

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 24 日現在

機関番号：12501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度
 課題番号：21791268
 研究課題名（和文） ヒートショックプロテインを用いた新規食道癌ワクチン療法の開発
 研究課題名（英文） A research for new cancer vaccine with heat shock protein for esophageal cancer
 研究代表者
 阿久津 泰典（AKUTSU YASUNORI）
 千葉大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号：00375677

研究成果の概要（和文）：

H22 年度から 23 年度にかけてはマウス SCCVII 扁平上皮癌細胞を用いて Tumor-derived HSP-peptide complex の抽出を安定して施行できる環境を確立した。Purification は、Pramod K. Srivastava の方法 (METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 12, 165-171 (1997)) に従った。また、臨床検体を用いて、gp96 の発現状況と食道癌術後の予後の相関関係を統計学的に検討した。その結果、切除標本における gp96 の陽性率は全体で 73% であった。リンパ節転移陽性率は gp96 陰性の症例で高い傾向にあった。単変量解析による検討では gp96 陽性症例は陰性症例にくらべて有意に予後良好であった ($p=0.049$)。多変量解析でも「gp96 陰性」は独立した予後規定因子であった (Hazard ratio: 2.6, $p=0.04$)。リンパ節転移個数は gp96 陽性症例に比べて陰性症例において多い傾向にあった。すなわち、gp96 は食道癌のバイオマーカーとして有用であると思われた。これらの結果については英文誌にて公表した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a procedure for extraction of tumor-derived HSP-peptide complex from tumor using mouse squamous cell carcinoma SCCVII. Purification was carried out according to Pramod K. Srivastav's method (METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 12, 165-171 (1997)). Then using clinical specimens, we evaluated the expression of gp96 and prognosis of esophageal cancer patients that underwent surgery and analyzed a correlation between gp96 expression and surgical outcome.

In surgical specimens, 73% of all cases expressed gp96. A positive rate of lymph node metastases was higher in cases with negative gp96 expression. By univariate analysis, gp96 positivity indicated good survival compared to negative cases ($p=0.049$). By multivariate analysis, negativity for gp96 was an independent prognostic factor (Hazard ratio: 2.6, $p=0.04$). The number of metastatic lymph nodes was much higher in gp96 negative cases. These results indicated that gp96 can be a useful biomarker for esophageal cancer. These result has been published in a scientific journal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

1. 研究開始当初の背景

食道癌は、難治性の疾患で死亡率の高い悪性腫瘍の一つである。現在、手術を含め放射線、抗癌剤による集学的治療が標準的となっており、一定の効果が報告されつつある。しかし食道癌は高度進行症例が多く、遠隔転移や再発をきたしやすい。このため容易に Systemic Disease へ移行する疾患である。このような Systemic な病態となった食道癌に対しては抗癌剤の全身投与が行われるが、残念ながらその効果は限定的で、有効な抗癌剤治療が Failure した後の治療法は事実上ないといってよい。このような特性をもつ食道癌に対し、新たな Modality として Systemic な治療法である免疫療法は有望な治療法であり、最近次第にその成果が報告されるようになってきている。

これまでの免疫療法は、LAK 療法、CTL 療法、ペプチド療法などが試みられてきた。我々はさらに有効な免疫療法を開発するために、NKT 療法、 α -ガラクトシルセラミドパルス樹状細胞療法(文献:業績 33,34)などの別な切り口での免疫療法を開発してきた。これらの一連の研究の中で、Heat Shock Protein(HSP)が抗腫瘍効果を強力に増強することを明らかにした。HSPは抗原提示細胞に癌抗原が取り込まれる際の分子シャペロンの役割を果たすと考えられている。そこで我々は癌細胞に放射線を照射し、このストレスにより HSP の発現を増強させることで抗腫瘍効果を増強させることに成功した(文献:業績 11)。これはすなわち、HSP は癌ワクチンとして作用することを示唆するものである。現在、海外でもいくつかの HSP による癌ワクチン療法の試みが始まっており、有効例の報告が増加している(Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck.Cancer Gene Ther. 2008;15:676-84.)。さらに、2008年4月に米国 Antigenics 社が腎癌細胞を対象とした HSP(gp96)-Peptide

