

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06881

研究課題名(和文) 免疫抑制分子阻害療法の効果を促進する新規卵巣がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new immunotherapy for resistant ovarian cancer to immunecheckpoint blockade therapy

研究代表者

岩間 達章 (IWAMA, Tatsuaki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：90757600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：グリピカン3 (GPC3) ペプチドワクチンを投与するとGPC3特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) が誘導される。GPC3特異的CTLの誘導は、しばしば予後と相関するが完治には至らない。我々は、GPC3ペプチドとリポソームを結合したワクチンを作製し、その抗腫瘍効果を評価した。このワクチンは従来のペプチドワクチン法と比べ少ない量でペプチド特異的CTLを誘導できた。効率的なCTL誘導には、ペプチドとリポソームの結合が重要であり、投与によりGPC3発現腫瘍の成長を著しく抑制した。本法は新しいがん治療法を提供しうる。

研究成果の概要(英文)：Although vaccine-induced glypican-3 (GPC3)-peptide-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) were often tumor reactive in vitro and were correlated with overall survival, no complete response was observed. In the current study, we synthesized liposome-coupled GPC3-derived CTL epitope peptide (pGPC3-liposome) and investigated its antitumor potential. Vaccination with pGPC3-liposome induced peptide-specific CTLs at a lower dose than conventional peptide vaccine emulsified in incomplete Freund's adjuvant. Coupling of pGPC3 to liposomes was essential for effective priming of GPC3-specific CTLs. In addition, immunization with pGPC3-liposome inhibited GPC3-expressing tumor growth. Thus, vaccination with tumor-associated antigen-derived epitope peptides coupled to the surfaces of liposomes may be a novel therapeutic strategy for cancer.

研究分野：免疫学

キーワード：婦人科 外科 がん 免疫 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

抗原特異的免疫療法は、がん細胞のみを標的とするため、副作用が少なく効果の高い治療法になる可能性を秘めている。これまで、がん抗原タンパクやこれに由来するペプチド、がん抗原DNAをワクチン投与方法、あるいは抗体療法が開発されてきた。今日までに、さまざまな腫瘍関連抗原(TAA)、およびこれに由来するCTLエピトープペプチドが同定されてきた。GPC3は、肝細胞がん(HCC)やメラノーマ、卵巣がんに発現しているが、胎盤や胎児期の肝臓を除く正常組織では発現していない。それ故に、GPC3はがん免疫療法において理想的なターゲット分子と考えられている。

以前に、ヒトGPC3のCTLエピトープとして、HLA-A\*24:02拘束性GPC3<sub>298-306</sub>ペプチドとHLA-A\*02:01拘束性GPC3<sub>144-152</sub>ペプチドが同定されている。最近、我々は、bハプロタイプマウスのH2-K<sup>b</sup>/H2-D<sup>b</sup>拘束性エピトープペプチド(GPC3<sub>127-136</sub>)を同定した。最近実施された進行肝細胞がん患者を対象とするGPC3由来ペプチドワクチンの第1相臨床試験では、ペプチドワクチンの安全性や免疫原性、生存期間の改善が認められた。しかしながら、その抗腫瘍効果は一部の患者に限定的であった。この試験では不完全フロイントアジュバント(IFA)に混合したワクチンが用いられた。ところが、最近のマウスモデルを用いた解析の報告では、IFA混合ワクチンはCTLの低応答を引き起こすことが報告された。つまり、GPC3ペプチドワクチンの抗腫瘍効果を高めるためには、IFAを用いない新たなワクチン法が必要と考えられる。

IFAは免疫賦活効果が乏しいと考えられる。近年Toll様受容体(TLR)アゴニストを免疫賦活化剤として応用することが検討されている。ウイルスまたは細菌由来のCGヌクレオチドに富む非メチル化オリゴヌクレオチド(CpG ODN)はTLR9のアゴニストであり、樹状細胞(DC)の活性化を通してTh1型応答を誘導することが知られている。

