

## 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：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501292

研究課題名(和文) マルチペプチド混合がんワクチンの開発基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for the development of multi-peptide cocktail vaccines for cancer

研究代表者

山田 亮 (YAMADA, Akira)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究者番号：50158177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：テーラーメイドペプチドワクチン療法は一般医療へ移行するには多くの課題があり、テーラーメイドワクチンと同等以上の臨床効果を有し、かつ事前の特殊検査を必要としない非テーラーメイド型のマルチペプチド混合ワクチンの開発が望まれている。そこで、前立腺がん患者の血中IgGと高頻度に反応し、かつ細胞傷害性T細胞誘導能の高いペプチド20種(KRM-20)、および消化管がんについては10種(KRM-10)からなるペプチドカクテルワクチンを開発した。さらに別資金で実施した臨床試験患者検体を用いて免疫学的解析を行い、免疫学的最少有効量が決定された。

研究成果の概要(英文)：Personalized peptide vaccine therapy must overcome several hurdles before being used as a general treatment for cancer. To this end, non-personalized multi-peptide cocktail vaccines that exhibit similar clinical effects without requiring time-consuming laboratory tests will be needed. In the present study, we have developed two new cocktail vaccines consisting of 20 peptides (KRM-20) and 10 peptides (KRM-10) for the treatment of prostate cancer and gastrointestinal cancers, respectively, by selecting the reactivity levels of their plasma IgG antibodies and cytotoxic T-lymphocyte-inducing activities. In addition, immunological analyses of blood samples of clinical trials suggested the immunological minimum effective doses.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍免疫学

キーワード：ワクチン療法

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは細胞傷害性T細胞(CTL)の認識するがん抗原由来のペプチド分子を標的としたペプチドワクチン療法の開発を行っており、現在までに200個以上のがん抗原ペプチドの同定およびそれらを標的としたワクチン療法の臨床試験を実施中である。がん細胞の特質にのみ注目し、がん細胞に選択的かつ高発現するがん抗原ペプチドを選定して用いる従来型のペプチドワクチン療法では臨床効果を得るのが難しいことから、申請者らは患者側の免疫記憶にも対応したペプチドワクチン療法、すなわちテラーメイドがんペプチドワクチン療法を提唱してきた。具体的には、患者のワクチン候補ペプチドに対する免疫反応性を事前に調べ、反応性の認められたペプチド数個を患者に同時に投与するというものであり、その安全性ならびにペプチド特異的免疫誘導能が確認されている。さらに、テラーメイドがんペプチドワクチン療法では、従来型のがんペプチドワクチンに比し、各段に高い臨床効果が得られるようになった。多くのがん種において抗がん剤との併用により、抗がん剤単独療法に比べ1.5ないし2倍の生存期間延長効果が認められている。

## 2. 研究の目的

上述のように個々の患者の免疫記憶に対応したペプチドを用いるテラーメイドペプチドワクチン療法では、従来型のがんペプチドワクチンに比し、各段に高い臨床効果が得られるようになった。しかしながら、個々の患者の多様性に対応するためには多くの種類のワクチン候補ペプチドを事前に用意しなければならず、また、HLA検査や免疫検査などの特殊検査が必要であり、一般医療へ移行するには多くの課題がある。そこで、テラーメイドワクチンと同等以上の臨床効果を有し、かつ事前の特殊検査を必要としない非テラーメイド型のマルチペプチド混

合ワクチンの開発を目的に本研究を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) **がん患者および健常人血清中抗ペプチドIgG抗体の網羅的解析**：過去のがんワクチン臨床試験に参加した患者のワクチン投与前の血液検体および健常人血清を用いて、ワクチン候補ペプチドパネルに対する血中IgG抗体の反応性をマイクロサスペンションアレイを用いて解析する。

