

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670606

研究課題名(和文)肝細胞癌HSP70のHLA Class Iに対する peptideの同定

研究課題名(英文)Identification of the HSP70 peptide for the development of cancer immunotherapy

研究代表者

岡 正朗 (OKA, Masaaki)

山口大学・その他部局等・学長

研究者番号：70144946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、肝細胞癌の特異的抗原としてHeat Shock Protein (HSP) 70を同定し、HSP70-mRNA導入樹状細胞(DC)療法を考案し、Phase I試験を行い、その安全性と有効性を得た。そこで、細胞療法と比較してより普遍的な癌ペプチドワクチン療法に転換することを考え、抗腫瘍反応を誘導するペプチドの同定を試みた。マルチHLA結合ペプチドと予測された候補について、ELISpot assay 及びELISAによって確認し、安全性をラット及びイヌにて確認した。ペプチド及びアジュバントについて特許出願を行い、複合免疫療法のFirst in Humanの臨床試験を開始した。

研究成果の概要(英文)：We identified the Heat Shock Protein (HSP) 70 as a specific antigen of hepatocellular carcinoma. Furthermore, the phase I study of HSP70-mRNA introduced dendritic cells therapy showed the safety and efficacy. In this study, we tried to identify the HSP70 peptide sequence, which can induce the anti-tumor response, in order to the development of useful peptide vaccine therapy for cancer. Candidate HSP70 peptides predicted as multi-HLA binding potency were confirmed by ELISpot assay and ELISA for IFN-gamma production. The safety of the peptides were examined in rats and dogs. We started a clinical trial of first in Human HSP70 peptide immunotherapy for several cancers.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 ワクチン療法

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでにマイクロアレイ法による遺伝子解析及び2次元電気泳動法によるプロテオミクス解析のデータベースより、肝細胞癌の特異的抗原タンパクを絞り込み、Heat Shock Protein (HSP) 70 を標的とした HSP70-mRNA 導入樹状細胞 (DC) 療法を考案し、切除不能・再発肝細胞癌患者を対象に Phase I 試験を行った。肝細胞癌における HSP70 及び HLA class-I 発現陽性の割合はそれぞれ 92%及び 59%であることを免疫組織化学法 (IHC) により確認し、mRNA の導入法として EGFP mRNA をエレクトロポレーション法により DC に導入され、タンパク発現が成されることを事前に確認した。

Phase I 試験により安全性が確認され、9 例中 2 例の腫瘍の完全消失 (CR)、5 例の stable disease (SD) を得たことから、Phase II 試験を開始した。これは HSP70 mRNA を in vitro にて DC に導入し、癌免疫療法として用いる方法で有り、期待される免疫学的反応は、遺伝子導入された HSP70 が腫瘍特異的な標的タンパクとして働くことと、シャペロンとして抗原提示を促進し、さらに免疫担当細胞の活性化を行うことである。

しかし、本療法は複雑な培養行程や細胞処理、高度な施設基準を要する。本療法をより簡便で普遍的な治療として普及させることを考えるとペプチド療法は大きな選択肢となり得る。従って、本研究が遂行されれば、有効性が高い治療に対する臨床応用への架け橋として、非常に重要な位置づけとなる。

2. 研究の目的

これまで、HSP70 を標的とした HSP70-mRNA 導入 DC 療法を考案し、その有効性および安全性を Phase I 試験にて確認している。しかしながら、上記のような細胞療法は、手間がかかるとともに規制を満たす施設は限られている。そこで、細胞療法と比較してより普遍的な癌ペプチドワクチン療法に転換することを考え、HSP70 ペプチドの内、抗腫瘍反応を誘導するペプチドを同定し、肝細胞癌ペプチドワクチン療法の臨床への橋渡しを行うことを目的とする (図 1)。

