

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 20日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究B

研究期間：2008～2011

課題番号：20390403

研究課題名（和文） 骨軟部肉腫の新規腫瘍抗原を標的としたペプチドワクチン療法の開発

研究課題名（英文） Development of peptide vaccination targeting novel musculoskeletal sarcoma antigens

研究代表者

和田 卓郎（WADA TAKURO）

札幌医科大学・道民医療推進学講座・特任教授

研究者番号：00244369

研究成果の概要（和文）：

滑膜肉腫と骨肉腫のペプチドワクチン療法の第I相臨床試験を行った。滑膜肉腫では試験が終了し、治療の安全性、特異的免疫の誘導、抗腫瘍効果が確認された。骨肉腫では試験を継続中である。

ヒト悪性線維性組織球腫、類上皮肉腫の細胞株からそれぞれの肉腫幹細胞株の分離に成功した。同時に、悪性線維性組織球腫幹細胞を特異的に認識傷害する自家T細胞クローンを樹立した。幹細胞を標的とした免疫療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We performed phase I clinical peptide vaccination trials for patients with disseminated synovial sarcoma or osteosarcoma. For synovial sarcoma, the trial was completed and the safety and efficacy of SYT-SSX peptide vaccination was confirmed. For osteosarcoma, the trial is continued.

We identified cancer-stem like cells from malignant fibrous histiocytoma of the bone and epithelial sarcoma. Furthermore, we established autologous cytotoxic T-lymphocyte clone recognizing cancer-stem like cells in the context of HLA class I. These observations open the door toward immunotherapy targeting cancer-stem like cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：①分子標的治療 ②骨軟部肉腫 ③癌ワクチン ④ペプチド

1. 研究開始当初の背景

外科手切除、化学療法、放射線照射による骨軟部肉腫の治療成績はすでに限界に達している。治療成績を飛躍的に向上させるため

には、分子標的治療を開発する以外に方法はない。骨軟部肉腫に最も有望な分子標的治療は、ペプチドワクチン療法である。ペプチドワクチン療法では、腫瘍細胞が産生する腫瘍

抗原を抗原ペプチドとして皮下投与する。抗原刺激によって生体内の抗原特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T-lymphocyte: CTL) を増殖・活性化させて腫瘍を縮小させる。腫瘍抗原ペプチドを分子標的とした新しい癌免疫療法である。化学療法に比べ副作用が極めて少ないのが大きな利点である。

我々は、骨軟部肉腫の新規腫瘍抗原を同定し、それを用いたペプチドワクチン療法の臨床試験に取り組んできた。

2. 研究の目的

(1)自ら同定した腫瘍抗原ペプチドを分子標的とした、滑膜肉腫と骨肉腫に対するペプチドワクチン療法の第1相臨床試験を実施する。抗原ペプチドの毒性、腫瘍免疫誘導能、腫瘍縮小効果を明らかにする。さらにペプチドワクチンの最適な投与量、投与方法を決定し、第2相、第3相臨床試験の基盤を作る。

(2)すでに樹立した骨軟部肉腫の細胞株から癌幹細胞を分離し、骨軟部肉腫の癌幹細胞抗原を同定する。癌幹細胞を標的としたより有効なペプチドワクチンを同定する。

3. 研究の方法

(1) 滑膜肉腫の第1相臨床試験

評価病変を持ち、SYT-SSX を発現する進行期滑膜肉腫患者を対象とした。滑膜肉腫特異的転座融合遺伝子 SYT-SSX 由来の HLA-A24 拘束性ペプチド (GYDQIMPCK; B ペプチド) およびアグレートブ改変ペプチド (GYDQIMPCKI; K9I ペプチド) を GMP グレードで合成した。ペプチドは 1mg/mL を不完全フロイントアジュバント (IFA) 1mL と共に患者皮下に接種した。またインターフェロン α (IFN α) 300 万単位を 2 回/週接種した。抗腫瘍効果は評価病変の CT 像を RECIST によって評価した。また患者免疫応答は患者末梢血単核球をペプチドと *in vitro* で共培養したのちに、HLA/ペプチドテトラマーによって評価した。

