

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07229

研究課題名（和文）経皮免疫法を用いたがんペプチドワクチンの基礎的研究

研究課題名（英文）A basic research to develop cancer peptide vaccine for transdermal immunization

研究代表者

和氣 加容子（Waki, Kayoko）

久留米大学・付置研究所・助教

研究者番号：40649597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：がんペプチドワクチンに多用されているフロイト不完全アジュバントの副作用を軽減し、同等もしくはそれ以上に抗原ペプチド特異的免疫反応を誘導する新たながんペプチドワクチンを開発する目的で、フロイト不完全アジュバントを用いず、乳酸を用いたケミカルピーリング経皮がんペプチドワクチンの免疫誘導能をマウスモデルを用いて検討した。ケミカルピーリング処置を行い経皮ペプチドワクチンを塗布投与し、その後、同部位にアジュバントであるイミキモドクリームを塗布をしたところ、抗原特異的T細胞の増殖促進、及び抗原特異的細胞傷害性T細胞の誘導が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんペプチドワクチンはがん抗原ペプチドをフロイト不完全アジュバントでエマルジョン化したワクチンを皮下投与するのが主流であるが、ワクチンの投与部位への長期残留と炎症反応が患者の大きな負担になっている。本研究で行った乳酸を用いた経皮がんペプチドワクチンが抗原特異的細胞傷害性T細胞を誘導できることから、患者にやさしい経皮がんペプチドワクチン療法の可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to develop transdermal cancer peptide vaccine without Floyd's incomplete adjuvant using a mouse model. Lactic acid-based chemical peeling prior to peptide vaccination augmented the proliferation of peptide-specific T cells in the CFSE cell division assay. In addition, application of imiquimod cream at the vaccinated site following the vaccination significantly induced peptide specific cytotoxic T cells in IFN-gamma ELISPOT assay. These suggested the possibility of transdermal cancer peptide vaccine, which was patient-friendly.

研究分野：がん免疫

キーワード：がんペプチドワクチン 経皮ワクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が認識するがん (関連) 抗原由来のペプチドを標的としたがんペプチドワクチン療法を開発してきた。がん細胞に特異的に選択的及び高発現している抗原ペプチド 31 種類から個々の患者の免疫記憶に対応するペプチドを最大 4 種類選択・投与するテラーメイドペプチドワクチン療法を提唱し、臨床試験を行ってきた。免疫記憶に基づくテラーメイドペプチドワクチン療法は従来のがんペプチドワクチンと比較し、格段に高い臨床効果が得られるようになった (Yamada et al., Cancer Sci, 2012)。

しかし、がんペプチドワクチンに多用されるフロイント不完全アジュバント (IFA, Montanide ISA51) の皮下投与は、投与部位における IFA の長期残留による炎症反応の惹起や、時に、痛みによる患者の QOL の低下につながることもある。またペプチドワクチンによる CTL 誘導と抗腫瘍効果の相関性が時に低い傾向がみられる。このことは、マウスを用いた実験で報告された (Hailemichael et al., Nat Med, 2013) 投与部位における抗原ペプチドの長期残留により、ワクチンで誘導された CTL が腫瘍部位よりも投与部位に集積し、更に投与部位で CTL が機能不全になりアポトーシスにより除去される、ことが要因となっている可能性がある。

故に、テラーメイドペプチドワクチンと同等以上の臨床効果を有し、痛みや炎症の原因となるフロイント不完全アジュバントに代わり投与局所への残留性の低い新規アジュバント並びに新規投与方法 (免疫法) の開発が望まれる。

### 2. 研究の目的

フロイント不完全アジュバント及び皮下投与以外の免疫法として、経皮免疫法を用いたがんペプチドワクチンの開発を目指す。経皮吸収においてがんペプチドワクチン抗原 (多くが分子量 800 以上) の角質層通過問題を解決するため、ケミカルピーリングによる経皮ワクチンの開発を行う。また、経皮ワクチンに適したアジュバント及び免疫増強剤の探索も行う。その際には、近年、がんワクチンにおいて TLR アゴニストが有用なアジュバントとして注目されており、我々もマウスを用いた研究で TLR7 アゴニスト (イミキモド) を皮膚に塗布後、ペプチド + HMBG1 阻害剤を皮下投与すると免疫反応の増強効果が確認されたので (Waki et al., Cancer Sci, 2016) これらを経皮ワクチンへ応用し、新規の経皮がんペプチドワクチンの臨床への応用を目指すことが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) ケミカルピーリングを用いた経皮免疫の検討及び至適化。