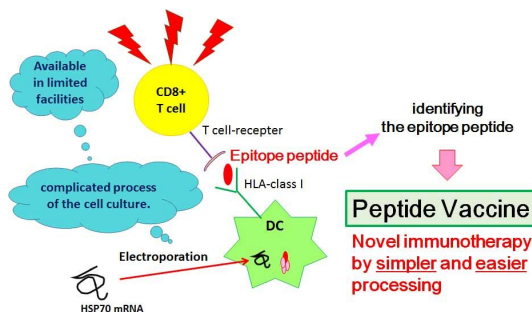


図 1. DC 療法からペプチドワクチン療法へ

3. 研究の方法

HLA-A\*24:02 (以下 HLA2402 と略記)、

HLA-A\*02:01 並びに HLA-A\*02:06 に親和性 (affinity) の高い HSP70 short peptide の検索により候補を絞った (図 2)。Healthy Volunteer (HV) の PBMC で、高い IFN- $\gamma$  活性を有したものを候補とした。具体的には、PBMC から分離した付着細胞を GM-CSF、IL-4 による未成熟樹状細胞への誘導、TNF- $\alpha$  による成熟化を行い、成熟樹状細胞を誘導した。一方、浮遊細胞を IL-2 添加下に培養し磁気ビーズを用いて CD8+ 細胞を negative selection で分離した。成熟樹状細胞に候補ペプチドをパルスした後、CD8+細胞と 1 週間共培養を行った。CD8+細胞を回収し、ペプチドをエレクトロポレーションによりパルスした細胞を標的として IFN- $\gamma$  ELISpot assay 及び培養上清の IFN- $\gamma$  を ELISA 法にて、各ペプチドの特異的免疫誘導能を比較した。

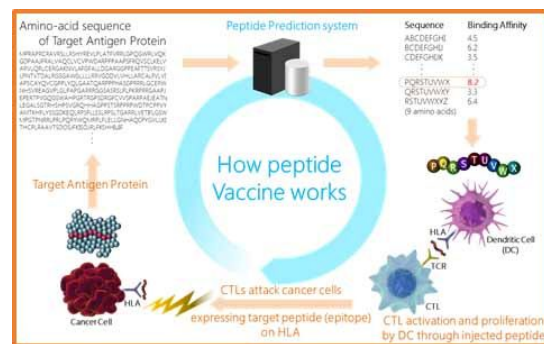


図 2. ペプチド同定に関する概略図

4. 研究成果

能動的学習法を用いたペプチド探索技術 (HLA Peptide Binding Predictions System) により、HSP70 由来ペプチドから 29 個のエピトープ候補ペプチドを同定した。これらの候補ペプチドから HLA2402, 0201, 0206 のいずれに対しても結合能を有するマルチ HLA 結合ペプチドとなりうるものを選択した。候補ペプチドに対し、HLA 結合ペプチド実験を行い、結合能に応じ、優先順位をつけた。

HSP70-DC 療法施行患者 4 症例について計 26 回の免疫誘導試験を行った結果、1 つの HSP70 由来ペプチドが ELISpot assay 及び ELISA において negative control と比べて有意に IFN- $\gamma$  発現頻度が高く、エピトープペプチドの最も有力な候補と考えられた。このペプチドは HLA2402 のみならず、HLA0201 症例においても IFN- $\gamma$  発現が認められた (図 3)。さらに、上記候補ペプチドの安全性をラット及びイヌを用いた動物試験にて確認した。

また、ペプチドワクチン療法の際に用いるアジュバントについても検討を行った。数種のアジュバント物質の組み合わせについて、マウスを用いた抗腫瘍効果の実験を実施し、LAG-3 Ig と polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) の組み合わせにより免疫抑制系がダウンレギュレートされ免疫疲弊を抑制し、他の組み合わせに比べて有意に抗腫瘍効果の高いことが確認された。これらペプチド及びアジュバントについて、特許出願

を行った (特願 2014-206730)。

### ELISpot assay: INF- $\gamma$ production

HSP70 peptide (PBMC: HLA-A\*02:01/-)



