

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 7 月 22 日現在

機関番号：熊本大学

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：23659953

研究課題名（和文） 口腔癌における術後アジュバンドペプチドワクチン療法の確立

研究課題名（英文） Clinical trial of adjuvant peptide vaccine therapy for oral cancer

研究代表者

篠原 正徳 (SHINOHARA MASANORI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90117127

研究成果の概要（和文）：われわれの癌ペプチドワクチン療法は口腔癌の治療として有用と考えられた。5名の患者は術後に局所再発や転移をおこした（腹腔内播種1例、肺転移1例、頸部リンパ節転移2例、局所再発1例）。しかしながら、腹腔内播種症例を除いては病巣は切除され、癌ペプチドワクチン療法も継続されている。その結果、すべての症例において治療後の局所再発も転移も認めていない。

HLA-24(+)例においては、ELISPOT assay で URLC10-, CDCA1-, and KOC1-特異的細胞障害性リンパ球の反応がおのおの 88.2%, 82.4%, 52.9%で認められた。RLC10-, CDCA1-, and KOC1-特異的細胞障害性リンパ球の反応が見られた症例では臨床反応も良好であった。

以上より、癌ペプチドワクチン療法は有用であり、良好な免疫応答と抗腫瘍効果が認められる。この療法によってもたらされる免疫応答は頭頸部癌患者の予後を改善することができる

研究成果の概要（英文）：Our cancer vaccination therapy using these peptides was well tolerated for oral cancer. 5 patients showed a postoperative local recurrence and metastasis (peritoneal dissemination;1 case, lung metastasis;1 case , cervical lymph node metastasis; 2 cases and local recurrence; 1case). However, metastatic foci without peritoneal dissemination were removed and all cases are continued vaccination therapy using these peptides. In all of cases, recurrence and/or metastasis are not recognized after treatment.

In the HLA-24(+) group, ELISPOT assay indicated that the URLC10-, CDCA1-, and KOC1-specific CTL responses were observed after the vaccination in 88.2%, 82.4%, and 52.9%, of the HLA-24(+) group, respectively. The patients showing URLC10 and CDCA1 specific CTL responses revealed the better clinical response, respectively.

Conclusions: Vaccination using these peptides was well tolerated, and measurable immune responses and antitumor efficacy are observed. The immune response induced by this vaccination can make their prognosis better for head and neck cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、ペプチドワクチン、腫瘍拒絶抗原、免疫療法、アジュバンド療法

1. 研究開始当初の背景

がんワクチン療法は、1991年にBoon博士らが腫瘍特異抗原を発見 (Science) から始まる。1995年に悪性黒色腫に対するペプチドワクチン療法が開始され (Int. J. Cancer)、1998年には悪性黒色腫に対しての症例報告がなされ (Nature Med.) 樹状細胞との併用療法も開始されたが、有効な治療効果を得るには至らなかった。2004年のNature med. では、ペプチドワクチン療法の奏功率は数%であるが、体内で免疫応答は確実に惹起されているとの報告がなされた。そんな中で、2006年のASCOにて、肺がんで術後の維持療法としてワクチン療法を施行したところ、有意に再発を抑制できたとの報告がなされた。また、2006年のサンアントニオ国際乳がん学会では、乳がんの術後の維持療法としてワクチン療法を施行したところ再発を約半分に抑える効果を認めた、との報告がなされた。

これらの結果は、ペプチドワクチン療法の有効性を示唆している。そこで今回われわれは口腔癌に対するペプチドワクチン療法を臨床研究として施行することを計画している。

2. 研究の目的

本臨床研究は、口腔癌切除術施行後で非担癌状態と診断された患者に対し、口腔癌に高頻度に高発現する新規腫瘍抗原である URLC10、CDCA1 ならびに KOC1 由来の HLA-A24 (HLA-A*2402: 日本人の60%が所有) 拘束性エピトープペプチドを Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) と混和して患者の皮下に投与し、腫瘍特異的抗腫瘍効果を期待するペプチドワクチン療法の臨床研究である。

