

小児がんに対する WT1 ペプチドワクチン療法

太田 秀明, 橋井 佳子

I はじめに

WT1 (Wilms'tumor gene 1) 遺伝子は, Wilms 腫瘍の原因遺伝子として単離され, 当初は癌抑制遺伝子として機能すると考えられていたが, 一連の研究によって, 多くの悪性腫瘍においてむしろ癌遺伝子として機能していることが明らかになっている. 実際に, 成人, 小児いずれの血液腫瘍, 固形腫瘍の多くで WT1 遺伝子および WT1 蛋白が高発現しており, WT1 蛋白を標的とした免疫療法が開発され, すでに臨床応用されている. 最近発表された National Cancer Institute による報告では, 臨床応用で優先すべき癌抗原として, WT1 はトップに挙げられている¹⁾. ここでは, WT1 ペプチドワクチン療法に関するこれまでの研究とともに, 当院で施行してきた小児がんに対する臨床試験について概説する.

II WT1 ペプチドワクチンの原理

WT1 遺伝子は転写因子をコードしており, 種々の遺伝子発現を制御し, 細胞増殖, 分化, アポトーシス, 臓器発生に関与している. しかしながら, 野生型 WT1 遺伝子および WT1 遺伝子産物が, 造血器悪性腫瘍や種々の悪性固形腫瘍で過剰発現していることが明らかにされている^{2,3)}. さらに, WT1 アンチセンスオリゴマーによって WT1 発現細胞の増殖が抑制されることや, 腫瘍患者で WT1 高発現と予後不良に相関関係が認め

られることなどから, WT1 遺伝子が癌遺伝子としての役割を果たしていることが明らかになった.

WT1 蛋白はプロセッシングを受けて WT1 ペプチド断片 (9~10 アミノ酸) となり, HLA class I 分子と複合体を形成し細胞表面に提示され, 細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の標的となると考えられる. 実際, マウスを使った実験で, MHC class I に結合する WT1 ペプチド (9 アミノ酸) で免疫したところ, WT1 ペプチド特異的 CTL が誘導され, さらに, 免疫後に移植された WT1 発現癌細胞が拒絶されることが観察されている⁴⁾. しかも, WT1 遺伝子を発現している腎や骨髄などの正常組織は傷害を受けないことがわかっている⁴⁾.

ヒトにおける検討でも, HLA-A2.1 (遺伝子型 HLA-A0201: 日本人の約 20%) 分子に結合する WT1 ペプチドによる in vitro での刺激で WT1 特異的 CTL が誘導され, ヒトの WT1 発現癌細胞が HLA-A2 拘束性に傷害されることが観察されている⁵⁾. また, HLA-A24 (遺伝子型 HLA-A2402: 日本人の約 60%) 分子に結合する WT1 ペプチド CMTWNQMNLL によって WT1 特異的 CTL が誘導され⁶⁾, さらに, この 2 番目のアミノ酸のメチオニン (M) をチロシン (Y) に改変した改変型ペプチドは, 天然型のペプチドよりもさらに強い WT1 特異的 CTL の誘導能を持つことが明らかになった⁷⁾.

以上のことから, WT1 ペプチドによる WT1 特異的免疫反応がヒトにおいても十分期待できることがわかったため, WT1 ペプチドがワクチン

療法として以下に述べる臨床試験で実施されることになった。

Ⅲ WT1 ペプチドワクチン療法の臨床試験

WT1 ペプチドワクチンの臨床応用は、大阪大学医学部附属病院で精力的に行われてきた。2001年12月から同院において、白血病、骨髓異形成症候群、乳癌、肺癌の成人26名を対象としてWT1 ペプチドを用いた免疫療法の第Ⅰ相臨床試験⁸⁾が開始された。この試験においては、天然型または改変型ペプチドが Montanide ISA51 をアジュバントとして2週間ごとに3回皮内投与され、3回投与後有効と考えられる症例については投与が継続された。

その結果、微少残存白血病細胞を有する急性骨髄性白血病の6例中4例で白血病細胞の減少やWT1mRNA 値の低下が見られ、肺癌6例中3例、乳癌2例中2例に腫瘍マーカーの低下や腫瘍の縮小が観察された。接種が2回以下であった症例のうち骨髓異形成症候群の2例においては、奏効した結果、病的な造血幹細胞に由来する血球が著明に減少した⁹⁾。そのため、以後のMDS患者に対してはWT1 ペプチドの減量により血球減少を回避している¹⁰⁾。安全性に関しては上述の骨髓異形成症候群による血球減少を除き重篤な有害事象は認めず、安全に投与が可能であった。

