

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19510209

研究課題名 (和文) HLA 結合性ペプチド予想システム構築とワクチン開発

研究課題名 (英文) Construction of a system to develop immunotherapy by exploiting the computational algorithm to identify HLA-binding peptides.

研究代表者

宇高 恵子 (UDAKA KEIKO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：40263066

### 1. 研究成果の概要 (和文)：

我々が NEC と共同で開発した HLA 結合性ペプチド予想プログラムを活用して、複数の HLA 分子に結合する、まれなペプチドを見つけ、免疫療法を開発するシステムの構築を行った。さらに Th1 誘導性の免疫賦活剤として百日咳全菌体ワクチンを添加する方法を工夫し、動物実験の後、臨床第 I/II 相試験を行った。その結果、悪性腫瘍に対しては、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導性ペプチドのみの免疫の 2 倍程度の腫瘍制御効果が長期にわたって観察された。

研究成果の概要 (英文)：

We have developed a system to establish immunotherapies against tumors and viruses by exploiting the computational algorithm to identify HLA-binding peptides. We further developed a method to recruit Th1 cells by including Pertussis whole cell vaccine as an adjuvant in order to induce highly cytotoxic T lymphocytes. After testing on mouse models we conducted phase I/II clinical trials for patients suffering from malignant tumors or chronic hepatitis C virus infection. Tumor control rate obtained was twice the percentage using HLA-binding peptides alone. A long-term tumor control was further observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：免疫学、ゲノム、癌、トランスレーショナルリサーチ、医療・福祉

## 1. 研究開始当初の背景

MHC class I 分子結合性ペプチドのコンピュータを使った予想法は、世界標準の方法では、ランダムなペプチド配列に対する的中率が30-40%程度に留まり、ペプチドワクチンの開発には十分でない。そこで、我々が NEC と共同で開発した、隠れマルコフモデルを基盤とした質問学習法による予想法で90%を超える的中率を利用して、複数の MHC 分子に結合するまれなペプチドを探索し、ペプチド免疫療法を開発する基本技術の確立をはかる。

## 2. 研究の目的

HLA 結合性ペプチドを用いた細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導型の免疫療法を開発する。

まず、これまでに MHC 結合性ペプチドを同定した WT1 腫瘍抗原ペプチドについては、初期臨床第 I/II 相試験を行い、有効性と安全性について概観をつかむ。同じく C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する免疫療法については、トランスジェニックマウスモデルを使ってペプチド免疫による *in vivo* 応答の解析と、安全性の確認を行う。一方、愛媛大と共同で臨床第 I/II 相試験を行う。

次に、新規にペプチド免疫療法を開発するために、EB ウイルスの慢性期に発現される遺伝子産物および、デングウイルス全ゲノムを網羅的に探索して、HLA 結合性ペプチドを同定する。

## 3. 研究の方法

1) WT1 腫瘍抗原ペプチドを用いた悪性腫瘍の免疫療法の初期臨床第 I/II 相試験

Wilms' Tumor 1 遺伝子産物を標的として同定した HLA-A\*2402, A\*0201, A\*0206 に共通に結合するまれなペプチドを免疫源とし、これに Th1 誘導型の免疫賦活剤として百日咳全菌体ワクチンを添加したものを投与する方法で、悪性腫瘍に対する初期臨床第 I/II 相試験を行う。目標症例は、30 例程度とする。

2) HCV ペプチドを用いた慢性 C 型肝炎に対するペプチド免疫療法の初期臨床第 I/II 相試験

標準治療である PEG-IFN+Ribavirin 投与に抵抗性の症例および、その治療を選択しなかった症例約30例に対して、我々が同定した HLA-A\*2402, A\*0201, A\*0206 に共通に結合するペプチドを免疫源とし、Th1 誘導型ワクチンとして百日咳全菌体ワクチンを添加して投与する方法で、臨床第 I/II 相試験を、愛媛大と共同で行う。

一方、都立臨床研の小原道法らが開発した HCV ゲノムトランスジェニックマウスを利用して、任意にウイルス抗原の発現誘導を行い、ペプチド免疫後の T 細胞の誘導や *in vivo* に

おける抗原特異的 T 細胞の動態を調べる。また、安全性の評価を行う。

3) EB ウイルス、デングウイルスを標的とした、新規ペプチド免疫療法の開発

EB ウイルスの慢性感染時に持続発現される A73, LMP2A, LMP1, EBNA1 について HLA-A\*2402, A\*0201, A\*0206 結合性ペプチドの予測をし、結合実験により結合ペプチドの同定を行う。