(2) **ワクチン候補ペプチドパネルに対するCTL反応の網羅的解析**：過去のがんワクチン臨床試験に参加した患者のワクチン投与前後の血液検体を用いて、ワクチン候補ペプチドパネルに対するCTLの反応性をインターフェロンガンマ産生を指標としてELISPOT法により検討する。

(3) **がん患者の免疫反応性に基づくワクチン候補ペプチドの絞り込み**：上記解析結果に基づき、患者血中のIgGと高頻度に反応し、かつCTL誘導能の高いペプチドを15種程度選択する。

(4) **混合ワクチンの製剤学的検討**：上記で絞り込んだペプチドについて、混合溶液とした場合の溶解性・溶解方法の検討を行うとともに、フロイント不完全アジュバント(Montanide ISA51VG, Seppic社製)と混合して作成したエマルジョン製剤の安定性についての検討を行う。また、エマルジョン中での各ペプチドの安定性についてはアルコール抽出後にHPLCで検討を行う。

(5) **マルチペプチド混合ワクチン臨床試験参加者の免疫学的解析**：他の研究資金(学内の自己資金)により実施されるマルチペプチド混合ワクチンの臨床試験に参加した患者の免疫学的解析を行う。免疫指標としては、抗ペプチドIgG抗体、ELISPOT法によるインターフェロンガン

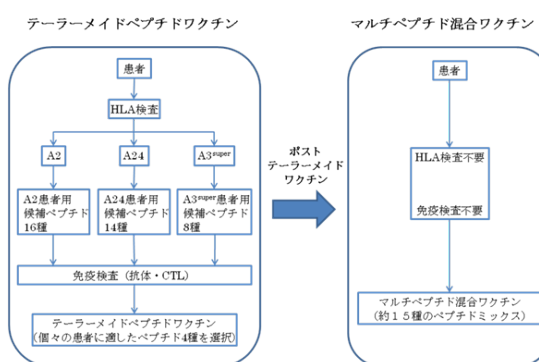
マ産生細胞数、テトラマー法を用いたペプチド特異的 CD8T 細胞数などを測定し、従来からのテラーメイドがんペプチドワクチンの結果と比較検討する。ポストテラーメイドがんペプチドワクチンの可能性について明らかにする。

#### (6) 予後因子としての各種遺伝子発現の

**探索：**がんワクチン療法では生命予後の延長効果が認められるにも関わらず、低分子の抗がん剤で一般的に認められるような腫瘍縮小効果は一部（2-3割程度）の症例で認められるのみである。したがって、現時点では全生存期間以外に臨床効果を評価可能なサロゲートマーカーは存在しておらず、新たなバイオマーカーの同定が求められている。TNF-アルファなどの炎症性サイトカインや TGF-アルファなどの発現ががん細胞の増殖を助ける環境を作り出していることが知られている。そこで、マルチペプチド混合ワクチン臨床試験参加者におけるこれらのサイトカインや急性期たんぱく、ミエロイド由来抑制細胞（MDSC）、制御 T 細胞（Treg）や免疫チェックポイント分子などの遺伝子発現を解析し、予後との相関解析を行うことにより、全生存期間に代わりうる新たなバイオマーカーを見出す。

#### 4. 研究成果

テラーメイドペプチドワクチン療法では、個々の患者の多様性に対応するためには多種類のワクチン候補ペプチドを事前に用意し、かつ HLA 検査や免疫検査などの特殊検査が必要であり、一般医療へ移行するには多くの課題がある。本研究ではテラーメイドワクチンと同等以上の臨床効果を有し、かつ事前の特殊検査を必要としない非テラーメイド型のマルチペプチド混合ワクチンの開発研究を行った。



#### (1) 研究の主な成果

**ワクチン候補ペプチドパネルに対する免疫反応の網羅的解析およびワクチンペプチドの決定：**がん患者の血液検体を用い、ペプチドパネルに対する血中 IgG 抗体および CTL 反応性を検討した。その結果、前立腺がん患者の血中 IgG と高頻度に反応し、かつ CTL 誘導能の高いペプチド 20 種（KRM-20）、および消化管がんについては 10 種（KRM-10）を決定した。

