

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月24日現在

機関番号：14101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592191
 研究課題名（和文）頭頸部腫瘍における蛋白ワクチンによる腫瘍破壊の免疫モニタリング
 研究課題名（英文）Immunomonitoring in head and neck cancer patients treated with protein vaccine through tumor destruction

研究代表者
 影山 慎一（KAGEYAMA SHINICHI）
 三重大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：80194695

研究成果の概要（和文）：疎水化多糖類プルランと MAGE-A4 組換え蛋白の複合体をワクチンとするがんワクチン臨床試験の免疫モニタリング解析を実施した。頭頸部腫瘍を含む 16 例において 6 回以上のワクチン反復投与を完了した。MAGE-A4 抗体価は ELISA で IgG 抗体反応解析を行った。ワクチン前の抗体陽性は 3 例にみられ、自然免疫反応がみられることが判明し、反応が増強するものが 1 例、陰性例 4 例では 2 例が陽性化した。また、MAGE-A4 以外への抗原拡大現象が存在することが観察された。

研究成果の概要（英文）：Immune reactions in head/neck cancer patients treated with protein vaccine, recombinant MAGE-A4 protein complexed with cholesteryl pullulan, were analyzed. 16 subjects including head /neck cancer patients completed 6 or more vaccination. Humoral IgG responses were analyzed with ELISA assay. 3 patients were positive for MAGE-A4 antibody prior vaccination, suggesting that there exists natural positive immunity in MAGE-A4 antigen positive cancer patients. Among them, MAGE-A4 immunity was augmented in one case. In 4 MAGE-A4 antibody negative patients, 2 converted to MAGE-A4 IgG positive. Spreading of immune reactions other than vaccinated antigen was observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：がんワクチン 臨床試験 免疫モニタリング

1. 研究開始当初の背景

我々は疎水化多糖である“プルラン”を抗原デリバリーとしたがんワクチンを開発してきた。146アミノ酸短縮型HER2蛋白と疎水化多糖類プルランの複合体（CHP-HER2）を作製し、マウス実験系で抗原提示細胞がCHP-HER2を取

り込み、HER2抗原由来MHCクラスIおよびクラスII結合性ペプチドを効率よくCD8⁺、CD4⁺T細胞に提示していることを明らかにした。in vivo実験では、CHP-HER2処理樹状細胞をワクチンとして投与することにより、HER2陽性腫

瘍の拒絶効果を示してきた。ヒトにおいては、CHP-HER2は末梢血リンパ球からHER2抗原特異的CD8⁺T細胞を誘導することも明らかにした。以上、CHP-抗原蛋白複合体ワクチンは、抗原提示細胞に能動的に取り込まれ、細胞内で抗原蛋白プロセッシングを受け、抗原提示システムのクラスIとクラスIIの双方にペプチドとして提示され、CD8⁺キラーT細胞およびCD4⁺ヘルパーT細胞の双方の活性化を行い、がんワクチンとして臨床開発することの合理性が高いと考えられた。

ヒトへのがんワクチン応用のためCHP-HER2 ワクチンの安全性と免疫反応効果を評価する第I相臨床試験を施行した。T細胞性免疫反応は9例中5例に検出された。その5例中4例にHER2特異的CD8⁺T細胞が、4例に特異的CD4⁺T細胞が検出された。2例はCD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞ともに検出された。CD8⁺T細胞誘導例のうち2例は同定HLA-A24拘束性HER2ペプチドp63-71に反応していたが、他2例は本同定ペプチドには反応せず未同定ペプチドへの免疫誘導が行われたと考えられた。さらに我々はGM-CSFを併用したCHP-HER2ワクチンの臨床試験も行い、15例のワクチンを投与された患者血清の解析を行い、14例でHER2抗原に特異的なIgG抗体が出現し、またIgGの併用投与によりHER2抗原に対する液性免疫反応が促進されること、IgG抗体反応がCD4⁺T細胞反応のバイオマーカーとして有用な方法であることも公表してきた。

2. 研究の目的

がんワクチン・CHP-MAGE-A4臨床試験にてワクチン投与を受けた頭頸部腫瘍例での末梢血と腫瘍組織（組織浸潤リンパ球）のMAGE-A4抗原特異的T細胞免疫モニタリングを行うことを目的とした。

末梢血、組織浸潤リンパ球でのMAGE-A4以外の発現抗原（NY-ESO-1, SAGE）の抗原発現を観察し、抗原拡大現象（Antigen-spreading）を解析する。このことによりワクチンによる免疫反応の結果、腫瘍破壊が起こり新たな抗原に対する免疫反応が拡大したことを意味する。