Complex(HSPPC-96,Vitespen)を発売し、またその成績は Lancet にも報告されるに至っている(An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial.Lancet. 2008;372:145-54.)。このように HSP による癌ワクチン療法はきわめて有望であると考えられているが、本邦においてその有効性はほとんど検討がなされておらず、特に食道癌

においては全く検証されていない。そこで、今回、食道癌に対する新たな癌免疫療法の開発を目指し、HSP を用いた食道癌腫瘍特異的ワクチン療法の開発を行う。また近年、癌免疫逃避機構の原因であることが推測されている MHC-ClassI 分子が、HSP の抗原提示経路上にあることが報告され、MHC と HSP ワクチン療法の効果との関連を分子機構的に裏付ける。また HDAC-I,樹状細胞、NKT 細胞などとの併用による相乗効果、そして最終的にヒト食道癌抗原ペプチドである URLC10, TTK, KOC1 を用いた HSP-ペプチド療法の臨床応用への可能性を探る。

2. 研究の目的

1)Tumor-derived HSP-peptide complex の Purification の確立

Tumor-derived HSP-peptide complex は Tamura らの報告を参考に(Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations.Science. 1997 Oct3;278(5335):117-20)、Pramod の方法に従う

(Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination Against cancers And Intracellular pathogens.Methods.1997Jun;12(2):165-71)。代表的な HSP である gp96, hsp90, hsp70 について、その HSP 抗原複合体の安定した Purification の確立を行う。

2)Tumor-derived HSP-peptide complex による in vivo における抗腫瘍効果

1)で作成した Tumor-derived HSP-peptide complex を in vivo で投与し抗腫瘍効果を検討する。比較対象として、腫瘍抗原との複合体を形成していないと考えられる正常組織由来の HSP を同様の方法で Purify し用いる。

3)HDAC inhibitor 併用による相乗効果についての検討

われわれこれまで histone deacetylase inhibitor(HDAC-I)による抗腫瘍効果について報告してきた。近年、HDAC-I である MS-275 と NK 細胞との組み合わせによる抗腫瘍効果増強が報告されている。一方、癌細胞では細胞表面の HLA 発現レベルの低下がしばしばみられるが HDAC-I による HLA 発現の回復も報告されている。HDAC-I による HLA の変化と HSP ワクチンの効果との関連について検討し、癌の免疫逃避機構については HLA 分子の発現を検討する。

4)樹状細胞の併用による相乗効果についての検討

本研究では HSP と DC との併用効果を検討する。さらに Tumor-derived HSP-peptide

をパルスした DC を投与する実験を行い、さらに強い抗腫瘍効果が得られるかどうか検討する。

5) HSP- α -GalCer Complex の抗腫瘍効果についての検討

われわれはこれまで NKT 細胞療法について検討してきたが、今回は HSP との相乗効果についても検討する。NKT 細胞のリガンドである α ガラクトシルセラミド(α -Galactosylceramide(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopyranosyl)-N-hexacosanoyl-2-amino-1,3,4-octadecanetriol; α -GalCer)と HSP との Complex を形成させ、強力な NKT 細胞療法を確立する。

6) Tumor-derived HSP-peptide complex 投与による in vivo における CTL 誘導、腫瘍特異性、T-reg 分画、CD91 分子の変化についての検討

主に上記項目について HSP ワクチン療法による影響を検討し、HSP ワクチン療法を理論的に裏付ける。

7) Human HSP と ヒト 食道癌抗原 Complex による抗腫瘍効果の検討

近年、ヒト食道癌特異的抗原である URLC10, TTK, KOC1 によるペプチドワクチン療法の臨床研究が始まっている。HSP と、このペプチドワクチンを融合させ、さらなる効率化を目指す。

