

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10195

研究課題名(和文)カクテルペプチドワクチン療法とS-1隔日投与を併用した低侵襲な新規膵癌治療の開発

研究課題名(英文)Low invasive treatment using pancreatic cancer vaccine

研究代表者

廣野 誠子(Hirono, Seiko)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60468288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的遺伝子発現解析により膵癌の浸潤に関与する遺伝子MUC16とmesothelinを同定した。これらの遺伝子をshRNAで発現抑制すると、膵癌の浸潤能・遊走能とも抑制された。これらの遺伝子を標的としたペプチドワクチンの開発した。MUC16ならびにmesothelin由来のHLA-A*2402拘束候補ペプチドを各遺伝子に19種類ずつ選択した。健常人の末梢血からPBMCを分離し、樹状細胞を誘導し、ペプチドパルスを行い、CTLを誘導した。CTLラインを樹立し、クローニングを行い、細胞障害を確認すると、mesothelinの1種類のペプチドのみ特異的な細胞障害を認め、エピトープペプチドと同定した。

研究成果の概要(英文)：We identified MUC16 and mesothelin, the genes associated with invasion in pancreatic cancer by expression profile. The downregulation of MUC16 and mesothelin by shRNA inhibited both invasion and migration of pancreatic cancer cell lines. Therefore, we focused on these genes as a tumor-specific antigen target for pancreatic cancer vaccine. We investigated the MUC16 or mesothelin-derived epitope peptide restricted to HLA-A*2402, and we determined their potential to induce peptide-specific T lymphocytes (CTL). After the expansion of each CTL, two CTL lines (each gene) were established. Finally, we could generate only one peptide-specific CTL clone. These results indicate that our identified mesothelin peptide is a novel HLA-A*2402 restricted CTL epitope, and that is a candidate for antigen-specific immunotherapy against pancreatic cancers.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 ペプチドワクチン

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、予後不良な癌種で、根治可能な唯一の治療法は外科的切除のみである。しかしながら、膵癌診断時には約 7 割の患者が、切除不能と診断され、また外科的切除を受けた患者においても、術後再発・転移が生じうる。膵癌に対する化学療法は、ジェムザール (GEM) から始まり、TS1、FOLFIRINOX、GEM と nab-Paclitaxel (PTX) の併用療法が保険適応であるが、後者 2 つのメニューは、強い副作用が生じ得、down dose することがしばしばあり、膵癌患者の新規治療として重要なことは、強い抗腫瘍効果をもつ低侵襲な治療法である。

われわれは、以前から低侵襲な治療法であるペプチドワクチン療法の開発に着目してきた。まず、腫瘍新生血管を標的とした VEGFR2 由来ペプチドワクチンを用いた新規免疫療法を開発し、第 1 相臨床試験を行った。その結果、ペプチド投与群全患者の生存期間は延長しなかったが、免疫応答の高かった患者の生存期間は有意に延長したことを報告した (*Cancer Sci* 2015)。さらに、強い抗腫瘍効果を目指し、VEGFR1、VEGFR2、KIF20A のペプチドカクテルワクチン (OCV-01) を開発し、膵癌術後補助療法として S-1 と OCV-01 の併用療法により、KIF20A 高発現を認めた膵癌患者の再発が予防できたことを報告した (*Int J Cancer* 2017)。本研究は、網羅的遺伝子発現解析により、膵癌に特異的に高発現を認める遺伝子群を同定し、標的遺伝子由来ペプチドワクチンを開発、さらには OCV-01 に加えることで、より多くの膵癌患者に有効な、抗腫瘍効果の強いペプチドカクテルワクチンを開発することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、網羅的遺伝子発現解析により、膵癌に特異的に高発現を認める遺伝子群を同定し、標的遺伝子由来ペプチドワクチンを開発することを第 1 の目的とした。さらに、VEGFR1、VEGFR2、KIF20A のペプチドカクテルワクチン (OCV-01) に、本研究で同定したペプチドワクチンを加えることで、より多くの膵癌患者に有効な、抗腫瘍効果の強いペプチドカクテルワクチンを開発することを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

新規膵癌浸潤規定遺伝子の同定

膵癌の浸潤過程に関与する特異的な遺伝子の同定を行う目的で、同一個体の膵癌凍結組織からマイクロダイセクションにて回収した、膵癌の浸潤癌細胞と上皮内癌細胞のマイクロアレイデータを比較し、全ての症例で、上皮内癌細胞より浸潤癌細胞で高発現を認めた遺伝子群を膵癌浸潤規定遺伝

