

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791781

研究課題名(和文)腎癌、膀胱癌に対するペプチドワクチン療法の抗腫瘍効果の解明と臨床試験

研究課題名(英文) Solution of the antitumor effect and clinical trials of the peptide vaccine therapy for renal cell carcinoma and bladder cancer

研究代表者

小原 航(Obara, Wataru)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：90337155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドワクチン療法を実施した臨床検体を用いて、治療効果に関連する因子の検討を行った。全例にMPHOSPH1およびDEPDC1抗原の発現は認められたが、発現強度と腫瘍のグレードやステージの間に相関は認めなかった。80%以上の症例でワクチン投与後にCTL誘導を認め、経過観察中にもCTL誘導は維持されていた。ワクチン投与部位の反応(発赤、腫脹、硬結)を認めた症例は、認めなかった症例と比較して、再発率の低下を認めた。Performance Status、CTL誘導およびワクチン投与部位反応が、ワクチンの治療効果の関連因子として同定された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the predictive factor associated with the effect of the peptide vaccine treatment using clinical specimen. The expression of MPHOSPH1 and DEPDC1 antigen were recognized in all cases, but there was no correlation between expression intensity and grade and stage of the tumor. Cases 80% or more showed CTL induction after vaccination, and the CTL induction was maintained during follow-up period. The patient in recognition of the response of the vaccine administration site showed a decrease of the recurrence rate as compared with an absent case. Performance Status, CTL induction and injection site reaction were identified as an associated factor of the peptide vaccine treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：がんペプチドワクチン療法

### 1. 研究開始当初の背景

2010年4月にFDAが前立腺癌ワクチン(Provenge)を癌治療用ワクチンとして初めて承認したこともあり、癌ワクチン療法は世界的に脚光を浴びている。腫瘍免疫の歴史としては、1980年代後半にT細胞抗原受容体が発見され、90年代になり細胞障害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte; CTL)によって認識されるヒトの癌抗原が同定可能となった。その抗原の正体は8-10個のアミノ酸残基からなる短鎖ペプチドである事が判明し、世界中で癌抗原の遺伝子クローニング、抗原ペプチドの同定、それらを用いたペプチドワクチン療法の研究が進められている。この領域は国内外問わず急速な進展がみられている。理想的な癌抗原とは、発現が癌細胞特異的である癌細胞の増殖に不可欠である強い免疫原性を有する抗原に反応するCTLが豊富などが条件としてあげられる。我々はこれまでにcDNAマイクロアレイ解析により腎癌および膀胱癌細胞に特異的に発現し、癌細胞の増殖に必須である新規遺伝子(HIG2, MPHOSPH1, DEPDC1)を同定してきた。さらに、この遺伝子からなる蛋白のアミノ酸配列のうち、CTL活性を強力に有するHLA-A\*24またはA\*02拘束性ペプチドを同定した。次いでGMPグレードのペプチドを精製し、これらペプチドを用いた医師主導型臨床試験を実施してきた。進行性膀胱癌症例に対するMPHOSPH1およびDEPDC1遺伝子由来HLA-A\*2402拘束性ペプチドワクチン療法の第1相試験の結果、忍容性が十分でペプチド特異的CTLが高頻度に検出され、一部の症例で抗腫瘍効果を認めた。同様に、進行性腎癌症例に対するHIG2遺伝子由来HLA-A\*02拘束性ペプチドワクチン療法の第1相試験の結果、本治療は忍容性が十分でペプチド特異的CTLが検出され、生存期間の延

長が期待されることを報告した。

### 2. 研究の目的

本研究では腎癌、膀胱癌に対するペプチドワクチン療法の免疫学的作用機序を明らかにするとともに、ペプチドワクチン療法をより効率よく発揮させるための免疫環境を解明し、癌の再発予防や新規治療の確立へと発展させることを目的とする。最終目標としては個々の腎癌、膀胱癌患者に適切なペプチドワクチン療法を提供したいと考える。

### 3. 研究の方法

(1)膀胱癌臨床検体を用いたMPHOSPH1, DEPDC1抗原およびHLA-classの発現解析  
膀胱癌標本の未染色スライドを作成し、抗MPHOSPH1, DEPDC1抗体を用いて免疫染色を行う。これらの発現程度と臨床病理学的因子(癌の浸達度、悪性度、静脈浸潤等)との関連をretrospectiveに検討する。また、同臨床検体を用いた免疫染色によりHLA-class発現の検討も行う。

(2)腎癌臨床検体を用いたHIG2抗原およびHLA-classの発現解析  
腎癌標本の未染色スライドを作成し、抗HIG2抗体を用いて免疫染色を行う。これらの発現程度と臨床病理学的因子(癌の浸達度、悪性度、静脈浸潤等)との関連をretrospectiveに検討する。また、同一検体を用いた免疫染色によりHLA-class発現の検討も行う。

(3)臨床試験の立案ならびに実施  
ワクチン療法が最も効果を発揮するのは術後アジュバントによる再発予防とされる。これまで実施した第1相臨床試験の結果から、適切なペプチド投与量や投与回数を評価し、第2相臨床試験のプロトコルを立案し実施する。