一方、不飽和脂肪酸からなるリポソームの表面に化学的に結合させた抗原は、抗原提示細胞によりMHCクラスIを介して効率よく交差提示(クロスプレゼンテーション)され、抗原特異的なCTLを刺激できることが知られている。また、ウイルス由来ペプチドを結合したりポソームをマウスに投与することにより、ペプチド特異的CTLが誘導され、ウイルスに対する感染を防御できることが報告されている。さらに、モデル抗原であるオボアルブミン(OVA)ペプチド結合リポソームをマウスに投与することにより、ペプチド特異的CTLが誘導され、OVA発現がん細胞(EG7)を移植したマウスの腫瘍が縮小することが報告されている。加えて、ペプチド結合リポソームを投与したマウスでは、誘導されたペプチド特異的なCTLが生体内で長期間維持されることが報告されている。以上

のことから、ペプチド結合リポソームは、IFA混合ペプチドワクチンに代わる新たながんペプチドワクチン応用の選択肢になりうると思われる。

2. 研究の目的

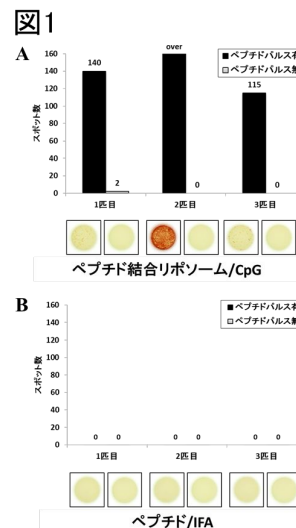
ペプチド結合リポソームはIFA混合ペプチドワクチンに代わる新たながんペプチドワクチンの選択肢になりうることを検証する。このためにモデル抗原ではなく、実際の腫瘍抗原であるGPC3のT細胞エピトープペプチドとリポソームを結合させたワクチンを作製し、それをCpG ODNと共にマウスに投与することにより、ペプチド特異的CTLの存在、および抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とした

3. 研究の方法

・ペプチド結合リポソームワクチンはCTL誘導に優れる

GPC3を結合したりポソームワクチンにおけるペプチド特異的CTL誘導能を評価した。CpG ODNを含むGPC3p(A2)結合リポソームワクチンはHLA-A2トランスジェニックマウスに投与した。一方、CpG ODNを含むGPC3p(B6)結合リポソームはB6マウスに投与した。ワクチン投与したマウスのCD8+脾細胞をエフェクター細胞として、RMA-S-HHD(ペプチド+/-)、RMA-S(ペプチド+/-)をターゲット細胞として共培養した。ワクチンによって誘導されたペプチド特異的CTL頻度をIFN-ELISpotアッセイにより評価した。その結果、GPC3p(A2)結合リポソームワクチンおよびGPC3p(B6)結合リポソームを投与したマウスのCD8+脾細胞は、ペプチドパルスしたターゲット細胞に対してIFN- $\gamma$ を産生した(図1A)。これにより、ペプチド結合リポソームワクチンは、生体内でペプチド特異的CTLを誘導することが示唆された。