**混合ワクチンの製剤学的検討：**エマルジョン製剤は冷凍保存ができないことから、冷凍保存可能なペプチド混合溶液を 2 種作製し、フロイント不完全アジュバントと用事混合、エマルジョン製剤とすることとした。ペプチド混合溶液は -20℃ 冷凍保存下で 24 か月間安定であった。

**非臨床および臨床試験による安全性の検討（本研究費とは別資金で実施）：**カクテルワクチンの毒性について、ラットを用いて検討した。ラットに 4 週間並びに 26 週間、ヒトで投与予定の 100 倍量のカクテルワクチン製剤を反復投与した実験結果についてのレビューを行った。その結果、注射部位の軽度の炎症以外には毒性所見は認められなかった。以上より、ヒトでの臨床試験を開始することの妥当性が担保された。ラット反復投与毒性試験で安全性を確認したのちに、KRM-20 については去勢抵抗性前立腺がん患者 17 例を対象とした第Ⅰ相試験を医師主導治験として実施した。その結果、各ペプチドあたり 0.3 mg ~ 3 mg のいずれの用量においても重篤

な有害事象は認められず安全性が確認された。KRM-10 に関しては進行消化管がん患者 18 例を対象に第 相試験を実施し、同様にヒトに対する安全性が確認された。

**混合ワクチンの免疫学的解析：**ワクチン投与患者末梢血中のワクチンペプチドに対する IgG 及び CTL 反応増強はワクチン投与 4 週後から認められ、免疫学的最少有効量は各ペプチドあたり 1 mg であった。3 mg 投与では制御性 T 細胞の誘導が認められた。また、ミエロイド由来抑制性細胞 (MDSC) の誘導には用量依存性は認められなかった。以上の結果より、早期第 2 相試験は 1 mg を至適用量として実施することが推奨された。

**予後因子としての各種遺伝子発現の探索：**ペプチドワクチン投与患者の末梢血 T 細胞上の免疫チェックポイント分子の発現と予後との関連を調べた。その結果、非小細胞肺癌患者において、PD-1 陽性 T 細胞の増加が予後と相関することが明らかとなった。

**(2) 得られた成果の国内外における位置づけ：**欧米の研究グループによってもマルチペプチド混合ワクチンの開発が進められているが、汎 HLA 型に適応可能なものは本研究のものだけであり、極めてユニークかつ実用性に富んだものである。

**(3) 今後の展望：**KRM-20 の早期第 相ランダム化比較試験が去勢抵抗性前立腺がんを対象として多施設共同で実地中である。また、進行乳がんを対象とした第 相試験も予定されており、臨床応用への実用化に向けて研究が継続されている。

#### 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 23 件)

Noguchi N, Maruyama I, Yamada A. The influence of *Chlorella* and its hot water extract supplementation on quality of life in patients with breast cancer. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, in press.

[査読有]

Kawano K, Tsuda N, Matsueda S, 他 8 名 10 番目. Feasibility study of personalized peptide vaccination for recurrent ovarian cancer patients.

Immunopharmacol Immunotoxicol, in press. 2014. [査読有]

Sasada T, Yamada A, Noguchi M, Itoh K. Personalized Peptide Vaccine for Treatment of Advanced Cancer. Curr Med Chem. 2014 Feb 5. [Epub ahead of print] [査読有]

Noguchi M, Moriya F, Suekane S, 他 5 名 7 番目. A phase II trial of personalized peptide vaccination in castration-resistant prostate cancer patients: Prolongation of prostate-specific antigen doubling time. BMC Cancer. 2013 Dec 30;13:613. doi: 10.1186/1471-2407-13-613 [査読有]

Yutani S, Komatsu N, Matsueda S, 他 5 名 6 番目. Juzentaihoto Failed to Augment Antigen-Specific Immunity but Prevented Deterioration of Patients' Conditions in Advanced Pancreatic Cancer under Personalized Peptide Vaccine. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:981717. doi: 10.1155/2013/981717. Epub 2013 Jun 10. [査読有]

Matsueda S, Komatsu N, Kusumoto K, Koga S, Yamada A, 他 14 名 5 番目. Humoral immune responses to CTL epitope peptides from tumor-associated antigens are widely detectable in humans: a new biomarker for overall survival of patients with malignant diseases. Dev Comp Immunol. 2013;41(1):68-76. doi: 10.1016/j.dci.2013.04.004. Epub 2013 Apr 11. [査読有]

Yutani S, Komatsu N, Yoshitomi M, 他 8 名 9 番目. A phase II study of a personalized peptide vaccination for chemotherapy-resistant advanced pancreatic cancer patients. Oncol Rep. 2013 Sep;30(3):1094-100. doi: 10.3892/or.2013.2556. Epub 2013 Jun 20. [査読有]

Terasaki M, Murotani K, Narita Y, 他 5 名 6 番目. Controversies in Clinical Trials of Cancer Vaccines for Glioblastoma, J Vaccines Vaccin. 4:171, 2013. [査読有]

Takahashi R, Yoshitomi M, Yutani S, 他 5 名 6 番目. Current status of immunotherapy for the treatment of biliary tract cancer. Hum Vaccin Immunother. 2013 May;9(5):1069-72. doi: 10.4161/hv.23844. Epub 2013 Feb 1. [査読有]

Yamada A, Sasada T, Noguchi M, Itoh K. The next generation of peptide vaccines for advanced cancer. Cancer Sci. 2013;104(1):15-21. doi: 10.1111/cas.12050. [査読有]

Noguchi M, Moriya F, Suekane S, 他 6 名 8 番目. Phase II study of personalized peptide vaccination for castration-resistant prostate cancer patients who failed in docetaxel-based chemotherapy. Prostate. 2012 Jun 1;72(8):834-45. doi:

10.1002/pros.21485. Epub 2011 Sep 19. [査読有]

Komatsu N, Matsueda S, Tashiro K, 他 11 名 7 番目. Gene expression profiles in peripheral blood as a biomarker in cancer patients receiving peptide vaccination. *Cancer*. 2012 Jun 15;118(12):3208-21. doi:

10.1002/cncr.26636. Epub 2011 Nov 9. [査読有]

Yoshitomi M, Yutani S, Matsueda S, 他 7 名 7 番目. Personalized peptide vaccination for advanced biliary tract cancer: IL-6, nutritional status, and pre-existing antigen-specific immunity as possible biomarkers for patient prognosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3: 463-469, 2012. [査読有]

Terazaki Y, Yoshiyama K, Matsueda S, 他 12 名 10 番目. Immunological Evaluation of Personalized Peptide Vaccination in Refractory Small Cell Lung Cancer. *Cancer Sci*, 2012 Apr;103(4):638-44. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02202.x. Epub 2012 Feb 13.

Yoshiyama K, Terazaki Y, Matsueda S, 他 8 名 6 番目. Personalized peptide vaccination in patients with refractory non-small cell lung cancer, *Int J Oncol*, 2012 May;40(5):1492-500. doi: 10.3892/ijo.2012.1351. Epub 2012 Feb 1. [査読有]

Toyoshima T, Kumamaru W, Hayashida J, 他 6 名 7 番目. In vitro induction of specific CD8+ T lymphocytes by tumor-associated antigenic peptides in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2012 Sep 1;322(1):86-91. doi: 10.1016/j.canlet.2012.02.016. Epub 2012 Feb 22. [査読有]

Sasada T, Noguchi M, Yamada A, Itoh K. Personalized peptide vaccination: a novel immunotherapeutic approach for advanced cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Sep;8(9):1309-13. doi: 10.4161/hv.20988. Epub 2012 Aug 16. [査読有]

