

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791130
 研究課題名 (和文) 前立腺癌患者に対する癌ワクチン療法に応用できる腫瘍関連抗原由来ペプチドの同定
 研究課題名 (英文) Identification of tumor antigen derived peptides having the potential to promise candidates for cancer vaccine therapy from prostate cancer patients
 研究代表者 南 高文
 (MINAMI TAKAFUMI)
 近畿大学・医学部・助教
 研究者番号：70340809

研究成果の概要 (和文)：

前立腺癌患者より末梢血を採取し、末梢血単核球細胞を遠心分離とHLA-Aをanti-HLA-A11 monoclonal antibody, anti-HLA-A31 mAbとanti-HLA-A33 mAbを使用しフローサイトメトリーにて同定しHLA-A3 supertype allelesのうちHLA - A11, -A31, -A33陽性のものを対象とした。7種類の前立腺癌関連抗原のクラス I 拘束性ペプチドを1抗原10種類合成し、次にLNCaPにHLA-A11, -A31, -A33分子を発現させる為にHLA-A1101, -A3101, -A3303プラスミドcDNAを挿入しHLA-A1101, -A3101, -A3303強発現LNCaPトランスフェクタントを樹立した。また、約20例ほどのHLAタイピング及びPBMCの採取をすることができた。

研究成果の概要 (英文)：

Peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were obtained from prostate cancer patients who had provided a written informed consent. Fifty milliliter of peripheral blood was obtained, and the PBMCs were prepared by Ficoll-Conray density centrifugation. The expression of HLA-A11, -A31, and -A33 molecules on the PBMCs was determined by flow cytometry using these antibodies-anti-HLA-A11, anti-HLA-A31, anti-HLA-A33-and FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin G(IgG) monoclonal antibodies.

7 prostate cancer-related antigens(SART2, CypB, PTH-rP, HER2neu, EGFR, MRP3, EZH2) prepared based on the binding motifs to the MHC-class I alleles.

To generate LNCaP sublines expressing each of the HLA-A11, -A31, and -A33 molecules, an HLA-A1101, -A3101, or -A3303 plasmid cDNA was inserted into the eukaryotic expression vector pCR3.1.

20 patient's peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were obtained from prostate cancer patients. The expression of HLA-A11, -A31, -A33 molecules on the PBMCs was determined by flow cytometry using these antibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 癌ワクチン HLA-A3 supertype alleles

1. 研究開始当初の背景

ホルモン抵抗性前立腺癌 (HRPC) 患者の平均生存期間は約 1 年と予後不良であり、有効な治療法がないのが現状である。最近の前向きランダム化臨床試験の結果から、ドセタキセルにエストラムスチンあるいはプレドニゾロンを併用した化学療法が HRPC の標準治療として行われるようになった。生存期間を数ヶ月延長させる効果はあるものの、骨髄抑制や食欲不振など化学療法剤としての毒性も無視できず、患者にとっての benefit が十分あるとは言えない。このような状況を鑑みると、HRPC に対する有効な患者 benefit のある治療法の開発が早急に必要である。近年、多くの腫瘍抗原が cytotoxic T lymphocytes(CTLs)を誘導することが確認されており、その腫瘍抗原のペプチドを利用した癌ペプチドワクチン療法の有効性が報告されている (Noguchi et al.The Prostate 63,2005/Hueman et al.Clin Cancer Res 11,2005)。ヒト腫瘍免疫療法において、MHC class I に提示された腫瘍関連抗原由来ペプチドを認識することにより CD8⁺CTLs が腫瘍細胞を傷害することが実験的に確認されており、各種癌に対する臨床研究においても腫瘍特異的 CD8⁺CTLs の有効性が確認されている (van der Bruggen P et al.Science 254,1991/Kawakami Y et al.J Exp Med 180,1994)。また T cell の腫瘍特異的 activation は十分な腫瘍関連ペプチドの提示に依存し、最も効果的な抗原性ペプチドの提示は樹状細胞に依存すると考えられている

(Steinman,R.M.Annu.Rev.Immunol.,9,1991/Banchereau,J et al.Nature,392,1998)。このような背景から、伊東らは前立腺癌に発現している各種癌関連抗原 (SART2,3, CypB,

Her2, PSA, PSM, PAP,PSCA, Lck, PTH-rR, EZH2, EGFR など) より、前立腺癌担癌患者の末梢リンパ球を用いた研究で、CTL 誘導可能な HLA-A2 および HLA-A24 拘束性の MHC クラス I ペプチド約 50 種類同定している。また野口らは、それらペプチドを用いて HLA-A2 および HLA-A24 陽性 HRPC 患者に対して、治療開始前の末梢リンパ球を用いた CTL スクリーニングによるテーラーメイド型ペプチドワクチン療法の臨床研究を 50 症例以上行い、その有効性を示している (Noguchi et al.The Prostate,57,2003/Noguchi et al.The Prostate,60,2004/Noguchi et al.The Prostate,63,2005)。われわれの施設 (近畿大学医学部附属病院および奈良病院) においても、久留米大学医学部免疫学教室との共同研究で、HLA-A2 および HLA-A24 陽性 HRPC 患者に対し、独自のペプチドワクチン療法の第一相臨床研究を行い、その安全性・免疫反応性・臨床効果について検討した結果は多くの症例で特異的 CTL 誘導が確認され、重篤な有害事象は認められず、ほとんどの症例で QOL を損なうことなく治療が続けられ安全と思われた。臨床効果については約 20%において PSA 値の下降が認められ、エントリーからの平均生存期間は 19 ヶ月とドセタキセルをベースにした化学療法と比較しても遜色なく、むしろより有用であると思える結果となった。以上のようなエビデンスより、医薬品としての有用性を検討するため、厚生労働省医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構に申請のうえ、HLA-A24 陽性 HRPC 患者を対象に全国 4 施設において、現在、第一相臨床治験が進行中である。HLA-A2 は日本人の約 40%、HLA-A24 は約 60%が陽性で majority を占め