3. 研究の方法

1) Tumor-derived HSP-peptide complex の Purification の確立

マウス SCCVII 扁平上皮癌細胞を用いて Tumor-derived HSP-peptide complex の抽出を安定して施行できる環境を確立する。Purification は、Pramod の方法 (Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens. Methods. 1997 Jun;12(2):165-71) に従う。この方法では、抗体の種類を変えることによって、代表的な HSP である gp96, hsp90, hsp70 など数種類の HSP を抽出することが可能である。抽出には 100,000g の遠心分離を要するが、当施設に既に導入済みであり、研究の遂行に支障はない。HSP の Purification がうまくいかない場合は、コマーシャルベースの gp96 (文献:業績 11 で使用実績あり) の使用も視野に入れる。また同時にヒト食道癌細胞からも HSP の Purification も確立する。

2) Tumor-derived HSP-peptide complex による in vivo における抗腫瘍効果

1) で作成した Tumor-derived HSP-peptide complex を担癌マウス (C3H) に投与し、in vivo における抗腫瘍効果を検討する。対象として、normal tissue-derived HPS を抽出する。こ

れは、正常組織由来であり、腫瘍抗原複合体を形成していないナイーブな HSP と考えられる。担癌マウスは SCCVII 細胞を用いるが既に確立済みであるが、これまでの経験では (文献:業績 11) Day 7 に 5mm 程度の腫瘍塊を形成する。その後上記 HSP ワクチン、コントロール HSP、PBS を皮下投与し、これら 3 群で抗腫瘍効果を比較検討する。HSP は文献を参考に SCCVII 細胞 1×10^6 cells 分を 1 回分の投与とし、本研究では 1 回/Week $\times 3$ 回程度の投与を予定している。

3) HDAC inhibitor 併用による相乗効果についての検討

第一段階として、癌細胞でしばしばみられる細胞表面の HLA 発現レベルの低下をフローサイトメトリーで確認した後、HDAC-I によって発現回復がみられるかどうか検討する。

HDAC-I はこれまで FK-228 を用いてきたため (文献:業績 20)、今回も主として FK-228 を用いて検討するが、新規 HDAC-I も数種ストックがあり適宜使用する。FK-228 の濃度に応じて、HLA の発現がどのように変化するのか、フローサイトメトリー、及びウェスタンブロットにて確認する。さらに、第二段階として HDAC-I の投与によって最終的に HSP ワクチン療法の効率化が可能であるか評価する。方法は上記 2) 同様、SCCVII 担癌マウスモデル (C3H) を用いる (確立済み)。

4) 樹状細胞の併用による相乗効果についての検討

HSP をワクチンとして使用する上で、効率的な抗腫瘍効果を発揮させるためには樹状細胞の存在が極めて重要となる。我々の過去の NKT 細胞の実験でも、抗腫瘍効果を発揮する細胞そのものの投与よりも、抗原提示細胞の移入のほうがより効果的であった。したがって、HSP ワクチン療法においても HSP の受け手となる樹状細胞を移入することでさらに強力な抗腫瘍効果が得られる可能性がある。そこで、本研究では HSP と樹状細胞の併用療法の可能性についても検討する。投与する樹状細胞は 3×10^6 個程度を皮下もしくは静脈注射にて投与する予定である (文献:業績 29, 33)。

5) HSP- α -GalCer Complex の抗腫瘍効果についての検討

上記 4) の通り細胞免疫療法では、投与する細胞は NKT 細胞よりも DC のほうがより強力であった (文献:業績 29-30, 32-24)。

α -GalCer は、NKT 細胞の特異的リガンドであるが、本研究では NKT 細胞療法のさらなる効率化にどのように HSP が影響を及ぼすか検討する。 α -GalCer は、それ単独の投与でも効果はみられるものの、 α -GalCer パルス DC に比べると効果がやや劣る。しかし α -GalCer + HSP により、強力な抗腫瘍効果がえられるならば、実臨床における簡便性を考えたときに

ex vivoでの細胞調整が不要となるためきわめて簡便な方法となりえる。さらにHSP-DC併用に加え、HSP- α -GalCer ComplexをDCにパルスしたものでさらに効率のよい抗腫瘍効果が得られるかどうか検討する。