デングウイルスの全ゲノムを標的として、同様 HLA 結合性ペプチドの同定を行う。これらに対する T 細胞応答については、共同研究者である長崎大の平山謙二らと共同で、患者 T 細胞の解析を行う。

4) ペプチド免疫療法に適した Th1 誘導型免疫賦活剤の開発

Th1 誘導活性のある百日咳全菌体ワクチンを免疫賦活剤として添加するペプチド免疫療法の動物実験を行い、臨床研究に持ち込む。

## 4. 研究成果

1) WT1 腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究

我々が同定した HLA-A\*2402, A\*0201, A\*0206 結合性 WT1 ペプチド2種を用いた初期臨床第 I/II 相試験を、倫理委員会の承認を得て実施した。3種の HLA 分子に共通に結合するペプチドであるため、日本人の約8割が治療対象となるのが有利である。

2010年3月末までの治療症例について、固形悪性腫瘍に対す腫瘍制御効果を RECIST 基準を用いて評価したところ、31 症例中 10 例 (32%) で、治療開始後3ヶ月の時点で、SD (stable disease)と判定された。特に前立腺がんや腺様のう胞がんなど、比較的成長が緩徐である腫瘍については40%程度の腫瘍制御効果 (SD 以上) がみられた。さらに、SD と判定された症例の半数程度には、半年から3年にわたる長期腫瘍制御効果が観察された。この試験の前に行った WT1 ペプチドを免疫賦活効果に乏しい Freund' s incomplete adjuvant に懸濁して投与した場合には、同様の判定基準による腫瘍制御効果が20%であったことと比べると、良好な反応がみられた。また、いずれの症例においても、CTCAE による重篤な有害事象は観察されず、ある程度安全に投与できる見通しが立った (論文準備中)。

免疫治療の前後で、免疫に使った HLA 結合性ペプチドに反応する末梢血 T 細胞の誘導活性をモニターした。テクニカルな問題から、一部の症例からしかデータが得られなかったが、治療効果が観察された症例の中には、ペプチド反応性 CTL の増加が観察され、長期にわたり腫瘍制御効果が観察されたものもあった。

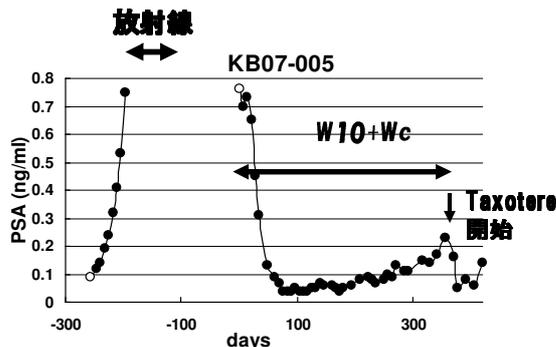


図1 ホルモン治療抵抗性前立腺がん症例005におけるPSAの変化。W10ペプチドに百日咳全菌体ワクチン(Wc)を添加した免疫治療後、急速にPSAが低下し、10ヶ月以上腫瘍制御効果が継続した。

**固形腫瘍まとめ 10月31日評価可能例=32% SD 腫瘍制御効果**

(脳腫瘍以外、すべて遠隔転移のあるstage IV症例)

症例番号	疾患名	腫瘍制御期間(週)	投与回数	経過	3ヶ月後のRECIST判定
001	膵臓のう胞がん	33	44	33週後もCTでSD	SD
002	乳房外Paget病	38	60		SD→PD
003	前立腺がん	37	63	休薬するとPSA↑	SD
005	前立腺がん(未分化)	30	64	PSA↓30週後MRIでSD	SD
006	膵臓のう胞がん	32	130	32週後CTでSD	SD→PD
007	肺大細胞がん	0	10		PD
009	口腔扁平上皮がん	6	6	腫瘍融解、感染→中止	判定不能
011	desmoplastic s.r.t	4	14		PD
012	大腸がん	0	9	腫瘍マーカー持続上昇	PD
013	悪性黒色腫	0	13	原発巣不変、新規病変↑	PD
017	顎下腺がん	0	6	肺、骨、肝転移	PD
018	glioblastoma	12	15	術後再発予防	PD
019	gliomatosis cerebri	4	120	成長速度抑制、継続治療	PD→SD
021	前立腺がん	17	38	PSA再発症例	SD
022	前立腺がん	0	10	PSA低下→上昇	PD
023	前立腺がん	9	9	PSA低下→上昇	PD
024	仙骨脊索腫	19	97		SD→PR

