

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390331

研究課題名(和文) 膵癌に対する2方向性ペプチドワクチン療法を応用した新規治療戦略

研究課題名(英文) The new strategy applied with bidirectional peptide vaccine therapy for pancreatic cancer.

研究代表者

山上 裕機 (YAMAUE, HIROKI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円、(間接経費) 3,480,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-A*0201を有する膵癌患者に対するVEGFR1・VEGFR2・KIF20Aを標的分子としたカクテルワクチンが臨床応用可能な段階となり、今後新規標的分子となるoncoantigenであるMUC-16とmesothelinのエピトープペプチドを同定・作成し、生化学的な安定性などを確認し、第Ⅰ相臨床試験を開始できた。

膵癌に対するペプチドワクチン療法を市民公開講座などで広報し、多くの膵癌手術患者が集まった。これにより新たな膵癌手術式の開発や術後合併症対策の臨床研究も進み、臨床成績が向上し、結果として術後ペプチドワクチン併用補助療法への移行が良好となった。

研究成果の概要(英文)：1. We apply cocktail vaccine for pancreatic cancer patient who is positive for HLA-A*0201 which target on VEGFR1/VEGFR2/KIF20A in a clinical setting. Next stage, we will identify and produce a new target molecular target, oncoantigen; epitope peptide of MUC-16, mesothelin, ensure the safety and stability, and have started Phase I study.

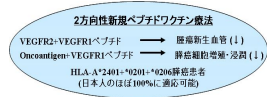
2. As the applicance of peptide vaccine therapy with Gemcitabine based adjuvant chemotherapy, many patients presented and apply for other clinical study, new procedure and postoperative management has been established. As a result, the incidence of postoperative complication has been decreased, and the time between operation and adjuvant chemotherapy was gradually shortened.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌治療 ペプチド ワクチン 補助化学療法

1. 研究開始当初の背景



膵癌の腫瘍新生血管と同時に膵癌細胞自身も抑制する**2方向性**

ペプチドワクチン療法を HLA-A*2402 患者のみならず A*0201, A*0206 患者に対応するペプチドを新規開発することで、ほぼ 100% の症例が適応となり、難治である膵癌治療に光明をもたらす可能性が高い。すなわち、全米総合がん情報ネットワーク(NCCN)による膵癌ガイドラインでは、外科的切除が長期生存を得るための唯一の治療法であるとされている。しかし、膵癌切除症例の平均生存期間は 12~20 ヶ月、5 年生存率は 10~20%と、手術のみでは完治が難しいのが現状である。したがって、膵癌に対する新規治療法の開発、**とくに臨床応用可能な治療法を独自に考案し国際発信できるか否か**が、日本の医療従事者にいま問われている。われわれは日本発の新規ペプチドワクチン療法を臨床試験まで発展させてきた。**このペプチドワクチン療法を臨床応用するためにわれわれはつぎのような戦略で研究を遂行していきたい。**

2. 研究の目的

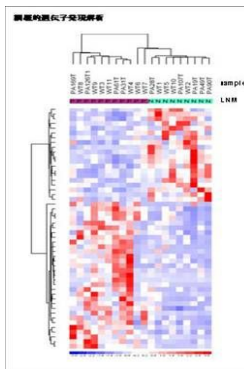
平成 19 年度科学研究費基盤 B 研究助成 (課題番号 1939034: 消化器癌微小環境理論に立脚した新規免疫・ウイルス治療の開発) により、膵癌に対する VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2)由来ペプチドによる腫瘍新生血管を標的とした新規免疫療法を和歌山県立医科大学外科学第 2 講座主導の第 I 相臨床試験として世界に先駆けて展開した(Cancer Sci, 2010)。さらに、大規模臨床治験として、全国 25 施設の参加により第 II/III 相臨床治験を開始した(主任研究者; 山上裕機)。しかし、この研究で用いたペプチドは日本人をはじめとするアジア系民族の約 60%に陽性である HLA-A*2402 のみを認識するもので、**HLA-A*0201・A*0206 など約 40%の症例には適応できなかった。本研究ではほぼ 100%の症例に適応可能なペプチド療法を提唱する。**さらに、VEGFR1 も新生血管増生に強く関与し免疫療法のように標的であることがわかってきた(Nature 2009, Nature Cell Biol 2010)。膵癌細胞自身は VEGF シグナル、とくに VEGFR1 を使って EMT (Epithelial to mesenchymal transition)が生じ増殖・浸潤することが報告されており(Cancer Res 2006, Cancer Res 2007)、**VEGFR2 と R1 のふたつのペプチドを同時に用いることで、腫瘍新生血管をより強く抑制するのみならず膵癌細胞自身の VEGF 増殖シグナルを抑制できると考えた。**

