

機関番号：23803  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590063  
 研究課題名(和文) オーダーメイド癌治療を目的としたエピトープペプチドワクチンの作製と臨床応用  
 研究課題名(英文) Development and clinical application of antibody epitope peptide vaccines for personalized tumor immunotherapy.  
 研究代表者  
 伊藤 邦彦 (ITO KUNIHICO)  
 静岡県立大学・薬学部・教授  
 研究者番号：90221770

## 研究成果の概要(和文)：

MALT リンパ腫患者より単離した AHSArFab のエピトープ解析を行い、得られた結果に基づきペプチドワクチンを作製した。ワクチンをマウスに免疫して得られた rFab クローンの反応性は AHSArFab とほぼ同様であったが、より高い親和性を示した。抗体医薬等の認識するエピトープあるいはミモトープに基づくペプチドワクチンは高親和性で高特異性の抗腫瘍抗体群の誘導に有効であることを明らかにした。現在臨床応用について検討中である。

## 研究成果の概要(英文)：

I performed the epitope analysis of human recombinant Fab (AHSAr) retrieved from a patient with MALT lymphoma using phage display random peptide library. AHSAr-derived epitope peptide vaccines were given to BALB/c mice and then antibody Fab libraries were constructed from immunized spleen cells. Selected Fab clones show the same reactivity as AHSAr against target antigen. Moreover, they showed the binding affinity stronger than that of AHSAr. These results suggest that peptide vaccines from the epitope or mimotope of antibody medicines may serve as a effective inducers of highly specific and reactive anti-tumor antibody repertoires. Clinical applications of epitope peptide vaccines are now in progress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：抗体工学、免疫学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：オーダーメイド医療、癌治療、エピトープワクチン、抗体医薬、ファージディスプレイ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌化学療法分野では、これまでの代謝拮抗薬や核酸合成阻害薬にかわり、癌細

胞で特異的に発現しているタンパク分子を狙い撃ちする分子標的治療薬が開発され、臨床で高い治療成績をあげている。具体的には、手術不能または転移性の非小細胞性肺癌治

療薬であるゲフィチニブ（イレッサ）や慢性骨髄性白血病およびフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病治療薬であるメシル酸イマチニブ（グリベック）などの低分子化合物や HER2 過剰発現の転移性乳癌の治療薬であるトランスツズマブ（ハーセプチン）や CD20 陽性のびまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫の治療薬であるリツキシマブ（リツキサン）などのヒト化抗体医薬があげられる。抗体医薬は臨床の場で高い治療成績を残している一方で、克服すべき様々な問題点を持ち合わせているのも事実である。1) 単回投与では効果が現れることが少なく、通常複数回の投与が必要であること、2) 非常に高価であり、患者を経済的に圧迫する可能性があること、3) 完全ヒト型抗体ではないので、マウス抗体の抗原性に起因するアナフィラキシーショックを起こす可能性があること、4) 体内で抗マウス抗体が形成され治療効果が減弱する可能性があることなどが挙げられる。

## 2. 研究の目的

完全ヒト型抗体が作製できれば、上記の問題点のいくつかについては解決可能である。しかしながら、ヒト型抗体の製造過程は、多くの特許でカバーされており、実験室レベルで疾患の治療に有用なヒト型抗体を作製できたとしても、それを抗体医薬として臨床に供するためには長い時間と莫大な費用が必要となる。本研究は、抗体医薬のもつさまざまな欠点の克服とともに患者個人に最適化した癌治療の実現を目的として、癌患者自身から抗腫瘍活性を有するリコンビナント抗体を単離し、そのエピトープあるいはエピトープ擬似（ミモトープ）配列（以下エピトープ配列と一括して記述）に基づくペプチドワクチンの投与により自己癌を治療するという、能動免疫の観点に立ったオーダーメイド癌免疫療法の確立を目指すものである。ミモトープワクチンによる抗腫瘍免疫誘導に関する研究は、抗 CD20 抗体を出発材料とした Li らの研究(*Cell. Immunol.*, 239, 136, 2006) やセツキシマブを出発材料とした Riemer らの研究(*J. Natl. Cancer Inst.*, 97, 1663, 2005) など、1998 年に報告された抗 IgE 抗体ミモトープの免疫に関する Rudolf らの研究(*J. Immunol.*, 160, 3315, 1998) を皮切りに、現在までに 20 数報の論文が発表されているがすべて国外の報告である。国内においてはこのような研究に関する報告は未だにない。申請者は、これまで、科学研究費補助金を受け、平成 15～16 年度（基盤研究 C）では、癌患者からファージディスプレイ法により癌細胞反応性のヒト型リコンビナント抗体フラグメントの単離に成功している。また、

平成 17～18 年度（基盤研究 C）では、癌抑制（細胞増殖抑制）活性を有する抗 CD98H 鎖モノクローナル抗体のエピトープ解析を行い、作製したエピトープペプチドのマウスへの免疫による抗腫瘍免疫誘導について検討した。その結果、誘導された抗体レパートリー中に癌抑制抗体と構造および機能がほぼ同一の抗体クローンが存在することを確認した (*Cancer Sci.*, 100, 126, 2009)。申請者は、これらふたつの研究成果を有機的に結合させることができれば、癌患者個人に対して、有効性が高く副作用の少ない癌治療法（オーダーメイド癌免疫療法）の提供が可能になるのではないかとこの着想に至った。すなわち、自己の癌細胞に反応する抗体を自己の免疫細胞（癌浸潤リンパ球、末梢血リンパ球、骨髄細胞など）から単離し、抗原エピトープの解析を行う。さらに得られたエピトープ配列に基づき作製したペプチドワクチンの免疫により自己の癌を攻撃する抗腫瘍免疫を誘導しようとするものであり、国内外を問わずこのような研究は他に例を見ない。

## 3. 研究の方法

申請者が先にリンパ腫患者の骨髄細胞から単離したヒト型リコンビナント Fab(AHSArFab)を出発材料とする。本リコンビナント Fab は、培養系 HeLaS3 細胞と反応するが、その認識抗原を同定するまでには至っていない。そこで、ファージディスプレイペプチドライブラリーを用いたエピトープ解析を行い、ClustalW などの解析プログラムを用いて認識抗原を同定する。得られたエピトープ配列の抗原分子内での配置について分子モデリングにより解析する。それらの結果に基づきエピトープペプチドのデザインと合成を行い、さらに KLH などのキャリアタンパク質との複合体を作製する。エピトープペプチド-KLH でマウスを過免疫し、血清抗体価の上昇を確認後、頸静脈切断により血液を回収後、抗血清を得る。また、同時に脾臓も回収する。抗血清については、HeLaS3 細胞を標的細胞として抗原結合活性や細胞障害活性について、AHSArFab との比較のもとで検討する。脾臓については、脾細胞を回収し、抗体遺伝子ライブラリーを構築する。ファージディスプレイ法により、HeLaS3 細胞に対するパニングとスクリーニングを行い、HeLaS3 細胞に反応性のクローンを単離する。得られたクローンの構造的および機能的特徴を解析することによって、エピトープペプチドワクチンによる抗腫瘍免疫誘導の有用性を検討する。さらには、その臨床応用として、リンパ腫患者を対象にして、自己の腫瘍と反応するリコンビナント抗体分子の単離とヒトへの投与が可能なエピト