図2 W10+Wc免疫療法による固形悪性腫瘍の治療効果のまとめ。31例の集計と、個々の治療症例の一部を示す。

これらの結果を受けて、より信頼度の高い臨床試験を行うため、疾患別にペプチド免疫療法の臨床研究を立ち上げ、多施設試験を開始した。対象として、前立腺がん、脳腫瘍、頭頸部腫瘍、白血病の試験が進行中である。

2) HCV ペプチドを用いた臨床研究

HLA-A\*2402, A\*0201, A\*0206 結合性 HCV ペプチド 2 種を用いた初期臨床第 I/II 相試験を、倫理委員会の承認を得て実施した。まず、健康人ボランティアを対象とした試験で、有害事象は発生しなかったため、慢性 C 型肝炎症例を対象とする臨床試験を行った。その結果、最初の 4 例において、治療開始後、一時的な血清肝酵素 (AST, ALT) 値の低下を認めた。うち 2 例では、治療を中断すると、1 ヶ月後に酵素の上昇がみられリバウンド現象が示唆された。しかし、血清ウイルス量の変化は観察できなかった。これは、CTL が感染細胞 1 個ずつに apoptosis を誘導するメカニズムを考えると、当然と解釈できる結果である。つまり、残った感染肝細胞からウイルス

粒子が産生され、再感染を繰り返す状況では、ウイルス量の制御はむずかしいことを示唆している。これらの結果を受けて、臨床研究を組み直し、PEG-IFN+Ribavirin の標準治療とペプチド免疫療法を併用し、血清ウイルス量を下げた状態で、残った感染細胞を CTL に攻撃させる方法に変えて臨床研究を継続中である。

一方、ペプチド免疫後の生体内での免疫応答をモニターし、過免疫による有害事象の検討をするため、HCV ゲノムを任意の時点で誘導可能なトランスジェニックマウス (CN2-29) のモデル実験系を用いてペプチド免疫実験および、過免疫による有害事象の観察を行った。まずマウスの MHC 分子結合性ペプチドを新たに同定し、ペプチド免疫後のマウスの T 細胞応答を調べた。その結果、ペプチド免疫により抗原特異的 CTL が誘導されること、その CTL は、hydrodynamic injection (HD) 法で HCV の発現を誘導したトランスジェニックマウスの肝細胞にみられる HCV 陽性細胞をめがけて CTL が浸潤していること、が観察された。興味深いことに、CTL により、HCV 発現細胞が積極的に攻撃されている組織像が得られたマウスにおいても、血清肝酵素の上昇はみられなかった。これは、今回使ったマウスモデルでは、発現誘導細胞の割合が感染肝細胞より少なかった可能性、あるいは、CTL による感染細胞の殺傷は apoptosis によることから、血清に肝臓の逸脱酵素である AST, ALT の上昇は見られにくかった可能性が示唆された。また、マウスは過免疫を行っても、有害事象や、HCV を発現しない組織への攻撃反応はみられなかったため、ヒトに対しても安全に治療ができる可能性が示唆された (近日、論文投稿予定)。

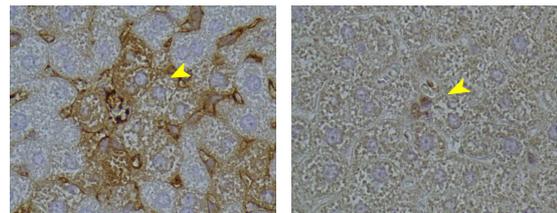


図3 HD法によりHCV抗原の発現を誘導した肝細胞(左図茶色に染まった細胞)の局所に浸潤したペプチド特異的T細胞(右図)。

3) 新規免疫療法の標的ペプチドの同定

予定通り、EB ウイルスの慢性感染時に持続発現される A73, LMP2A, LMP1, EBNA1 について HLA-A\*2402, A\*0201, A\*0206 結合性ペプチドの予測をし、結合実験により結合活性の測定をした。高知大の微生物学教室と共同で T 細胞誘導実験を始めたが、担当者の急な退職で中断している。

