

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293353

研究課題名(和文)膀胱癌に対するキラーおよびヘルパーT細胞をともに活性化するがん免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new immunotherapy activating both cytotoxic and helper T cells against bladder cancer

研究代表者

江藤 正俊 (Eto, Masatoshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90315078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は本試験にて日本人で頻度が高いHLAクラス II分子に結合する膀胱癌高発現がん精巢抗原(以下、膀胱癌TAA)由来の22～29個のアミノ酸により構成される長鎖ペプチド(Long peptide: LP)を4種類同定し、合成し免疫原性を調べたところ、健康人のヒト単核球より、がん抗原特異的なヘルパーT細胞を誘導できた。次に膀胱癌患者末梢血から膀胱癌TAA由来のLPs特異的1型ヘルパーT細胞を検出できた。トランスジェニックマウスを用いた実験でLPsで免疫したにも関わらず、細胞障害性T細胞の誘導にも成功し、LPsと抗PD1抗体の併用の有効性も示すことができ、今後の臨床試験への応用の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have succeeded in identifying 4 long peptides (LPs) that comprise from 22-29 amino acids originated from Bladder cancer tumor-associated antigens (TAA). We confirmed the immunogenicity of LPs from Bladder cancer TAA (TAA-LP) by induction of TAA-LP-specific helper T (Th) cells from healthy donors. We could also detect type 1 Th (Th1) cells specific for TAA-LPs from Bladder cancer patients. Using transgenic mice expressing human HLA-A2, we next showed the induction of cytotoxic T cells (CTLs) specific for short peptides (SPs) from Bladder cancer TAA (TAA-SP), even after immunization with TAA-LPs, indicating the cross-presentation to Th cells and CTLs by TAA-LPs. We also succeeded in the enhancement of CTLs against TAA-SPs when combined with LPs, Th clones, and anti-PD-1 mAb, implicating the new strategy of combination therapy with TAA-LPs. The above results have indicated that TAA-LPs are effective, and can be a new treatment option for patients with Bladder cancer.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：癌 免疫学 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

腎癌や前立腺癌に対する新薬は次々に開発されているが、しかし、膀胱癌を始めとする尿路上皮癌に対する標準的薬物療法にはGC療法とMVAC療法の2つのシスプラチンベースのレジメンしかないため、その不応例に対する治療法の開発が緊急の課題であった。従来より膀胱癌に対するBCG膀胱内注入療法が広く行われてきたことが示すように、膀胱癌は免疫原性の高い癌であることが考えられていた。

細胞傷害性T細胞(CTL)を活性化する、がん抗原を用いた免疫療法については、前立腺癌に対するSipuleucel-TがFDAに承認されたり(*N Engl J Med.* 363:411, 2010)、肺がん患者におけるMAGE3および子宮頸がん患者におけるHPVを標的抗原とする、T細胞誘導がん免疫療法の臨床第Ⅰ相試験において、患者の生存期間の延長が観察され(*Nat Rev Cancer* 8: 351, 2008, *New Engl. J. Med.* 361: 1838, 2009)、がん抗原でT細胞性腫瘍免疫を誘導する免疫療法の臨床応用が見直されつつあった。またがんワクチンに関する臨床研究では、T細胞性がん免疫応答の誘導には安全かつ安価である、がん抗原由来のCTL認識ペプチドが多用されており、連携研究者らは膀胱癌に高頻度に高発現する新規がん精巢抗原(以下、膀胱癌TAA)を同定し、HLA-A2やA24と結合して、癌細胞を破壊するCTLを誘導できる9~10個のアミノ酸により構成される、短鎖ペプチド(Short peptide: SP)を同定してきた。しかし、ナイーブCTLから反応性が良い、がん抗原特異的メモリーCTLを誘導するには、1型ヘルパーT細胞(Th1)細胞が産生するIL-2の存在が重要であることが、動物実験により証明されている(*Nature* 441: 890, 2006, *J. Immunol.* 181: 7445, 2008)。したがって、TAAのCTLエピトープのみならずTh細胞エピトープを同定して、これを同時投与することが望ましいと想定されていた。