この最初の臨床試験以降、海外を含め多くの報告がされている。血液腫瘍の他、腎癌、多発性骨髄腫、成人再発膠芽腫¹¹⁾などで病勢安定化、延命効果が多くみられ、効果を認めたとする報告が多い。

Ⅳ 小児がんに対する WT1 ペプチドワクチン療法

小児がん、特に悪性固形腫瘍における WT1 蛋白の発現についての報告は少ないが、Nakatsuka ら³⁾は成人も含めた解析でPNET/Ewingで3/7、横紋筋肉腫で6/6、骨肉腫で3/6の症例でWT1 高発現を報告している。我々の施設で検討した結果では、神経芽腫を除いて多くの小児悪性固形腫瘍や小児脳腫瘍で高頻度にWT1の強発現を認めた。

小児がんに対する WT1 ペプチドワクチン療法については、澤田らの報告¹²⁾以外にまとまったものはない。澤田らは15例16コースのWT1 ペプチド投与を行い、腫瘍残存例での投与例11例中3例に臨床的効果を認め、うち1例は寛解に至ったが後に再発している¹²⁾。高リスク症例の寛解期での投与例5例中4例が寛解を維持している。

本稿では当科で実施してきた臨床試験について概要を報告する。

1. WT1 ペプチドを用いた小児がんに対する免疫療法の第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験

当大阪大学医学部附属病院では、残存腫瘍（評価病変）を有する小児がん患者を対象に、倫理審査委員会の承認を得た後、2006年3月よりWT1 ペプチドワクチン療法の臨床試験を開始した。

患者適格基準は以下のすべてを満たす者である。

- ①急性白血病・悪性固形腫瘍と診断され、標準的治療法で十分な治療効果が得られなかった者、
- ②年齢が20歳未満の者、
- ③HLA 遺伝子型がA2402である者、
- ④腫瘍におけるWT1 遺伝子の発現が確認された者（白血病ではWT1mRNA 値が正常値を越える。正常値は骨髓 <1000 copy/ μ g RNA, 末梢血 50 copy/ μ g RNA；悪性固形腫瘍では免疫染色などにてWT1 蛋白が陽性）、
- ⑤当試験開始前に残存病変が確認されている者、
- ⑥残存病変最終確認後、化学療法や放射線療法が施行されない者、
- ⑦Performance Status が0-2の者、
- ⑧主要臓器の機能が保持されている者、
- ⑨代諾者および16歳以上の被験者から本試験参加について文書による同意が得られた者。

投与方法は、GMP グレードのHLA-A2402 拘束型 WT1 ペプチド改変型 (a. a. 235-243 CYTWNQMNL) とモンタナイドアジュバントのエマルジョンを作成し、即時型アレルギーがないことをWT1 ペプチドとして10 μ g 投与によって確認した後に、週1回12週間投与を行い、有害事象をモニターするとともに、腫瘍縮小効果をRECIST、あるいは末梢血、骨髓中の芽球、WT1mRNA 値により評価した。投与量は患者体重に従い決定した。すなわち、体重10 kg 未満で

表1 小児がんに対する WT1 ペプチドワクチン療法 (Phase I/II, 残存腫瘍あり)

症例	診断	年齢	前治療への反応	WT1 ワクチンに対する反応	WT1 ワクチン投与	結果 (月)
1	横紋筋肉腫	7	VGPR	CR	完遂→継続中	無病生存 (47)
2	骨肉腫	12	PD	PD	完遂	死亡 (12)
3	脂肪肉腫	16	PD	SD	完遂→継続→中止	担癌生存 (38)
4	滑膜肉腫	19	PD	PD	完遂	死亡 (3)
5	ALL	9	PD	PD	中止	死亡 (1)

ALL, acute lymphoblastic leukemia; VGPR, very good partial response; PD, progressive disease; CR, complete response; SD, stable disease

表2 末梢血中 WT1 特異的 CTL の推移 (文献 14 より引用)

症例	WT1 ワクチン投与前					WT1 ワクチン投与後				
	Total (%)	亜分画の割合 (%)				Total (%)	亜分画の割合 (%)			
		N	CM	EM	E		N	CM	EM	E
1	0.24	61.3	0	19.4	19.4	0.37 (4 週後)	38.5	0	24	36.5
2	0.08	36.1	11.1	13.9	38.9	0.52 (5 週後)	50	9.5	17.4	22.8
3	0.08	ND	ND	ND	ND	0.02 (8 週後)	ND	ND	ND	ND
4	0.09	50	0	8.3	41.7	0.16 (8 週後)	53	38.9	5.6	2.8
5	0.00	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	ND

N, naïve; CM, central memory; EM, effector memory; E, effector; ND, not done

は 0.5 mg, 体重 20 kg 未満では 1 mg, 体重 40 kg 未満では 2 mg, 体重 40 kg 以上では 3 mg とした。

これまでに計 5 例に対して WT1 ペプチド投与を行った (表 1)。症例 1 は胞巣型横紋筋肉腫 stage IV の症例で, 前治療に very good partial response (VGPR) を示し, 骨シンチ上骨転移が残存した状態で WT1 ペプチドワクチンの投与を開始した。投与開始後, 骨シンチの取り込みは消退傾向となり, 12 週後には取り込みが消失した。この症例では, WT1 ペプチドワクチンを間隔を空けて継続投与中であり, 現在, 投与開始後 4 年近くになるが無病生存中である。なお, この症例の詳細な経過は既に報告している¹³⁾。症例 1 を除く 4 例は, 大量化学療法も含めた集学的な前治療に対して抵抗性となった症例で, WT1 ペプチドワクチン投与時の病期が progressive disease (PD) での投与例である。投与 12 週後の評価で 1 例 (症例 3) に stable disease (SD) が認められた。残る 3 例については, RECIST による評価や腫瘍マーカーの推移によって一過性に効果が

認められた症例も存在したが結局 progressive disease (PD) となって投与を中止している¹⁴⁾。

WT1 テトラマーを用いたフローサイトメトリ法により WT1 特異的 CTL の割合を解析した結果を表 2 に示す。症例 1 では投与開始前より 0.24% (正常では 0.1% 以下) と増加を示しており, 投与前から原病によって WT1 に対する免疫反応が惹起されていたことを示唆している¹⁴⁾。症例 1, 2, 4 で WT1 ペプチドワクチン投与開始後に WT1 特異的 CTL が平均 0.14% から 0.35% と平均 3.3 倍に上昇しており, WT1 に対する免疫反応が誘導されたものと考えられた。また, 各亜分画をみると, 症例 1, 2 では effector memory や effector の亜分画が増加しており, ワクチン投与により効率的に免疫されていることが示唆される。症例 4 については, central memory が増加していたが, effector memory や effector への分化は進んでいなかった。症例 3 では WT1 特異的 CTL の増加を認めなかったが, 臨床的には SD と一定の効果がみられ, 腫瘍存在局所での免疫反応は起こっていたが末梢血 CTL の

表3 小児がんに対する同種移植後 WT1 ペプチドワクチン療法

症例	診断	年齢	同種移植時病期	WT ワクチン投与 時病期	WT1 ワクチン投与	結果 (月*)
6	ALL	4	3rd relapse	血液学的寛解 WT1mRNA ↑	継続中	無病生存 (24) WT1mRNA 正常化
7	AML	13	1st CR	血液学的寛解 WT1mRNA ↑	継続中	無病生存 (16) WT1mRNA 正常化

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CR, complete remission

* 同種移植後の月数

表4 小児がんに対する化学療法後 WT1 ペプチドワクチン療法

症例	診断	年齢	WT1 ワクチン投与	結果 (月*)
8	横紋筋肉腫再発	6	完遂→継続中	無病生存 (33)
9	横紋筋肉腫	9	中止 (再発)	再発 (1) 死亡 (5)
10	横紋筋肉腫	18	完遂	再発 (4) 死亡 (12)
11	神経鞘腫	9	継続中	無病生存 (10)
12	横紋筋肉腫	3	継続中	無病生存 (8)

* ワクチン開始後からの月数

増加にはつながらなかったものと推測される¹⁴⁾。

副作用については、局所の発赤・腫脹が全例に認められたがいずれも軽度であり、その他の重篤な有害事象は観察されず安全に投与可能であった。

以上の結果から、治療抵抗性の残存腫瘍を持ち、しかも PD の状態では、WT1 特異的 CTL が誘導されたとしても、WT1 ペプチドワクチンの臨床効果は期待しにくいことが明らかである。そのため、腫瘍量ができるだけ少ない時期、すなわち、臨床的に寛解にある状態で、あるいは、少なくとも minimal residual disease の状態での WT1 ペプチドワクチン療法が理想的であると考え、以下の同種移植後および化学療法後の WT1 ペプチドワクチン療法臨床試験を施行中である。

2. 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Ⅱ相試験

この臨床試験の対象は、血液腫瘍患者で同種造血幹細胞移植を受けた症例のうち、同種造血幹細胞移植後寛解ではあるが移植後再発の可能性が高い症例で、Primary End Point は再発までの期間

とし再発抑制効果をみるものである。その他の適格条件は、上記 第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験の②～④、⑦～⑨と同じである。投与は週 1 回、12 週の投与後、効果、安全に問題なければ投与を継続するものである。

これまでに 3 例に対して WT1 ペプチドワクチンを投与しており、長期投与例の 2 例を表 3 に示した。現在のところ、2 例とも血液学的寛解を維持している。いずれの症例でも WT1 投与開始後 WT1mRNA 値が正常化し、WT1 特異的 CTL の増加も認めている。

3. 難治性小児悪性腫瘍患者を対象とした化学療法後免疫療法としての WT1 ワクチンの有効性 第Ⅱ相試験

この臨床試験の対象は、画像上寛解部分寛解以上を得ているが再発のリスクが高く、再発後の生命予後が不良な横紋筋肉腫を含む軟部組織肉腫と神経芽腫を対象とした。その他の適格条件は上記 2 つの試験と同様であり、再発抑制効果をみる試験である。

現在までに 8 例に投与しているが、長期投与例

の5例を表4に示した。うち1例は横紋筋肉腫再発の症例で、同種移植後の寛解期にWT1 ペプチドワクチン投与を開始し、長期の寛解を維持している。しかし、2例では中枢神経系に早い時期に再発した。

V おわりに

小児がんに対する我々の経験を中心に概説した。WT1 ペプチドワクチン投与に伴う有害事象は局所の皮膚反応のみであり、高いQOLを保ったまま安全に投与可能である。効果が最も期待できるのは腫瘍量が少ない時期での投与であり、再発のリスクが高い小児がん患者の寛解期が最も良い適応と考えられるが、効果については今後のさらなる症例の蓄積が必要である。

謝辞：WT1 ペプチドワクチン療法を実施するにあたっては、大阪大学大学院医学系研究科 機能診断学 杉山治夫先生、同 呼吸器・免疫アレルギー内科学 岡 芳弘先生、同 生体情報学 尾路祐介先生、同 癌ワクチン療法学 坪井昭博先生、西田純幸先生に多大な御協力を頂きました。ここに深謝致します。

文 献

- 1) Cheever MA, et al: The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin Cancer Res. 15 : 5323-5337, 2009
- 2) Oka Y, et al: WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. Curr Opin Immunol. 20 : 211-220, 2008
- 3) Nakatsuka S, et al: Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. Mod Pathol. 19 : 804-814, 2006
- 4) Oka Y, et al: Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. J Immunol. 164 : 1873-1880, 2000
- 5) Oka Y, et al: Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product. Immunogenetics. 51 : 99-107, 2000
- 6) Ohminami H, et al: HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. Blood. 95 : 286-293, 2000
- 7) Tsuboi A, et al: Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. Cancer Immunol Immunother. 51 : 614-620, 2002
- 8) Oka Y, et al: Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. Proc Natl Acad Sci U S A. 101 : 13885-13890, 2004
- 9) Oka Y, et al: Wilms tumor gene peptide-based immunotherapy for patients with overt leukemia from myelodysplastic syndrome (MDS) or MDS with myelofibrosis. Int J Hematol. 78 : 56-61, 2003
- 10) Kawakami M, et al: Clinical and immunologic responses to very low-dose vaccination with WT1 peptide (5 microg/body) in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. Int J Hematol. 85 : 426-429, 2007
- 11) Izumoto S, et al: Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. J Neurosurg. 108 : 963-971, 2008
- 12) 澤田明久, 他: 小児がんに対する WT1 ペプチドによるワクチン療法. 小児がん. 46 : 6-16, 2009
- 13) Ohta H, et al: WT1 (Wilms tumor 1) peptide immunotherapy for childhood rhabdomyosarcoma: a case report. Pediatr Hematol Oncol. 26 : 74-83, 2009
- 14) Hashii Y, et al: WT1 peptide immunotherapy for cancer in children and young adults. Pediatr Blood Cancer (in press)