われわれは K-ras gene の点突然変異が新しい免疫療法に応用できることを報告し(Br J Cancer; 2003)、抗癌剤耐性遺伝子を同定してきたが(Pancreas 2010)。しかし、膵癌発生機構を解明する一部の遺伝子群を解析した

にすぎず、膵癌の増殖・浸潤・転移に必須分子(Oncoantigen)を**網羅的遺伝子解析**で同定し、その Oncoantigen を機能抑制することが膵癌治療に繋がることを提唱したい。すなわち、膵癌の転移・浸潤に強く関与する遺伝子を同定するために、**一部の遺伝子を解析するのみではなく、新しい手法を用いて網羅的・包括的にゲノム 1 次構造異常を解析するとともに発現プロファイリングを同時に解明する必要があった(平成 19・20 年度萌芽研究: 課題番号 19659346)。**すなわち、マイクロアレイ技術による網羅的遺伝子発現プロファイリングを用いて **DNA 1 次構造異常 (SNPs アレイ解析)**および**遺伝子発現解析**を同時に行うことで新たな膵癌特異的な遺伝子変異を明らかにし(左図)、その遺伝子異常から膵癌リンパ節転移予測遺伝子 **MUC-17** を新たに同定した(Cancer Sci 2010, Pancreas 2010)。また、**MUC-17 遺伝子産物由来ペプチドによる細胞傷害性 T 細胞誘導を応用した免疫療法は膵癌治療法を画期的に発展させる可能性があることを基礎研究で明らかにしてきた(平成 21・22 年度挑戦的萌芽研究: 課題番号 21659325)。**さらに、その後の予備的研究で膵癌浸潤部の網羅的遺伝子検索結果から **MUC16 遺伝子と Mesothelin 遺伝子の相互作用**が膵癌の浸潤に強く関与する機能遺伝子(Oncoantigen)であることを明らかにしつつある。すなわち、**われわれが独自に同定した膵癌の増殖・浸潤に必要な機能分子で、かつ強い免疫原性を有する Oncoantigen である MUC17, MUC16 および Mesothelin 遺伝子由来ペプチドによる新規免疫療法を臨床応用することで膵癌の治療成績が画期的に向上することが期待できる。**

3. 研究の方法

いままで多くの免疫療法に関する Translational research が行われてきたが、**いずれも質の高い臨床試験までには至っていない。**その理由として、**1. 抗腫瘍効果を発揮する抗原(Oncoantigen および腫瘍新生血管特異的抗原)が発見されていなかったこと、2. 臨床試験のデザイン計画・実施が十分でなかったこと**が挙げられる。われわれは以下の研究計画で述べる抗腫瘍効果を発揮するペプチドの同定・腫瘍新生血管に特異的な内皮増殖因子レセプター抗原ペプチドの同定、そ



の機能解析を遂行するに十分な技術と経験を持っている。また、研究を完遂できる人材・組織の準備ができています。

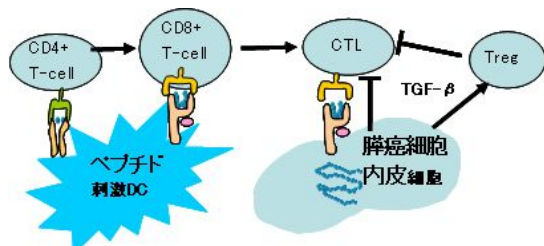
以下では、HLA-A*2402 結合性 VEGFR1 ペプチドの同定、HLA-A*0201, A*0206 結合性 VEGFR1, R2 ペプチドの同定、

網羅的遺伝子解析による膵癌転移・浸潤を規定する Oncoantigen 由来ペプチドの同定、十分に練られた試験デザインによる第 I・II 相臨床試験の方法について述べる。