ープペプチドワクチンの作製について検討を加える。

#### 4. 研究成果

(1) ファージディスプレイランダムペプチドライブラリーを用いたエピトープ解析

MALT リンパ腫患者の骨髄細胞から単離したリコンビナント Fab(AHSArFab)を解析対象とし、本 rFab が認識する細胞表面抗原の同定を目的として、ファージディスプレイランダムペプチドライブラリー(PhD-7)を用いたエピトープ解析を行った。PhD-7 を AHSArFab に対して 4 ラウンドのパニングを行った結果、AHSArFab 結合ファージタイターは 850 倍に上昇した。ELISA にて AHSArFab 陽性であったクローン 27 個 (30 個中)のランダムペプチド部分のシーケンス解析を行なった結果、LSYLEPW(21 個)、LSYLEPP(3 個)、LSYLEPT(1 個)、LSYIEPI(1 個)、VSYLEPP(1 個)という配列がカッコ内の頻度で得られた。Protein-BLAST による相同性解析の結果、LSYLEP 配列が sphingomyelin phosphodiesterase 4 (SMPD4) の A<sub>402</sub>-A<sub>408</sub> とほぼ一致したことから、SMPD4 が AHSArFab の認識抗原である可能性が示唆された。

(2) ミモトープペプチドのデザインと作製および免疫抗血清の解析

最も出現頻度の高かった LSYLEPW 配列 (ミモトープと呼ぶ) に基づきリンカー (GGGC) を付加したペプチドを合成し KLH との複合体を作製した。LSYLEPW-KLH で過免疫した BALB/c マウスより血清および脾臓を採取した。抗血清は、用量依存的に LSYLEPW-KLH に対して反応性を示したが、HeLaS3 細胞に対する反応性は弱いものであった。

(3) ミモトープペプチド免疫により誘導された抗体レパートリーの解析

LSYLEPW-KLH 複合体で過免疫した BALB/c マウス脾細胞より抗体遺伝子ライブラリーを構築した。抗体提示ファージライブラリーは抗原陽性の HeLaS3 細胞あるいは LSYLEPW-BSA に対してパニングを行い、rFab クローンのスクリーニングは間接蛍光抗体法あるいは ELISA 法により行った。陽性クローンについては可変部領域のシーケンス解析もあわせて行った。HeLaS3 パニングで得られた rFab は HeLaS3 生細胞に対する AHSArFab との二重染色により染色部位

の重複が認められた。LSYLEPW-BSA パニングで得られた rFab は AHSArFab とペプチドの反応を競合的に阻害した。ミモトープペプチド免疫で誘導された rFab のエピトープが AHSArFab とオーバーラップしていることが示唆された。また、陽性 rFab と AHSArFab の可変部領域の相同性は約 50~70% であり、これらの rFab は HeLaS3 あるいはミモトープペプチドに対して AHSArFab より高い親和性を有していた。

(4) リンパ腫患者の自己腫瘍と反応するリコンビナント抗体の単離と臨床応用

リンパ腫患者の骨髄細胞 cDNA は連携研究者の金沢医大正木准教授より提供して頂いた。これを出発材料として、抗体遺伝子断片の増幅と IgG1, kappa(K)/lambda(L) ライブラリー構築を行った。ライブラリーサイズは、それぞれ(K)1.5 x 10<sup>7</sup> cfu, (L)5.7 x 10<sup>6</sup> cfu であった。当初の計画では自己腫瘍に対してパニングする予定であったが入手できなかったため、5% (v/v) フォルマリン固定 HeLa 細胞を使うこととし、同細胞に対する 4 ラウンドのパニングを行った。その結果、(K)では 257 倍、(L)では 32 倍のファージタイターの上昇が認められた。最終ラウンドのファージを大腸菌に感染させ、ファージミド DNA を回収し、可溶性 Fab 発現型に変換した後、大腸菌に再導入した。プレートよりシングルコロニーを 30 個選択し、可溶性 Fab を調製ののち、フォルマリン固定 HeLa 細胞に対する反応性を指標にスクリーニングした。その結果、(K)ライブラリーから 5 個の陽性クローンが得られたが、(L)ライブラリーからは陽性クローンは得られなかった。可変部シーケンス解析の結果、5 個の陽性クローンは同一であることが明らかとなった。今後は、対応抗原解析、エピトープ解析、ペプチド合成、キャリアタンパク質複合体のマウスへの免疫により、臨床応用の可能性について検討していくつもりである。