Noguchi M, Uemura H, Naito S, Akaza H, Yamada A, Itoh K. A phase I study of personalized peptide vaccination using 14 kinds of vaccine in combination with low-dose estramustine in HLA-A24-positive patients with castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. 2011 Apr;71(5):470-9. doi: 10.1002/pros.21261. Epub 2010 Sep 28. [査読有]

Yoshida K, Noguchi M, Mine T, 他 7 名 10 番目. Characteristics of severe adverse events after peptide vaccination for advanced cancer patients: analysis of 500 cases. *Oncol Report*. 2011 Jan; 25:57-62. [査読有]

Yamada A, Noguchi M, Komatsu N, 他 7 名 1 番目. Phase-I clinical study of a personalized peptide vaccination available for six different HLA (HLA-A2, -A3, -A11, -A24, -A31, and -A33)-positive patients with advanced

cancer. *Exp Ther Med*. 2011, 2: 109-117. [査読有]

②①Noguchi M, Mine T, Komatsu N, 他 17 名 9 番目. Assessment of immunological biomarkers in patients with advanced cancer treated by personalized peptide vaccination. *Cancer Biol Ther*, 2011 Jan, 10(12):1266-79. [査読有]

②②Terasaki M, Shibui S, Narita Y, 他 8 名 10 番目. Phase I trial of a personalized peptide vaccine for patients positive for human leukocyte antigen-A24 with recurrent or progressive glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*, 2011 Jan 20;29(3):337-44. doi: 10.1200/JCO.2010.29.7499. Epub 2010 Dec 13. [査読有]

②③Matsumoto K, Noguchi M, Satoh T, 他 7 名 7 番目. A phase I study of personalized peptide vaccination for advanced urothelial carcinoma patients who failed treatment with methotrexate, vinblastine, adriamycin and cisplatin. *BJU International*, 108:831-838, 2011 [査読有]

[学会発表](計 25 件)

野口正典 去勢抵抗性前立腺がんに対するペプチドワクチン療法 第 78 回日本泌尿器科学会東部総会 2013 年 10 月 17-19 日 新潟市

伊東恭悟 CTL エピトープワクチン療法 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 5 日 横浜市

和氣加容子 ペプチドワクチン投与非小細胞肺癌患者末梢血 T 細胞における PD-1 の発現 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 5 日 横浜市

山田亮 去勢抵抗性前立腺がん患者を対象とした 20 ペプチド混合ワクチンの第 1 相臨床試験 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 4 日 横浜市

Noguchi M. Phase I trial of a novel cancer vaccine consisting of 20 mixed peptides in patients with castration-resistant prostate cancer. The Congress of the Soci Internationale d'Urologie (SIU) 2013 年 9 月 8-12 日 Vancouver, Canada

野口正典 去勢抵抗性前立腺がんに対するペプチドワクチン療法 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術総会 2013 年 8 月 29-31 日 仙台市

山田亮 Phase II randomized study of personalized peptide vaccine for patients with early stages of castration-resistant prostate cancer. 第 17 回日本がん免疫学会総会 2013 年 7 月 3 日 宇部市

Akira Yamada Phase I trial of a novel cancer vaccine consisting of 20 mixed peptides in patients with castration-resistant prostate cancer. 11th CIMT Annual Meeting(CIMT) 2013 年