経皮吸収型ペプチドワクチンにおいて、表皮内のランゲルハンス細胞や真皮・皮下組織に存在する樹状細胞に抗原ペプチドが効率よく取り込まれることが必須のため、以下のことを検討した。

ケミカルピーリング剤の至適化: 乳酸やグリコール酸を使用したケミカルピーリング剤の種類、濃度、適用時間を調整した。

ワクチンを塗布するのに適した基剤の至適化: 化粧品等に多岐にわたり使用されているカーボポール (カルボキシビニルポリマー) を基剤とし、抗原ペプチドとの溶解性を検討、塗布に適して条件を検討した。

効果的なペプチド抗原浸透・免疫誘導する塗布法の至適化: 塗布量・面積・時間を検討し、ペプチド抗原皮下投与と比較し、より効果的に免疫誘導する条件を検討した。

抗原特異的免疫応答誘導能の評価は、ペプチド OVA257-264 を認識する TCR を発現させたトランスジェニックマウス OT-I の脾臓細胞を CFSE で標識後 C57BL/6 マウスに静脈投与し、ケミカルピーリング処置 + OVA 由来の H-2Kb 拘束性 CTL エピトープペプチド OVA257-264 ワクチンを C57BL/6 マウスに塗布投与後、OT-I 由来の CD8 陽性 T 細胞の増殖をフローサイトメトリーで解析した (CFSE 増殖アッセイ)。本研究は、久留米大学動物実験委員会、遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て行った。

(2) ケミカルピーリング経皮ワクチンの CTL 誘導の解析。

CTL 誘導に必要なワクチン投与回数 (2 もしくは 3 回、頻度は週 1 間隔) を検討後、ケミカルピーリング + ペプチドワクチンを塗布投与し、最終投与から一週間後に C57BL/6 マウスの脾臓細胞を用いて、インターフェロンガンマ産生の CD8T 細胞をエリスポットアッセイで検出した。

(3) 経皮ワクチンに適した免疫増強剤の検討。

アジュバントとしてイミキモドクリーム塗布量とタイミング (ペプチドワクチンと同時にまたは個別に前後で塗布) とコアジュバントとして HMBG1 阻害剤の免疫増強効果を上記で述べた CFSE 増殖アッセイとインターフェロンガンマ産生の CD8T 細胞をエリスポットアッセイで検討した。

(4) 経皮ワクチンの抗腫瘍効果の解析

前項で至適化したワクチンプロトコールを使用し、EG.7-OVA 腫瘍細胞を皮下移植した C57BL/6 マウスにケミカルピーリング経皮ワクチンを週一回で、2 回塗布投与し、腫瘍細胞の増殖抑制効果と腫瘍細胞移植後からの生存期間で評価した。

### 4. 研究成果

乳酸を用いたケミカルピーリング剤の経皮がんペプチドワクチンへの応用への可能性は、CFSE 標識した OT-I 細胞を静脈投与したマウスを使用した CFSE 増殖アッセイにおいて、ピーリング+経皮ワクチン群でペプチド抗原特異的増殖反応の増強が見られたことで示された(図1)。グリコール酸を用いたピーリング剤の効果も検討したが、pH2.5のピーリング剤を作成するのが乳酸に比べ難しいのと、ペプチド抗原特異的増殖誘導能が乳酸を用いた時と変わらなかったため、以降の実験は乳酸のピーリング剤を用いて経皮ワクチンの条件至適化を検討した。

この抗原特異的免疫応答誘導能を増強するため、イミキモドクリームをペプチドワクチンに混合してアジュバントの増強効果を検討した。このワクチンプロトコルにおいて、CFSE 増殖アッセイやエリスポットアッセイにおいて抗原特異的免疫応答の増強効果が見られたが、EG.7-OVA 腫瘍細胞を用いた in vivo 抗腫瘍効果の検討においては、その効果はあまり見られなかった。