同様に、デングウイルスの全ゲノムを標的

として、HLA 結合性ペプチドの同定を行った。長崎大熱帯医学研と共同で、反応性 T 細胞の誘導を試している。

#### 4) 百日咳全菌体ワクチンを免疫賦活剤としたペプチド免疫療法の開発および臨床研究

Th 誘導型の免疫賦活剤としてペプチドに百日咳全菌体ワクチンを添加して投与する方法の動物実験を行い、その有効性を示した (Yano et al.)。

この結果を受けて、上記 WT1、HCV ペプチドを使ったペプチド免疫療法のアジュバントとして百日咳全菌体ワクチンを添加したものを投与する初期第 I/II 相臨床試験を行った。

#### 5) コンピューターを使った MHC 結合性ペプチド予想法の開発

この部分は、補助的な貢献のみである。ペプチド結合特性が十分にわかっていない MHC 分子について、他の MHC 分子も含めて既存のペプチド結合情報を活用して、予想精度を上げる工夫をしたもの。MetaMHC は、MHC 結合性ペプチド研究の consortium が主催する 2009 年の competition で 1 位となった (Hu, 10)。

#### 6) MHC class II 分子認識における脂質ラフトの関与についての研究

MHC 分子結合性ペプチドを標的とした T 細胞誘導型免疫療法の次世代ワクチンには、MHC class II 結合性ペプチドも含めた免疫誘導の工夫が必要である。しかし、単純に MHC 分子結合性ペプチドを見つけるだけでは不十分であり、MHC 分子の class の違いによる反応場の違いを十分に理解しなければ、目的にそぐうワクチン開発はできない。その端的な例として、胸腺培養の系で、MHC 分子の反応場の違いによる CTL, Th の分化の仕分けの分子機構を明らかにした (Komaniwa, 09)。

MHC class II 分子の細胞膜貫通ドメインには、種を超えて強く保存される Cys が存在する。この Cys には、palmitoyl 化が起こり、ラフト会合性になることが明らかとなった。一方、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が認識する MHC class I 分子は、ラフトと非会合性に膜に存在していた。MHC class II 分子の Cys を置換すると、ラフト会合性が失われた。本来、胸腺上皮細胞が提示する MHC class II を認識する胸腺細胞は、ヘルパー T 細胞 (Th) に分化するが、この変異 MHC class II 分子を認識した胸腺細胞は、誤って細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に分化することがわかった。

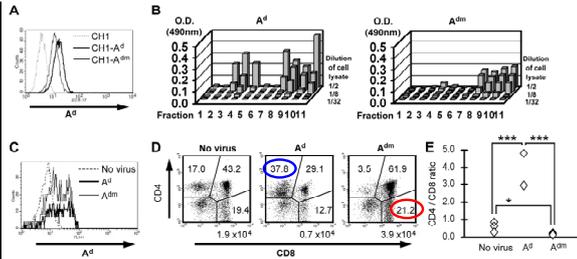


図4 ラフト会合性を失った MHC class II 分子は、胸腺で Th ではなく CTL を誘導するようになる

#### 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 9 件)

- ①Hu, X., Zhou, W., Udaka K., Mamitsuka H., Zhu S., MetaMHC: a Meta approach to predict peptides binding to MHC molecules. *Nucleic Acids Res*, 査読有, [Epub ahead of print 2010 May 18].
- ②Komaniwa S., Hayashi H., Kawamoto H., Sato S.B., Ikawa T., Katsura Y. and Udaka K., Lipid-mediated presentation of MHC class II molecules guides thymocytes to the CD4 lineage. *Eur J Immunol*, 査読有 39, 2009, 1-7
- ③Li Z., Oka Y., Tsuboi A., Kawakami Y., Udaka K., Oji Y., and Sugiyama H. (計 20 名中 17 番目), Identification of a WT1 protein-derived peptide, WT1<sub>187</sub> as an HLA-A\*0206-restricted, WT1-specific CTL epitope. *Microbiology and Immunology* 査読有, 52(11), 2008, 551-558
- ④Sera T., Hiasa Y., Mashiba T., Tokumoto Y., Hirooka M., Konishi I., Matsuura B., Michitaka K., Udaka K. and Onji M., Wilms' tumor 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Eur J Cancer* 査読有 44(4), 2008, 600-608
- ⑤Tsuboi A., Oka Y., Udaka K., Kawase I. and Sugiyama H. (計 21 名中 19 番目) Wilms' tumor gene WT1 peptide-based immunotherapy induced a minimal response in a patient with advanced therapy-resistant multiple myeloma. *Int J Hematol* 査読有, 86(5), 2007, 414-417
- ⑥Yano A., Komatsu T., Ishibashi M. and Udaka K. Potent CTL induction by a whole cell Pertussis vaccine in anti-tumor

peptide immunotherapy. Microbiol Immunol 査読有, 51(7), 2007, 685-699

⑦Iiyama T., Takeda S., Udaka K., Takeuchi T., Adachi Y.C., Shuin T., Ohtsuki Y., Oka Y., Tsuboi A., Nakatsuka S., Elisseeva O.A., Oji Y., Nakajima H., Kawakami M., Nishida S., Shirakata T. and Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor 1) peptide immunotherapy for renal cell carcinoma. Microbiol Immunol 査読有, 51(5), 2007, 519-530

[学会発表] (計 9 件)

①宇高恵子 慢性C型肝炎に対するペプチド免疫療法の開発 四国免疫フォーラム、2009. 6. 27、香川県木田郡

②麻植啓輔、木岐 淳、耕崎拓大、西森 功、宇高恵子、自己免疫性膵炎における制御性T細胞と HLA-DRB1\*0405 結合-炭酸脱水酵素 IV ペプチドに対する細胞性免疫応答の検討、第 46 回日本消化器免疫学会総会、2009. 7. 23-24、松山

③宇高恵子、. HLA クラス I 結合性ペプチドの計算予測を活用した、がんの免疫療法の開発 シンポジウム「理論解析と実験から見出される生物物理学」、日本生物物理学会第 46 回年会、2008. 12. 3-5 福岡

④宇高恵子、他、Designing T cell epitope peptides that bind promiscuously to several HLA class I molecules. 日本生物物理学会第 45 回年会、2007. 12. 21、横浜

⑤KATAOKA S., UDAKA K. et al. A mouse model of peptide immunotherapy for hepatitis C Virus、第 37 回日本免疫学会総会、2007. 11. 20、東京

⑥矢野有紗、宇高恵子、他、抗腫瘍ペプチド免疫療法における百日咳ワクチンのCTL誘導活性、第 37 回日本免疫学会総会、2007. 11. 22、東京

⑦日浅陽一、眞柴寿枝、宇高恵子、恩地森一、Peg-IFN、リバビリン併用療法後の新しい免疫療法の開発をめざして-ペプチドワクチン療法-、日本インターフェロンサイトカイン学会シンポジウム 2007. 7. 5-6、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

① 名称：細胞傷害性 T 細胞の誘導方法、細胞傷害性 T 細胞の誘導剤、およびそれを用いた医薬組成物およびワクチン

発明者：宮川 知也、宇高 恵子

権利者：日本電気株式会社、国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：PCT/JP2008/003419

出願年月日：2008 年 11 月 20 日

国内外の別：国外

②

名称：癌の治療剤

発明者：石橋 正英、宇高 恵子

権利者：阪大微生物病研究会、国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：PCT/JP2008/52070

出願年月日：2008 年 2 月 7 日

国内外の別：国外

③

名称：細胞傷害性 T 細胞の誘導方法、細胞傷害性 T 細胞の誘導剤、およびそれを用いた医薬組成物およびワクチン

発明者：宮川 知也、宇高 恵子

権利者：日本電気株式会社、国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：特願 2007-301000

出願年月日：2007 年 11 月 20 日

国内外の別：国内

④

名称：HLA 結合性ペプチド、その前駆体、それをコードする DNA 断片および組み換えベクター

発明者：宮川 知也、宇高 恵子

権利者：日本電気株式会社、国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：PCT/JP2007/069348

出願年月日：2007 年 10 月 3 日

国内外の別：国外

⑤

名称：HLA 結合性ペプチド、その前駆体、それをコードする DNA 断片および組み換えベクター

発明者：宮川 知也、宇高 恵子

権利者：日本電気株式会社、国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：特願 2007-189047

出願年月日：2007 年 7 月 20 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：HLA 結合性ペプチド、それをコードする DNA 断片および組み換えベクター

発明者：宮川 知也、宇高 恵子

権利者：日本電気株式会社、国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：4475469

取得年月日：2010 年 3 月 19 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇高 恵子 (UDAKA KEIKO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：40263066