ることから、現在、癌ワクチン療法の適応は HLA-A2,-A24 陽性患者のみで臨床に応用できる HLA-A3 supertype alleles 拘束性の癌ペプチドは無いのが現状である。今回われわれは両分子とも陰性であったため、残念なことにペプチドワクチン療法を受けられなかった症例を少なからず経験した。この状況を打開するためには日本人の 46% が陽性と思われる第 3 の MHC クラス I 分子、HLA-A3 supertype alleles 拘束性のペプチド同定が必要であると考えられる。そこでわれわれは HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者に対する MHC クラス I ペプチドワクチンを開発すべく、HLA-A2,-A24 陽性前立腺癌患者において有効な癌ペプチドとして報告されている SART3 抗原由来ペプチドのなかで癌ワクチン療法に応用できるペプチドの同定を試みた。約 20 種類の SART3 MHC クラス I ペプチドを作製し、各ペプチドに対するキラー前駆細胞の反応性を IFN- γ release アッセイおよび ^{51}Cr release アッセイで検討したところ、候補として SART3p₅₁₁₋₅₁₉, SART3p₇₃₄₋₇₄₂ にてペプチド特異的、cancer-reactive CTL 誘導を認めた (Minami et al. Cancer Immunol. Immunother.2006.)。

2. 研究の目的

われわれは SART3 以外の前立腺癌関連抗原においても HLA-A3 supertype alleles 拘束性の癌ペプチドワクチンの開発が必要と考え、HLA-A2 および HLA-A24HRPC 患者の臨床研究で有用であった各癌関連抗原について、新しい HLA-A3 supertype alleles 拘束性ペプチドの同定を目的として本研究を計画した。具体的には、7 種類の前立腺癌関連抗原 (PSA, PSM, PSCA, PAP, EGFR, Lck, EZH2) のクラス I 拘束性ペプチドを 1 抗原 10-20 種類合成し、SART3 抗原ペプチド同定

に用いた手法で 1 抗原ずつスクリーニングし、癌ワクチン療法に使用可能なペプチドを同定する。このような背景から HLA-A2,-A24 陽性前立腺癌患者以外にも癌ペプチドワクチン療法の適応を拡大するために、HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者に応用できる有望なペプチド同定を試みる。HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者においても先に述べた腫瘍関連抗原由来ペプチドの発現が予想され現在まだ同定されていない、前立腺癌関連抗原においてそれぞれ由来のペプチドを使用し ELISA による IFN- γ 測定、 ^{51}Cr 試験にてスクリーニングにて同定し癌ペプチドワクチン療法に応用できる候補と成り得るペプチドを同定する。現在まで癌ワクチン療法を希望したホルモン不応再燃前立腺癌患者の中で日本人にも HLA-A3 supertype alleles 陽性者は 46% であり HLA-A2,-A24 陰性の場合、治療は不可能であったが今回の研究にて HLA-A3 supertype alleles 陽性ホルモン不応再燃前立腺癌患者に対するペプチド同定にてテラメイド癌ペプチドワクチン療法適応範囲拡大を担うと思われる。また、今回の研究が前立腺癌患者のみでなく、他臓器癌に対する HLA-A3 supertype alleles 陽性患者への癌ペプチドワクチン療法の礎になるものと思われる。

3. 研究の方法

本学医学部倫理委員会に承認を得て、本研究に対し同意を得た前立腺癌患者より末梢血 50cc を採取し、Ficoll-Conray 液による末梢血単核球細胞を遠心分離と HLA-A を anti-HLA-A11 monoclonal antibody, anti-HLA-A31 mAb と anti-HLA-A33 mAb を使用しフローサイトメトリーにて同定し HLA-A3 supertype alleles のうち

HLA-A11,-A31,-A33 陽性のものを対象とした。また全サンプル、実験に使用するまで凍結保存した。

LNCaP は HLA-A0201 陽性前立腺癌 cell line である。LNCaP に HLA-A11,-A31,-A33 分子を発現させる為に真核細胞の発現ベクターPcr3.1に HLA-A1101,-A3101,-A3303 プラスミド cDNA を挿入した。全 cell line は RPMI1640 with 10%FCS にて培養した。

SART2,CypB,PTH-rP,HER2neu,EGFR,MRP3,EZH2 の各抗原由来ペプチドを合成、全ペプチド90%以上の純度である。

4. 研究成果

本研究に対し同意を得た前立腺癌患者より末梢血を採取し、末梢血単核球細胞を遠心分離と HLA-A を anti-HLA-A11 monoclonal antibody,anti-HLA-A31mAb と anti-HLA-A33 mAb を使用しフローサイトメトリーにて同定し HLA-A3 supertype allelesのうち HLA-A11,-A31,-A33 陽性のものを対象とした。7 種類の前立腺癌関連抗原 (SART2, CypB,PTH-rP,HER2neu,EGFR,MRP3,EZH2) のクラス I 拘束性ペプチドを 1 抗原 10 種類合成した。次に LNCaP に HLA-A11,-A31,-A33 分子を発現させる為に真核細胞の発現ベクターPcr3.1に HLA-A1101,-A3101,-A3303 プラスミド cDNA を挿入し HLA-A1101,-A3101,-A3303 強発現 LNCaP トランスフェクタントを樹立した。約 20 例ほどの HLA タイピング及び PBMC の採取をした。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者 南 高文
(MINAMI TAKAFUMI)
近畿大学・医学部・助教

研究者番号：70340809

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：