抑制的免疫反応解析（FOXp3, PD1など）を行い、末梢血、腫瘍組織での正と負の抗原特異的免疫応答動態評価を行い、新しいワクチン療法開発の基盤データとする。

3. 研究の方法

新規抗原デリバリーシステムである疎水化多糖類プルランと癌抗原MAGE-A4組換え蛋

白の複合体をワクチンとするがんワクチン臨床試験「MAGE-A4 抗原を発現する難治性悪性腫瘍に対する CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床研究」を開始する。

①臨床試験用ワクチン

1)MAGE-A4 蛋白；N末端に12アミノ酸His-tagを含む329アミノ酸の分子量36.3kdの癌精巢蛋白質。

2)CHP（疎水化多糖類プルラン）；プルラン（分子量約6万）100グルコース・ユニットにつき1.4の比率でコレステリル部と結合した化合物）。

3)CHP-MAGE-A4複合体ワクチン：MAGE-A4蛋白CHPを複合体形成させたもので、CHP-MAGE-A4ワクチンとして臨床試験参加例に投与する。

②臨床試験実施

本試験は、MAGE-A4 抗原発現する頭頸部腫瘍を含む難治性悪性腫瘍例に対してコレステリル疎水化多糖類・MAGE-A4 蛋白複合体（CHP-MAGE-A4 ワクチン）の皮下反復投与をして、その安全性を評価し、POC（proof-of-concept）としてのMAGE-A4抗原特異的免疫反応を観察・評価する内外初のMAGE-A4 標的がんワクチンである。

対象例6例（最大12例）で、標準的治療難治性の頭頸部腫瘍を含むMAGE-A4 発現腫瘍で、CHP-MAGE-A4 複合体ワクチンを蛋白量として割り当て量100μgあるいは300μgを2週間隔で6回以上皮下注射する。有害事象をCTCAE 基準にてモニターしながら試験を進行させる。

③免疫モニタリング検体採取

ワクチン投与前

・腫瘍組織（手術時検体または生検検体を凍結保存・パラフィン固定保存）

・末梢血液（リンパ球保存、血清保存）

ワクチン投与中（原則2週毎に採取）

・末梢血液（リンパ球保存、血清保存）

ワクチン投与前

・腫瘍組織（生検検体を凍結保存・パラフィン固定保存）

・末梢血液（リンパ球保存、血清保存）

④MAGE-A4 抗体価測定 ELISA

モニタリング採血血清を用いてMAGE-A4蛋白、NY-ESO-1蛋白、SAGE蛋白に対するIgG抗体反応をELISAで測定し、陽性化とその血清タイターを記録する。

⑤腫瘍破壊モニタリング、抗原拡大現象 (antigen-spreading) 解析

ワクチン前、中、後の患者末梢血と組織検体 (生検あるいは手術検体、入手可能例) より CD8⁺T細胞と CD4⁺T細胞を分離し、MAGE-A4 抗原以外への免疫反応の拡大現象を解析するために、NY-ESO-1, SAGE, MAGE-A3, WT-1 の抗原ペプチドへの反応性をテトラマー、ELISPOTにてデータ解析をする。

また、前述した 血清の各種抗原に対する IgG抗体価により抗原拡大現象を解析する。

⑥Tリンパ球免疫モニタリング

ワクチン前、中、後の患者末梢血と組織検体 (生検あるいは手術検体、入手可能例) より CD8⁺T細胞と CD4⁺T細胞を分離する。PHA刺激した患者 CD4⁺T細胞に MAGE-A4 mRNA 導入または MAGE-A4 ペプチドパルスし *in vitro* 刺激として用いる。 *in vitro* 刺激した CD8⁺T細胞と CD4⁺T細胞を ELISPOT法、テトラマー法、CTL アッセイにて、MAGE-A4 蛋白特異的免疫反応性を検討する。

⑦腫瘍組織 *in situ* 免疫反応解析 (検体入手可能例に限る)

ワクチン前、後の腫瘍組織 (生検あるいは手術検体、入手可能例) にて病理組織学的検討を行う。免疫組織染色パネル作成して抗体を用いて染色パターン観察と解析を行う。

・H&E染色にて組織浸潤細胞の有無・程度を観察する。

・リンパ球マーカー ; CD3, CD4, CD25, CD8, FoxP3

・がん幹細胞マーカー ; CD24, CD44, CD133,
・免疫標的マーカー ; HLA-class I, MAGE 抗原 (57B)

⑧腫瘍組織浸潤細胞生物活性解析 (検体入手可能例に限る)

ワクチン前、中、後の組織検体 (生検あるいは手術検体、入手可能例) よりリンパ球を分離し、MAGE-A4 抗原刺激系、非刺激系に分け、培養する。サイトカイン産生プロフィールを各サイトカイン (IFN γ , IL-2, IL-10, IL-4, IL-17, TNF α など) を ELISA, ELISPOT にて解析する。MAGE-A4 刺激系において、テトラマー陽性細胞と CD45RA, CD45RO, CCR7, CD62L との発現により、Tリンパ球の機能解析を行う。

4. 研究成果

新規抗原デリバリーシステムである疎水化多糖類プルランと癌抗原 MAGE-A4 組換え蛋白

の複合体をワクチンとするがんワクチン臨床試験「MAGE-A4 抗原を発現する難治性悪性腫瘍に対する CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床研究」の実施症例の免疫モニタリング解析を実施した。

頭頸部腫瘍を含む 25 例に対してワクチン投与 (症例毎に 1 回投与量を 100 μ g 群、300 μ g に振分け) を行い、16 例において 6 回以上の反復投与を完了し、ワクチンの安全性の評価が可能であった。当初計画より症例数の拡大を行った。これら被験者より免疫モニタリング検体を採取し、リンパ球、血清の保存を行った。

MAGE-A4 抗体価測定系での ELISA 評価については、測定の信頼性を確認するために、陽性、陰性コントロールを使用した測定を実施し、カット・オフ値を設定した。これを用いた MAGE-A4 蛋白に対する IgG 抗体反応について解析を行った。解析例中ワクチン前の抗体陽性は 3 例にみられ、自然免疫反応がみられることが判明した。その内、ワクチン投与に伴い反応が増強するものが 1 例、陰性例 4 例では 2 例が陽性化した。また、投与量は 300 μ g が 100 μ g に較べて抗体反応陽性例が多かった。これらより、本ワクチンは MAGE-A4 抗原特異的免疫反応が約半数に誘導されることが判明した。さらに、MAGE-A4 以外に NY-ESO-1 抗原に対する抗体価が上昇する例がみられ、抗原拡大現象が存在することが観察された。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 影山愼一、治療用がんワクチン開発のための FDA からのガイダンス、腫瘍内科、査読無、8 巻、2011、167-171
- ② 影山愼一、CHP がん蛋白ワクチン、腫瘍内科、査読無、8 巻、2011、446-451
- ③ Ohtake S, Miyawaki S, Kiyoi H, Miyazaki Y, Okumura H, Matsuda S, Nagai T, Kishimoto Y, Okada M, Takahashi M, Handa H, Takeuchi J, Kageyama S, Asou N, Yagasaki F, Maeda Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Randomized trial of response-oriented individualized versus fixed-schedule induction chemotherapy with idarubicin and cytarabine in adult acute myeloid leukemia: the JALSG AML95 study, *Int J Hematol*, 査読有, 91, 2010, 276-283
- ④ Antibody responses against NY-ESO-1 and HER2 antigens in patients

vaccinated with combinations of cholesteryl pullulan (CHP)-NY-ESO-1 and CHP-HER2 with OK-432, Aoki M, Ueda S, Nishikawa H, Kitano S, Hirayama M, Ikeda H, Toyoda H, Tanaka K, Kanai M, Takabayashi A, Imai H, Shiraishi T, Sato E, Wada H, Nakayama E, Takei Y, Katayama N, Shiku H, Kageyama S, Vaccine, 査読有, 27, 2009, 6854-6861

アソシエイト

研究者番号：80293778

〔学会発表〕(計6件)

- ① 影山慎一、疎水化多糖・タンパクがんワクチン TR からのレッスン、第 49 回日本癌治療学会学術総会、平成 23 年 10 月 28 日、名古屋市
- ② 影山慎一、CHP-抗原蛋白のがんワクチン橋渡し研究、第 14 回日本がん免疫学会総会、平成 23 年 7 月 22 日、熊本市
- ③ 影山慎一 他、MAGE-A4 抗原を発現する難治性悪性腫瘍に対する CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験 (第 I + II 相試験)、第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9 月 24 日、大阪市
- ④ 影山慎一 他、MAGE-A4 抗原を発現する非小細胞性肺癌細胞株における MAGE-A4 発現の検討、第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9 月 24 日、大阪市
- ⑤ 影山慎一、CHP-抗原がんワクチンのトランスレーショナルリサーチを通じた得られた成果と課題、第 13 回日本がん免疫学会総会、平成 22 年 6 月 24 日、北九州市
- ⑥ 影山慎一 他、OK-432 を用いた CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチンにより誘導された CD4+T 細胞の解析、第 68 回日本癌学会学術総会、平成 21 年 10 月 1 日、横浜市

〔図書〕(計1件)

- ① 影山慎一、シーエムシー出版、がん免疫療法—実用化へのチャレンジ、2010、250 ページ(第 22 章分担執筆)

〔その他〕

ホームページ等

- ① <http://www.shikuken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 慎一 (KAGEYAMA SHINICHI)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80194695

(2) 研究分担者

湯田 厚司 (YUTA ATSUSHI)
三重大学・大学院医学系研究科・リサーチ