(2) 骨肉腫の抗原ペプチドの決定と第1相臨床試験

PBF の全アミノ酸配列 (513aa) より BIMAS によって HLA-A24 および HLA-A2 に結合するペプチド配列を予測して、それぞれ 10 種類ずつ合成した。*in vitro* における HLA 分子との結合力を HLA peptide stabilization assay によって検討した。もっとも強い結合力を持つペプチドを用いてテトラマーを合成した。そして骨肉腫患者末梢血単核球を限界希釈環境化にペプチドで *in vitro* 刺激し、テトラマー陽性細胞を検出した。また HLA-A2 拘束性テトラマー陽性細胞は FACS Aria II を

用いて single cell sorting を行って CTL clone を作製した。テトラマー陽性 CTL のペプチド特異性および骨肉腫細胞株に対する反応性は 51Cr 細胞傷害性試験で検討した。また上記により同定された HLA-A24 および HLA-A2 拘束性 PBF ペプチドを GMP グレードで合成した。評価病変を持ち、PBF を発現する進行期骨肉腫患者を対象としてペプチドワクチンの第1相臨床試験を行った。ペプチドは 1mg または 10mg を IFA 1mL とエマルジョンを行い、患者皮下に 1 回/2 週で接種した。

(3) ヒト骨肉腫細胞株 7 種、骨 MFH 細胞株 (MFH2003) 1 種を用いて、side population (SP) 法によって高い Hoechst 色素排出能をもつ細胞集団を SP 細胞として、SP 細胞以外の細胞集団は main population (MP) 細胞とした。SP 細胞及び MP 細胞をセルソーターで分離し、*in vitro* での細胞増殖能を spherical colony formation assay で検討した。*in vivo* における造腫瘍能を NOD/SCID マウスを用いた xenograft model で検討した。

ヒト類上皮肉腫の生検組織より新しい細胞株 ES-X を樹立した。ES-X を用いて ALDEFLUOR 法によって ALDH+細胞と ALDH-細胞を同定して、それぞれの集団をセルソーターを用いて分離し、*in vivo* における造腫瘍能を NOD/SCID マウスを用いた xenograft model によって検討した。また ALDH+細胞と ALDH-細胞より RNA を抽出して、cDNA マイクロアレイを用いた gene profiling を行った。

4. 研究成果

(1) 滑膜肉腫の第1相臨床試験

登録症例数が予定の 21 例に達し、試験を終了した。有害事象として、発熱が 14 例、脳出血が 1 例に認められた。ペプチド特異的 CTL の誘導は 7 例 (33%) に認められた。抗腫瘍効果に関しては、7 例 (33%) が SD、14 例 (67%) が PD であった。1 例で 48% の腫瘍縮小が認められ (図 1)、2 例で 4 年以上の長期生存が得られた。SD 症例はいずれも腫瘍径が 10mm 以下の症例であった。国内外初の成果であり、ペプチドワクチンを術後補助療法として用いる、第2相臨床試験を多施設共同で計画している。

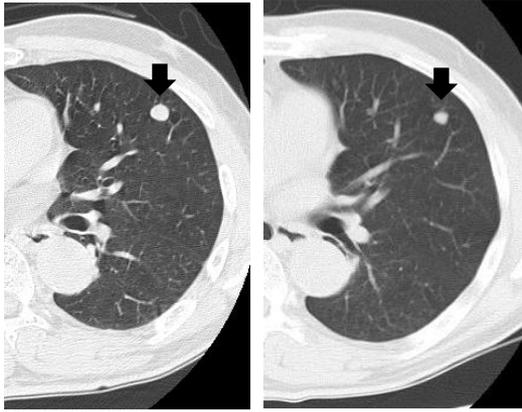


図1. SYT-SSX ペプチドワクチンの抗腫瘍効果。投与前(左)に比べ4回投与後(右)に肺転移病巣(矢印)に48%の縮小が認められた。

(2) 骨肉腫の抗原ペプチドの決定と第1相臨床試験

HLA 分子結合能、細胞傷害性より HLA-A24 拘束性 PBF A24.2 (AYRPVSRNI) および HLA-A2 拘束性 PBF A2.2 (ALPSFQIPV) を選択した。進行期骨肉腫患者に対するペプチドワクチン療法の第 I 相臨床試験を本学 IRB の承認下に開始した。A24.2 ペプチド投与例 4 例、A2.2 ペプチド投与例 1 例が登録された。有害事象として発熱が 1 例に、白血球減少が 1 例に認められた。抗腫瘍効果は SD が 1 例、PD が 4 例であった。今後さらに症例を増やして臨床効果を検討するとともに、免疫モニタリングによる免疫応答を検討していく。