HSP70 peptide (PBMC: HLA-A\*24:02/-)



図 3. ELISpot assay の結果

また、HSP70 は肝細胞癌以外に食道扁平上皮癌、胃癌、大腸癌、膵腺管癌、乳癌でも高率に発現していることを IHC により確認した (図 4)。

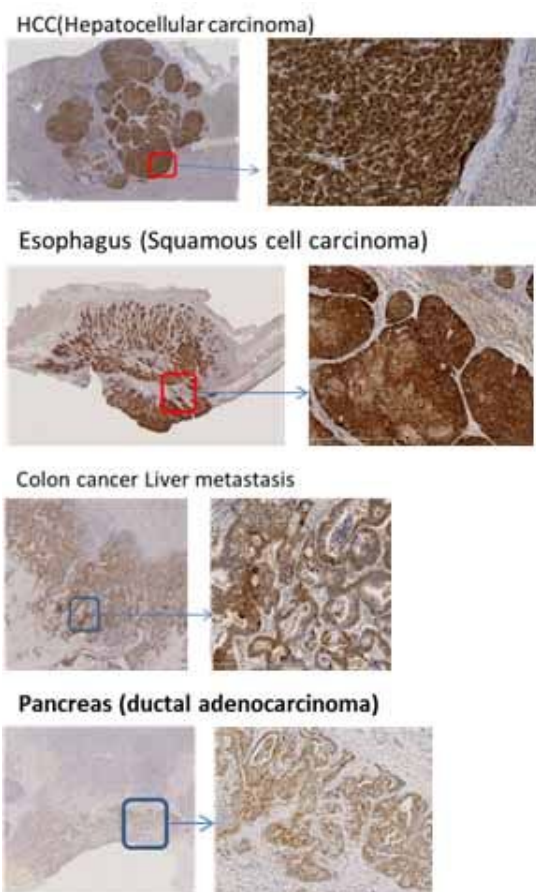


図 4. 癌腫における HSP70 発現

以上の結果をもとに、進行・再発固形癌(肝細胞癌、食道扁平上皮癌、胃癌、大腸癌、膵腺管癌、乳癌)に対する HSP70 由来ペプチド、組み換え可溶性ヒト LAG-3 Ig 融合タンパク質、poly(I:C) を併用した複合免疫療法の First in Human の臨床試験を平成 28 年 1 月から開始した。これまでに施行の 4 例において、重篤な副作用は認められず、1 例で病勢のコントロールが得られている。

### 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 8 件)

Yoshinari Maeda, Kiyoshi Yoshimura, Hiroto Matsui, Yoshitaro Shindo, Takao Tamesa, Yukio Tokumitsu, Noriaki Hashimoto, Yoshihiro Tokuhisa, Kazuhiko Sakamoto, Kouhei Sakai, Yutaka Suehiro, Yuji Hinoda, Koji Tamada, Shigefumi Yoshino, Shoichi Hazama, Masaaki Oka. Dendritic cells transfected with heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a phase 1 dose escalation clinical trial. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 64: 1047-56 (2015), 査読有, doi: 10.1007/s00262-015-1709-1.

Hiroko Ideo, Yuji Hinoda, Kohei Sakai, Ikue Hoshi, Shigeru Yamamoto, Masaaki Oka, Kazunari Maeda, Noriko Maeda, Shoichi Hazama, Junko Amano, Katsuko Yamashita. Expression of mucin 1 possessing a 3 -sulfated core1 in recurrent and metastatic breast cancer. *International Journal of Cancer*, 137: 1652-60 (2015), 査読有, doi: 10.1002/ijc.29520.

