

CML に対する WT1 ペプチドワクチン療法による
WT1 特異的 CTL の長期間の増幅岩谷 俊平¹⁾・成田美和子¹⁾・増子 正義²⁾・西澤 幹則¹⁾
大岩 恵理¹⁾・井田 桃里²⁾・岩渕 南¹⁾・内山 孝由¹⁾
柴崎 康彦²⁾・瀧澤 淳²⁾・曾根 博仁²⁾・高橋 益廣¹⁾

Key words : WT1 ペプチドワクチン, CML, WT1 抗原, 細胞傷害活性 T 細胞 (CTL), 細胞傷害活性

要旨 imatinib と改変型 WT1 ペプチドワクチンの併用療法を行った HLA-A*24:02 陽性の慢性骨髄性白血病慢性期 (chronic myeloid leukemia-chronic phase ; CML-CP) の症例に対し, ワクチン接種前から 4 週間毎に 14 日の末梢血単核球を混合リンパ球ペプチド培養 (mixed lymphocyte peptide culture ; MLPC) 行い, WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞の末梢血 CD8 陽性細胞中の頻度の変動を 6 年間継続して解析した。ペプチドを添加した自己 B 細胞株を標的細胞として細胞傷害活性試験を行い, 今回検出された WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞は確実に細胞傷害活性を有することを確認した。

WT1 ペプチドワクチンの臨床効果も確認された。すなわち, ワクチン投与終了 7 ヶ月後には, bcr/abl コピー数が次第に減少し MMR (major molecular response ; MMR) に入り, その後, CMR (complete molecular response ; CMR) に到達し, WT1 ペプチドワクチン投与終了後 5 年経過した現在も CMR は維持されている。

WT1 ペプチドワクチンと imatinib 併用療法は, TKI (tyrosine kinase inhibitor ; TKI) が十分に作用できない CML 幹細胞に対し有効である可能性が示された。

緒言

WT1 遺伝子は, 小児の腎腫瘍である Wilms 腫瘍の原因遺伝子として発見された。白血病や固形腫瘍においても腫瘍関連遺伝子/抗原タンパクとして高発現していることが確認され, 白血病治療においては, WT1 mRNA の量的測定が, 顕微鏡的に確認が難しい微量残存病変の推移の測定に応用されている。一方, 抗腫瘍免疫療法における標的分子としても注目されており, 体内の WT1 タンパクに対する細胞傷害性 T 細胞を増幅する目的で, WT1 ペプチドワクチン療法が開発された。WT1 タンパクのアミノ酸配列のうち, 日本人の約 7 割が有する HLA-A*24:02 と最も結合力の高い 9 個のアミノ酸配列を選択した。さらに結合力を高めるために 2 番目のアミノ酸のメチオニンをチロシンに置換した改変型ペプチドをワクチンとして臨床投与している。本

邦や欧米を中心として WT1 ペプチドワクチンや WT1 ペプチドをパルスした単球由来樹状細胞を用いた樹状細胞ワクチンの臨床試験が進行中である^{1) 2)}。

imatinib は, bcr/abl チロシンキナーゼ活性を阻害し CML (chronic myeloid leukemia ; CML) 細胞の増殖を抑制する分子標的治療薬の代表的薬剤である。本邦では 2001 年に認可され CML の第一選択薬として使用され劇的な効果が確認されている³⁾。CML に対する TKI (tyrosine kinase inhibitor ; TKI) としては, その後, 第二世代の nilotinib や dasatinib が加わり, 最近の CML 治療の目標は, 最低でも遺伝子学的寛解 (major molecular response ; MMR, 当初の WT1 mRNA 量の 3 log reduction がほぼ匹敵) を得ること, さらには遺伝子学的完全寛解 (complete molecular response ; CMR) を達成して, TKI 治療を中止可能にするという進歩を遂げている。しかし, 一部に, 治療中に薬剤抵抗性となる例, 治療

1) 新潟大学大学院保健学研究科 血液腫瘍検査学

2) 新潟大学大学院医歯学総合病院 血液学内科

平成 26 年 2 月 24 日受理

初期からチロシンキナーゼ阻害薬が効きにくい症例、さらに細胞遺伝学的寛解(complete cytogenetic response; CCR)は得られてもそれ以上の深い寛解に達しない例などが存在し、これらの例に対する治療の工夫が必要である。欧米ではTKIにIFN- α を併用する研究が行われているが強い副作用の発現が障害となっている。

WT1遺伝子はCMLクローンに由来する細胞でも高発現している事が確認されている⁴⁾。CMLのマーカーであるbcr/abl遺伝子やタンパクはCML特異的抗原ではあるが、bcr/ablタンパクをターゲットとしたペプチドワクチン療法の開発は難しくimatinibに代表されるbcr/ablを分子標的としたTKIがその役割を担っている。このTKIによる増殖抑制効果やアポトーシス誘導効果が弱いCML細胞に対して、TKIにWT1ペプチドワクチンを併用する臨床研究が開始された。