次に、GPC3ペプチド結合リポソームワクチンとIFA混合GPC3ペプチドワクチンの効果を比較検討した。その結果、GPC3ペプチド結

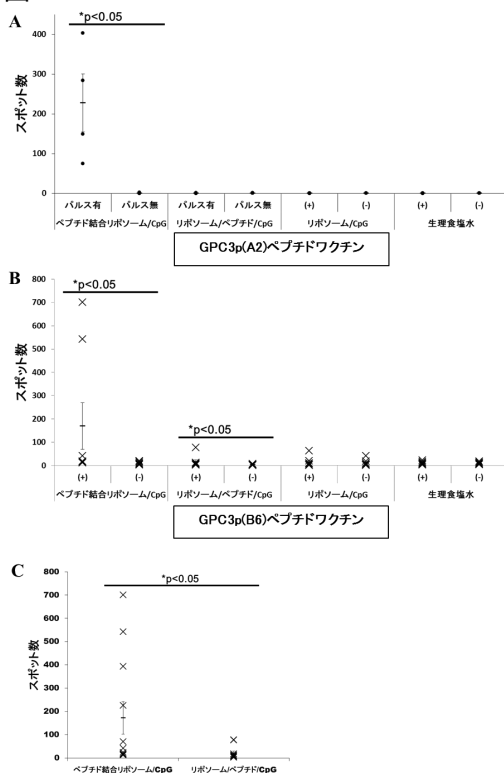


合リポソームワクチンは、IFA 混合 GPC3 ペプチドワクチンよりも、GPC3 ペプチド特異的に IFN- $\gamma$  を産生する CD8+脾細胞の頻度が有意に高かった (図 1A, B)。この結果から、GPC3 ペプチド結合リポソームは、IFA 混合 GPC3 ペプチドワクチンと比較して GPC3 ペプチド特異的 CTL の誘導効率が高いことが示唆された。

・ CTL の効率的な誘導にはペプチドとリポソームの結合が重要である

ペプチド結合リポソームワクチンによる CTL 誘導においてペプチドとリポソームの結合が重要であるかを検討した。CpG ODN を含む GPC3 ペプチド結合リポソームワクチン (ペプチド結合リポソーム/CpG)、CpG ODN を含む GPC3 ペプチドとリポソームを混合したワクチン (リポソーム/ペプチド/CpG) あるいは CpG ODN を含むリポソームのみのワクチン (リポソーム/CpG) をマウスに投与して比較検討した。その結果、HLA-A2 トランスジェニックマウスを用いた解析において、GPC3p(A2) 結合リポソームワクチンを投与したマウスの脾細胞の中に、GPC3p(A2) 特異的に IFN- $\gamma$  を産生する CD8+細胞が認められた (図 2A)。また B6 マウスを用いた解析では、GPC3p(B6) 結合リポソームワクチン、あるいは GPC3p(B6) とリポソームを混合したワクチンを投与した両方のマウスの脾細胞に GPC3p(B6) 特異的に IFN- $\gamma$  を産生する CD8+細胞が認められた (図 2B)。さらに、GPC3p(B6) 結合リポソームワクチン ( $172.6 \pm 70$ ) を投与したマウスの脾細胞は、GPC3p(B6) とリポソームを混合したワクチン ( $21.8 \pm 7.7$ ) を投与したマウスの脾細胞よりも IFN- $\gamma$  を産

図2



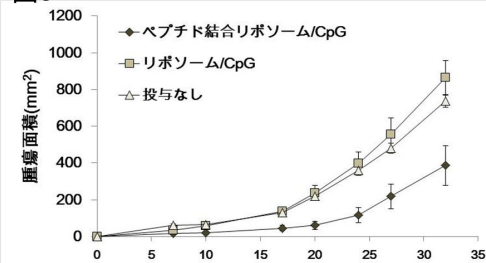
生する CD8+細胞の頻度が高かった (図 2C)。

以上の結果により、GPC3 ペプチド結合リポソームをマウスにワクチン投与すると、ペプチド特異的 CTL が効率よく誘導されることが分かった。また、その効果的な CTL の誘導には、ペプチドとリポソームが結合していることが重要であることが明らかとなった。

・ GPC3(A2) 結合リポソームは GPC3 発現がん細胞に対して抗腫瘍効果を示す

GPC3 ペプチド結合リポソームの生体内における抗腫瘍効果を検討した。HLA-A2 トランスジェニックマウスに GPC3p(A2) 結合リポソームワクチン投与と RMA-HHD-GPC3 移植を行った。RMA-HHD-GPC3 移植後 7 日目以降、腫瘍の長径と短径を測定し、腫瘍面積を算出した。32 日目の腫瘍面積の比較において、GPC3p(A2) 結合リポソームワクチンを投与した群 ( $386.3 \pm 107.5$ ) は、CpG ODN を含むリポソームワクチンを投与した群 ( $863.3 \pm 95.7$ )、あるいはワクチンを投与していない群 ( $737.6 \pm 33.1$ ) と比較して、腫瘍の成長が抑制された (図 3)。以上より、GPC3p(A2) 結合リポソームワクチンは抗腫瘍効果に優れることが明らかになった。