5月14-16日 マインツ・ドイツ  
笹田哲朗 テーラーメイドがんペプチド  
ワクチン進行がんに対する新規免疫療法  
第71回日本癌学会学術総会 2012年9月  
21日 札幌市  
山田亮 化学療法抵抗性進行膵がん患者  
に対するセカンドラインとしてのテーラ  
ーメイドペプチドワクチン療法 第71回  
日本癌学会学術総会 2012年9月21日  
札幌市  
山田亮 テーラーメイドがんペプチドワ  
クチンの現状 第16回日本がん免疫学会  
総会 2012年7月28日 札幌市  
M Noguchi Delayed PSA responses in  
personalized peptide vaccination for  
castration-resistant prostate cancer:  
Phase II study American Urological  
Association 2012 Meeting 2012年5月  
20日 Atlanta, USA  
Sasada T Identification of Predictive  
Biomarkers in Cancer Patients Receiving  
Personalized Peptide Vaccination.  
26th Annual Meeting of Society for  
Immunotherapy of Cancer 2011年11月4  
日 USA  
河野光一郎 再発卵巣：卵管がんにおける  
テーラーメイドがんペプチドワクチン療  
法第 相臨床試験；予後予測バイオマー  
カーの探索 第49回日本癌治療学会学術集  
会 2011年10月27日-29日 名古屋市  
伊東恭悟 テーラーメイドペプチドワク  
チン療法の現状と今後 第49回日本癌治  
療学会学術集会 2011年10月27日-29日  
名古屋市  
野口正典 去勢抵抗性前立腺がんに対す  
るペプチドワクチン療法の予後規定バイ  
オマーカー：中間解析 第49回日本癌治  
療学会学術集会 2011年10月29日 名古  
屋市  
末金茂高 分子標的治療時代における進  
行性腎癌に対するがんペプチドワクチン  
療法の可能性 第49回日本癌治療学会学  
術集会 2011年10月28日 名古屋市  
寺崎泰宏 標準治療抵抗性肺癌に対す  
るテーラーメイドペプチドワクチン療法第  
相臨床試験 第49回日本癌治療学会学  
術集会 2011年10月28日 名古屋市  
山田亮 前立腺癌に対するテーラーメイ  
ドがんペプチドワクチン臨床試験 第70  
回日本癌学会総会 2011年10月5日 名  
古屋市  
笹田哲朗 テーラーメイドがんペプチド  
ワクチン療法の予後予測に有用なバイオ  
マーカー 第70回日本癌学会総会 2011  
年10月4日 名古屋市

- ① Sasada T. Predictive Biomarker in  
Cancer Patients Receiving Personalized  
Peptide Vaccination 第70回日本癌学会  
総会 2011年10月3日-5日 名古屋市  
② Sasada T. Identification of Predictive

Biomarkers in Cancer Patients Receiving  
Personalized Peptide Vaccination 第15  
回日本がん免疫学会総会 2011年6月30  
日 大阪市

- ③ 山田亮 C型肝炎肝硬変からの発がん予  
防および肝がん術後再発予防ワクチンの  
開発 第15回日本がん免疫学会総会  
2011年6月30日 大阪市  
④ 吉富宗宏 進行胆道がんに対するテーラ  
ーメイドペプチドワクチン療法 第111回  
日本外科学会定期学術集会 2011年5月  
26日より5月28日（紙上開催） 東京都  
⑤ 末金茂高 標準治療抵抗性尿路上皮がん  
に対するテーラーメイドペプチドワクチ  
ン療法第 相試験 第32回癌免疫外科研  
究会 2011年5月20日 和歌山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：ペプチドカクテルワクチン

発明者：伊東恭悟、野口正典、笹田哲朗、  
由谷茂、山田亮、小松誠和、松枝智子、七  
條茂樹

権利者：久留米大学

種類：特許

番号：61/821348（米国仮出願）

出願年月日：2013.5.9

国内外の別：国外

名称：がんの検査用試薬及び検査方法

発明者：伊東恭悟、笹田哲朗、松枝智子、  
小松誠和、野口正典、山田亮、七條茂樹

権利者：久留米大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/065993

出願年月日：2012.6.22

国内外の別：国外

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/index.html>（久留米大学先端癌治療  
研究センター）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 亮（YAMADA AKIRA）

久留米大学・先端癌治療研究センター・教  
授

研究者番号：50158177