主要目的としては口腔癌切除術後の患者に対する術後アジュバントペプチドワクチン療法の安全性を検証することであり、副次的目的としては全生存期間 (OS)、実行可能性を評価することである。さらに、術後アジュバントとしてペプチドワクチンを投与することによって生じる免疫応答および臨床的有効性を評価することも目的としている。

3. 研究の方法

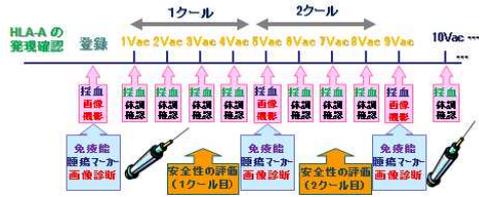
口腔癌で高頻度に高発現している新規腫瘍抗原 URLC10、IMP3 ならびに CDCA1 を標的とする術後アジュバントペプチドワクチン療法を行う。

対象：① 口腔癌患者で、その癌が根治的に切除 (R0) されたと考えられる患者。なお、術後アジュバント療法の開始は、原則として術後 8 週間以内に開始することとする。開始が 8 週間を超える場合には、その時点で画像診断上再発所見がないことを確認した上で、投与は可能とする。

実施方法：① 対象癌患者の選択；対象患者は、HLA-A*2402 を保有した、根治的に切除 (R0) された口腔癌患者。

② ペプチド及びアジュバントの投与量及び投与方法：合成した 3 種類の GMP グレードのペプチド各 1 mg を、不完全フロイントアジュバン (MONTANIDE*ISA51VG, SEPPIC, France) と混合し、エマルジョン化したものを、腋窩あるいは鼠径部付近の皮下に投与する。

③ ペプチドワクチンの投与スケジュール = 投与スケジュール =



ワクチン投与をペプチド投与総量として 3mg に固定する。1 コースで安全性の評価をする。安全性の評価で問題がなければ、同じ投与方法で、1年間繰り返し投与する。本臨床試験は、再発あるいは転移が生じた時点で終了となるが、ペプチドの継続投与について患者の強い希望があり、ペプチド投与の安全性が担保され、かつ、ペプチド投与が患者の不利益とならないと判定された場合は、責任医師の判断でペプチドの投与を継続することができるものとする。

④ペプチドワクチンを投与した口腔癌患者における免疫動態の解析：まず、ペプチドワクチン投与直前の免疫細胞の状態を確認する。その後は定期的にペプチドワクチン投与後の患者より採血を行い、免疫動態のモニタリングを行う。

検査内容：①ペプチド刺激による *ex vivo* CTL (細胞傷害性 T 細胞) の誘導；ペプチドワクチンを投与された患者の末梢血単核球をペプチドにて刺激し、IFN- γ 産生能を ELISPOT にて測定する。これによって、IFN- γ 産生細胞の変化や CTL 前駆細胞の変化を解析する。②Flowcytometry による HLA- β プチドに反応する CD8 陽性 T 細胞分画の変化を解析する。

⑤今回用いる術後アジュバントペプチドワクチンによる *in vivo* 抗腫瘍免疫誘導の検討：①口腔癌患者にペプチドワクチン療法を施行し、すべての患者におけるペプチドワクチン療法の効果を評価する。②すべてのペプチドワクチン投与患者における免疫誘導を解析し、ペプチド

ワクチンの最適な投与方法、投与量、投与スケジュールなどを決定し、術後アジュバントペプチドワクチン療法の確立をめざす。

⑥ 口腔癌におけるさらなる効果的なワクチン療法の開発をめざす：①腫瘍拒絶抗原を投与することによって口腔癌患者の体内で生じる免疫応答を解析することにより、より効果的に腫瘍を拒絶させることのできる工夫や再発予防のために免疫反応を高める有効な方法を検討する。

4. 研究成果：今回の臨床試験では以下のペプチドを使用した。URLC10：177-186 (RYCNLEGPPI)、CDCA1：56-64 (VY GIRLEHF)、KOC1 (IMP3)：508-516 (KTVNELQNL) の 3 種類を投与した。

①検索症例 (17 症例)：口腔、喉頭扁平上皮癌；13 症例、骨肉腫；2 症例、血管肉腫；1 症例、唾液腺癌；1 症例

②投与回数 6-36 回行った。

③特異的 CTL が誘導出来た症例：URLC10 特異的 CTL が誘導できた症例 (15/17 症例)、CDCA1 特異的 CTL が誘導できた症例 (14/17 症例)、IMP3 (KOC1) 特異的 CTL が誘導できた症例 (9/17 症例)

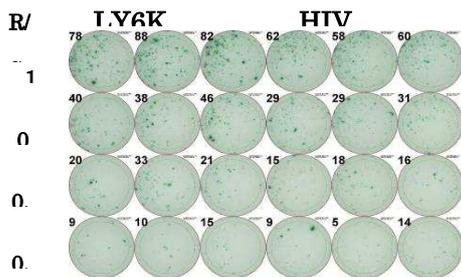
Patient	Age/Gender	Primary	pStage	Prior therapy	Frequency of administration	Recurrence (months-local)
1	58/M	Pharynx (pT1N0M0)	I	Chemo(CBDCA ¹), RT(70Gy), Operation(LT,ND)	26	-
2	78/F	Mandibular gingiva (pT2N0M0)	II	Operation	36	-
3	77/F	Mutinous Adenocarcinoma (pT4N0M0)	IV	Chemo(CBDCA ¹), RT(70Gy), Operation(LT,ND)	23	+ 12 months Peritoneal dissemination
4	64/M	Angiosarcoma (pT4N2bM0)	IV	Operation Chemo(Adriamycin ²)	33	+ 15 months Lung
5	19/M	Osteosarcoma (pT4N2bM0)	IV	Operation Chemo(Irromide ³), RT(70Gy)	28	-
6	40/M	Osteosarcoma (pT4N2bM0)	IV	Operation Chemo(Irromide ³), RT(70Gy)	23	+ 12 months Mandibular bone

Patient	Age/Gender	Primary	pStage	Prior therapy	Frequency of administration	Recurrence (months-local)
7	58/M	Tongue (pT2N1M0)	IV	Chemo(TS1), RT(30Gy), Operation(LT,ND)	20	-
8	49/F	Mandibular gingiva (pT2N0M0)	II	Operation	20	-
9	69/F	Tongue (pT2N1M0)	IV	Chemo(TS1), RT(30Gy), Operation(LT,ND)	18	-
10	56/F	Mandibular gingiva (pT4N2bM0)	IV	Operation(RND), Chemo(TS1), RA(30Gy), Operation	18	-
11	71/M	Tongue (pT4N2bM0)	IV	Chemo(TS1), RT(30Gy), Operation(RND)	15	-
12	57/M	Buccal mucosa (pT4N2bM0)	IV	Chemo(TS1), RT(30Gy)	15	-

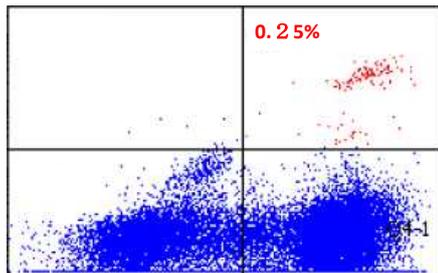
Characteristics of enrolled patients for Adjuvant peptide vaccine therapy						
Patient	Age/ Gender	Primary	pStage	Prior therapy	Frequency of administratio	Recurrence (months-local)
13	59/M	Tongue (pT2N2bM0)	IV	Chemo(CBDCA), RT(70Gy), Operation(Lt.ND)	12	-
14	72/F	Mandibular Gingiva (pT2N0M0)	II	Operation, Chemo(TS-1*), RT(60Gy)	12	-
15	68/F	Oral multiple cancer (pT2N0M0)	II	Operation, Chemo(TS-1*), RT(30Gy)	9	+ 2 months Cervical lymph node
16	54/M	Oral multiple cancer (pT3N0M0)	III	Operation, Chemo(TS-1*,TXT), RT(30Gy)	8	+ 1.5 months Upper lip
17	65/M	Buccal carcinoma (pT4N2bM0)	IV	Operation, Chemo(TS-1*,TXT), RT(70Gy)	6	-

④ワクチン投与局所に 15 症例で Grade1 の搔痒感・発赤・硬結を認めた。Grade 3 以上の重篤な全身有害事象は認めなかった。
 ⑤Flowcytometry による HLA-ペプチドに反応する CD8 陽性 T 細胞中での CTL の頻度は数%から最高 25%であり、全症例で CTL が認められた。CTL 反応「+++」である時期から、Dextramer 陽性細胞が検出された。一方 CTL 反応「-」である時期では陽性細胞は検出されず、CTL 反応と相関する結果が得られた。
 ⑥再発は唾液腺癌で腹膜播種、血管肉腫で肺転移、骨肉腫の 1 例で局所再発がみられた。これらすべては 1 年のペプチド治療終了後に発症していた。その後、ペプチド治療を再開し、腫瘍の増大は抑制されている。扁平上皮癌 2 例は 9 回、8 回投与時に頸部転移をおこし、頸部郭清をおこなった。その後、ペプチド投与を再開し、再発は認めない。

症例 7 ペプチド 5 回投与時

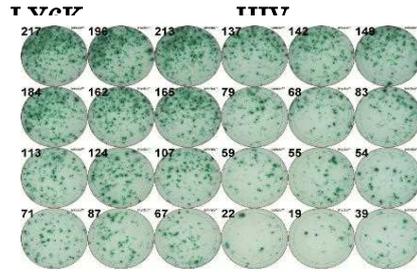


症例 7 ペプチド 5 回投与時

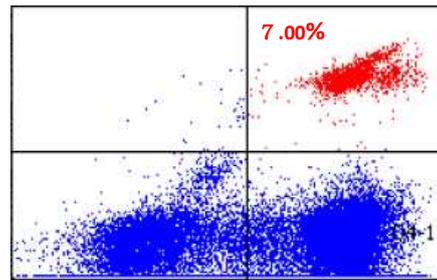


ペプチドワクチンを 5 回投与された患者の末梢血単核球をペプチドにて刺激し、IFN- γ 産生能を ELISPOT にて測定：陽性細胞はほとんど認められない。
 Flowcytometry による HLA-ペプチドに反応する CD8 陽性 T 細胞分画：CD8 中に CTL は 0.2%に過ぎない。

症例 7 ペプチド 10 回投与時



症例 7 ペプチド 10 回投与時



ペプチドワクチンを 10 回投与された患者の末梢血単核球をペプチドにて刺激し、IFN- γ 産生能を ELISPOT にて測定：陽性細胞の増加が認められる。Flowcytometry による HLA-ペプチドに反応する CD8 陽性 T 細胞分画：CD8 中に CTL は 7.0%に増加している。

考察：①口腔癌に対する癌ペプチドワクチン療法は腫瘍増殖抑制効果があり有用な方法であることが示唆された。

②本療法は臨床の効果発現に時間がかかり、ワクチンの効果の発現前に再発を経験する可能性がある。(臨床効果の遅延反応)

③残存病変のない患者や微小ながんを持つ患者にがんワクチンを投与することで、免疫活性化のための十分な時間を確保することが可能である。

④問題となるような有害事象は認められない。

⑤以上より、癌ペプチドワクチン療法はアジュヴァンド療法として用いることによって癌の局所再発や遠隔転移を抑制する可

能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 正徳 (SHINOHARA MASANORI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：90117127

(2) 研究分担者

吉武 義泰 (YOSHITAKE YOSHIYASU)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00423682

平木 昭光 (HIRAKI AKIMITSU)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：60404034

中山 秀樹 (NAKAYAMA HIDEKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：70381001

(3) 連携研究者：なし