

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293336

研究課題名(和文)腎細胞癌に対するマルチペプチドワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of multi-peptide tumor vaccine for renal cell carcinoma

研究代表者

植村 天受 (UEMURA, Hirotsugu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90213397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌に対する新規ペプチドワクチン(5種類のターゲット分子)の開発に着手し、HLA-A 24拘束性の新規ペプチド(EPOR、PDL1、HIF1)を同定した。EPOR、PDL1ワクチンの特許を申請し、HIF1については準備中である。また、以前に開発したCA9およびVEGFR1ペプチドワクチンをあわせて、マルチペプチドワクチンを確立した。

研究成果の概要(英文)：We have been working on the development of new MHC-class-I restricted peptide vaccines for five independent therapeutic targets and have identified a significant candidate EPOR, PDL1 and HIF1. We made the application of patents for EPOR and PDL1 peptide vaccine and are preparing the application for HIF1. Together with CA9 and VEGFR1 previously developed peptide vaccines, we established multi-peptide vaccination system using these five peptide vaccines.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎細胞癌 癌ワクチン ペプチドワクチン 免疫療法

1. 研究開始当初の背景  
腎細胞癌(RCC)は術後転移の自然経過として、縮小・消失など宿主免疫機能に深く関係している。また、化学療法や放射線療法など一般的な癌の治療には、ほとんどの効果を示さない難治性疾患である。腎癌の特異性に適した治療法であり、これまでにサイトカイン療法が標準治療とされているが、奏効率は低く、奏効期間も満足できないものであった。近年、血管内皮増殖因子受容体(vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR)などをターゲットにした分子標的治療薬が開発され、RCCにおいて奏効することから、本邦においても平成20年度から使用可能となっており、現在mTOR薬であるtemsirolimusとeverolimusとレセプターチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)であるsorafenib、sunitinib、Axitinib、Pazopanibの合計6種類の分子標的薬が用いられている。これは、腎癌とくにclear cell RCCの発生・増殖に重要な役割を担っているVHL-HIF-1 $\alpha$  pathwayの標的分子であるVEGFやPDGFのレセプターやシグナル伝達因子を阻害することによって、細胞質内における増殖シグナル(PI3K-Akt-mTOR)をblockすることが増殖抑制メカニズムと考えられる。われわれは、難治性腎癌に対して各分子標的薬を用いた薬物治療を170名以上の患者に副作用を少なく、Grade 4以上の重篤な副作用を認めず、推奨容量による治療継続が困難であった。このような治療経験から難治性腎癌に対しては、治療効果だけでなく、OOLも十分配慮した患者のbenefitのある集学的治療が必要であり、サイトカインや分子標的薬による既存治療に加え、新しい治療戦略の開発が望まれる。また、昨年、PD1-PDL1の結合により惹起される癌細胞による免疫抑制シグナルを阻害することにより、T細胞を再活性化して抗腫瘍効果を引き出す免疫チェックポイント阻害薬(抗PD1抗体: Nivolumab)が開発され、RCCにおいても生存期間の延長を認め、米国で承認され使用されている。本邦においてもすでにメラノーマや肺癌で使用されており、今年度中にRCCについても承認される予定である。このように癌免疫療法の有効性が改めてクローズアップされる中で、我々は以前よりMHCクラスIペプチドを用いたワクチン療法について開発を進めてきた。近年、数多くの癌関連抗原が同定され、それら抗原をターゲットにした新しい癌ワクチン療法が開発され、TroVax、RNAワクチン、hTERTペプチド、EC90ワクチンなど腎癌に対するphase-II studyが報告されている(J Immunother, 36, 2009, J Clin Oncol, 26, 2008; Abstr. #3004, #3053, #3017, #3030, #3081)。本邦においてもMHCクラスI上に提示された癌関連抗原由来ペプチドを用いた癌ワクチン療法の有効性が各種癌に対する臨床研究で報告されている(Noguchi M, et al. Prostate 2003, Sato Y, et al. Cancer Sci 2003, Mine T, et al. Cancer Sci 2003, Tsuda N, et al. J Immunother 2004)。われわれは、RCCの約90%に発現しているCarbonic Anhydrase 9 (CA9)抗原に着目し、診断および治療の標的分子としての有用性に

