

機関番号：31201  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591864  
 研究課題名(和文) 上部尿路上皮癌に対する腫瘍抗原遺伝子由来エピトープペプチド腫瘍の特異ワクチン療法  
 研究課題名(英文) Tumor-specific vaccine therapy using the epitope peptide derived from a tumor antigen gene for the upper urinary tract cancer  
 研究代表者  
 藤岡 知昭 (FUJIOKA TOMOAKI)  
 岩手医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：80173409

研究成果の概要(和文)：上部尿路上皮癌では stage および grade 非依存性に新規腫瘍抗原 MPHOSPH1 および DEPDC1 蛋白は高い割合で発現していた。上部尿路上皮癌に対するペプチドワクチンの投与は安全であり、術後再発予防として有用である。その抗腫瘍効果には、TIL が関与している。

研究成果の概要(英文)： We were stage and grade-independent, and novel tumor antigen MPHOSPH1 and DEPDC1 protein high frequently expressed in the upper urinary tract cancer with stage and grade-independent. The peptide vaccine treatment for the upper urinary tract cancer is safe and is useful as postoperative prevention of recurrence. TIL is involved in the antitumor effect.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：上部尿路上皮癌、腫瘍特異的、ペプチドワクチン、個別化医療

## 1. 研究開始当初の背景

上部尿路上皮癌の標準治療は、腎尿管摘除術であるが、リンパ管浸潤・リンパ節転移が高率にみられ、術後膀胱内再発も認められる。術後補助療法として MVAC 等の化学療法が追加されることが多いが、その有効性は不確実であり、重篤な副作用が問題となる。したがって、再発予防を目的とした新たな補助療法の開発は急務である。

癌ワクチン療法の歴史は、1991年、Boon

博士らにより腫瘍特異抗原の発見にもとに、1995年、悪性黒色腫でのペプチド療法が開始されたが、高度進行性癌患者では、ワクチンによる免疫反応は惹起されるものの奏効率は数%であり悲観的な見方がされてきた。近年、乳癌および肺癌に対する術後アジュバント療法の有効性が報告され、再発予防という新たな観点からの癌ワクチン療法の可能性が展開されている。2006年、米国サンアント

ニオ国際乳癌学会において、Pooke GE は、再発性の高い乳癌患者に HER/new 遺伝子由来ペプチドワクチン療法を施行し、平均 24 カ月の術後経過観察において、対照群で 16.0%に対して、投与群で 8.6%と再発率が半分であったことを報告した。また、2007 年、米国癌学会において、Vincent G らは、肺癌患者に MAGE3 を抗原としたワクチン療法を施行し、病期 II においては対照群で 57.0%に対して、投与群で 30.0%と半減できたことを報告した。これらの知見は、ワクチン療法が再発予防の戦術となるという方向性を支持するものである。

私どもは、マイクロアレイ法による 32,000 の遺伝子情報から、膀胱癌に高頻度に高発現している新規遺伝子として MPHOSP1 および DEPC1 の新規腫瘍抗原遺伝子を同定した。前者は、10 番染色体長腕に存在し 1,781 個のアミノ酸から、後者は 1 番染色体短腕に位置し 812 個のアミノ酸よりなる。ともに、腫瘍細胞の核に局在し、正常細胞では精巣以外に発現していなく、膀胱癌細胞の増殖に関与していることが解明している。これら遺伝子由来で HLA-A2402 に結合能を持ち、MPHOSP1 および DEPC1 を認識・傷害する CTL を誘導できるペプチドワクチンの同定・開発に成功し、膀胱癌症例において、このエピトープペプチドワクチンの安全性を確認する Phase I 臨床研究を終了しており、表在性膀胱癌再発に対する効果を検討する Phase II 臨床研究が進行中である。

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)は、生体における腫瘍拒絶免疫反応のひとつと考えられ、TIL を大量に培養し養子移入する治療法も細胞療法として施行されてきた。この TIL の解析はワクチン療法の抗腫瘍作用を考えるうえで不可欠である。最近、腫瘍局所における regulatory T 細胞(reg T)の存在が解明され、

たとえ強力な腫瘍拒絶免疫反応である TIL が腫瘍局所に浸潤しても、reg T によって不活性化されることが明らかになってきた。しかし、TIL の腫瘍局所への浸潤している数が多い症例は予後良好であり、生体における抗腫瘍免疫反応の指標としての重要性については明らかである。どの分子を認識している TIL が腫瘍局所に浸潤しているかを詳細に解析することで、生体における抗腫瘍免疫反応を理解することは、ワクチン療法の腫瘍免疫療法の臨床効果増強に寄与できるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、上部尿路上皮癌の新たな術後補助療法の開発を目的とする Phase I/II 臨床研究である。まず、臨床研究前基礎研究として、膀胱癌と同様に上部尿路上皮癌において新規腫瘍抗原遺伝子 MHOSP1 および DEPC1 由来 HLA-A24 拘束性エピトープペプチドを用いた腫瘍特異的ワクチン療法の可能性を、次に、ペプチドワクチン療法の臨床的な効果とエピトープペプチド刺激により TIL の反応性を検討する。すなわち、3 年間の研究期間内に以下の 3 点を明らかにするとともに、ペプチドワクチン療法による再発予防効果について検討する。