故に、更なる抗原特異的免疫応答を増強するため、イミキモドクリームの塗布のタイミングを検討したところ、イミキモドクリームをペプチドワクチンに混合して同時に塗布するより、ペプチドワクチンとは別にして、ペプチドワクチンの後に塗布した時に、より一層の増強効果が見られた。このワクチンプロトコルにおいて、30ug の OVA ペプチドを経皮ワクチンで塗布投与した場合、30ug の OVA ペプチドを皮下投与した場合と同等の抗原特異的免疫応答を誘導することが確認された。また、ペプチドワクチンに HMGB1 阻害剤であるグリチルリチンを加えた混合液を塗布投与すると、CFSE 増殖アッセイにおいて抗原特異的免疫応答の増強が見られた(図2)。同様に、ペプチドワクチン塗布後にイミキモドクリームを塗布することにより、ペプチド抗原特異的 CTL 誘導能は、ペプチド+イミキモドクリーム混合ワクチンに比べて、飛躍的に増強された。しかし、このプロトコルに HMGB1 阻害剤(グリチルリチン)の顕著な追加効果は確認されなかった。抗原特異的 CTL 誘導の傾向は、in vivo における抗腫瘍効果を検討する実験においても同様であった。これらのことは、ワクチンの至適化に検討するべき項目があることを示している。

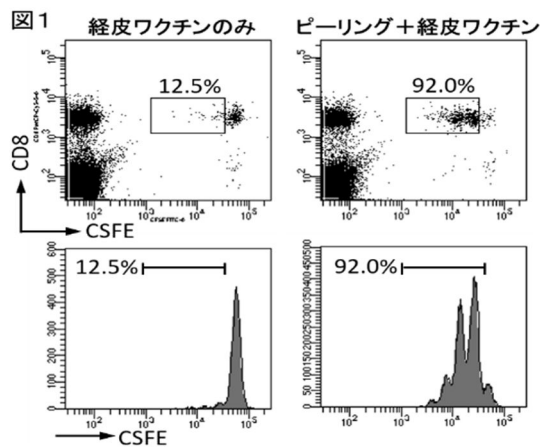
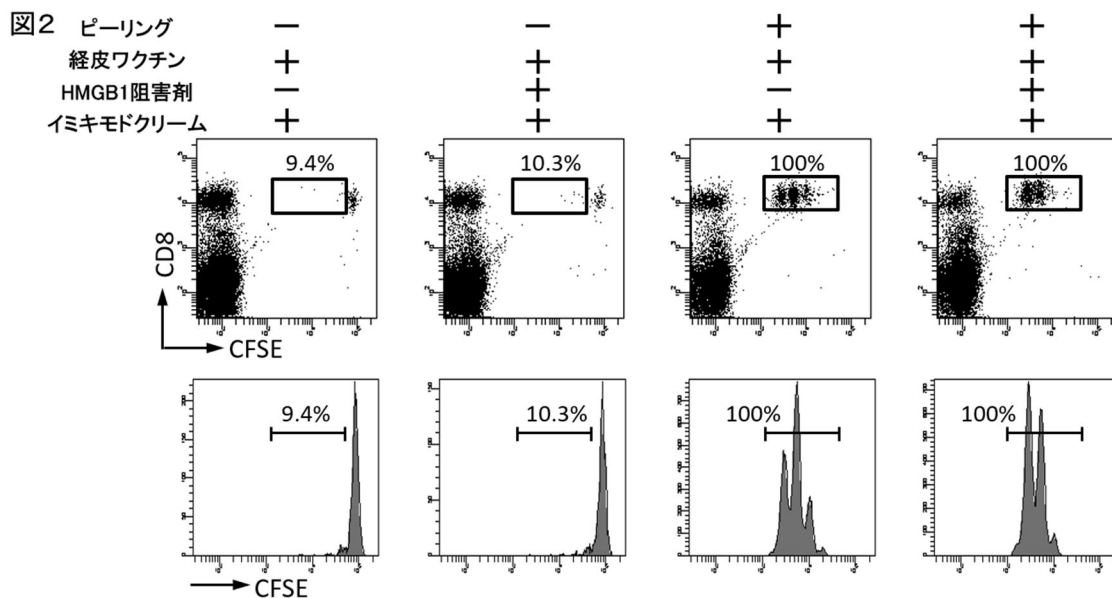


図1 ピーリング処置は抗原特異的T細胞(CFSE<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>)の増殖を促進する。増殖した全細胞をボックス内もしくはバーで表示している。



以上より、本研究において、経皮吸収型であるケミカルピーリング経皮がんペプチドワクチンは抗原ペプチド特異的 CTL 誘導が可能であることが示された。今後、抗腫瘍効果を増強するように本ワクチンシステムを検討することで、新規の経皮がんペプチドワクチンの開発へつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 亮  (Yamada Akira)  (50158177)	久留米大学・付置研究所・教授    (37104)	