

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592415

研究課題名(和文)腎細胞がんに対するがんワクチン・抗原特異的CTL・抗がん剤を用いた併用療法の検討

研究課題名(英文)Combination therapy using cancer vaccine, antigen-specific CTL and an anticancer drug for renal cell carcinoma

研究代表者

吉川 和宏 (Yoshikawa, Kazuhiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60109759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ペプチドワクチンを用いたCTLの増幅法の改良と種々抗がん剤との併用による有効性の向上を目指して実施した。ペプチドワクチンにより、高率にCTLの誘導、増幅が可能であった。また、CMVペプチドによる刺激で得られたCTLに対する抗がん剤の影響を調べたところ、ドセタキセル、ゲムシタビン、シスプラチンでは、増殖阻害効果が認められたが、反応阻害効果は認められず、CTLとの併用は可能だが、ペプチドワクチンとの併用はできないと考えられた。イレッサ、ソラフェニブ、5-FUでは、CTLへの反応阻害効果、増殖阻害効果、直接傷害性については認められず、CTL、ペプチドワクチンとの併用の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to improve immune-cell therapy for cancer by improvement of an amplification system of cytotoxic T-cells (CTL) activated with cancer peptide vaccine and, combination with CTL and anticancer drugs.

CTLs were able to induce and expand in efficiently using cancer peptide vaccine as activation antigen. The influence of anticancer drugs for CTLs were tested using CTLs activated with a CMV peptide. Docetaxel, Gemcitabin and Cisplatin did not show any influence for reactivity of CTL, but showed inhibition activity for proliferation. These results showed that Docetaxel, Gemcitabin and Cisplatin were able to use with CTLs for treatment with cancer patients, but not combination with peptide vaccines. Iressa, Sorafenib and 5-FU did not show any influence for reactive activity and proliferation of CTL, and direct cytotoxicity for CTLs. These results indicate that these drugs can be used with CTLs and peptide vaccines for the treatment of cancer patients.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：免疫治療 細胞治療 併用療法 抗がん剤 CTL

## 1. 研究開始当初の背景

平成 13 年より自家腫瘍特異的細胞傷害性リンパ球(CTL)療法について、学内倫理委員会の承認を得て臨床研究を開始し、平成 17 年 GMP 準拠した細胞調整室(CPC)を設置。同年高度先進医療としての申請を行った。平成 18 年 12 月に先進医療としての承認を得、平成 19 年本学病院内に中央診療部門として細胞治療センターを設置し、同年先進医療としての治療を開始している。すでに先進医療として 37 例の治療を行い、CR3 例、PR1 例、SD7 例、PD25 例で、治療効果の観察された患者はおよそ 3 割となっている。効果の上がない理由としては、免疫抑制機能を持つ制御性 T 細胞(Treg)の存在があげられる。そこで、マウスモデルにおいて抗体による Treg の除去と、増幅したがん細胞に特異的に反応する CTL とによる併用療法を試み、高い治療効果が得られることを確認した。しかし、ヒトがん細胞特異的 CTL の増幅法については未だ十分確立できていないのが現状となっている。

近年、がんペプチドを用いた治療が多くの施設で試みられているが、報告者も腎臓がんが発現する MN/CA9 抗原由来ペプチドのがんワクチンとして有用性をマウスモデルで確認の後、ヒト腎細胞がん患者に対する臨床試験を実施し、ペプチド接種による CTL の誘導と治療効果も観察している (A Phase I Trial of Vaccination of CA9-Derived Peptides for HLA-A24-Positive Patients with Cytokine-Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma. Clin Cancer Res. 12:1768-1775, 2006)。この臨床試験において、ワクチンとして用いた 3 つの合成ペプチドのうち 2 つにおいて CTL の誘導が確認できており、これらのワクチンを用いることで、患者体内で CTL の増幅を計ることが可能と考えられた。

また、MN/CA9 抗原については、これまで

子宮がんや腎細胞がんに限られた発現が報告されていたが、最近、種々の固形がんばかりでなく、また血液腫瘍でもある慢性骨髄性白血病にも発現が報告され、この抗原の治療対象は極めて多くのがん種に拡大していることが明らかになりつつある。泌尿器系がんでは、腎臓がんばかりでなく、膀胱がんにおいても発現が観察されており、泌尿器系がんでの研究成果は、他のがん種においても臨床応用が可能であることが予想された。

## 2. 研究の目的

本研究では、まずは、MN/CA9 ペプチド等のペプチドを用いて CTL を誘導し、治療のための CTL 増幅法の確立を目指す。得られた CTL とこの CTL が反応性を有するがん抗原発現細胞株を標的とした免疫治療モデルを作成し、各種抗がん剤の CTL による細胞傷害反応への影響を検討し、CTL 療法との併用の可・不可を明らかにする。さらに、作成した抗原特異的 CTL と抗がん剤併用による、治療方法について確立し、臨床応用への基礎データとする事を目的として実施する。

## 3. 研究の方法

(1)ヒト末梢血リンパ球より、がんワクチンとしてのペプチドに反応性を有する CTL の誘導、増幅法を検討する。

マウス系の検討のみならず、MN/CA9 を始め、久留米大学 免疫・免疫治療学講座 伊東恭悟教授より使用の許可をいただいた、SART-3 抗原由来 HLA-A 24 拘束性ペプチドを用い、あらかじめ、患者組織の免疫染色で発現を確認した抗原について、患者リンパ球の反応性を確認し、反応性のあったペプチドを患者 T-cell にパルスした細胞を刺激として CTL を誘導し、治療のための CTL 増幅法の確立も目指す。なお、患者リンパ球以外に、モデルとして健常人でも誘導可能なサイトメガロウイルス (CMV) に対する CTL も誘導して以下の実験に用いる。

## (2)CTL 対応抗原発現細胞株の樹立

CTL の反応性を確認することを目的として、MN/CA9 など抗原発現遺伝子をマウス移植用細胞に導入、また、CMV の pp65 抗原の発現遺伝子をヒト細胞に導入して安定な抗原発現細胞株を作成する。

## (3)細胞治療との併用の可能な抗がん剤のスクリーニング.

(1)で確立された CTL と活性の検出システムを利用して、in vitro において、CTL の増殖抑制効果、あるいは殺細胞効果への影響のない抗がん剤を選択する。

抗がん剤としては、アルキル化剤 4 種 (L-PAM, MCNU, TMZ, DIC)、代謝拮抗剤 3 種 (GEM, TS-1, 5-FU)、抗ガン性抗生物質 4 種 (ACT-D, ADR, BLM, MMC)、植物アルカロイド 7 種 (CPT-11, VP-16, DOC, トポテカン, TAX, VCR, VBL)、プラチナ製剤 3 種 L-OHP, CBDCA, CDDP)、ホルモン剤 2 種 (アナストロゾール, TAM)、分子標的薬 4 種 (イマチニブ、ゲフィニチブ、スニチニブ、ソラエニブ) より選択して検討する。

## 4. 研究成果

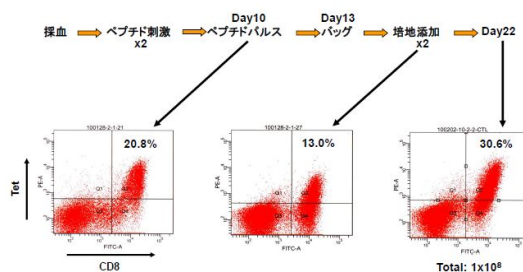
(1)ヒト末梢血リンパ球より、がんワクチンとしてのペプチドに反応性を有する CTL の誘導、増幅法を検討する。

提供された患者血液より、HLA のタイプが HLA-A 24 の患者のスクリーニングを予定していたが、継続的な提供が得られなかったため、健康人血液を用いて、検討した。

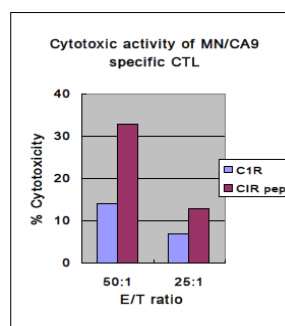
まず、96 ウエルプレートに IL-2: 100 IU/ml、5% 血漿の培地に浮遊させた  $1 \times 10^5$ /well のリンパ球を  $10 \mu\text{g/ml}$  の MN/CA9 ペプチドとともに培養し、CTL の誘導について検討した。

その結果、ほぼ全てのウエルで MN/CA9 テトラマー陽性の CTL の誘導が確認できた。そこで、患者投与を目指した CTL 増幅を試みた

ところ、下図のように抗 CD3 を用いず、IL2 の濃度を高くした培養法により、比較的高率に CTL の誘導、増幅が可能である事が分かった。



誘導された CTL の殺細胞効果を調べたところ下図のように標的ペプチドをパルスした細胞に対して傷害効果のある事も確認できた。



抗がん剤の影響など種々解析に用いるために、CMV のペプチドに対する CTL も誘導したところ 1 週間の培養でおよそ 50%、また、2 週間の培養で 90% のテトラマー陽性 CTL の誘導が可能であった。

## (2)CTL 対応抗原発現細胞株の樹立

ヒト HLA-A24 と同じ MHC クラス I 抗原へのペプチド結合モチーフを持つ BALB/c マウス由来腎細胞がん株 RenCa に MN/CA9 遺伝子を導入して、安定に MN/CA9 を発現する細胞株を得た。また、HLA-A2、A24 を発現するヒト口腔がん細胞株 HSC-3 に CMV の pp65 を発現させた細胞株も得た。

## (3)CTL と抗がん剤の併用の可能性についての検討.

CMV 抗原に反応する CTL を誘導し、CMV 抗原を発現するヒト細胞株を用いて抗がん剤に

よる CTL に対する影響について検討した。

抗がん剤の CTL 活性に及ぼす影響。

CTL を各抗がん剤の  $c_{max}$  濃度が含まれる条件下、CMV ペプチドで刺激し、ペプチドに対する反応性を、細胞内 IFN- $\gamma$  産生能で検討した。その結果、既に成熟して反応性を持つ CTL では、反応の場においては、何れの抗がん剤も阻害効果を示さなかった。

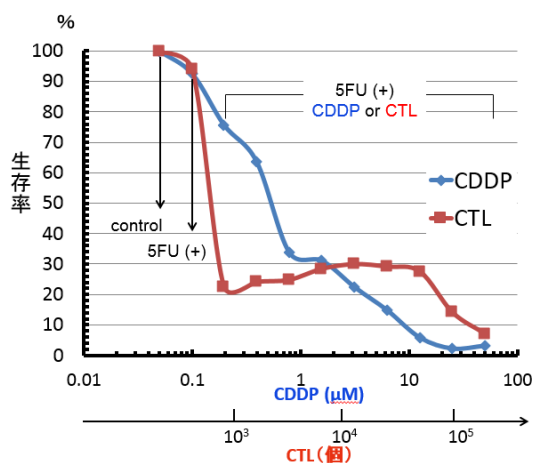
抗がん剤による CTL の増殖性に及ぼす影響

CMV ペプチドで誘導された CTL のペプチドパルス LCL に対する反応性 (LCL を腫瘍細胞の代用として) を指標として、各抗がん剤の  $c_{max}$  濃度、 $c_{max}$  の 1/10 量を含む培地内で一週間培養し、CTL に対する抗がん剤の影響を検討したところ、イレッサ、ソラフェニブでは、 $c_{max}$  濃度においても CTL のさらなる増殖に対して阻害効果は示さなかった。 $c_{max}$  の 1/10 量では、イレッサ、ソラフェニブの他、シスプラチン、5-FU においても阻害効果は認められなかった。しかし、ドセタキセル、ゲムシタピンでは、何れの濃度においても、CTL の分裂増殖を阻害することが明らかとなった。さらに、シスプラチンと 5-FU について実際に投与された生体中での濃度で検査したところ、5-FU では増殖阻害は認められなかったが、シスプラチンについてはおよそ 40% の増殖阻害が認められた。このことからドセタキセル、ゲムシタピン、シスプラチンは、ペプチドワクチンとの併用は困難であるが、CTL との併用が可能性である事が示された。

CTL と抗がん剤の併用効果

併用が可能と考えられた 5-FU と CTL の併用効果と、5-FU と他の抗がん剤との併用による殺細胞効果との比較を行った。その結果、5-FU と CTL との併用は、5-FU とシスプラチンとの併用とほぼ同等の殺細胞効果が得られ、抗がん剤の副作用を軽減することが可能

と考えられた。また、このときの CTL の殺細胞効果は、E/T 比がおよそ 0.1 でも効果が見られ、密な腫瘍塊に対しては、効果が期待できると考えられた。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Suzuki S, Ishida T, Yoshikawa K, Ueda R., Current status of immune-therapy, 査読有 Jpn J Clin Oncol.46、2015、191-203

Sugimoto Y, Hirota M, Yoshikawa K, Sumitomo M, Nakamura K, Ueda R, Niwa R, Suzawa T, Yamasaki M, Shitara K, Kato T, Nakamura K., The therapeutic potential of a novel PSMA antibody and its IL-2 conjugate in prostate cancer, 査読有、Anticancer Res. 34、2014、89-97

Ohtani T, Yamada Y, Furuhashi A, Ohmura Y, Nakamura S, Kato H, Yoshikawa K, Kazaoka Y., Activated cytotoxic T-lymphocyte immunotherapy is effective for advanced oral and maxillofacial cancers, 査読有、Int J Oncol. 45、2014、2051-2057

[学会発表](計2件)

西尾 麻矢子、鈴木 進、大村 元伸、山田 陽一、上田 龍三、吉川 和宏、風岡宜暁、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)における 5-F

ルオロウラシル(5-FU)併用免疫療法、第  
73回日本癌学会学術総会、2014.9

Suzuki S, Yoshikawa K, Takahashi Y,  
Kojima S, Ueda R、Development of CTL  
preparation kit for adoptive T cell  
Immunotherapy, 20th Annual Cancer  
Research Institute International  
Symposium “Cancer Immunotherapy  
2012” (New York), 2012.10

〔図書〕(計 1件)

Suzuki S, Isida T, Yoshikawa K, Ueda R,  
Springer、Progress in clinical use of  
CC chemokine receptor 4 antibody for  
regulatory T cell suppression、2015、  
207

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉川 和宏 (YOSHIKAWA, Kazuhiro)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60109759

### (2)研究協力者

鈴木 進 (SUZUKI, Susumu)  
柏木 隆宏 (KASHIWAGI, Takahiro)  
西尾 麻矢子 (NISHIO, Mayako)  
西野 永希子 (NISHINO, Tokiko)