6) Tumor-derived HSP-peptide complex 投与による in vivoにおけるCTL誘導、腫瘍特異性、T-reg分画、CD91分子の変化についての検討

Tumor-derived HSPによって、腫瘍特異的CTLの誘導を確認し、HSPのワクチンとしての効果の理論的裏付けを証明する。CTLの誘導はフローサイトメトリーにて、また腫瘍特異性は、腫瘍リチャレンジング実験および in vitroでのCytotoxic Assayもしくは、サイトカインのELISAによる定量、ELISPOT等にて評価する。一方、免疫逃避機構の一因とされる制御性T細胞(Regulatory T cells:Treg)が、HSP投与によりどのように影響を与えるのか、Tregをブロックする(抗CD25抗体:シムレクト)ことでHSPワクチンが効率化されるか検討する。さらに、数種の癌細胞株を用いて、HSPの効果とAPC表面に存在するgp96受容体であるCD91の発現の因果関係を、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット等で検討することも視野に入れている。

7) Human HSPとヒト食道癌抗原Complexによる抗腫瘍効果の検討

現在、当施設では新規癌関連抗原遺伝子(URLC10, TTK, KOC1)由来のエピトープペプチド療法の臨床研究を準備中である。本研究では最終年度までにこのペプチド療法を劇的に効率化する可能性のあるHSP-ペプチド療法の実用化を目指す。URLC10, TTK, KOC1などはヒトHLA-A24拘束性であるが、HSP-ペプチド複合体を作成できれば、将来極めて有望な、そして強力な癌特異的腫瘍免疫療法が実現できる。HSP-ペプチド複合体の作成はこれまでの検討が少なく、どの程度の効率で作成することができるか不明瞭である。

しかし、前述のVitespen(参照URL:<http://www.antigenics.com/products/cancer/oncophage/>)と同種の癌ワクチンを開発することは理論的に可能である。

4. 研究成果

[主な成果と国内外における位置づけとインパクト]

本研究ではヒートショックプロテイン gp96が抗原取り込みの際に重要な分子であり、かつ免疫療法においては抗腫瘍効果を増強させる効果があることを証明することができた。また、放射線を併用した際の免疫療法の効果増強の際にも gp96が重要な役割を担っていることを示すことができた。

一方で、実臨床においては、gp96の発現と病態との密接な因果関係があることを示した。

すなわち gp96が低い発現の症例では高い症例に比べてリンパ節転移頻度、転移個数がいずれも高く、食道癌症例においても gp96が宿主の免疫状態を反映していることを示すことができた。さらに、食道癌に対する化学放射線療法においては COX2の発現も同様に治療アウトカムと密接にかかわっていることを示すことができた。すなわち COX2高発現の症例では治療抵抗性を示す。これらの gp96および COX2は食道癌における有用なバイオマーカーになる可能性が高い。食道癌における gp96のバイオマーカーとしての有用性についての報告は我々の報告が最初であると思われ、今後の免疫療法の発展に有用な成果であると思われる。

[今後の展望]

このように gp96は食道癌における免疫療法において重要な分子であるばかりではなく、食道癌症例における免疫状態を反映するバイオマーカーとして有用であることを示すことができた。今後は gp96を免疫療法の効果増強のための補助的薬剤として、製薬化をめざしてゆきたい。

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2件)

- ① Y. Akutsu (8人中1番目、査読あり) et al. Correlation between gp96 expression and the surgical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*. 2011,18.832-837
- ② Y. Akutsu (10人中1番目、査読あり) et al. COX2 expression predicts resistance to chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*. 2011, 18. 2946-51

[学会発表] (計1件)

- ① Y. Akutsu (9人中1番目) et al. Antitumor effect for squamous cell carcinoma mediated by heat shock protein gp96 2010年AACR-JCA合同会議 2010年2月6日 Waikoloa, Hawaii (U.S.A.)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿久津 泰典 (AKUTSU YASUNORI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 00375677