#### 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 4 件)

①Ohshima, M., Tadakuma, T., Hayashi, H., Inoue, K. and Itoh, K. Generation of a recombinant single chain variable fragment (scFv) targeting 5-methyl-2'-deoxycytidine. J. Biochem., 147, 135-141 (2010) 査読あり

②Ohshima, M., Inoue, K., Hayashi, H., Tsuji, D., Mizugaki, M., and Itoh, K.

Generation of AcGFP-labeled single chain Fv against 5-methyl-2' - deoxycytidine from a hyperimmunized mouse using phage display technology. Prot. Eng. Des. Select., 23, 881-888 (2010) 査読あり

③Urushibata, Y., Itoh, K., Ohshima, M., and Seto, Y. Generation of Fab Fragment-like Molecular Recognition Proteins against Staphylococcal Enterotoxin B by Phage Display Technology. Clin. Vaccine Immunol., 17, 1708-17 (2010) 査読あり

④Itoh, K., Ohshima, M., Sonobe, M., Saito, M., Yoshida, A., Hayashi, H., Inoue, K., and Masuko, T. Antibody epitope peptides as potential inducers of IgG antibodies against CD98 oncoprotein. Cancer Sci, 100, 126-131 (2009) 査読あり

[学会発表] (計6件)

①成島悠太, 近藤雅紘, 板野太亮, 井上和幸, 林秀樹, 辻大樹, 正木康史, 益子高, 伊藤邦彦 MALT リンパ腫患者から単離したヒト型リコンビナント Fab の認識する抗原の解析 (第3報): 免疫沈降法を用いた rFab 認識抗原の同定 日本薬学会第131年会 2011年3月静岡

②江上蓉子, 大島幹弘, 成島悠太, 井上和幸, 林秀樹, 辻大樹, 正木康史, 益子高, 伊藤邦彦 MALT リンパ腫患者から単離したヒト型リコンビナント Fab の認識する抗原の解析 (第2報): ミモトープペプチド免疫で誘導したリコンビナント Fab の性状解析 日本薬学会第130年会 2010年3月岡山

③近藤雅紘, 齋藤美沙, 大島幹弘, 出口和輝, 林秀樹, 井上和幸, 辻大樹, 益子高, 伊藤邦彦 鎖状ミモトープペプチドによる効率的抗腫瘍免疫誘導の検討 日本薬学会第130年会 2010年3月岡山

④江上蓉子, 大島幹弘, 吉田晃, 井上和幸, 林秀樹, 正木康史, 益子高, 伊藤邦彦 MALT リンパ腫患者から単離したヒト型リコンビナント Fab の認識する抗原の解析: ファージディスプレイランダムペプチドライブラリーを用いた検討 日本薬学会第129年会 2009年3月京都

⑤齋藤美沙, 大島幹弘, 近藤雅紘, 井上和幸, 林秀樹, 益子高, 伊藤邦彦 抗体エピトープペプチドによる抗腫瘍免疫誘導: ミモトープペプチドを用いた検討 日本薬学会第129年

会 2009年3月京都

⑥大島幹弘, 菌部桃代, 齋藤美沙, 吉田晃, 林秀樹, 益子高, 伊藤邦彦 抗腫瘍抗体エピトープペプチドにより誘導された抗体レパートリーのクローニングと機能および構造解析 日本薬学会第128年会 2008年3月横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/cli/nphar/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 邦彦 (ITOH KUNIHICO)  
静岡県立大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90221770

(2) 研究分担者

林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)  
静岡県立大学・薬学部・講師  
研究者番号: 00419665

(3) 連携研究者

正木 康史 (MASAKI YASUFUMI)  
金沢医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40238895