ついて検討してきた(Uemura H, et al. Br J Cancer 1999, Shimizu K, Uemura H, et al. Oncol Rep 2003)。そこで抗原特異的細胞性免疫を誘導するHLA-A24拘束性ペプチドワクチン3種類(CA9p219, p288, p323)を開発し、難治性腎癌患者23例に対して第1/2相臨床研究を行った。結果は16例に特異的細胞性免疫(cytotoxic T lymphocyte: CTL)が誘導され、臨床的にはPR:3例、SD:6例であった。Overall survivalの中央値は20カ月で、分子標的治療薬を含む既存の治療法と比べても全般的に遜色ない結果であった。また全症例で重篤な有害事象は認められず、OOLを損なうことなく治療が続けられ、安全と思われた(Uemura H, et al. Clin Cancer Res, 2006)。我々はVEGFR1についてもHLA-A2およびA24拘束性のペプチドを用いて第1/2相臨床試験を行い、同様の結果を得た(Yoshimura K, Uemura H, et al. Brit J Cancer, 2013)。しかし、特異的CTL誘導までに約6カ月間を要し、臨床効果も早期には認めなかったことから、より免疫反応性の高いペプチドワクチンの開発が望まれた。伊東らの癌細胞数準備している関連抗原のペプチド多準を解析し、治療開始前の患者末梢リンパ球を用いたCTLスクリーニングによるテラーメイド型ペプチドワクチン療法を行い、有望な結果を報告している(Noguchi et al. The Prostate, 57: 2003/ 60: 2004/ 63: 2005)。われわれも伊東らとの共同研究で、再燃前立腺癌患者21例に対してテラーメイドワクチン療法のphase-I/II studyを行った。RCCのワクチン療法に比較して、ペプチド特異的CTL誘導ならびにIgG誘導が速やかでかつ臨床効果も早期から現れ、有用な結果を得ている(Uemura H, et al. J Clin Oncol, 26:suppl, 2008. 植村天受 Urology View, 4:83-89, 2006)。このようなエビデンスに基づき、RCC治療に有効と思われる標的抗原の中からCA9、VEGFR、EPOR (Erythropoietin receptor)、PDL1 (Programmed death ligand)、HIF-1(Hypoxia inducible factor)の5分子を選択し、それらのMHCクラスIペプチドのなかでワクチン療法に有効性を発揮すると思われるepitopeを同定し、RCCに対するマルチペプチドワクチン療法の有用性について基礎的に検討した。

2. 研究の目的  
われわれは以前、RCCに対するペプチドワクチン療法として、CA9ワクチンおよびVEGFR1ワクチンを用いた臨床研究を行い、その安全性、有用性について報告してきた。これらの患者の免疫状態の多様性によって、個々の患者の免疫状態の多様性によって、免疫応答が多彩であること、一巨有効であった症例も免疫逃避あるいは寛容により無効となること、明らかとなつた。また、このような現状を鑑み、一つの決まらな抗原をターゲットとするのではなく、複数の分子をターゲットにしたマルチペプチドワクチン療法が必要と思われる。この構想に基づき、RCCの増殖・進展に重要と思われる分子に対するターゲットとしてEPOR、PDL1、HIF1の3分子について、HLA-A24拘束性のペプチドワクチンを同定し、既存のペプチドとともに5種類

の抗原に対するマルチペプチドワクチンを確立する。

### 3. 研究の方法

#### a. Preclinical translational study

##### ペプチドの準備

これまでの基礎研究により選択した候補ペプチドは下記の5種類であり、その選択根拠については割愛する。各種数種類(3-8種類)ずつ98%以上の純度(外注)の研究用ペプチドを合成した。

- 1) CA9: HLA-A24 拘束性ペプチド (CA9 p219, 288, 323).
- 2) VEGFR ペプチド: VEGFR1,R2, HLA-A24 拘束性ペプチド.
- 3) EPOR: エリスロポイエチンレセプター HLA-A24 拘束性ペプチド.
- 4) PDL1 (programmed death ligand-1): HLA-A24 拘束性ペプチド.
- 5) HIF1- $\alpha$  (hypoxia inducible factor): HLA-A24 拘束性ペプチド.