(1) 上部尿路上皮癌に腫瘍抗原遺伝子 MPHOSP1 および DEPC1 は発現しているのか。腎尿管摘除術により得られた腫瘍組織内に MPHOSP1 および DEPC1 遺伝子発現の状態を RT-PCR 法と免疫染色により明らかにし、臨床情報との関連性を検討する。膀胱癌組織では、MHOSP1 遺伝子は、RT-PCR により 81%で発現を認め、浸潤例の 70%、表在例の 67.5%で免疫染色されている。一方、DEPC1 遺伝子は、RT-PCR により 95%で発現を認め、浸潤例の 67%、表在例の 75%で免疫染色されている。

(2) エピトープペプチド刺激は上部尿路上皮癌組織内腫瘍浸潤リンパ球にどのような影響をあたえるか。上部尿路上皮癌組織から TIL を分離・培養し、ワクチン療法に用いる MPHOSP1 および DEPDC1 遺伝子由来の 2 種類の腫瘍抗原エピトープペプチドで CD8 陽性 T 細胞を刺激することにより細胞障害性 T 細胞 (CTL) クローンを誘導できるかに関して検討し、その前駆体および regT 細胞とともに頻度・特徴を解析する。(3) ペプチドワクチン療法は上部尿路上皮癌の術後補助療法になりうるのか。腎尿管摘除術・リンパ節隔清術施行例でリンパ節転移を認めた症例に対し、ペプチドワクチン療法を施行しその有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 上部尿路上皮癌組織の MPHOSP1 および DEPDC1 遺伝子の発現解析; 当教室で凍結保存している手術材料より、LMM 処理後、RNA を抽出し RT-PCR 法を施行する。さらに、保存しているパラフィン包埋切片の免疫染色により、MPHOSP1 および DEPDC1 遺伝子発現を臨床情報とともに検討する。(検討症例:30 例)

(2) 腎尿管摘除術・リンパ節転移例に対するワクチン療法; 腎尿管摘除術前に HLA (A locus) を検査する。リンパ節転移例において、免疫染色により腫瘍組織の MPHOSP1 および DEPDC1 遺伝子の発現解析し、HLA-A2402 およびこれら遺伝子の発現例に対して合成ペプチドおよびアジュバント (IFA) を患者腋皮下に投与し、CT 画像診断により再発予防効果を検討する。同時期の腎尿管摘除施行例でリンパ節転移を認め、HLA-A24 および組織の MPHOSP1 および DEPDC1 遺伝子の発現を認めない症例を対照とする。(目標症例数:30、対照:30)

(3) ワクチン療法に用いるエピトープペプチドに対する反応性解析; 摘出された上部尿路上皮癌組織は、無菌的に細切し、メッシュを通し単細胞化する。Ficoll を用いた不連続密度勾配法にて TIL を回収する。回収した TIL をワクチン療法に使用するエピトープペプチドにて *in vitro* で 2 週間刺激し効果細胞とする。この効果細胞を刺激細胞と反応させ、INF- $\gamma$  ELISPOT 法にて CTL 前駆体を解析する。さらに、同時に分離できる reg T を解析することで上部尿路上皮癌における免疫反応を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 腎尿管摘除術により得られた病理標本のパラフィンブロックより未染色スライドを作成し、腫瘍組織内 MPHOSP1 および DEPDC1 遺伝子の発現を免疫染色で検討した。30 例の検体を用いた結果、MHOSP1 遺伝子は 22 例で発現を認めた。一方、DEPC1 遺伝子は 28 例で発現を認めた。両遺伝子は臨床因子である stage および grade に非依存性に恒常的に発現していた。

(2) ペプチドワクチンの安全性確認のため、既存治療 (化学療法・放射線療法) に抵抗性を示す進行性腎盂尿管癌症例のなかで HLA-A2402 を有し、腫瘍組織中で MPHOSH1 または DEPDC1 の発現を認めた症例に対してペプチドワクチンの投与を行った。6 例に対してワクチン投与を行い、重篤な有害事象は認めなかった。次いで、腎盂尿管癌の手術症例で pT3 以上またはリンパ節転移陽性例のうち HLA-A24 で腫瘍内に MPH または DEP の発現を認めた症例に対して、アジュバント目的にペプチドワクチンを投与した。17 例に投与を行い、1 年以内に再発を認めたのは 2 例 (11.8%) であったのに対し、12 例の対照群 (非 A24 症

例)のうち、再発を認めたのは4例(33.3%)で、ワクチンによる再発予防効果が示唆された。

(3) 上部尿路上皮癌組織 15 例のうち 7 例から TIL の浸潤を認め、分離・培養が可能であった。MPHOSP1 および DEPDC1 由来エピトープペプチドで CD8 陽性 T 細胞を刺激し CTL を誘導することが可能であった。

#### 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 1 件)

Harada Y, Kanehira M, Fujisawa Y, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, Nakamura Y, Katagiri T. Cell-permeable peptide DEPDC1-ZNF224 interferes with transcriptional repression and oncogenicity in bladder cancer cells. Cancer Res 70; 5829-39, 2010

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

小原航、高田亮、藤岡知昭 がんペプチドワクチン療法 (中村祐輔編) 腎がん 新規腫瘍抗原 (HIG2) を利用したワクチン療法 中山書店 2009

小原航、高田亮、兼平貢、藤岡知昭 がんペプチドワクチン療法 (中村祐輔編) 膀胱がん 新規腫瘍抗原 (MPHOSP1, DEPDC1) を利用したワクチン療法 中山書店 2009

高田亮、片桐豊雅、兼平貢、小原航、中村祐輔、藤岡知昭 【尿路上皮癌の診断と治療 Update】 膀胱癌組織の遺伝子発現解析による MVAC ネオアジュバント化学療法の効果予測 Urology View 2008

[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

藤岡 知昭 (FUJIOKA TOMOAKI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80173409

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者