に投与する、多施設臨床研究に参加して、試験治療を行う。

B. 研究方法

HLA-A*2402 型をもち、腫瘍が WT1 免疫染色陽性である固形悪性腫瘍患者に対して、週1回計3ヶ月間 WT1 ペプチドを皮内注射し、腫瘍径、腫瘍マーカーの測定および血液、生化学的検査を行い安全性および臨床効果を観察した。

(倫理面への配慮)

多施設臨床試験のプロトコールに基づき、本学倫理委員会の承認をうけて実施した。被験者の研究への参加は自由意思に基づき、被験者のプライバシーを保護することはプロトコールに明記されている。

C. 研究結果

臨床試験を希望する患者は 135 名にのぼったが、HLA 型の不適合、WT1 の発現の欠如、腫瘍の進展等の理由で、新規に WT1 ペプチドの投与を行えた症例は3症例であった。前立腺癌症例で9週目に腫瘍マーカーが鈍化し、腫瘍径は SD で12週の投与を完遂した。腎盂尿管癌症例が11週目に腎不全で中止と

なった(PD)3症例目の前立腺癌はWT1 ペプチドワクチンを現在投与中である。

D. 考察

ペプチドを FIA に懸濁して投与する方法では、2005 年1月からの積算で本学で WT1 ペプチドの投与を行った 21 例中 3 例で RECIST 基準で SD が得られた。

E. 結論

一部の症例で腫瘍抑制効果を認めた。しかしながら腫瘍の縮小に至る症例は得られておらず、WT1 ペプチドワクチンの抗腫瘍効果の更なる改善が望まれる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

WT1 peptide immunotherapy for renal cell carcinoma. Iiyama et al., (submitted)

2. 学会発表

第 36 回日本免疫学会総会口頭発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

分担研究報告書

血液腫瘍に対する免疫療法

分担研究者 塚田 順一 産業医科大学化学療法センター助教授

研究要旨:血液領域における WT1 発現と WT1 ワクチン療法の有効性を検討する目的で、急性白血病の骨髄細胞における WT1 定量を行った完全寛解期において WT1 mRNA はいずれも低値であり、早期再発期 1 例に高値であり、急性白血病治療の分子標的として適切であることが考えられた。

A. 研究目的

血液領域における WT1 発現と WT1 ワクチン療法の有効性を検討する。

B. 研究方法

血液腫瘍患者、特に急性白血病 10 例に対して通常の寛解導入療法後、胸骨から骨髄液を採取し、骨髄細胞における WT1 発現を RealTime-PCR 法を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本臨床試験は産業医科大学倫理審査委員会の承認を得て行われている。被験者の研究への参加は自由意志に基づき、被験者のプライバシーを保護すること等はプロトコールに明記されている。

C. 研究結果

WT1 発現は検索した全例に観察することができた。完全寛解期症例では WT1 mRNA はいずれも低値であり、早期再発期 1 例に異常高値であり、血液学的再発例も高値を呈した。

D. 考察

上記ごとく、WT1 は再発早期より上昇傾向を示し、白血病細胞で特異的に発現していることが考えられた。

E. 結論

WT1 ワクチンの投与にはいたらなかったが、WT1 が急性白血病の病勢評価、さらには治療の分子標的として、適切であることが示唆された。

F. 健康危険情報

今回は通常検査における骨髄液の一部を WT1 検査に利用した。さらに、これら通常の骨髄穿刺では特に問題となる有害事象は生じなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表
未発表
2. 学会発表
未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

厚生科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

分担研究報告書

泌尿器癌に対する免疫療法

分担研究者 内藤 誠二 九州大学大学院医学研究院 教授

研究要旨:泌尿器癌の中でも、免疫療法が有効とされる腎細胞癌に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植(通常、ミニ移植)のマウスモデルを作成し、GVHD の軽減に成功した。

A. 研究目的

腎細胞癌に対する免疫療法のひとつとしてミニ移植が注目されている。しかしながら、ミニ移植においても抗腫瘍効果と移植片対宿主病(GVHD)反応を分けて誘導することは困難で、GVHDを許容されるレベルに留めながらも十分な抗腫瘍効果を得ることが課題となる。そのためにミニ移植を行い、非特異的な抗腫瘍効果に上乘せして、WT1等を標的とした特異的な免疫反応を誘導して特異的な抗腫瘍効果を高めることはひとつの戦略となりうる。そこでまずミニ移植のマウスモデルを作成し、このモデルにおける抗腫瘍効果を免疫学的に検討することとした。

B. 研究方法

BALB/cマウスと同系の腎癌であるRenca細胞を用いて、ドナーにはマイナー抗原のみが異なるDBA/2を用いる。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は九州大学の動物取り扱いに関する委員会にて承認されている。

C. 研究結果

腎細胞癌に対するミニ移植のマウスモデルの作成に世界で初めて成功し、そのモデルでGVHDの軽減に成功した。

D. 考察

本研究は腎細胞癌に対するミニ移植の臨床における問題点の解明、さらには新たな戦略に基づく腎癌に対する免疫療法の開発に有用であると思われた。

E. 結論

腎細胞癌に対するミニ移植のマウスモデルは、臨床のミニ移植の問題点の解明に有用であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morita S, Oka Y., Tsuboi A, Kawakami M, Maruno M, Izumoto S, Osaki T, Taguchi T, Ueda T, Myoui A, Nishida S, Shirakata T, Ohno S, Oji Y, Aozasa K, Hatazawa J, Udaka K, Yoshikawa H, Yoshimine T, Noguchi S, Kawase I, Nakatsuka S, <u>Sugiyama H</u> , Sakamoto J.	A Phase I/II Trial of a WT1 (Wilms' Tumor Gene) Peptide Vaccine in Patients with Solid Malignancy: Safety Assessment Based on the Phase I Data.	Japanese Journal of Clinical Oncology	36	231-236	2006
Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, Nakajima H, Elisseeva OA, Harada Y, Ito K, Li Z, Tatsumi N, Sakaguchi N, Fujioka T, Masuda T, Yasukawa M, Udaka K, Oji Y, <u>Sugiyama H</u> .	Identification and characterization of a WT1 (Wilms' tumor gene) protein-derived HLA-DRB1*0405 - restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes.	J Immunother	in press		