図3



#### 4. 研究成果

進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 由来ペプチドワクチンの第 1 相臨床試験が終了した。この結果、IFA 混合ペプチドワクチンの安全性や免疫原性、生存期間の改善が認められたが、その抗腫瘍効果は一部の患者に限定したものであった。最近のモデルマウスを用いた解析で、IFA 混合ワクチンは CTL の低応答を引き起こし、抗腫瘍効果を低下させることが報告された。このことから、IFA を使用しないワクチンの開発に期待が寄せられている。ウイルス抗原由来ペプチドや OVA ペプチド結合リポソームワクチンは、ウイルス感染の防御や OVA 発現がん細胞に対する抗腫瘍効果が観察されている。これらから、ペプチド結合リポソームは IFA 混合ペプチドワクチンに代わる新しいがんペプチドワクチンの選択肢の 1 つになりうると思われる。これを検証するために、がん抗原の 1 つである GPC3 に由来するペプチドを結合したリポソームを作製し、これをマウスに投与して、ペプチド特異的 CTL 誘導能、および抗腫瘍効果の検討を行った。

GPC3 結合リポソームを CpG ODN と共にマウスへ投与することにより、ペプチド特異的 CTL が誘導されることを評価した。その結果、HLA-A2 トランスジェニックマウスと B6 マウスを用いた場合において、ペプチド特異的 CTL の誘導が観察された。また、IFA 混合ペプチドワクチンを投与したものと比較すると、ペプチド結合リポソームワクチンは、IFA 混合ペプチドワクチンよりも、CTL の誘導効率が高いことが確認された。この効率的な CTL の誘導には、ペプチドとリポソームの結合が必要であることが明らかとなった。

GPC3 ペプチド結合リポソームワクチンが、実際に生体内で抗腫瘍効果を発揮できるかを検討した。その結果、GPC3p(A2) 結合リポソームワクチン投与により、腫瘍の生着を完全に防ぐことはできないものの、ペプチドを結合していないリポソーム、あるいはワクチンを投与していない群と比べ、明らかに腫瘍の成長が抑制された。B6 マウスを用いた GPC3p(B6) 結合リポソームワクチンの抗腫瘍効果の検討は、マウス GPC3 遺伝子を導入したがん細胞を作製し、現在進行中である。B6 マウスでの効果が明らかになれば、同質遺伝的モデルであるため、ヒトに応用するための前臨床試験として重要な意義をもつ。

以上より、GPC3 ペプチド結合リポソームをマウスにワクチン投与することにより、ペプチド特異的 CTL が効率よく誘導される。その誘導効率は、IFA 混合ペプチドワクチンよりも高いことが示唆された。また、効率的な CTL の誘導にはペプチドとリポソームの結合が重要であることが明らかとなった。加えて、GPC3 ペプチド結合リポソームには、腫瘍の成長を抑制する効果があることを確認し、GPC3 ペプチド結合リポソームワクチン法は IFA 混合ペプチドワクチン法に代わる新しいがんペプチドワクチンになる可能性を示すことができた。

#### 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 5 件)

1. Tatsuaki Iwama, Tetsuya Uchida, Yu Sawada, Nobuhiro Tsuchiya, Shiori Sugai, Norihiro Fujinami, Manami Shimomura, Toshiaki Yoshikawa, Rong Zhang, Yasushi Uemura, Tetsuya Nakatsura  
Vaccination with liposome-coupled glypican-3-derived epitope peptide stimulates cytotoxic T lymphocytes and inhibits GPC3-expressing tumor growth in mice  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(1):138-143, 2016 (査読あり)
2. Shuichi Kitayama, Rong Zhang, Tian-Yi