本研究は、新潟大学医歯学総合病院血液内科において、imatinib治療にWT1ペプチドワクチンの併用を行ったCML例におけるWT1特異的免疫反応および抗腫瘍効果を評価した。抗腫瘍効果の評価には、bcr/abl mRNAの定量とリンパ球ペプチド混合培養法(mixed lymphocyte peptide culture; MLPC)を用いて増幅したWT1特異的細胞傷害性T細胞をMHC tetramerを用いて詳細に検出し定量した。

材料と方法

症例

51歳男性。2003年1月、慢性骨髄性白血病慢性期(CML-CP; chronic myelocytic leukemia-chronic phase)の診断でイマチニブ400mg通常量の内服を開始した。末梢血bcr/abl mRNAのコピー数はRNA1 μ gあたり700前後まで減少したが、治療開始29ヶ月後に4000まで増加したためimatinibを600mgへ増量した。しかし、副作用としての貧血の進行、右下肢痛やCK値上昇などが出現し、36ヶ月後に400 mgへ戻した。末梢血bcr/abl コピー数は増量の効果にて低下傾向となり500前後まで減少したが、治療開始後51ヶ月目に再度上昇に転じ1000程度まで増加した。imatinibのみで、bcr/ablコピー数の3 log reductionレベル到達(310コピー)は困難と判断し、HLA-A*24:02陽性であったことから、治療開始後57ヶ月目の2007年10月よりHLA-A*24:02特異的改変型WT1ペプチドワクチンの併用を大阪大学のプロトコールに従って開始した。なお、本治療と検討は、新潟大学倫理委員会とIRBの承認、および本人の同意を得た後に施行された。

WT1ペプチド投与

大阪大学のプロトコールに従い改変型WT1ペプチド(CYTWNQMNL)3mgをDMSOで溶解後、5%ブドウ糖液にて希釈し、Montanideを加えてemulsionを作成し、その1mgを上腕と大腿の2箇所皮下注射した。1から11回目は2週間間隔で、その後は4週間間隔で投与した。

混合リンパ球ペプチド培養(mixed lymphocyte peptide culture; MLPC)

末梢血を採取し、2500 rpm、20分の遠心により血漿を分離した。血漿にトロンビン(ミドリ十字、大阪)を5 U/ml加え37 $^{\circ}$ Cで1-2時間反応させた後、2500 rpm、20分遠心により血清を分離した。また、血漿分離時のinterfaceからLymphoprep(Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway)を用いて単核球分離を行った。得られた単核球を 3×10^5 個/wellになるように、ペニシリン/ストレプトマイシン(Life technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を加えたRoswell Park Memorial Institute-1640培養液(PMI1640; Life technologies Corporation)に浮遊させ、5%自己血清と改変型WT1ペプチド10 μ g/mlを加えて、各wellあたり100 μ lずつを96well U-bottomプレートに敷き込んで培養を開始した。3日後にInterleukin-2(IL-2; シオノギ製薬、大阪)50 U/mlを加えた培養液を100 μ l加え、その後は2-3日毎に上清を100 μ lずつIL-2を加えた培養液と交換した。培養開始後14日目に各wellについてフローサイトメトリーを用いて改変型WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞が増幅され検出されるか否かについての解析を行った。末梢血中のWT1特異的CTL、すなわちWT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞の頻度は(WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺陽性細胞が検出されたwell)/(well当たりの敷きこみ単核球数 \times 培養well数 \times CD8⁺細胞の割合)の計算式から算出した。

フローサイトメトリーを用いたWT1/MHC-tetramer解析

MLPC後のwell中の全ての細胞を抗体染色した。Fc γ レセプターブロック試薬、各種蛍光標識抗体を加え4 $^{\circ}$ C、20分間反応させ染色した。抗体は、FITC標識IgG1(BD Biosciences)、CD3、CD8(BioLegend, San Diego, CA, USA)、PE標識改変型WT1/MHC-tetramer(HLA-A*24:02 WT1 mutant tetramer- CYTWNQMNL, 医学生物学研究所、長野)、HIV tetramer(Lot No.110d A*24:02-HIV-1 env-RYL-PE:RYLRDQQLL, がんセンター腫瘍免疫学部、愛知)、PC5標識CD8(Beckman Coulter,

Fullerton, CA) を使用した。染色後, PBS で 1 回洗浄し, フローサイトメトリーを用いることにより解析した。データは CellQuest software を用いて処理した。

WT1 ペプチドワクチンとイマチニブ併用療法による免疫反応

末梢血 bcr/abl mRNA のコピー数は, 新潟大学医歯学総合病院血液内科にて GAPDH を内在性コントロールとして Real Time PCR にて 3-4 ヶ月後に測定された。末梢血単核球を用いた 14 日間の MLPC を用いた WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞の frequency の計算は 4 週毎に行った。bcr/abl mRNA のコピー数と WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞の頻度の変動を評価することによって, ワクチンの臨床的な効果を評価した。

細胞傷害性試験

標的細胞としては, 10 μM の 5,6-carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR) で標識された自己 B 細胞株を使用した。効果細胞には 14 日間 MLPC を行った後の well 中の全ての細胞を用いた。標的細胞と効果細胞を 37°C, 4 時間, 5%CO₂ で培養した。共培養後, 7-amino-actinomycin.D (7AAD; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) で暗所にて 15 分間反応させ, フローサイトメトリーを用いて解析を行った。CFSE⁺7AAD 細胞を生細胞とし, 標的細胞のみを加えたコントロールと比較して減少した生細胞数から細胞傷害活性を算出した。

Cold target inhibition test

CFSE で標識された自己 B 細胞株 (hot target) と標識されていない自己 B 細胞株 (cold target) を使用した。WT1 ペプチドをパルスした B 細胞株を標的細胞として, 細胞傷害性試験同様に効果細胞と共培養し細胞傷害活性を解析した。また, CFSE で標識された自己 B 細胞株に抗 MHC class I 抗体 (clone W6/32, mouse IgG2a; Serotec Oxford, UK), 抗 MHC class II 抗体 (clone Tu39, mouse IgG2a; BD Pharmingen, San Diego, CA) をそれぞれ 10 μg/ml 加え 30 分間反応させ, 細胞傷害性試験同様に効果細胞と共培養し細胞傷害活性を解析した。

ELISpot assay (ELISpot; Enzyme-Linked ImmunoSpot)

解析には, ELISpot^{plus} for Human IFN-γ キット (Mabtech Nacka Strand, Sweden) を使用した。ELISpot plate に monoclonal antibody 1-D1K 15 μg/ml を固相化し, 14 日間 MLPC にて WT1 特異的細胞傷害性 T 細胞を増幅

した。回収した well 毎のリンパ球は, IL-2 を取り除くため RPMI-1640 で 3 回洗浄した後 ELISpot plate に加え 37°C, 5%CO₂, 48 時間で培養した。Anti-CD3mAb CD3-2 を加えた well を陽性 control とした。培養細胞を取り除いた plate に Biotinylated monoclonal antibody 1 μg/ml を加え 2 時間反応させ, Streptavidin-Alkaline Phosphatase 1 μg/ml を加えて 1 時間反応させ, 最後に BCIP/NBT-plus substrate を加えて 15-30 分間反応させた。実体顕微鏡 1.5 倍にて観察し, spot の数を測定した。

結果

MLPC による WT1/MHC tetramer⁺細胞の検出 (図 1)

MLPC 後の各 well の細胞について, WT1 特異的 T 細胞が増幅したか否かを確認し, 明らかに WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞が検出された well を陽性 well としてその割合を算出した。末梢血単核球を WT1 ペプチドと共培養せず直接染色した場合は WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞は極めて少数で, frequency の継時的解析を行うには MLPC を用いた解析の方が優れていた。なお, ペプチドワクチン治療開始前の末梢血を用いた MLPC では tetramer 陽性 well は認められなかった。

WT1 ペプチドワクチンとイマチニブ併用療法による免疫反応 (図 2)

WT1 ペプチドワクチン投与 13 回目以降末梢血単核球由来 RNA 1 μg あたりの bcr/abl mRNA のコピー数は減少し, WT1 ペプチドワクチン投与を終了してから 7 ヶ月後には 170 コピーにまで減少し MMR を達成した。11 ヶ月後には検出感度以下まで減少し CMR を達成した。WT1 ペプチドワクチン投与終了してから 5 年経過した現在でも継続して CMR を維持している。ワクチン投与 2 回目以降から, WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞が検出され, 末梢血中に占める頻度は約 5-15 個/10⁶CD8⁺リンパ球で WT1 ペプチドワクチン投与を終了後も検出されている。

MLPC により誘導されたリンパ球の細胞傷害性試験 (図 3)

MLPC により誘導された well ごとのリンパ球を効果細胞, WT1 ペプチドをパルスした自己 B 細胞株を標的細胞として, 細胞傷害性試験を行った。ペプチドをパルスしていないコントロールに比べて多くの well の細胞においてペプチドをパルスした自己 B 細胞株に対して強い細胞傷害活性が見られた。また, 大部分の well で改変型だけでなく野生型のペプチドをパルスした自

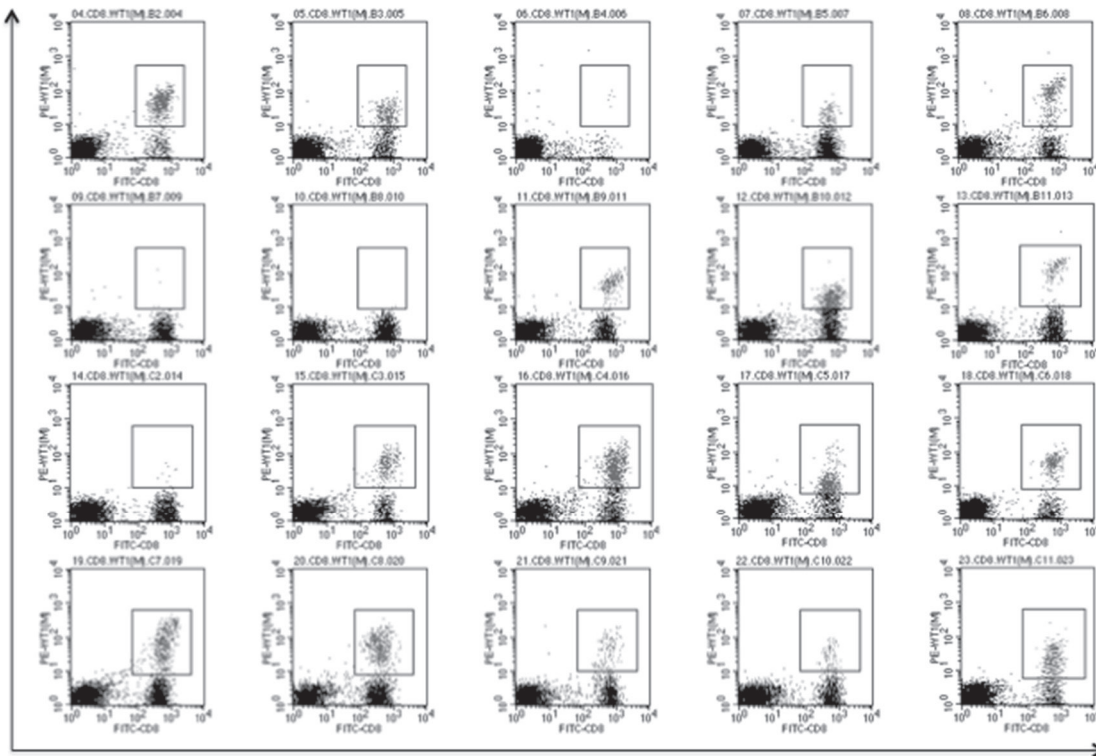


図1. MLPCを行った各wellのWT1/MHC-tetramer解析。HIV tetramerを陰性コントロールとして、WT1/MHC-tetramer陽性wellを検出した。

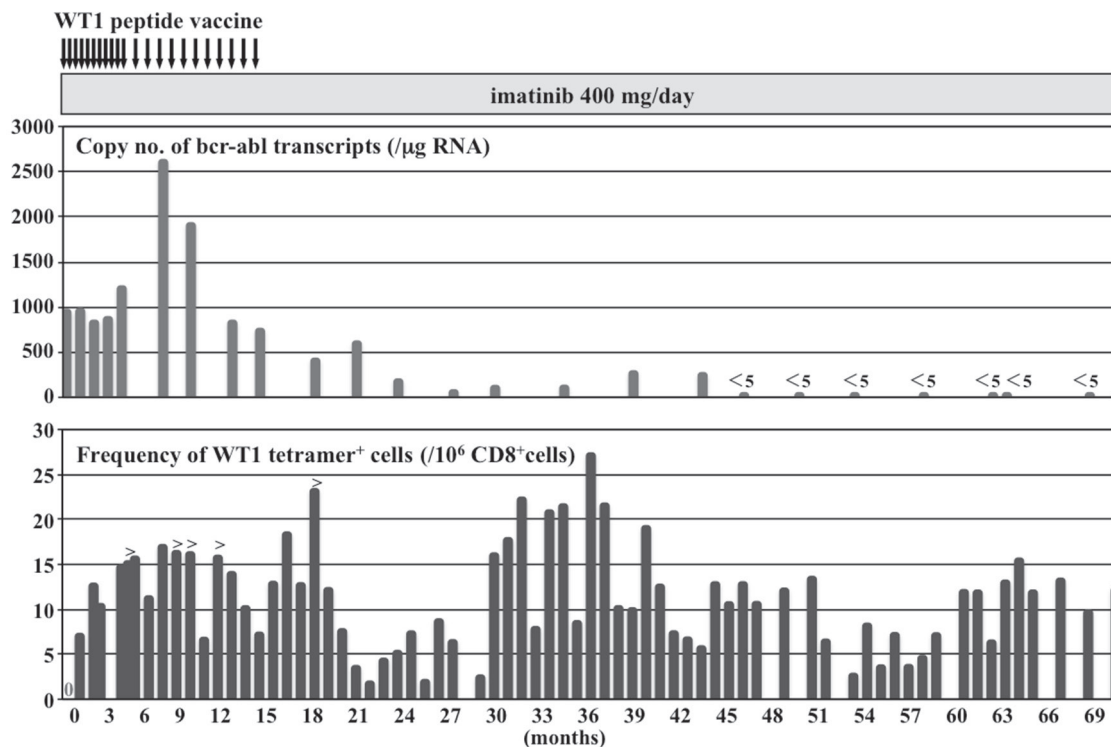


図2. WT1ペプチドワクチン投与後の経過, bcr/abl mRNAコピー数の変化とWT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺の出現頻度の推移。

CML に対する WT1 ペプチドワクチン療法による WT1 特異的 CTL の長期間の増幅

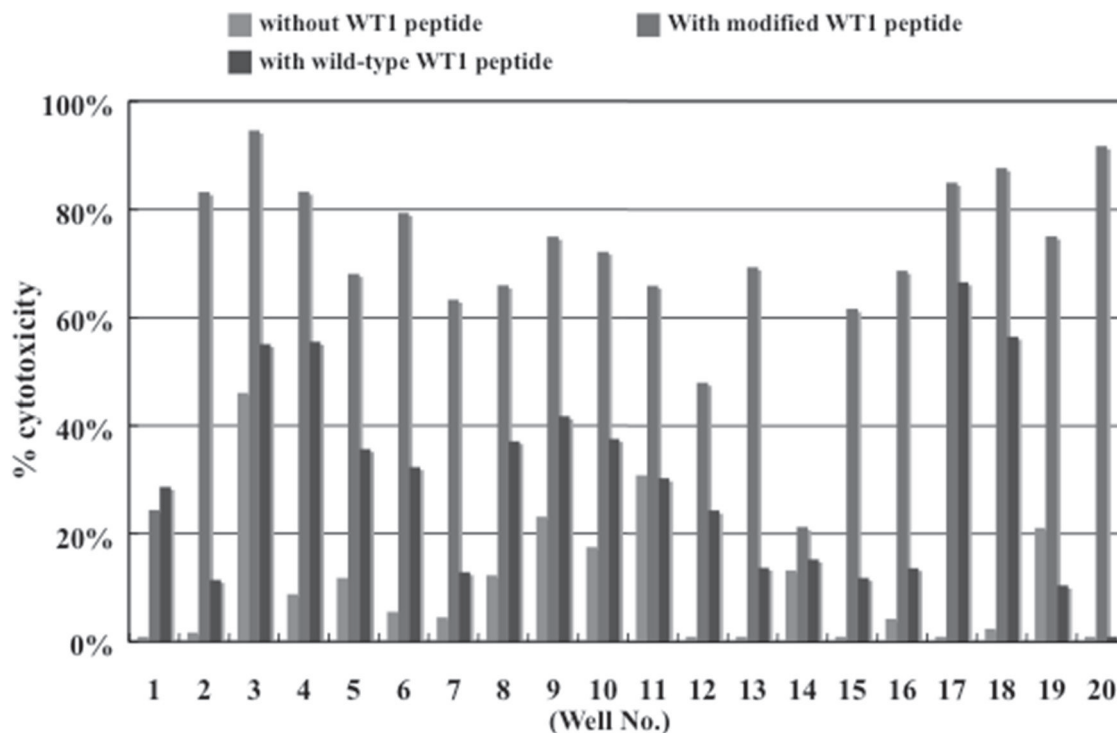


図3. MLPCより得られた細胞を効果細胞, CFSE染色し, ペプチドをパルスした自己B細胞株を標的細胞として行った細胞傷害性試験。

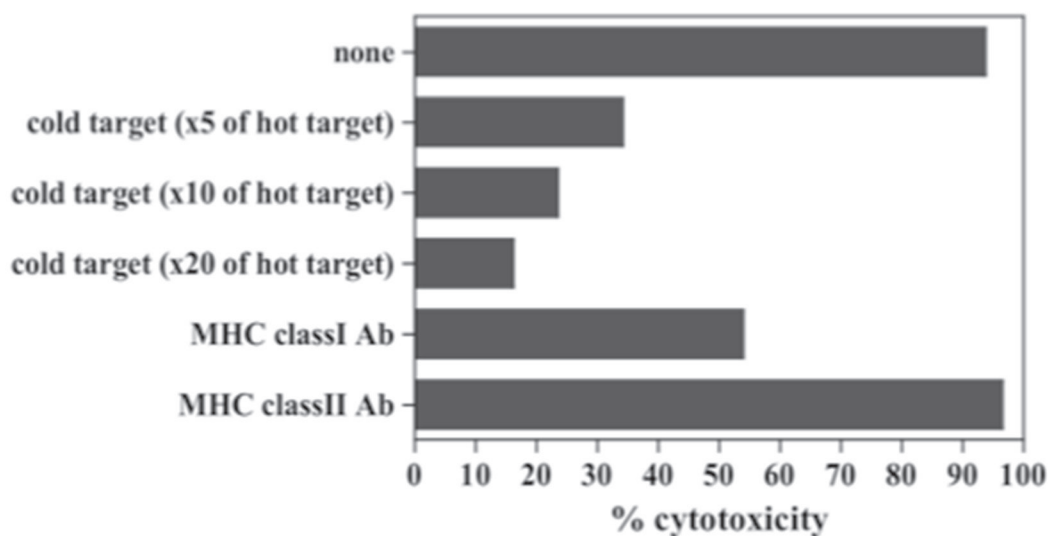


図4. MLPCにより誘導されたリンパ球の細胞傷害性に関するcold target および抗HLA抗体による抑制試験。CFSEで標識した自己B細胞株 (hot target), 標識していない自己B細胞株 (cold target) を図で示した割合, CFSEで標識された自己B細胞株に抗MHC class I抗体, 抗MHC class II抗体をそれぞれ10 µg/ml加えた細胞傷害性試験の結果を示す。

己B細胞株に対して細胞傷害活性が確認され、改変型WT1ペプチドによって誘導されたWT1特異的細胞傷害性T細胞は野生型のWT1ペプチドも認識し臨床効果があることが証明された。

MLPCにより誘導されたリンパ球のCold target inhibition test (図4)

MLPCにより誘導されたwellごとのリンパ球を効果細胞、WT1ペプチドをパルスした自己B-LCLを標的細胞として、細胞傷害性試験を行った。cold targetを加える事で細胞傷害活性の抑制が認められた。抗MHC class I抗体を加える事で細胞傷害活性が抑制され、抗MHC class II抗体を加えたものでは抑制が認められなかった。この結果から、MLPCによって誘導されたWT1 tetramer陽性細胞の細胞傷害性はペプチド特異的でHLA class I拘束性であることが確認された。

MLPCにより誘導されたリンパ球のELISpot assay(図5)

MLPCにより誘導されたリンパ球を用いてELISpot

assayを行った。改変型WT1ペプチドを加えたWT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺陽性wellで、IFN- γ 分泌が確認できた。WT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺陰性wellにおいてもIFN- γ 陽性の反応が検出されたことにより、WT1/MHC-tetramer陽性率との有意な相関を確認することはできなかった。

考察

WT1遺伝子はWilms腫瘍の原因遺伝子として発見され、白血病や各種固形腫瘍で高発現していることが確認されている^{5),6)}。2000年に大阪大学の杉山らは、WT1タンパクの amino acid配列の中からマウスのMHC class IであるH-2Db分子に結合する9merのWT1ペプチドを発見し、in vivoで誘導されたWT1特異的CTLが正常造血幹細胞を傷害しない事を確認している^{7),8)}。同様にヒトのHLA-A*02:01分子との結合能が高い9個の amino acid配列のWT1ペプチドを見つけ、このペプチドを用いることでin vitroでHLA-A*02:01拘束性の細胞傷