(3) 骨 MFH 細胞株(MFH2003)において、5%程度の SP 細胞が観察された。分離した SP 細胞は in vitro においてコロニー系性能を持ち、xenograft において MP 細胞より高い造腫瘍能を示した。そして、MFH2003 より分離した SP 細胞に放射線照射を行って、自家末梢血単核球と共培養することで、SP 細胞を特異的に認識する自家 CTL クローンの誘導を行った。CTL クローン Tc4c-6 は SP 細胞を特異的に傷害し、この反応は抗 HLA class I 抗体によって抑制された。癌幹細胞が自家 CTL クローンによって HLA class I 分子拘束性に認識されることを世界で初めて示した。そして自家 CTL クローンに認識される癌幹細胞抗原が存在することがわかった。今後、CTL クローンより T 細胞受容体をクローニングして人工 CTL を作製して自家 CTL クローンが認識する癌幹細胞抗原の同定を進めていく。

また ES-X には癌幹細胞を含有すると言われる ALDH+細胞が存在した。分離した ALDH+細胞は xenograft model にて造腫瘍能を示した。また ALDH+細胞と ALDH-細胞を用いた gene profiling の結果、ALDH+細胞では CD109 が強く発現していることがわかった。CD109 が類

上皮肉腫における癌幹細胞マーカーをなる可能性がある。また新しい治療標的分子となり得る可能性がある。

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 23 件)

① Yabe H, Tsukahara T, Kawaguchi S, Wada T, Torigoe T, Sato N, Terai C, Aoki M, Hirose S, Morioka H, Yabe H. Prognostic significance of HLA class I expression in Ewing's sarcoma family of tumors. *J Surg Oncol* 2011, 103: 380-385.(査読有)

② Kano M, Tsukahara T, Emori M, Masaki Murase, Torigoe T, Kawaguchi S, Wada T, Yamashita T, Sato N. Autologous CTL response against cancer stem-like cells/cancer-initiating cells of bone malignant fibrous histiocytoma *Cancer Sci* 2011, 102: 1443-1447. (査読有)

③ Murase M, Kano M, Tsukahara T, Takahashi A, Torigoe T, Kawaguchi S, Kimura S, Wada T, Uchihashi Y, Kondo T, Yamashita T, Sato N. Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas. *Br J Cancer* 2009, 101: 1425-1432. (査読有)

④ Tsukahara T, Kimura S, Ichimiya S, Torigoe T, Kawaguchi S, Wada T, Yamashita T, Sato N. Scythe/BAT3 regulates apoptotic cell death induced by papillomavirus binding factor in human osteosarcoma. *Cancer Sci* 2009, 100: 47-53. (査読有)

⑤ Tsukahara T, Kawaguchi S, Torigoe T, Murase M, Wada T, Kaya M, Nagoya S, Yamashita T, Sato N. HLA-A*0201-restricted CTL epitope of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor. *J Transl Med* 2009, 7:44. (査読有)

⑥ Yabe H, Tsukahara T, Kawaguchi S, Wada T, Sato N, Morioka H, Yabe H. Overexpression of papillomavirus binding factor in Ewing's sarcoma family of tumors conferring poor prognosis.

Oncol Rep 2008, 19: 129-134. (査読有)

⑦Kimura S, Kozakai Y, Kawaguchi S, Tsukahara T, Ida K, Murase M, Matsumura T, Kaya M, Torigoe T, Wada T, Sato N, Yamashita T. Clonal T-cell response against autologous pleomorphic malignant fibrous histiocytoma antigen presented by retrieved HLA-A*0206. J Orthop Res 2008, 26: 271-278. (査読有)

⑧Tsukahara T, Torigoe T, Tamura Y, Wada T, Kawaguchi S, Tsuruma T, Hirata K, Yamashita T, Sato N. Antigenic peptide vaccination: Provoking immune response and clinical benefit for cancer. Curr Immunol Rev 2008, 4: 235-241. (査読有)

⑨Tsukahara T, Kawaguchi S, Torigoe T, Kimura S, Murase M, Ichimiya S, Wada T, Kaya M, Nagoya S, Ishii T, Tatezaki S, Yamashita T, Sato N. Prognostic impact and immunogenicity of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor, in patients with osteosarcoma. Cancer Sci 2008, 99: 368-375. (査読有)

[学会発表] (計 40 件)

①塚原智英, 鳥越俊彦, 佐藤昇志, 和田卓郎: Generation of TCR-like antibody against HLA/peptide complex of an osteosarcoma antigen PBF 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋

②塚原智英, 佐藤昇志, 嘉野真允, 江森誠, 山下敏彦, 和田卓郎: 骨軟部肉腫における癌幹細胞を標的とする免疫療法「パネルディスプレイ I 幹細胞研究の骨・軟部腫瘍学への応用」第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会, 2011 年 7 月 14-15 日, 京都

③Tomohide Tsukahara, Shigeharu Kimura, Shingo Ichimiya, Satoshi Kawaguchi, Masanobu Kano, Takuro Wada, Toshihiko Torigoe, Toshihiko Yamashita, Noriyuki Sato. Scythe/BAT3 regulates apoptotic cell death induced by the osteosarcoma antigen PBF in human osteosarcoma 16th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2010 Nov 11-13, Paris,

④塚原智英, 川口哲, 和田卓郎, 名越智, 加谷光規, 嘉野真允, 山下敏彦, 鳥越俊彦, 佐藤昇志: HLA-A2 拘束性骨肉腫抗原 PBF ペプチドに対する基礎的研究と第 1 相臨床試験第 24 回

日本整形外科学会基礎学術集会, 2009 年 11 月 5-6 日, 横浜

⑤塚原智英, 木村重治, 川口哲, 嘉野真允, 和田卓郎, 山下敏彦, 一宮慎吾, 鳥越俊彦, 佐藤昇志: Scythe/BAT3 は PBF に誘導される AIF 依存的な骨肉腫の細胞死を制御する第 42 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会, 2009 年 7 月 16-17 日, 横浜

⑥塚原智英, 川口哲, 嘉野真允, 和田卓郎, 山下敏彦, 鳥越俊彦, 高橋あかり, 佐藤昇志 Characterization and clinical vaccination study of HLA-A*0201-restricted epitope of the osteosarcoma antigen PBF 第 13 回日本がん免疫学会総会, 2009 年 6 月 24-25 日, 北九州

⑦Wada T, Kawaguchi S, Tsukahara T, Ida K, Murase M, Nagoya S, Kaya M, Torigoe T, Sato N, Yamashita T. The third vaccination trial of SYT-SSX junction peptide in patients with disseminated synovial sarcoma. 14th Annual CTOS Meeting, November 13-15, 2008, London

⑧塚原智英, 木村重治, 川口哲, 和田卓郎, 山下敏彦, 一宮慎吾, 鳥越俊彦, 佐藤昇志: Scythe/BAT3 regulates apoptotic cell death induced by papillomavirus binding factor in human osteosarcoma. 第 67 回日本癌学会総会, 2008 年 10 月 28 日-30 日, 名古屋

⑨塚原智英, 川口哲, 村瀬正樹, 和田卓郎, 名越智, 加谷光規, 山下敏彦, 鳥越俊彦, 佐藤昇志: 新規骨肉腫抗原 PBF 由来ペプチドに対する HLA-A2 陽性骨肉腫患者の免疫応答. 第 41 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会, 2008 年 7 月 17-18 日, 浜松市

[図書] (計 3 件)

加谷光規, 和田卓郎. 傍骨性骨肉腫. 矢部啓夫編. アトラス骨・関節画像診断 骨軟部腫瘍. 東京: 中外医学社 2010:14-5.

和田卓郎. 骨軟骨腫, 内軟骨腫, 単純性骨嚢腫. 山口徹, 北原光夫, 福井次矢, 編. 今日の治療指針 2011 年版. 東京: 医学書院 2011:984.

[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）

①名称：腫瘍抗原ペプチド及びその利用。
発明者：佐藤昇志，塚原智英，川口哲，和田卓郎
権利者：佐藤昇志，塚原智英，川口哲，和田卓郎
種類：
番号：特願 2008-270078
取得年月日：2008年10月20日
国内外の別：国内

②名称：Tumor antigen peptide and use thereof.
発明者：佐藤昇志，塚原智英，川口哲，和田卓郎
権利者：佐藤昇志，塚原智英，川口哲，和田卓郎
種類：
番号：09822007.2-2403 PCT/JP2009068013
取得年月日：2011年6月29日
国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等
<http://web.sapmed.ac.jp/orsurg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 卓郎 (WADA TAKURO)
札幌医科大学・道民医療推進学講座・特任教授
研究者番号：00244369

(2) 研究分担者

山下 敏彦 (YMASHITA TOSHIHIKO)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：70244366

佐藤 昇志 (SATO NORIYUKI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50158937