Liu, Norihiro Ueda, Shoichi Iriguchi, Yutaka Yasui, Yohei Kawai, Minako Tatsumi, Norihito Hirai, Yasutaka Mizoro, Tatsuaki Iwama, Akira Watanabe, Mahito Nakanishi, Kiyotaka Kuzushima, Yasushi Uemura, Shin Kaneko

Cellular Adjuvant Properties, Direct Cytotoxicity of Re-differentiated V 24 Invariant NKT-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells  
*Stem Cell Reports*, 6(2):213-227, 2016 (査読あり)

3. Shiori Sugai, Toshiaki Yoshikawa, Tatsuaki Iwama, Nobuhiro Tsuchiya, Norihiro Ueda, Norihiro Fujinami, Manami Shimomura, Rong Zhang, Shin Kaneko, Yasushi Uemura, Tetsuya Nakatsura  
Hepatocellular carcinoma cell sensitivity to V 9V 2 T lymphocyte-mediated killing is increased by zoledronate  
*International Journal of Oncology*, 48(5):1794-1804, 2016 (査読あり)
4. Norihiro Ueda, Rong Zhang, Minako Tatsumi, Tian-Yi Liu, Shuichi Kitayama, Yutaka Yasui, Shiori Sugai, Tatsuaki Iwama, Satoru Senju, Seiji Okada, Tetsuya Nakatsura, Kiyotaka Kuzushima, Hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe, Shin Kaneko, Yasushi Uemura  
BCR-ABL-specific CD4+ T-helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells  
*Cellular & Molecular Immunology*, 2016 (査読あり)
5. Norihiro Fujinami, Toshiaki Yoshikawa, Yu Sawada, Manami Shimomura, Tatsuaki Iwama, Shiori Sugai, Shigehisa Kitano, Yasushi Uemura, Tetsuya Nakatsura  
Enhancement of antitumor effect by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody: Study in a murine model  
*Biochemistry and Biophysics Reports*, 2016 (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

1. 喜多山秀一、張工イ、入口翔一、岩間達章、溝曾路祥孝、渡辺亮、葛島清隆、植村靖史、金子新、「アジュバンド効果並びに細胞傷害能を有するヒト iPS 細胞由来 iNKT 細胞の再分化誘導」、『第 75 回日本癌学会学術総会』、P-1163、神奈川、2016 年 10 月、ポスター発表
2. 土屋伸広、植村靖史、岩間達章、張工イ、鈴木利宙、吉川聡明、澤田雄、田久保圭誉、阪上-沢野朝子、宮脇敦史、遠藤格、

中面哲也、「IFN を産生する iPSC 由来増殖性ミエロイド細胞のがん治療への応用」、『第 75 回日本癌学会学術総会』、P-3210、神奈川、2016 年 10 月、ポスター発表

3. 張エイ、上田格弘、喜多山秀一、安井裕、土屋伸広、劉天懿、岩間達章、葛島清隆、中面哲也、清井仁、金子新、植村靖史、「ダサチニブによる急性 GVHD 治療の可能性」、『第 75 回日本癌学会学術総会』、P-3312、神奈川、2016 年 10 月、ポスター発表
4. ZHANG Rong, KITAYAMA Syuichi, LIU Tianyi, Ueda Norihiro, IWAMA Tatsuaki, NAKATSURA Tetsuya, KUZUSHIMA Kiyotaka, KANEKO Shin, UEMURA Yasushi、「Cellular adjuvant properties and direct cytotoxicity in rejuvenated V 24 invariant NKT cells from human induced pluripotent stem cells」、『第 45 回日本免疫学会学術集会』、3-A-W23-14-P、沖縄、2016 年 12 月、ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

国立研究開発法人 国立がん研究センター  
先端医療開発センター 免疫療法開発分野  
特任研究員 岩間 達章 (IWAMA Tatsuaki)  
研究者番号：90757600

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )