

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26870462
研究課題名(和文) ヒト乳頭腫ウイルス 関連頭頸部癌における樹状細胞を用いた新規ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of new immunotherapy using a dendritic cell in human papilloma virus-related head and neck cancer

研究代表者
上原 貴行 (UEHARA, Takayuki)
琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00644402
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はHPV(ヒト乳頭腫ウイルス)関連の頭頸部癌を対象にした新規治療の開発を目的とし、樹状細胞(DC)を用いたがんワクチン治療の研究を行った。本研究に参加同意を得たボランティアおよび頭頸部癌患者より得た血液より樹状細胞(CD14陽性細胞)、細胞障害性Tリンパ球(CTL)を抽出、HPV6、E7抗原に由来するHLA*A24拘束性ペプチドにより抗原特異的刺激を行った樹状細胞ワクチンをin vitroに作製した。また当科で所有しているHPV16感染頭頸部癌細胞株(UMSCC-047、HSC4細胞株)に、in vitro下に曝露し有用性を継続し検討している。

研究成果の概要(英文)：We had experimented for development of the new treatment to HPV (human papilloma virus) related head and neck cancer. We had experimented to establish cancer vaccine therapy using a dendritic cell (DC). A dendritic cell (CD14 positive cell) and cytotoxic T lymphocytes (CTL) were extracted from the blood which we got from the volunteer and head and neck cancer patients who were taken participation consent in this research and we made DC vaccines which were stimulated antigen-specifically by HLA*A24 binding peptides which derives from HPV6, E7 antigen in vitro. In addition, we research the antitumor effect by antigen specific DC Vaccine to HPV16 infected head and neck cancer cell-lines (UMSCC-047 and HSC4 cell line) which own our laboratory, and we were continuously analyzed.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科学

キーワード：頭頸部癌 ヒト乳頭腫ウイルス 樹状細胞ワクチン 免疫治療

1. 研究開始当初の背景

がん抗原の存在は、2001年に悪性黒色腫におけるMAGE-1の発見に端を成し、以来CD8陽性キラーT細胞およびCD4陽性ヘルパーT細胞により認識され、がんに対し細胞障害性の免疫応答を誘導する上では各がん抗原において種々の抗原提示細胞によって認識されるヒト組織適合抗原(Human lymphocyte antigen:以下HLA)が拘束性をもつエピトープ(ペプチド配列)が重要となる。また、頭頸部領域ではヒト乳頭腫ウイルス(HPV)感染から生じるHPV関連癌が増加していることから、HPVにターゲットを絞った低侵襲治療の研究・開発は重要であり、我々はHPVの腫瘍ながん遺伝子であるE6/E7の遺伝子産物が癌細胞内で恒常的な発現を認めることに着目し、これを癌免疫治療の理想的な標的となりうると考えた(図1)。

さらに近年の細胞培養技術の進歩により、試験管レベルでの抗原刺激免疫担当細胞の培養・増殖が可能となってきた。特に樹状細胞(Dendritic cell:以下DC)はがん免疫において抗原提示能を有しその中心的役割を担っており、がん免疫ワクチン治療の重要なツールとなっている。HPV関連癌として先行する子宮頸癌の研究領域においてはE6/E7抗原を主とするHPV関連抗原特異的なDCワクチンの開発研究が行われており、特異的CTLの誘導やマウス腫瘍モデル等での抗腫瘍効果を示した報告が散見される。一方で、HPV頭頸部癌を対象としたDCワクチンによる免疫治療についての報告は現状で未だ確認されない。

2. 研究の目的

前述のとおり未だHPV頭頸部癌を対象とした免疫治療についての研究や臨床応用は進んでいないことから、我々は新たに有効な免疫療法の開発、特にDCワクチンの開発研

究を想起した。前述したHLA拘束性を考慮し、**日本人に最多(約35%)とされるHLA*A24に拘束性をもつHPV E6/E7抗原ペプチド配列に対し特異性をもつDCワクチン**を開発すべく、過去の知見から報告されている候補となるペプチド配列(図2)を標的とした活性化DCの作製を行った。

図2. HLA拘束性から見たHPV E6/E7関連ペプチド候補

HLA拘束性	Peptide配列
-HLA-A*2402	HPV16E6(49-57) (82-90) (87-95) (98-106) HPV16E7(61-69) (67-76)
-HLA-A*0201	HPV16E7(11-20) (82-90) (86-93)
-HLA DR15	HPV16E7(43-62) (48-62)
-HLA DR4 or 15	(1-12) (62-75)

3. 研究の方法

HPV16 E6/E7抗原特異的DCワクチンの作製、開発

HLA*A24陽性患者 or ボランディアの抽出

当科にて治療した頭頸部癌患者においてHPV関連癌であることが証明された患者の中から本研究において参加および血液検体の提供の同意文書(臨床研究倫理審査承認済み)に了承を得た患者およびボランディアの血液を2ml採取し、外注委託でPCR-rSSO法によりHLAタイピング解析を行い、HLA*A24の発現につき検討した。ボランディア5例中2例で陽性であった、一方で頭頸部癌患者において2例中該当者は認めなかった。現在も症例を追加し検討を継続している。ボランディアの陽性例2例の血液を用いて次項のDCワクチンの作製を行った。(現在も頭頸部癌対象症例での解析は継続中である)

HLA 拘束性 HPV16 型 E6、E7 抗原ペプチドの合成

上述の図 2 にて過去の報告より HLA*A24 拘束性が確認された HPV16 型 HPVE6,E7 蛋白中のペプチド配列を外注委託（スクラム社）において各種人工的に合成を行った。

抗原特異的 DC ワクチンの作製

上述した対象者から採取した末梢血(20ml)より、Ficoll 密度勾配遠心法を用いて末梢血単核球細胞（PBMC）を抽出した。

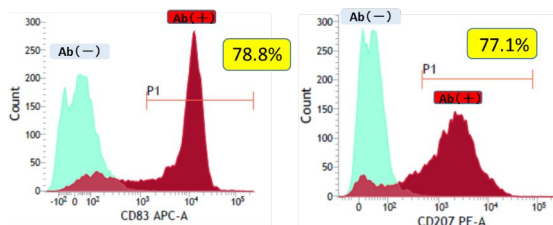
PBMC を MACS beads システムを用い、磁気ビーズ・カラム抽出法（Positive selection）により CD14 陽性細胞を抽出した。同時に PBMC より CD8 陽性細胞も同様に抽出した。CD14細胞はDCへの分化のため、RPMI1640 培地に GM-CSF(100ng/ml)、IL-4(100ng/ml) を添加した培地で 5 日間培養（培地は 2 日おきに交換）。その後成熟化 DC を誘導するために、前述の培地に TNFα(10ng/ml)、IL-1β(10ng/ml)、IL-6 (1000U)、PGE2 (1μg/ml)を添加し、また上記で作成したペプチドを同時に添加し 48 時間（2 日間）の培養を行い抗原特異的な成熟化 DC を作成した。

4. 研究成果

抗原特異的 DC ワクチンの作製

成熟化の有無については、成熟化 DC の表面マーカーである CD83,CD207 の発現誘導により確認を行った(図 3)。なお、先に抽出した CD8陽性細胞は一旦 Cell banker 保存液により 80 に保存した。

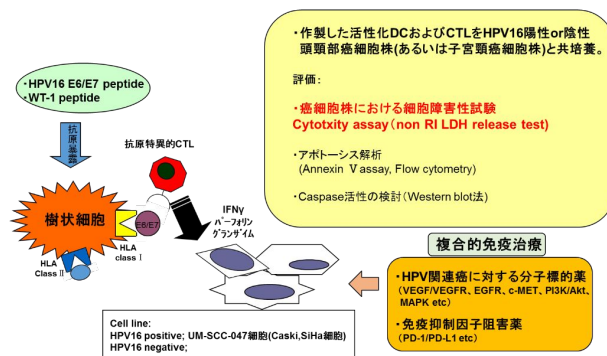
図3. 成熟化DC表面マーカーの発現



HPV16E6/E7 抗原特異的 DC ワクチンによる HPV 関連頭頸部癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検証

当科で所有しているヒト頭頸部癌細胞株において HLA 発現状況を前述した PCR-r SSO 法を用いた HLA タイピング解析を行った。HPV16 型陽性頭頸部癌 5 細胞株および子宮頸癌 1 細胞株で検討した結果、頭頸部癌細胞株のうち HSC4 株で HLA*A24 の発現がみられ、また UM-SCC 047 株において高い相同性をもつ HLA*A23 の発現を認めた。これらを対象に上記で作成した抗原特異的 DC ワクチンによる有効性、抗腫瘍効果の有無を検討することとした。96Well plate に各種細胞株を散布し、抗原特異的 DC および CTL (CD8 陽性細胞) を添加し in vitro 下で共培養を行ったのち LDH 放出試験 (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) において有効性を検討している。現在条件設定を行い、検討を継続している。今後の研究予定として Cytotoxic assay に加えて、アポトーシス解析 (Annexin assay、Caspase 活性) また他の分子標的薬や免疫抑制因子阻害剤との複合的治療についても検討を予定している。(以下 Figure)

特異的DCおよびCTLによる抗腫瘍効果の検討 (in vitro)



引用文献

Satoko Morishima et al, ' Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-c on the presentation of a cryptic epitope. ' Int. J. Cancer: 120, 594-604 (2006).

Rahma et al. 'Pre-immature dendritic cells (PIDC) pulsed withHPV16 E6 or E7 peptide are capable of eliciting specific immune response in patients with advanced cervical cancer.' Journal of Translational Medicine 2014, 12:353.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕
特記なし

6. 研究組織
(1)研究代表者

上原 貴行 (UEHARA, Takayuki)

琉球大学 医学部附属病院・助教

研究者番号 00644402