子と同定した。

同定遺伝子群の臨床・生物学的意義の解明

本研究で同定した膵癌浸潤規定遺伝子群の臨床学的意義を解明する目的で、膵癌切除標本を用いて、免疫染色によるタンパク発現を確認し、タンパク発現と臨床因子の相関を確認した。さらに *in vitro* にて、膵癌細胞株を用いて、これらの遺伝子の発現量を shRNA で低下させ、invasion assay ならびに migration assay を行い、浸潤能と遊走能を確認した。

ペプチドワクチンの開発

特定の HLA に結合するペプチドの構造モチーフ検索データベース BIMAS (<http://www.bimas.cit.nih.gov/>) を利用し、同定した遺伝子群由来の HLA-A*2402 および HLA-A*02 (日本人の 8 割をカバー) 拘束性のペプチドを、それぞれの binding score の高いもの、すなわち HLA に親和性の高いペプチドを選択する。HLA-A*2402 陽性の健康ボランティアより末梢血を採取し、Ficoll-Paque 法にて PBMC を分離し、同時に浮遊細胞を回収し、MACS separation system を用いて CD8 陽性細胞を単離する。PBMC を over night で培養した後、2 日目に IL-4、GM-CSF を加え、樹状細胞 (dendritic cell: DC) を誘導し、5 日目に誘導した DC にピシバニールを加え成熟化させる。培養 7 日目に成熟 DC を回収し、ペプチドパルスを行う。またペプチドパルス前日には、末梢血から単離した CD8 陽性細胞に IL-7 を加えておく。ペプチドパルスした DC と CD8 陽性細胞を合わせ、IL-2 を加えて培養し、同様の方法で計 3 回のペプチドパルスを行い、CTL を誘導する。なお、HLA-A*02 拘束性ペプチドに関しても、上記と同じ方法で CTL を誘導する。誘導した CTL の IFN- γ 産生を enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay により測定する。B リンパ球細胞株 (EB3, Jiyoye) を mitomycin C で処理し、抗 CD3 抗体・IL-2 を加えた後、CTL と coculture し、CTL の拡大培養を行う。拡大培養後 14 日目に IFN- γ assay にて評価する。拡大培養した CTL から限界希釈法にてクローニングを行う。膵癌の cell line のうち Western blotting・免疫染色・RT-PCR にて標的遺伝子群を発現している膵癌 cell line と発現していない膵癌 cell line の HLA-A*2402 あるいは HLA-A*02 の発現を確認する。標的遺伝子発現 (+) の cell line と (-) の cell line、HLA-A*2402 の発現 (+) の cell line と (-) の cell line の計 4 群に対して、

上記で作成した CTL クローンを用いて killing assay を行う。killing は 24hr-Cr release assay にて評価する。標的遺伝子の発現(+)かつ HLA-A*2402 の発現(+)の cell line にのみ選択的に細胞傷害を示す CTL クローンが誘導されれば、そのペプチド配列をもってエピトープペプチドと同定する。なお、複数のエピトープペプチドが同定された場合は、BIMAS score の最も高い、すなわち HLA との親和性が最も高いエピトープを選択する。HLA - A*02 についても同様の方法で、エピトープペプチドを同定する。

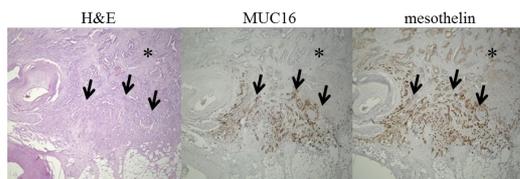
4. 研究成果

膵癌の浸潤に関与する遺伝子の同定

外科的切除した膵癌組織からマイクロRNA イセクションにより、同一個体の浸潤部と上皮内癌 (CIS) 部を採取し、それぞれの細胞から RNA を抽出した。Human Genome U133 Plus 2.0 array を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い、同一個体の浸潤癌と上皮内癌のマイクロアレイデータを比較した。全サンプルで上皮内癌よりも浸潤癌で有意に高発現を認められた MUC16 と mesothelin に着目した。