Shinsuke Kanekiyo, Norio Iizuka, Ryouichi Tsunedomi, Yukio Tokumitsu, Noriaki Hashimoto, Yoshihisa Tokuhisa, Yoshinari Maeda, Michihisa Iida, Kazuhiko Sakamoto, Takao Tamesa, Yusuke Fujita, Shigefumi Yoshino, Shoichi Hazama, Yoshihiko Hamamoto, Masaaki Oka. Preoperative Serum Methylation Signature as Prognostic Tool After Curative Hepatectomy in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Research*, 35: 997-1007 (2014), 査読有, doi: なし.

Noriaki Hashimoto, Ryouichi Tsunedomi, Kiyoshi Yoshimura, Yusaku Watanabe, Shoichi Hazama, and Masaaki Oka. Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. *BMC Cancer*, 14: 722 (2014), 査読有, doi: 10.1186/1471-2407-14-722.

Shoichi Hazama, Hiroko Takenouchi, Ryouichi Tsunedomi, Michihisa Iida, Nobuaki Suzuki, Norio Iizuka, Yuka Inoue, Kazuhiko Sakamoto, Mitsuhiro Nakao, Yoshitaro Shindo, Shinsuke Kanekiyo, Yukio Tokumitsu, Kiyoshi Yoshimura, Noriko Maeda, Kazunari Maeda, Yoshinari

Maeda, Hiroto Matsui, Shigefumi Yoshino, Yusuke Nakamura, Yusuke Fujita, Yoshihiko Hamamoto, Masato Okamoto, Tomonobu Fujita, Yutaka Kawakami, and Masaaki Oka. Predictive Biomarkers for the Outcome of Vaccination of Five Therapeutic Epitope Peptides for Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 34: 4201-5 (2014), 査読有, doi: なし.

Yoshitaro Shindo, Shoichi Hazama, Yoshinari Maeda, Hiroto Matsui, Michihisa Iida, Nobuaki Suzuki, Kiyoshi Yoshimura, Tomio Ueno, Shigefumi Yoshino, Kohei Sakai, Yutaka Suehiro, Takahiro Yamasaki, Yuji Hinoda, Masaaki Oka. Adoptive immunotherapy with MUC1-mRNA transfected dendritic cells and cytotoxic lymphocytes plus gemcitabine for unresectable pancreatic cancer. *Journal of Translational Medicine*, 12: 175 (2014), 査読有, doi: 10.1186/1479-5876-12-175.

Shoichi Hazama, Yusuke Nakamura, Hiroaki Tanaka, Kosei Hirakawa, Ko Tahara, Ryoichi Shimizu, Hiroaki Ozasa, Ryuichi Etoh, Fumiaki Sugiura, Kiyotaka Okuno, Takumi Furuya, Taku Nishimura, Koichiro Sakata, Kazuhiko Yoshimatsu, Hiroko Takenouchi, Ryouichi Tsunedomi, Yuka Inoue, Shinsuke Kanekiyo, Yoshitaro Shindo, Nobuaki Suzuki, Shigefumi Yoshino, Hirokazu Shinozaki, Akira Kamiya, Hiroyuki Furukawa, Takeharu Yamanaka, Tomonobu Fujita, Yutaka Kawakami, Masaaki Oka. A phase II study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *Journal of Translational Medicine*, 12: 108 (2014), 査読有, doi: 10.1186/1479-5876-12-108.

Shoichi Hazama, Yusuke Nakamura, Hiroko Takenouchi, Nobuaki Suzuki, Ryouichi Tsunedomi, Yuka Inoue, Yoshihiro Tokuhisa, Norio Iizuka, Shigefumi Yoshino, Kazuyoshi Takeda, Hirokazu Shinozaki, Akira Kamiya, Hiroyuki Furukawa, Masaaki Oka. A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome. *Journal of Translational Medicine*, 12: 63 (2014), 査読有, doi: 10.1186/1479-5876-12-63.

[学会発表](計15件)

恒富 亮一: 肝転移能亢進を示す癌幹細胞様細胞における分子標的の探索; 第26回

日本消化器癌発生学会総会、2015年11月20日、米子全日空ホテル(鳥取県・米子市)  
Shoichi Hazama: miR expression of the tumor might be a predictive biomarker for the efficacy of peptide vaccine for colorectal cancer; 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月10日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Ryouichi Tsunedomi: Up-regulation of antioxidant ability and HIF1 regulated genes in hepatocellular carcinoma stem-like sphere cells; 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Satoshi Matsukuma: Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem like cells; 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

恒富 亮一: Cancer-stem like 細胞の解析による術後肝内再発抑制に向けた分子標的の探索; 第24回癌病態治療研究会、2015年6月26日、日光千姫物語(栃木県・日光市)

恒富 亮一: 肝細胞癌細胞株より誘導した癌幹細胞様細胞における肝転移能; 第25回日本消化器癌発生学会総会、2014年11月13日、ホテル日航福岡(福岡県・福岡市)

飯田 通久: 肝細胞癌におけるMCM6の発現は予後と関連する; 第25回日本消化器癌発生学会総会、2014年11月13日、ホテル日航福岡(福岡県・福岡市)

恒富 亮一: 低分型ヒト肝細胞癌細胞株から誘導培養した癌幹細胞様細胞の解析; 第22回日本消化器関連学会週間(JDDW2014)、2014年10月26日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

Ryouichi Tsunedomi: CANCER STEM-LIKE SPHERE CELLS INDUCED FROM DE-DIFFERENTIATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA-DERIVED CELL LINES EXERTS LIVER METASTATIC POTENTIAL AND CHEMORESISTANCE; 22nd United European Gastroenterology Week (UEGW2014), 2014年10月22日、Vienna (AUSTRIA)

Ryouichi Tsunedomi: Induced cancer stem-like sphere cells from de-differentiated human hepatocellular carcinoma cell lines; 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

松井 洋人: 肝細胞癌(HCC)に対するHSP70-mRNA導入樹状細胞療法; 第18回日本がん免疫学会総会、愛媛、2014年7月31日、ひめぎんホール(愛媛県・松山市)

Shoichi Hazama: Biomarkers for immunotherapy: Results from the analysis of a HLA-A-status double-blind, biologically-randomized phase II study



of five therapeutic epitope-peptides with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study); 第18回日本がん免疫学会総会、愛媛、2014年7月31日、ひめぎんホール(愛媛県・松山市)  
恒富 亮一: 抗癌剤耐性を示すヒト肝細胞癌細胞株から誘導した癌幹細胞様細胞; 第69回消化器外科学会総会、2014年7月17日、福島郡山総合体育館(福島県・郡山市)  
恒富 亮一: ヒト肝細胞癌細胞株から誘導した癌幹細胞様細胞の解析; 第23回癌病態治療研究会、2014年6月12日、ホテルグランヴェール岐山(岐阜県・岐阜市)  
飯田 通久: 肝細胞癌切除後予後予測マーカーとしてのMinichromosome maintenance complex component 6発現の意義; 第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月4日、京都国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: ペプチドワクチン療法の効果予測方法  
発明者: 碓 彰一、岡 正朗、恒富 亮一、竹之内 寛子、浜本 義彦、藤田 悠介  
権利者: 山口大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-99682  
出願年月日: 2014年5月13日  
国内外の別: 国内

名称: HSP70由来のペプチド、これを用いた癌の治療又は予防のための医薬組成物、免疫誘導剤、及び抗原提示細胞の製造方法  
発明者: 岡 正朗、碓 彰一、恒富 亮一、玉田 耕治  
権利者: 日本電気株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-206730  
出願年月日: 2014年10月7日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡 正朗(OKA, Masaaki)

山口大学・学長

研究者番号: 70144946

### (2) 研究分担者

吉村 清(YOSHIMURA, Kiyoshi)

国立がん研究センター・先端医療開発センター・免疫療法開発分野・分野長

研究者番号: 30346564

### (2) 研究分担者

恒富 亮一(TSUNEDOMI, Ryouichi)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10420514