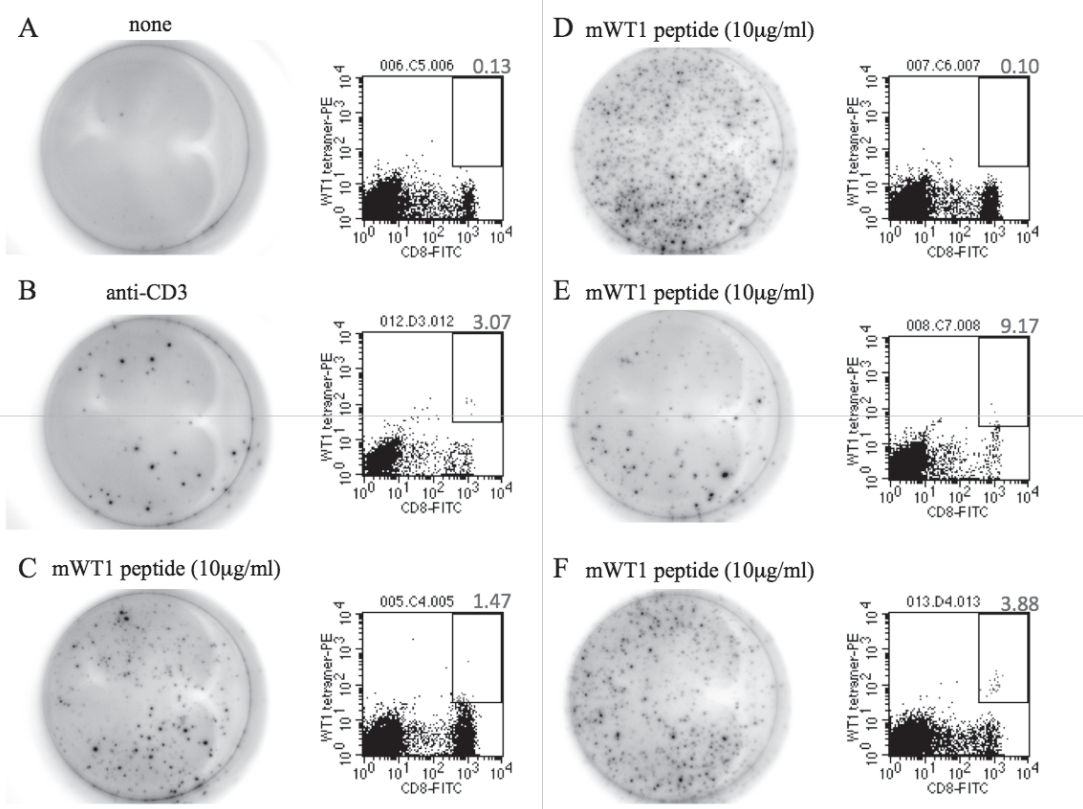


図5. MLPCにより誘導されたリンパ球のELISpot assay。各wellの実体顕微鏡で観察し、撮影した写真とWT1/MHC-tetramer解析結果。A; MLPCにより誘導されたリンパ球のみで培養したwell, B; MLPCにより誘導されたリンパ球とAnti-CD3mAb CD3-2を加えたwell, C, D, E, F; MLPCにより誘導されたリンパ球と改変型WT1ペプチド 10 μ g/mlをそれぞれ加えたwell。右に示すWT1/MHC-tetramer陽性率とspot数の相関は見られなかった。

害活性を有するWT1特異的CTLが誘導可能であることが確認された⁹⁾。HLA-A*24:02に対してもWT1ペプチドで刺激することにより、ヒト末梢血単核球からWT1特異的CTLが誘導出来ることがin vitroの実験において証明されている¹⁰⁾。また、野生型WT1ペプチド(CMTWNQMNL)の2番目のメチオニン(M)をチロシン(Y)に置換した改変型WT1ペプチド(CYTWNQMNL)を合成し、HLA-A*24:02に対する結合力が野生型に比べ強いことを発見している^{11),12)}。

本研究では、イマチニブ治療により細胞遺伝学的完全寛解(CCR; complete cytogenetic response)を得られたHLA-A*24:02陽性慢性期CML症例において、24ヶ月を過ぎてもbcr/abl コピー数が3 log reductionレベルに達しなかったため、新潟大学倫理委員会の承認と本人の同意を得た後、新潟大学付属病院第一内科にてWT1ペプチドワクチンとイマチニブの併用療法を行った例において、WT1特異的免疫反応および抗腫瘍効果を評価した。固形腫瘍例に対する改変型WT1ペプチドワクチンの安全性と体内のWT1特異的CTLの増幅が報告されていたことから、本症例に投与するWT1ペプチドワクチンとしては改変型WT1ペプチドを選択した。

末梢血中のWT1特異的CTLは非常に少なくtetramer染色の直接法で正確に定量することは難しい。今回MLPCを行う事でWT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞を増幅して検出することが可能であることが証明された。この方法で症例のCTLを4週間毎に追跡した結果、22回のWT1ペプチドワクチン終了から5年以上経過してもWT1特異的CTLはワクチン投与期間中と同程度の頻度で存在していることが確認された。

細胞傷害性の最終的な証明は、CTLのペプチド特異的INF- γ やTNF- α などのサイトカインの細胞外への確実な分泌あるいは細胞傷害分子であるperforinやgranzymeの分泌そのものを測定することである。抗原特異的CTLが多い感染症の分野では最近報告が認め始めているが、抗腫瘍免疫応答の検討では、血液中に僅かに存在する腫瘍抗原特異的CTLの抗原特異的分泌を測定する方法はまだ確立されておらず、従って、抗原特異的tetramer陽性細胞の検出が免疫増強効果の確認手段に止まっている。我々は、本症例のWT1ペプチド特異的CTLを1個からMLPCを用いて増幅しcloneを作成してその性格を継時的に解析することに成功した。確実なINF- γ の産生の確認にはELISPOT法を用いることが最適であるが、培養細胞においては、コントロール細胞の処理を含めて条件の設定が難しい。

今回の試みでは、WT1ペプチド特異的なINF- γ の産生傾向は確認できたが、条件設定にはさらなる工夫が必要であると思われた。

WT1ペプチドワクチン投与8回目以降bcr/ablコピー数の増加傾向が認められたが、13回目の投与以降bcr/ablコピー数は減少した。WT1ペプチドワクチン投与を終了してから7ヶ月後、bcr/ablコピー数は減少し3 log reductionを達成した。11ヶ月後には検出感度以下まで減少しCMRを達成した。bcr/abl mRNAのコピー数の減少と、MLPC法とテトラマーを用いたWT1/MHC-tetramer⁺CD8⁺細胞の検出に関連が認められたことから、WT1ペプチドワクチンによって増幅されたWT1特異的CTLが、CMLに対する持続的な抗腫瘍効果を有することが想定された。

MLPC法により抗原CTLの正確な出現頻度を計算し、MLPC法によって増幅したCTLの性格を解析することは、感染症や腫瘍免疫療法において、その病態や治療効果をさらには予防効果を客観的に評価することに寄与できる検査法であると思われる。

引用文献

- 1) Miyatake T, Ueda Y, Morimoto A, et al. WT1 peptide immunotherapy for gynecologic malignancies resistant to conventional therapies: a phase II trial. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Mar;139(3):457-63. doi: 10.1007/s00432-012-1348-2. Epub 2012 Nov 18.
- 2) Coosemans A, Vanderstraeten A, Tuyaerts S, et al. Wilms' Tumor Gene 1 (WT1)- loaded Dendritic Cell Immunotherapy in Patients with Uterine Tumors: A Phase I/II Clinical Trial. *Anticancer Res*. 2013 Dec;33(12):5495-500.
- 3) Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003 Oct 9;349(15):1423-32.
- 4) Schwartz J, Pinilla-Ibarz J, Yuan RR, et al. Novel targeted and immunotherapeutic strategies in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2003 Jan;40(1):87-96.
- 5) Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 1990 Feb 9;60(3):509-20.
- 6) Gessler M, Poustka A, Cavenee W, et al. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*. 1990 Feb 22;343(6260):774-8.
- 7) Oka Y, Udaka K, Tsuboi A, et al. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):1873-80.
- 8) Tsuboi A, Oka Y, Ogawa H, et al. Cytotoxic T-lymphocyte responses elicited to Wilms' tumor gene WT1 product by DNA vaccination. *J Clin Immunol*. 2000 May;20(3):195-202.
- 9) Oka Y, Elisseeva OA, Tsuboi A, et al. Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product. *Immunogenetics*. 2000 Feb;51(2):99-107.
- 10) Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S, et al. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):286-93.
- 11) Maier R, Falk K, Röttschke O, et al. Peptide motifs of HLA-A3, -A24, and -B7 molecules as determined by pool sequencing. *Immunogenetics*. 1994;40(4):306-8.
- 12) Kondo A, Sidney J, Southwood S, et al. Prominent roles of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A24 human class I molecules. *J Immunol*. 1995 Nov 1;155(9):4307-12.
- 13) Gao L, Bellantuono I, Elsässer A, et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood*. 2000 Apr 1;95(7):2198-203.

Long term generation of WT1 specific cytotoxic T lymphocytes in CML case treated with WT1 peptide vaccine

Shunpei IWAYA¹⁾, Miwako NARITA¹⁾, Masayoshi MASUKO²⁾, Yoshinori NISHIZAWA¹⁾
Tori IDA²⁾, Eri OIWA¹⁾, Minami IWABUCHI¹⁾, Takayoshi UCHIYAMA¹⁾
Yasuhiko SHIBAZAKI²⁾, Jun TAKIZAWA²⁾, Hirohito SONE²⁾, Masuhiro TAKAHASHI¹⁾

1) Laboratory of Hematology and Oncology, Graduate School of Health Sciences, Niigata University

2) Department of Hematology, Niigata University Medical and Dental General Hospital

Key words : WT1, cytotoxic T lymphocyte (CTL), peptide vaccine, CML, cytotoxicity

Abstract To clarify the effectiveness and safety of WT1 peptide vaccination against the residual CML cells, we started WT1 peptide vaccination in combination with regular dose of imatinib for a CML-CP patient who had been treated with 400 mg imatinib for 4 years but not achieved MMR. HLA-A*24:02-restricted mutant type WT1 peptide vaccination was undertaken 22 times totally. The appearance of WT1-specific CTLs in PB was confirmed by evaluating the frequency of MHC/WT1 tetramer⁺CD8⁺ T cells by using mixed lymphocyte peptide culture (MLPC) system every 4 weeks. WT1 tetramer⁺ cells detected by MLPC system were investigated for WT1 specific cytotoxicity. Bcr-abl transcripts have decreased to less than 500 copies by the administration of WT1 peptides every 4 weeks. After 7 months from the cessation of vaccination, transcripts decreased to the level of CMR, which is lasting thereafter Tumor antigen specific peptide vaccine therapy in combination with molecular targeted therapy is one of the potent methods for eradicating cancer stem cells.

Accepted : 2014.2.24