MUC16 と mesothelin の臨床・生物学的意義

103 例の膵癌切除標本を用いて、免疫染色により、MUC16 ならびに mesothelin のタンパク発現を調べた結果、正常膵組織、上皮内癌には発現を認めず、膵癌の浸潤癌にのみ発現を認めた。さらに、これらの遺伝子発現は、癌の浸潤部に強発現を認めた。



(*) main tumor; (arrow) invasion front

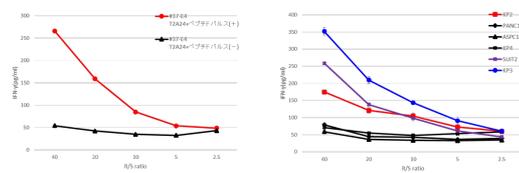
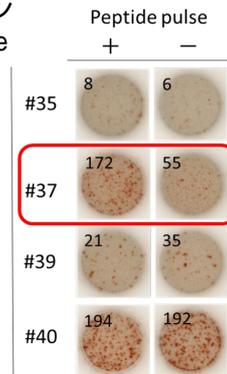
さらに MUC16, mesothelin 強発現症例は、独立した生存期間短縮因子であった。

次に、MUC16, mesothelin の生物学的意義を調べる目的で、MUC16, mesothelin 高発現を認めた膵癌細胞株 PK9 を用いて、shRNA により MUC16, mesothelin の発現量を低下させ、invasion assay, migration assay を行った。その結果、両遺伝子とも発現を低下させることで、浸潤・遊走能とも抑制された。

MUC16, mesothelin 由来ペプチドワクチンの開発

特定の HLA に結合するペプチドの構造モチーフ検索データベース BIMAS を利用し、HLA に親和性の高い MUC16, mesothelin 由来の HLA-A*2402 拘束性ペプチドをそれぞれの遺伝子に対して 19 種類の候補ペプチドを選択した。健康人の末梢血から PBMC を分離し、樹状細胞を誘導し、ペプチドパルスを行うこ

とで、CTL を誘導した。ELISPOT assay により誘導した CTL の IFN- γ 産生を認めた候補ペプチドの CTL ラインを樹立し、クローニングを行った。クローニングまでできたペプチドは、mesothelin のペプチド 1 種類のみであった。作成した CTL クローンを用いて 24hr-Cr release assay により細胞障害活性を確認し、mesothelin 発現陽性かつ HLA-A*2402 陽性の膵癌細胞株 KP2, SUI12, KP3 のみ選択的に細胞障害を認めた。



以上の結果、本ペプチド配列を mesothelin 由来エピトープペプチドと同定した (Oncotarget on submission),

今後の展望

本研究により開発した mesothelin 由来ペプチドを用いて、再発進行膵癌患者を対象に第相臨床試験を行い、安全性の確立と至適用量を同定した後、OCV-01 ワクチンに加えたペプチドカクテルワクチンの開発に進める。

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 2 件)

1. Miyazawa M, Katsuda M, Maguchi H, Katanuma A, Ishii H, Ozaki M, Yamao Y, Imaoka H, Kawai M, Hirono S, Okada K, Yamaue H. Phase II clinical trial using novel peptide cocktail vaccine as a postoperative adjuvant treatment for surgically resected pancreatic cancer patients. *Int J Cancer* 140: 973-982, 2017.
2. Shimizu A, Hirono S, Tani M, Kawai M, Okada K, Miyazawa M, Kitahata Y, Nakamura Y, Noda T, Yokoyama S and Yamaue H. Coexpression of

MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 103: 739-46, 2012.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：特許
発明者：山上裕機
権利者：山上裕機
種類：特願
番号：2017-203424
出願年月日：2017 年
国内外の別：国内

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣野 誠子 (HIRONO Seiko)
和歌山県立医科大学・第 2 外科・講師
研究者番号：60468288

(2) 研究分担者

清水 敦史 (SHIMIZU Atsushi)
和歌山県立医科大学・第 2 外科・学内助教
研究者番号：637910

山上 裕機 (Yamaue Hiroki)
和歌山県立医科大学・第 2 外科・教授
研究者番号：20191190

川井 学 (Kawai Manabu)
和歌山県立医科大学・第 2 外科・准教授
研究者番号：40398459

岡田 健一 (OKADA Ken-ichi)
和歌山県立医科大学・第 2 外科・講師
研究者番号：50407988

宮澤 基樹 (MIYAZAWA Motoki)
和歌山県立医科大学・第 2 外科・助教
研究者番号：90549734

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()