2. 研究の目的

- (1) Th細胞に強い免疫反応を誘導する、20数個のアミノ酸により構成される、膀胱癌TAA由来の長鎖ペプチド(Long peptide: LP)を同定し、CTLを誘導するSPワクチン療法と併用することにより、より効果が大きい癌免疫療法を確立する
- (2) がん抗原遺伝子を導入したヒトiPS細胞より、in vitroで樹状細胞(iPS-DC)を分化誘導し、当該がん抗原に特異的なCTLおよびTh1細胞の両方を誘導するシステムを開発する。

3. 研究の方法

(1) **膀胱がん免疫療法に理想的ながん抗原のHLAクラスI拘束性CTLエピトープの同定**
 がん組織ならびに正常組織における、ゲノムワイドcDNAマイクロアレイ解析の結果を利

用して、同定された膀胱癌TAAについて、そのアミノ酸配列からHLA-A2あるいはA24に結合する構造モチーフを有するSPをin silicoで選出して、これらを合成する。これを、HLA-A2あるいはA24を発現するTgmに免疫して、HLA拘束性マウスCTLを誘導できるがん抗原ペプチドを同定する。これらのSPで、当該HLAが陽性の健常人および当該がん抗原を高発現する、膀胱癌患者の末梢血単核細胞を刺激することにより、がん細胞を傷害するヒトCTLを誘導できるペプチドを同定する。

(2) **膀胱がん免疫療法に理想的なHLAクラスI拘束性Th細胞エピトープの同定**

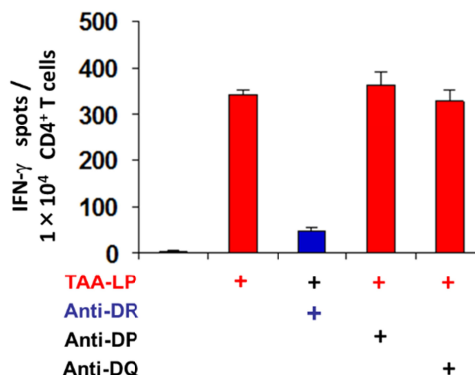
日本人で頻度が高いHLAクラスI分子である、HLA-DR4(DRB1*04:05)、HLA-DR9(DRB1*09:01)、HLA-DR15(DRB1*15:02)、HLA-DP2(DPB1*02:01)、HLA-DP5(DPB1*05:01)に結合すると推定される、膀胱癌TAA由来のアミノ酸により構成されるLPsを同定する。さらに免疫原性の確認としてLPs特異的Th1細胞を、健常人末梢血から誘導できることを確認する。またCTLエピトープ(SP)を内包するLPsについては樹状細胞によるcross-presentationにより、CTLエピトープが産生されCTLを活性化できるか否か検討する。また膀胱癌TAA-LP特異的Th1細胞の共存下におけるTAA-SP特異的CTLの誘導効率が抗PD1抗体により増強されるかの検討も行う。

(3) 将来の臨床応用を目指して、iPS-DCをフィーダー細胞および血清フリーの培養系で樹立する方法を開発する。

4. 研究成果

(1) 我々は上述の日本人で頻度が高いHLAクラスI分子に結合する膀胱癌TAA由来の22~29個のアミノ酸により構成されるLPsを4種類同定し合成し、LPsの免疫原性を調べたところ、健常人のヒト末梢血単核球より、がん抗原特異的なTh細胞を誘導することができた。その反応は抗DR抗体でのみ抑制され、HLAクラスI拘束性も示された(図1)。

図1

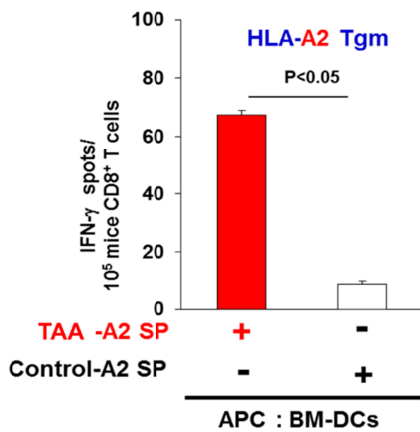


(2) 次に実際の膀胱癌患者の末梢血から膀胱癌TAA由来のLPs特異的Th1細胞を検出す

ることができるかを検討したところ、INF- γ 、IL-2、TNF- α 等の Th1 サイトカイン産生を確認でき、IL-4、IL-17 の産生は認めなかった (data not shown)。

(3) CTL エピトープ(SP)を内包する LPs を取り込んだ樹状細胞による SP 特異的 CTL への抗原提示 (Cross-presentation)に関する実験は前述した HLA-A2 を発現するトランスジェニックマウス (Tgm) に免疫することで行ったところ、図 2 に示すように

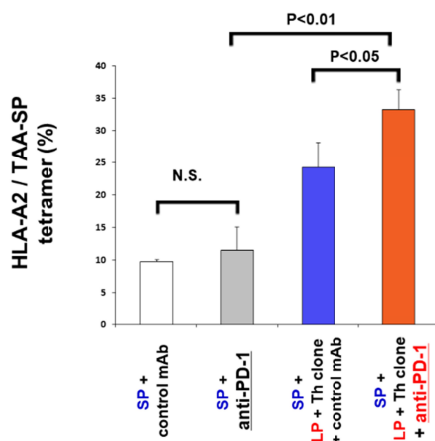
図 2



膀胱癌 TAA 由来の LP で免疫したにも関わらず、SP 特異的な CTL 活性の誘導が認められ、マウス生体内で実際に Th エピトープと CTL エピトープの Cross-presentation が起きていることを示すことができた。

(3) 次に膀胱癌 TAA-LP 特異的 Th1 細胞の共存下における TAA-SP 特異的 CTL の誘導効率抗 PD1 抗体により増強されるかの検討については in vitro の培養系で HLA-A2 拘束性 TAA-SP 特異的 CTL の tetramer 解析を用いて行った。その結果図 3 に示すように、TAA-SP 特異的 CTL の誘導は膀胱癌 TAA-LP と Th clone の存在下に抗 PD1 抗体を加えた場合に最も増強されることが示された。

図 3



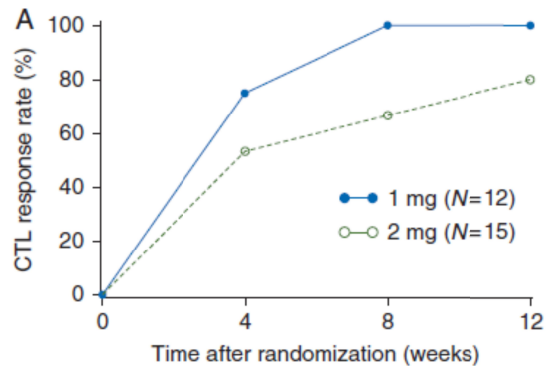
以上の結果は膀胱癌 TAA 由来の LP を臨床応用する際に抗腫瘍効果を増強するために有用な情報と考えられた。膀胱癌 TAA 由来の LP

については臨床応用に向けた前臨床試験を

開始している。上記の実験結果は主として第 45 回日本免疫学会学術集会 (学会発表) にて報告した。

(4) in vitro で樹状細胞 (iPS-DC) を分化誘導し、当該がん抗原に特異的な CTL および Th1 細胞の両方を誘導するシステムの開発については残念ながら大きな進展が得られなかったため、我々は連携研究者らが同定した 2 種類の癌抗原 (DEPDC1、MPHOSPH1) から得られた 2 種類の SP を用いた膀胱癌に対する癌ワクチン療法の第 1 相臨床治験に注力し、多くの患者登録を行ない、安全性と SP 特異的な CTL 活性の誘導を示すことができた。27 名の患者で免疫反応の検索が可能で、88.9% の患者で CTL 活性が誘導できた (文献)。図 4 に示すように CTL 活性はワクチン開始後 4 週目には検出でき、12 週目にはより高く検出できた (文献より引用)。また使用

図 4



するワクチンの量についても 1mg と 2mg の間に CTL 活性の誘導能に有意差を認めなかった (図 4)。以上の結果は本試験で同定した膀胱癌 TAA 由来の LP を臨床応用する際に非常に重要な情報と思われる。

(5) 我々は上記以外で、シスプラチン抵抗性膀胱癌に対する個別化ペプチドワクチン療法の医師主導第 1 相臨床試験にも参画した。その結果ペプチドワクチン群は BSC 群と比して有意に全生存期間が延長することが認められ (7.9M vs 4.1M)、膀胱癌における TAA-SP ワクチン療法の有用性を示した (文献)。以上の結果は今後の TAA 由来の LP を用いた臨床試験の有効性の可能性を示すものである。

(6) その他、膀胱癌に関する研究として、術前の尿細胞診は腫瘍径に加えて筋層非浸潤膀胱癌の膀胱内再発の有用な予測因子となり得る可能性を示した (文献)。また膀胱癌に対する代表的な免疫療法である BCG 膀胱内注入療法の抗腫瘍効果を増強する目的で IL-15 を産生するように改変した recombinant BCG 株 (以下 BCG-IL-15) を作成し、マウス膀胱癌 BCG 膀胱内注入療法モデルに用いたところ、コントロールである通常の BCG と比して、BCG-IL-15 群では有意にマウスの生存期間が延長した (文献)。IL-15

は好中球の遊走に関わる因子であり、BCG-IL-15 を注入したマウスの膀胱では実際に好中球の浸潤が有意に増加していた(文献)。以上の結果は BCG-IL-15 が筋層非浸潤膀胱癌に対する有用な膀胱内注入薬となる可能性を示した。

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)

Obara W, Eto M, Mimata H, Kohri K, Mitsuhashi N, Miura I, Shuin T, Miki T, Koie T, Fujimoto H, Minami K, Enomoto Y, Nasu T, Yoshida T, Fuse H, Hara I, Kawaguchi K, Arimura A, Fujioka T. A phase I/II study of cancer peptide vaccine S-288310 in patients with advanced urothelial carcinoma of the bladder. *Ann Oncol*, 査読有、Vol. 28, No. 4, 2017, pp. 798-803
doi: 10.1093/annonc/mdw675

Shiota M, Kiyoshima K, Yokomizo A, Takeuchi A, Kashiwagi E, Dejima T, Takahashi R, Inokuchi J, Tatsugami K, Eto M. Suppressed Recurrent Bladder Cancer after Androgen Suppression with Androgen Deprivation Therapy or 5 α -Reductase Inhibitor. *J Urol*, 査読有、Vol. 197, No. 2, 2017, pp. 308-313
doi: 10.1016/j.juro.2016.08.006

Shiota M, Yokomizo A, Takeuchi A, Inokuchi J, Tatsugami K, Ohga S, Sasaki T, Nakamura K, Honda H, Eto M. Smoking effect on secondary bladder cancer after external beam radiotherapy for prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 査読有、Vol. 46, No. 10, 2016, pp. 952-957

Takeuchi A, Eto M, Tatsugami K, Shiota M, Yamada H, Kamiyoy Y, Dejima T, Kashiwagi E, Kiyoshima K, Inokuchi J, Takahashi R, Yokomizo A, Ohara N, Yoshikai Y. Antitumor activity of recombinant Bacille Calmette-Guérin secreting interleukin-15-Ag85B fusion protein against bladder cancer. *Int Immunopharmacol*, 査読有、Vol. 35, No. 6, 2016, pp. 327-331
doi: 10.1016/j.intimp.2016.03.007

Masaoka H, Ito H, Soga N, Hosono S, Oze I, Watanabe M, Tanaka H, Yokomizo A, Hayashi N, Eto M, Matsuo K. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) and alcohol dehydrogenase 1B (ADH1B) polymorphisms exacerbate bladder cancer risk associated with alcohol drinking: gene-environment

interaction. *Carcinogenesis*, 査読有、Vol. 37, No. 6, 2016, pp. 583-588
doi: 10.1093/carcin/bgw033