1. VEGFR1 ペプチドの同定: VEGFR1 タンパクのアミノ酸配列から HLA-A*2402 拘束性エピトープペプチド (9 mer) をコンピューター解析により 10 種類のペプチドを作成する (HLA 結合モチーフ: 2nd portion; tryptophan, tyrosine, 9 th; leucine, tryptophan, isoleucine, methionine)。HLA への親和性解析は以前よりわれわれが報告している HLA-Binding assay で行う (*Int J Cancer* 1999, *Cancer Res* 2001, *Cancer Res* 2005)。

(1) 健常人末梢血由来細胞傷害性 T 細胞の誘導

末梢血単核球 (PBMC) より樹状細胞 (dendritic cell; DC) を誘導し、ペプチド刺激後の DC の表面マーカー CD80, CD83, CD86, MHC-class I, class II および CCR7, Toll-like receptor (TLR) 2, 4 の発現確認を flow cytometry で検討し、VEGFR1 ペプチドの DC 活性化能を検討する。健常ヒト自己 PBMC から CTL を誘導し、その機能解析を行う (下図)。



(1) CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell: MACS による positive selection

(2) CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell を responder として peptide-pulsed

DC を stimulator として 20:1 で *in vitro* sensitization

(3) CTL の killing mechanism を詳細に解析可能である。

CTL: cytotoxic T lymphocyte, 細胞傷害性 T リンパ球

Treg: regulatory T cell, 制御性 T 細胞
DC: dendritic cell, 樹状細胞

(2) IFN- release assay, intracellular cytokine production assay; 誘導した CTL を VEGFR1 cell lines と non-producing cell lines, VEGFR1-RNA transfected T1SI (autologous immortalized B cell) を対象とし IFN- release assay (ELISA), intracellular cytokine production assay (flow cytometry) および細胞傷害性試験 (4 時間 ⁵¹Cr-release assay: CRA) を行い、VEGFR1 特異的応答を解析する。CRA においては抗 CD4 抗体, 抗 CD8 抗体, 抗 class I 抗体を用いた antibody blocking assay にて MHC 拘束性および CTL の functional phenotype を解析する。

2. 網羅的遺伝子解析から Oncoantigen を同定する;

多くの網羅的遺伝子解析が行われてきたが、**真に膵癌患者の予後を規定する独立因子として抽出された遺伝子は少ない。**われわれは網羅的遺伝子解析から膵癌患者の生命予後に最も関連するリンパ節転移規定因子を同定することに成功した (平成 19・20 年萌芽研究, *Cancer Sci* 2010)。この実験手技と同様に、抽出した RNA から **RNA マイクロアレイ** **アッセイ** (Affymetrix 社) を行う。逆転写酵素・poly-T プライマーを用いて cDNA 合成を行う。**GeneChip Human U133 plus 2.0 array (Affymetrix 社)** に注入し 17 時間

hybridization を行い、GeneChip Operating Software (GCOS) により解析する。リンパ節転移規定遺伝子である *MUC-17* の臨床的意義を和歌山県立医科大学外科学第 2 講座で切除した **255 例の膵癌摘出標本で解析**する。下図に preliminary data として 57 例の膵癌における *MUC-17* 発現と生存期間の関係を示すが、*MUC-17* が Oncoantigen として有用である可能性が高い。

さらに、*MUC-17* 遺伝子の膵癌細胞の転移・浸潤に対する生物活性を *MUC-17* 陰性膵癌細胞株に遺伝子導入する実験で検証する。すなわち、**リンパ節転移に関する機能遺伝子を網羅的解析で明らかにした後に、ペプチド療法でリンパ節転移を抑制するという新しい治療原理を本研究により提案するものである。**

ついで、膵癌浸潤に關与する遺伝子の同定について、同一症例において浸潤部と上皮内癌 (CIS) を認める膵癌凍結組織 20 例を対象に、**Microdissection により膵癌細胞のみを回収し RNA を抽出する。** GeneChip Human U133 plus 2.0 array を用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。今回われわれは、**同一個体から浸潤癌と上皮内癌を別個にマイクロダイセクションし、マイクロアレイデータを比較する。** この方法は多大な労力を必要とするが、**精度の高い画期的なもので、** 現在までに膵癌 5 例の網羅的遺伝子発現解析が終了しており (廣野誠子)、5 例全てで上皮内癌に比べ浸潤癌で最も高発現を認めた *MUC16* やそのリガンドである *Mesothelin* などの **新規膵癌ペプチド療法に有効性の高い遺伝子を同定** しつつあるので、平成 23 年度はこれらの遺伝子群が真に浸潤部で高発現しているか否か、あと 15 例の膵癌症例で明らかにする。**1. HLA-A*0201, A*0206 結合ペプチドの同定:** VEGFR1,