##### 患者および検体サンプリング

近畿大学医学部倫理委員会に本研究の基礎的研究について申請し、承認を得た上で、本研究の内容についてインフォームドコンセントのうえ文書にて同意を得られた腎細胞癌担癌患者より末梢血 5cc を採取し、HLA-A の typing を抗 HLA-A24 抗体、抗 HLA-A2 抗体、抗 HLA-A3,11,31 抗体を用いてフローサイトメトリー (FACS) にて検索すると共に、同時に外注検査 (SRL) にて HLA の locus を確定する。HLA-A24 陽性患者から末梢血 30ml を採血し、末梢リンパ球 (PBMC) を分離・凍結保存する。

##### 候補ペプチドの同定(1-4)

準備したすべてのペプチドと CIR 細胞を用いた IFN- $\gamma$  release assay にて CTL 誘導能の高いペプチドを1抗原各 HLA タイプで3-6種類ずつ抽出する。スクリーニングするペプチドの種類は全部で15種類以上あり、患者 PBMC も限られていることから一度に IFN- $\gamma$  release assay をすることは不可能と思われる。これまでに血清中の各ペプチド反応性 IgG 抗体の定量を LUMINEX で行ない、反応性の高いものから先にスクリーニング CTL アッセイを行ってきた。

##### (1) ペプチド特異的 IgG の検出

サンプリングした患者血漿中のペプチド特異的反応性 IgG を ELISA (LUMINEX) にて測定しペプチド候補を絞り込む。

##### (2) 患者 PBMC からペプチド特異的 CTL の誘導

今回選択されたペプチド候補をさらに絞り込むため、末梢血単核球細胞からのペプチド特異的 CTL の誘導能を評価する。PBMC と microculture plate にてそれぞれのペプチドを 10 $\mu$ l/ml を加え 4 well にて培養する。培養液成分は 45% RPMI1640, 45% AIM-V medium, 10% FCS, IL-2(100units/ml), 0.1mmol/L MEM nonessential amino acid solution である。2-4 日毎に培養液半量を除去しペプチドと IL-2 を含む新しい medium に計 4-5 回交換する。培養 12-15 日目、細胞を 4-6 well に分ける。そのうち 2-4 well は、それぞれ同種のペプチドで刺激された CIR 細胞と一緒に培養し、残る 2-well は陰性コントロール HIV ペプチドで刺激された CIR 細胞と一緒に培養する。18 時間後、ELISA にて上澄みの IFN- $\gamma$  を測定し HIV 群と比

較し、有意差を認めた場合ペプチド特異的 CTL の誘導を認めたと定義する。

##### (3) <sup>51</sup>Cr release cytotoxicity assay

内因性に各種抗原を発現している RCC 培養細胞を準備する(後述)。ペプチド特異的 CTL の誘導を認めたペプチドを pulse された CD8<sup>+</sup> CTLs は 6 時間 <sup>51</sup>Cr release assay にて direct killing を確認する。PHA T cell は negative control として使用した。特異的 <sup>51</sup>Cr release は test cpm-spontaneous cpm にて計算する。Spontaneous release は effector 細胞を加えない sample にて測定し、Total release は 1% Triton 100-X を加えた sample にて測定する。<sup>51</sup>Cr-labeled target cell 間て HLA-A24 あるいは A3, A2 陽性群にて、HLA mismatch 抗原陽性細胞、PHA blast 群と比較し強く <sup>51</sup>Cr release を認めた場合、ペプチド特異的 CTL が癌細胞に対し殺細胞効果を持つと定義する。