Kiyoshima K, Akitake M, Shiota M, Takeuchi A, Takahashi R, Inokuchi J, Tatsugami K, Yokomizo A, Eto M. Prognostic Significance of Preoperative Urine Cytology in Low-grade Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Anticancer Res*, 査読有、Vol. 37, No. 6, 2016, pp. 583-588
doi: 10.1093/carcin/bgw033

Noguchi M, Matsumoto K, Uemura H, Arai G, Eto M, Naito S, Ohyama C, Nasu Y, Tanaka M, Moriya F, Suekane S, Matsueda S, Komatsu N, Sasada T, Yamada A, Kakuma T, Itoh K. An Open-Label, Randomized Phase II Trial of Personalized Peptide Vaccination in Patients with Bladder Cancer that Progressed after Platinum-Based Chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 査読有、Vol. 22, No. 1, 2016, pp. 54-60
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1265

Kitamura H, Tsukamoto T, Shibata T, Masumori N, Fujimoto H, Hirao Y, Fujimoto K, Kitamura Y, Tomita Y, Tobisu K, Niwakawa M, Naito S, Eto M, Kakehi Y; on behalf of Urologic Oncology Study Group. Randomised phase III study of neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, doxorubicin, vinblastine and cisplatin followed by radical cystectomy compared with radical cystectomy alone for muscle-invasive bladder cancer: Japan Clinical Oncology Group study JCOG0209. *Ann Oncol*, 査読有、Vol. 25, No. 6, 2014, pp. 1192-1198
doi: 10.1093/annonc/ndu126

[学会発表](計 19 件)

2016 年度

学会名; 2017 欧州泌尿器科会議、発表者(代表)名 出嶋 卓、江藤正俊、他 8 名、発表標題; Inhibition of LIM-SH3 domain protein 1 (LASP1) augments the anti-cancer effect of cisplatin in bladder cancer、発表年月日; 2017 年 3 月 27 日、発表場所; イギリス、ロンドン

学会名; 第 45 回日本免疫学会学術集会、発表者(代表)名 中根美季、江藤正俊、西村泰治、他 7 名、発表標題; Identification of cancer-testis antigen (DEPDC1 and MPHOSPH1)-derived long peptides encompassing both CTL and HLA class II-restricted Th cell epitopes、発表年月日; 2016 年 12 月 5 日、発表場所; 沖縄県宜野湾市

学会名；第 9 回 BCG 注入療法研究会、発表者(代表)名 柏木英志、江藤正俊、他 7 名、発表標題；High-grade T1 膀胱癌に対する 2nd TUR と BCG 注入療法による治療成績と予後因子の検討、発表年月日；2016 年 12 月 2 日、発表場所；東京都中央区

学会名；第 29 回日本バイオセラピー学会 学術集会総会、発表者(代表)名 武内在雄、江藤正俊、他 3 名、発表標題；筋層非浸潤性膀胱癌に対する BCG、インターロイキン 15 膀胱内注入療法の有効性、発表年月日；2016 年 12 月 1 日、発表場所；福岡県久留米市

学会名；第 68 回西日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 出嶋 卓、江藤正俊、他 6 名、発表標題；LIM-SH3 domain protein 1 knockdown inhibits cell growth and enhances activity of cisplatin in bladder cancer、発表年月日；2016 年 11 月 26 日、発表場所；山口県下関市

学会名；第 68 回西日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 江藤正俊、発表標題；筋層非浸潤性膀胱癌に対する最新の治療戦略、発表年月日；2016 年 11 月 25 日、発表場所；山口県下関市

学会名；第 68 回西日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 秋武正和、江藤正俊、他 11 名、発表標題；低リスク筋層非浸潤性膀胱癌の規定因子に関する検討、発表年月日；2016 年 11 月 25 日、発表場所；山口県下関市