VEGFR2, Oncoantigen (*MUC-16, MUC-17, Mesothelin*) タンパクのアミノ酸配列から HLA-A*0201, A*0206 拘束性エピトープペプチド (9 mer) をマッピングする。なお、この段階で次世代の研究者である大学院生・後期研修医も研究に参加させ、医学研究者マインドを醸成する。さらに、共同研究者である Dr. J Primus (Vanderbilt 大学免疫病理学教授) が樹立した HLA-A*2 transgenic mouse を用いて (*Cancer Res* 2001, *Cancer Res* 2005)、ヒト膵癌細胞株 (CIPT1, BxPC3, MiaPaCa2, AsPC1) を膵に移植するこ

とで同所移植膵癌モデルに対するペプチド刺激 DC を用いた免疫療法の抗腫瘍効果を検討する。

2. Oncoantigen の膵癌組織における発現:

平成 23 年度で解析した Oncoantigen 遺伝子 (*MUC-16*, *Mesothelin*) の膵癌における生物学的活性を明らかにする目的で、病理学的免疫染色解析を膵癌切除症例に対し施行する。現在までに、*MUC16* および *Mesothelin* は膵癌浸潤部に有意に高発現し、かつ同じ膵癌細胞に同時に発現していることからレセプター・リガンドの結合により autocrine 的に浸潤に関与することが示唆されている (*Shimizu et al. Ann Surg*, submitted)。平成 24 年度はこの preliminary な成績を当科で切除した 25 例の膵癌組織で確認し、*MUC-16*, *Mesothelin* が膵癌浸潤規定遺伝子であることを明らかにする。

3. VEGFR1 ペプチドおよび Oncoantigen ペプチドの第 I 相臨床試験

本臨床試験は、当科で独自に養成した CRC 2 名のサポートで行う。第 I 相臨床試験では VEGFR1, *MUC-17*, *MUC-16*, *Mesothelin* ペプチドをカクテル化して投与する (2 方向性ペプチド療法; **Dual channel peptide vaccine therapy**)。Primary endpoint は安全性と第 II 相臨床試験への推奨投与量の決定である。しかし、ペプチド療法は副作用がほとんどないので surrogate marker である免疫応答で推奨投与量が決定されるので (*Cancer Sci* 2010)、投与量はそれぞれ 0.5mg, 1mg, 2mg で 1 コホートを 6 例ずつとして Gemcitabine との併用を行う。Primary endpoint は安全性、臨床検査値異常変動を含むすべての有害事象の検証とし、secondary endpoints として CTL などの免疫反応、腫瘍縮小効果、1・2 年生存率、生存期間中央値、有害事象を検証する。計 18 例の症例登録であるので、和歌山医大のみで 1 年間で完遂可能である。そのためすべて当科でデータマネージメントする予定である。

4. 研究成果

HLA-A*0201 を有する膵癌患者に対する VEGFR1・VEGFR2・KIF20A を標的分子としたカクテルワクチンが臨床応用可能な段階となり、今後新規標的分子となる oncoantigen である *MUC-16* と *mesothelin* のエピートペプチドを同定・作成し、生化学的な安定性などを確認し、第 I 相臨床試験を開始できた。

膵癌に対するペプチドワクチン療法を市民公開講座などで広報し、多くの膵癌手術患者が集まった。これにより新たな膵癌手術術式の開発や術後合併症対策の臨床研究も進み、臨床成績が向上し、結果として術後ペプチドワクチン併用補助療法への移行が良好となった。

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 8 件)

Yamaue H, Miyazawa M, Tani M, et al. Phase II clinical study of alternate-day oral therapy with S-1 as first-line chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読有 2014;73(1):97-102.

Kawai M, Yamaue H, Tani M, et al. Pylorus-resecting pancreaticoduodenectomy offers long-term outcomes similar to those of pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy: results of a prospective study. *World J Surg*. 査読有 2014;38(6):1476-83.

Hirono S, Yamaue H, Tani M, et al. Indication for the use of an interposed graft during portal vein and/or superior mesenteric vein reconstruction in pancreatic resection based on perioperative outcomes. *Langenbecks Arch Surg*. 査読有 2014;399(4):461-71.

Okada K, Yamaue H, Kawai M, et al. Isolated Roux-en-Y anastomosis of the pancreatic stump in a duct-to-mucosa fashion in patients with distal pancreatectomy with en-bloc celiac axis resection. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 査読有 2014;21(3):193-8.

Kawai M, Yamaue H, Tani M, et al. Stump closure of a thick pancreas using stapler closure increases pancreatic fistula after distal pancreatectomy. *Am J Surg*. 査読有 2013;206(3):352-9.

Okada K, Yamaue H, Kawai M, et al. Surgical strategy for patients with pancreatic body/tail carcinoma: who should undergo distal pancreatectomy with en-bloc celiac axis resection? *Surgery*. 査読有 2013;153(3):365-72.

Yamaue H, Tani M, Kawai M, et al. Pancreatic dissection in the procedure of pancreaticoduodenectomy (with videos). *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 査読有 19;2012:95-99

Hirono S, Yamaue H, Tani M, et al. Identification of the lymphatic drainage pathways from the pancreatic head guided by indocyanine green fluorescence imaging during pancreaticoduodenectomy. *Dig Surg*. 査読有 2012;29(2):132-9.

〔学会発表〕(計8件)

山上裕機 : Distal pancreatectomy with celiac axis resection (DP-CAR) for borderline. resectable pancreatic body cancer 11th International Hepato-Pancreato-Biliary Association 2014.3, Degu, Korea

山上裕機 : Phase II/III clinical trial with VEGFR2-epitope peptide and gemcitabine for patients with locally advanced, metastatic, or unresectable pancreatic cancer. Pegasus-PC study. 2013 Gastrointestinal Cancers Symposium. 2013.2, San Francisco, USA

山上裕機 : New surgical strategy for patients with pancreatic body/tail carcinoma -the impact of distal pancreatectomy with en-bloc celiac axis resection- Americas Hepato-Pancreato-Biliary Association AHPBA Annual Meeting 2013.2, Miami, USA

山上裕機 : How to accomplish the prospective study in HBP surgery and write the scientific paper? 4th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association A-PHPBA 2013, 2013.3, Shanghai, China

山上裕機 : Researches in HBP surgery. 4th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association A-PHPBA 2013, 2013.3, Shanghai, China

山上裕機 : Venous or Arterial Resection for Pancreatic Body Cancer? Is It Worthwhile? The 36th Congress of The Korean Association of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery 2012.4, Seoul, Korea

山上裕機 : A multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blinded trial VEGFR2-epitope peptide and gemcitabine for patients with locally advanced, metastatic, or unresectable pancreatic cancer: PEGASUS-PC study. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会 2012.7、大阪

山上裕機 : Borderline resectable 膵がんに対する治療方針 外科治療 vs 化学療法 第50回日本癌治療学会 2012.10、横浜

山上裕機 : Borderline resectable 膵がんに対する治療方針 外科治療 vs 化学療法 第50回日本癌治療学会 2012.10、横浜

〔図書〕(計4件)

宮澤基樹 : 第4のがん治療法への期待第1集 市民のためのがんペプチドワクチンの会編 2012, 136-149 旬報社

谷 眞至 : 癌の臨床 2012, 329-332 篠原出版新社

谷 眞至 : 癌と化学療法、2012, 364-367 癌と化学療法社

山上裕機 :

膵・胆道癌 FRONTIER4、2012, 59-60
メディカルレビュー社

〔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://www.wakayama-med-2ndsurg.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 20191190

(2) 研究分担者

岩橋 誠 (IWAHASHI MAKOTO)

和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号 : 70244738

谷 眞至 (TANI MASAJI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 60236677

中森 幹人 (NAKAMORI MIKIHITO)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 10322372

川井 学 (KAWAI MANABU)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 40398459

廣野 誠子 (HIRONO SEIKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 60468288

宮澤 基樹 (MIYAZAWA MOTOKI)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号 : 90549734

(3) 連携研究者 なし