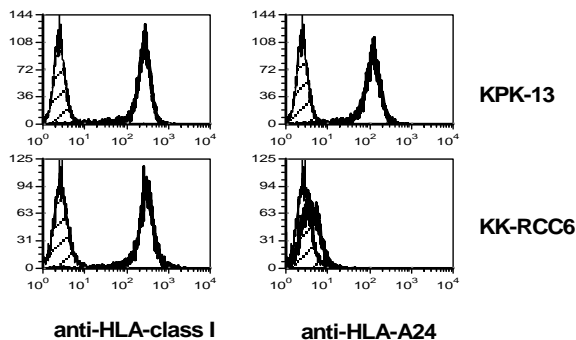
##### (4) cold inhibition assay

各ペプチドで刺激された CTL の特異性を cold inhibition assay にて確認する。<sup>51</sup>Cr-labeled target cells を effector cell と cold target cell と共に培養する。cold target cell として HIV ペプチドまたは各抗原ペプチドを刺激した CIR-A24 細胞を使用した。各抗原ペプチド刺激群と HIV ペプチド刺激群間で抗原ペプチド刺激群の <sup>51</sup>Cr release が有意に低値を示す場合、抗原ペプチドを刺激した cold target cell により <sup>51</sup>Cr-labeled target cell へ direct killing が抑制されたと定義しペプチド刺激された CTL の特異性を確認する。

##### (5) RCC cell lines

日本人 RCC 患者由来の RCC 培養細胞を全国の数大学より提供していただき、バックグラウンドを近畿大学でスクリーニングしたうえで、ペプチド選択の <sup>51</sup>Cr release CTL アッセイに用いた(下記)。

細胞名	A24(positive%)	A2(positive%)	CA9	VEGFR/EPOR	HIF1	PDL1	実験使用
大阪大学	KPK-13	99.02	5.64	positive	positive	positive	○
	KMR0-3	90.59	24.26	positive	positive	positive	
	KMR0-10	97.70	93.78	positive	positive	positive	○
	TUHR-10TKB	99.38	99.92	positive	positive	positive	
香川大学	KK-RCC4	1.30	11.52		positive		○
	KK-RCC6	1.92	12.27	positive	positive	positive	○
大阪大学	GUR-10	1.92	12.27		positive		
京都大学	KUR0-1	99.92	17.64	positive	positive	positive	



### 4. 研究成果

ここに示した一部のデータは publish されておらず、ペプチドワクチン特許申請準備中の HIF1 に関する結果は、図表など掲載できない。

#### a. Preclinical study

今回同定した新規ペプチドワクチン候補 EpoR, PDL1, HIF1 について報告する。

HLA-A24 陽性腎癌患者 PBMC より腎癌

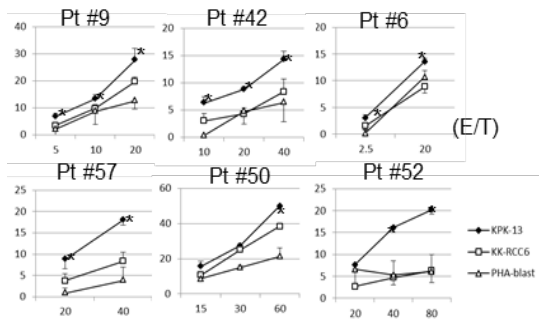
## ペプチド特異的 CTL 誘導能について

我々が同定したワクチン候補ペプチド EpoR, PDL1, HIF1 が特異的 CTL 反応を示すかどうか EpoR 陽性腎癌培養細胞 (前述) KPK-13 (HLA-A24 陽性) と KK-RCC6 (HLA-A24 陰性) を用いて検討した。