(4)ペプチド特異的CTL誘導能測定  
ヒト血液検体およびDNAを用いた研究に際

しては、本学の倫理委員会の承認を経た後に実施する。腎癌、膀胱癌患者からの血液サンプルはワクチン治療前後のHLA-A\*2402またはA\*0201陽性の患者から採取する。末梢血サンプル50mlからFicoll-Conray密度勾配遠心法によって、末梢血単核球細胞(PBMC)を単離する。抗原提示細胞の調整は、PBMC中のプレート接着細胞をGM-CSF、IL-4の存在下で培養してDC(樹状細胞)を誘導し、ペプチドをパルスした後、X線照射して抗原提示細胞とする。CTL活性の測定についてはPBMCよりmagnetic beadsで分離したCD8<sup>+</sup>細胞と抗原提示細胞をプレートのウェルに加え、IL-7存在下で培養する。その後、IL-10を加え、ペプチドをパルスしたプレート接着細胞で再刺激を行い、ペプチドパルスしたHLA-A24<sup>+</sup>細胞またはA02細胞(TISI)を標的細胞として細胞傷害性(IFN $\gamma$ 産生)をELISPOT法で測定する。

#### (5) CD8陽性T細胞の分画検討

ワクチン投与前後のCD8陽性細胞の分画をFACSにより解析する。それぞれの抗体はナイーブT細胞(CD45RA+CD27<sup>+</sup>)、メモリーT細胞(CD45RA-CD27<sup>+</sup>)、エフェクターメモリーT細胞(CD45RA-CD27<sup>-</sup>)、エフェクターT細胞(CD45RA+CD27<sup>-</sup>)を用いる。

#### (6) 制御性T(Treg)細胞の検出

CD4陽性細胞の一つのポピュレーションであるTreg細胞は抗腫瘍免疫を抑制し、結果として腫瘍の増殖を促進すると考えられている。ペプチドワクチン治療前後の患者末梢血PBMCからCD4+CD25<sup>+</sup>T細胞を分離し、治療前後での増減を確認する。

#### (8) 治療効果を予測するバイオマーカーの探索

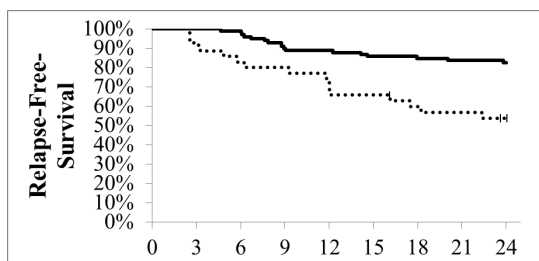
CTL活性、CD8陽性T細胞分画、Tregの解析結果に基づき、ペプチドワクチン療法の有効例、無効例を予測可能か検証する。

## 4. 研究成果

(1) 膀胱癌臨床検体(134症例)の未染色スライドを作成し、抗MPHOSPH1、DEPDC1抗体、抗HLAclass抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。その結果、全例にMPHOSPH1、DEPDC1、HLA-classいずれも発現を認めた。MPHOSPH1とDEPDC1に関しては、発現強度と腫瘍のグレードやステージの間に相関は認めなかった。なお、筋層非浸潤癌に比較して、筋層浸潤癌では、HLA-classの発現低下を認めた。

(2) 腎癌臨床検体(78症例)の未染色スライドを作成し、抗HIG2抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。その結果、全例(淡明細胞型腎癌)にHIG2の発現を認めた。発現強度と腫瘍のグレードやステージの間に相関は認めなかった。なお、進行病期においてHLAclassの発現低下を認めた。

(3) 筋層非浸潤性膀胱癌の術後アジュバント療法として、BCG膀胱内注入療法とHLA-A24拘束性MPHOSPH1およびDEPDC1ペプチドワクチン併用療法(多施設共同第2相臨床研究)を立案し実施した。BCGは8回投与、ペプチドワクチンの投与回数は11回とした。134例が登録され、HLAキーオープン解析の結果、HLA-A24群(79例)は非A24群(54例)に比較して、膀胱内再発率の低下傾向を認め、ペプチドワクチン療法の臨床的有効性が示唆された。また、ワクチン投与後のCTL誘導を認めた症例は認めなかった症例に比較して、再発率の低下を認めた。さらに、ワクチン投与部位の反応(発赤、腫脹、硬結)を認めた症例(98例)は、認めなかった症例(35例)に比較して、再発率の低下を認めた(図)。なお、ペプチド投与に伴う重篤な有害事象の発生は認めなかった。



(4) ワクチン治療後に、MPHOSPH1で82%、DEPDC1で83%の症例でペプチド特異的CTLの誘導を認めた。また、ワクチン投与期間のみだけでなく、経過観察中にも70%の症例でCTL誘導は維持されていた。

(5) ワクチン投与前後のCD8陽性T細胞の分画の解析では、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、エフェクターT細胞のいずれも、著明な増加および低下は認めなかった。

(6) ワクチン投与前後の制御性T細胞の解析では、ワクチン投与前に比較して、投与後で制御性T細胞の低下傾向を認めたが、有意差は認めなかった。

(7) Performance Status、CTL活性、ワクチン注射部位反応が、ワクチンの治療効果の関連因子として同定された。一方、治療前の抗原の発現程度やエフェクター細胞/T reg細胞比は、効果予測因子として不十分であった。

#### 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 4 件)

1. Obara W, Ohsawa R, Kanehira M, Takata R, Tsunoda T, Yoshida K, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Fujioka T. Cancer peptide vaccine therapy developed from oncoantigens identified through genome-wide expression profile analysis for

bladder cancer. Jpn J Clin Oncol.

2012 Jul;42(7):591-600.

2. 小原航 分子標的薬時代の治療戦略とペプチドワクチン療法の可能性 泌尿器外科 2012; 25: 967-968.
3. 小原航、藤岡知昭、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔 泌尿器がん免疫療法の開発と展望 ゲノム解析を基盤としたペプチドワクチン療法の開発と展望 西日泌尿 2012; 74: 167-175.
4. 小原航、藤岡知昭 進行腎癌に対するペプチドワクチン療法 . RCC Today 2011; 5: 9-10.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Obara W, Mitsuhashi N, Mimata H, Eto M, Kohri K, Miura I, Shuin T, Miki T, Fujimoto H, Fujioka T. A Phase I/II study of cancer peptide vaccine S-288310 in patients with advanced urothelial carcinoma. The European Cancer Congress 2013 ; 2013 10 ; Amsterdam, Netherlands.
2. 小原航 , 吉田浩二 , 角田卓也 , 中村祐輔 , 藤岡知昭 . シンポジウム : 腎癌に対するペプチドワクチン療法の可能性 . 第99回日本泌尿器科学会総会 ; 2011 4 ; 名古屋 .
3. 小原航 . シンポジウム : 分子標的薬時代の治療戦略とペプチドワクチン療法の可能性 . 第76回日本泌尿器科学会東部総会 ; 2011 10 ; 横浜 .
4. 小原航 , 光畑直喜 , 安富祖久明 , 西光雄 , 那須誉人 , 執印太郎 , 三木恒治 , 三股浩光 , 原勲 , 吉田浩二 , 角田卓也 , 中村祐輔 , 藤岡知昭 . ワークショップ : 筋層非浸潤膀胱癌の再発予防を目的としたがんペプチドワクチン療法 ( 第2相臨床研究 ) . 第49回日本癌治療学会学術集会 ; 2011 10 ; 名古屋 .
5. 小原航 . ワークショップ : ゲノム解析

- を基盤としたがんペプチドワクチン療法の開発と展望．第63回日本泌尿器科学会西日本総会 新しい治療法確立への挑戦．2011 11；久留米．
6. 小原航，光畑直喜，安富祖久明，西光雄，那須誉人，執印太郎，三木恒治，三股浩光，原勲，吉田浩二，角田卓也，中村祐輔，藤岡知昭．シンポジウム：がんペプチドワクチンによる筋層非浸潤膀胱癌に対する術後アジュバント療法（多施設共同第2相臨床研究）．第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会；2011 12；和歌山．
  7. 小原航．シンポジウム：がんペプチドワクチンを用いた筋層非浸潤性膀胱癌の術後再発予防．第21回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会；2012 7；高知．
  8. 小原航，吉田浩二，角田卓也，中村祐輔，藤岡知昭．ゲノム解析により同定されたoncoantigenを用いた膀胱がんペプチドワクチン療法．第50回日本癌治療学会学術集会；2012 10；横浜．
  9. 小原航．特別企画 日本発がんペプチドワクチン：検証試験の現状と課題 筋層非浸潤膀胱癌に対するがんペプチドワクチンを用いた術後アジュバント療法．第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会；2012 12；倉敷．
  10. 小原航，加藤陽一郎，高田亮，藤岡知昭．シンポジウム：尿路上皮癌の局所進行・遠隔転移に対するがんワクチン療法の可能性．第101回日本泌尿器科学会総会；2013 4；札幌．
  11. 小原航，中村祐輔，藤岡知昭．コアシ  
ンポジウム：がんペプチドワクチン療法の最近の進歩と臨床応用の展望 ゲ  
ノム解析に基づき開発された膀胱がん  
ペプチドワクチン療法．第72回日本癌  
学会学術総会；2013 10；横浜．
  12. 小原航，中村祐輔，藤岡知昭．シンポ

ジウム：トランスレーショナルリサーチの現状と今後の展望 ヒトゲノム解析に基づいた膀胱がんペプチドワクチン療法．第78回日本泌尿器科学会東部総会；2013 10；新潟．

13. 小原航，吉田浩二，角田卓也，中村祐輔，藤岡知昭．シンポジウム：癌ペプチドワクチンの展望：企業治験と医師主導臨床治験 膀胱がんペプチドワクチン療法～臨床研究から企業治験へ～．第26回日本バイオセラピー学会学術集会総会；2013 12；盛岡．

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況(計 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 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

6．研究組織  
(1)研究代表者  
小原 航 (OBARA WATARU)  
岩手医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90337155

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：