学会名；第 33 回日韓泌尿器科会議、発表者(代表)名 柏木英志、江藤正俊、他 6 名、発表標題；Androgen receptor activity modulates responses to cisplatin treatment in bladder cancer、発表年月日；2016 年 10 月 7 日、発表場所；青森県青森市

学会名；第 20 回日本がん免疫学会総会、発表者(代表)名 武内在雄、江藤正俊、他 3 名、発表標題；Efficacy of Recombinant BCG-interleukin-15 against bladder cancer、発表年月日；2016 年 7 月 28 日、発表場所；大阪府大阪市

学会名；2016 米国泌尿器科会議、発表者(代表)名 倉橋竜磨、江藤正俊、河野吉昭、他 8 名、発表標題；A randomized trial comparing two different retention periods of intravesical pirarubicin instillation for intermediate risk non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) after transurethral resection、発表年月日；2016 年 5 月 6 日、発表場所；アメリカ、サンディエゴ

学会名；第 104 回日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 秋武正和、江藤正俊、他 7 名、発表標題；低リスク筋層非浸潤性膀胱癌の規定因子に関する検討、発表年月日；2016 年 4 月 23 日、発表場所；宮城県仙台市

学会名；第 104 回日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 武内在雄、江藤正俊、他 5 名、発表標題；Efficacy of Recombinant BCG-interleukin-15 against bladder cancer、発表年月日；2016 年 4 月 23 日、発表場所；宮城県仙台市

学会名；第 104 回日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 塩田真己、江藤正俊、他 10 名、発表標題；Secondary bladder cancer after anticancer therapy for prostate cancer: the effect of androgen-deprivation therapy and smoking、発表年月日；2016 年 4 月 23 日、発表場所；宮城県仙台市

2015 年度

学会名；2016 欧州泌尿器科会議、発表者(代表)名 武内在雄、江藤正俊、他 7 名、発表標題；Efficacy of recombinant bacille Calmette-Guérin secreting interleukin-15 against bladder cancer、発表年月日；2016 年 3 月 13 日、発表場所；ドイツ、ミュンヘン

学会名；2016 欧州泌尿器科会議、発表者(代表)名 塩田真己、江藤正俊、他 10 名、発表標題；Secondary bladder cancer after anticancer therapy for prostate cancer; reduced comorbidity after androgen-deprivation therapy and increased comorbidity with smoking history、発表年月日；2016 年 3 月 12 日、発表場所；ドイツ、ミュンヘン

学会名；第 25 回泌尿器科分子・細胞研究会、発表者(代表)名 出嶋 卓、江藤正俊、他 5 名、発表標題；LIM and SH3 domain protein1 (LASP1)は膀胱癌の治療標的となりうる、発表年月日；2016 年 2 月 27 日、発表場所；大阪府大阪市

学会名；第 8 回 BCG 注入療法研究会、発表者(代表)名 秋武正和、江藤正俊、他 6 名、発表標題；膀胱上皮内癌単独症例の臨床病理学的検討、発表年月日；2015 年 11 月 13 日、発表場所；東京都千代田区

学会名；第 103 回日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 鹿瀬島裕、江藤正俊、河野吉昭、他 3 名、発表標題；マウス膀胱がんモデル及びシスプラチン耐性膀胱癌モデルにおける抗 CYLA-4 抗体による抗腫瘍効果についての検討、発表年月日；2015 年 4 月 18

日～21日、発表場所；石川県金沢市

2014年度

学会名；第52回日本癌治療学会学術集会、
発表者（代表）名 野口正典、江藤正俊、他
8名、発表標題；化学療法抵抗性膀胱がん
に対するがんワクチン療法の第 相無作為比
較試験、発表年月日；2014年8月29日、発
表場所；神奈川県横浜市

〔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 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江藤 正俊 (ETO, Masatoshi)
九州大学・医学（系）研究科（研究院）・
教授
研究者番号：90315078

(2) 研究分担者

河野 吉昭 (KAWANO, Yoshiaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：30593793

(3) 連携研究者

西村 泰治 (NISHIMURA, Yasuharu)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：10156119