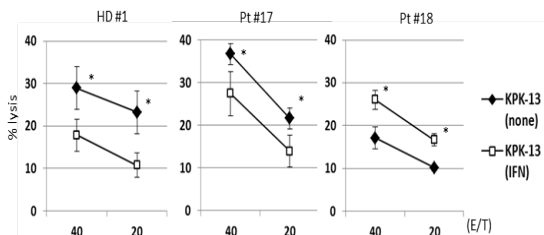
HLA-A24 陽性腎癌患者から得られた PBMC を今回同定した 3 分子の候補ペプチドで刺激し、腎癌培養細胞 KPK-13 と KK-RCC6 に対する Direct killing について比較検討した。3 ペプチド共に HLA-A24 拘束性に患者 PBMC から CTL 反応を誘導することはわかった。

## 腎癌細胞に対するペプチド特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞反応の誘導

細胞障害能のタイプについて KPK-13 と Tap deficient 細胞 C1R-A24 と各ペプチドを用いた競合 CTL アッセイにて各種ペプチドが誘導する細胞障害反応はペプチド特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞反応であることが示された。



(EPOR ペプチドによる Cr release assay)



(PDL1 ペプチドによる Cr release assay)

## 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 10 件)

1. Minami T, Minami T, Shimizu N, Yamamoto Y, De Velasco MA, Nozawa M, Yoshimura K, Harashima N, Harada M, Uemura H. New polycomb group protein enhancer of zeste homolog (EZH) 2-derived peptide with the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. *Int Immunopharmacol.* 2015 Mar 26. pii: S1567-5769(15)00125-3. doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.023. [Epub ahead of print] (査読有)

2. Eto M, Uemura H, Tomita Y, Kanayama H, Shinohara N, Kamei Y, Fujii Y, Umeyama Y, Ozono S, Naito S, Akaza H; Japan Axitinib Phase II Study Group. Overall survival and final efficacy and safety results from a Japanese phase II study of axitinib in cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2014 Dec; 105(12):1576-83. doi:10.1111/cas.12546. Epub 2014 Nov 25. (査読有)

3. Harashima N, Minami T, Uemura H, Harada M. Transfection of poly(I:C) can induce reactive oxygen species-triggered apoptosis and interferon-β-mediated growth arrest in human renal cell carcinoma cells via innate adjuvant receptors and the 2-5A system. *Mol Cancer.* 2014.Sep17;13:217.doi:10.1186/1476-4598-13-217. (査読有)

4. Inamoto T, Azuma H, Nonomura N, Nakatani T, Matsuda T, Nozawa M, Ueda T, Kinoshita H, Nishimura K, Kanayama HO, Miki T, Tomita Y, Yoshioka T, Tsujihata M, Uemura H. Favorable outcome in elderly asian patients with metastatic renal cell carcinoma treated with everolimus: the osaka urologic oncology group. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(4):1811-5. (査読有)

5. Ye D, Eto M, Chung JS, Kimura G, Chang WC, Chang YH, Pang ST, Lee JL, Niu Y, Gurney H, Uemura H. Use of Targeted Therapies for Advanced Renal Cell Carcinoma in the Asia-Pacific Region: Opinion Statement From China, Japan, Taiwan, Korea, and Australia. *Clin Genitourin Cancer.* 2014 Feb 4. pii: S1558-7673(14)00015-9.doi:10.1016/j.clgc.2014.01.007. [Epub ahead of print] Review. (査読有)

6. Minami T, Minami T, Shimizu N, Yamamoto Y, De Velasco M, Nozawa M, Yoshimura K, Harashima N, Harada M, Uemura H. Identification of erythropoietin receptor-derived peptides having the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes from HLA-A24+ patients with renal cell carcinoma. *Int Immunopharmacol.* 2014.Feb.26;20(1):59-65. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.018. [Epub ahead of print] (査読有)

7. Nozawa M, Nonomura N, Ueda T, Nishimura K, Kanayama HO, Miki T, Nakatani T, Tomita Y, Azuma H, Yoshioka T, Tsujihata M, Uemura H. Adverse Event Profile and Dose Modification of Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma in Real-world Japanese Clinical Practice. *Jpn J Clin Oncol.* 2013 Nov;43(11):1132-8. (査読有)

8. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, Nathan P, Staehler M, de Souza P, Merchan JR, Boleti E, Fife K, Jin J, Jones R, Uemura H, De Giorgi U, Harmenberg U, Wang J, Sternberg CN, Deen K, McCann L, Hackshaw MD, Crescenzo R, Pandite LN, Choueiri TK. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N.* (査読有)

9. Phase I clinical trial of human vascular endothelial growth factor receptor 1 peptide vaccines for patients with metastatic renal cell carcinoma. Yoshimura K, Minami T, Nozawa M, Uemura H. *Br J Cancer.* 2013 108(6):1260-6. (査読有)

10. STAT3 polymorphism can predict the response to interferon-α therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. Eto M, Kamba T, Miyake H, Fujisawa M, Kamai T, Uemura H, Tsukamoto T, Azuma H, Matsubara A, Nishimura K, Nakamura T, Ogawa O, Naito S; Japan Immunotherapy SNPs-Study Group for Kidney

Cancer. Eur Urol. 2013 745-52. ( 査読有 )

〔学会発表〕(計5件)

1.南高文、野澤昌弘、吉村一宏、植村天受(近大)、木村高弘、瀬川晋(慈恵医大)、藤元博行(国立がんセンター)、山田亮、伊東恭悟(久留米大)

A phase-II study of peptide vaccines and dexamethasone versus dexamethasone alone for chemotherapy-naive castration resistant prostate cancer-a final report  
The 30th Annual Congress of the European Association of Urology(EAU15)、マドリッド、2015.3.22

2.吉村一宏(近大)、南高文、野澤昌弘、植村天受(近大)

腎癌に対するワクチン療法

第102回日本泌尿器科学会総会、神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(神戸)、2014.4.25

3.Uemura H., Kimura T., Minami T., Yoshimura K., Nozawa M., Egawa S., Fujimoto H.,

Yamada A., Ito K.

Peptide vaccines with low-dose dexamethasone versus dexamethasone alone for chemotherapy-naive castration resistant prostate cancer a randomized phase II study

ASCO-GU, San Francisco, 2014.1.30

4. Clinical role of MHC-class I peptide vaccines for metastatic renal cell carcinoma. T. Minami, T Minami, N Shimizu, Y Yamamoto, M De Velasco, T Hayashi, M Nozawa, K. Yoshimura, T Ishii, H Uemura. 28th Annual EAU Congress, March 18, 2013, Milan

5. 植村天受(近大)、木村高弘(慈恵医大) 吉村一宏 南高文 野澤昌弘(近大) T.Nakagawa 藤本博行(国立がん研究センター) 瀬川晋(慈恵医大) 山田亮 伊藤恭悟(久留米大学)

Combination therapy of peptide vaccines and dexamethasone for chemotherapy naive castration resistant prostate cancer - a randomized phase-2 study

28th Annual EAU Congress、ミラノ、2013.3.16

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計2件)

発明の名称:腎細胞癌の予防又は治療に好適なペプチド、核酸分子、及びベクター、並びにそれらの利用

出願番号:特願2014-007671(平成26年(2014年)1月20日出願)(学内管理番号:KD1041)  
「HLA-A24陽性腎細胞癌患者に対する癌ワクチン療法に有用なEpoR由来ペプチド」

発明の名称:細胞性免疫に認識されるペプチド、及びそれを利用した医薬剤

出願番号:特願2014-189312(学内管理番号:KD1093)

出願申請時「HLA-A24陽性腎細胞癌患者に対する癌ワクチン療法に有用なPD-L1由来ペプチド」

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

植村 天受 (UEMURA Hirotsugu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号:90213397

(2)研究分担者

デベラスコ マルコ (DEVELASCO Marco)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号:20449838

南 高文 (MINAMI Takafumi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号:70340809

原田 守(HARADA Mamoru)

島根大学・医学部・教授

研究者番号:50260716

吉村 一宏 (YOSHIMURA Kazuhiro)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号:20283757

(3)連携研究者

( )

研究者番号: