

## 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25年 6月10日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592242

研究課題名（和文） 口腔がんに対するがんペプチドワクチン療法の開発

研究課題名（英文） Development of cancer peptide vaccine therapy for oral cancer

研究代表者

宮崎 晃亘（MIYAZAKI AKIHIRO）

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10305237

研究成果の概要（和文）：がん細胞に高発現しているサバイビントタンパクが分解されてできるサバイビン 2B 由来ペプチドを用いたがんペプチドワクチン療法の安全性と有効性を確認した。さらに、免疫賦活剤を併用した臨床試験ではペプチド単剤よりも強力な免疫効果が得られ、安全性も容認された。サバイビン以外のがんペプチドワクチンの開発においては、口腔のがん幹細胞に高発現している分子を同定し、より効果的ながんペプチドワクチン療法の臨床応用に向けての基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：We have confirmed the safety and efficacy of a cancer peptide vaccine therapy using a survivin2B-derived peptide decomposed from a survivin protein that is highly expressed in many malignancies. Furthermore, a clinical trial indicated that when using the peptide in conjunction with stimulants, a stronger immune effect could be obtained than from the peptide alone. The trial also confirmed the safety of the vaccine therapy. In the quest to develop a cancer peptide vaccine other than survivin, we have identified molecules that are highly expressed in cancer stem cells of the oral cavity, and established a foundation towards a more effective clinical application of cancer peptide vaccine therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、外科系歯学

キーワード：がんペプチドワクチン、がん抗原、口腔がん、サバイビン、がん免疫

## 1. 研究開始当初の背景

口腔がんの治療成績は、近年の治療技術の進歩により治療成績は全体としては向上しつつある。しかし、進行・再発口腔がんにおいては外科療法、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われているにも関

わらず十分な治療成績が得られていないため、新たな治療法の開発が待望されている。がんペプチドワクチン療法は、抗原ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)を増殖・活性化させ、がんの退縮さらには患者予後の改善を目指す治療法であり、新たながん治療法の

1つとして期待されている。したがって、口腔がんに対するがんペプチドワクチン療法の開発は、患者の予後や QOL の向上に直結する極めて重要な課題と考えられる。我々は口腔がんを含む各種がん組織に高発現しているサバイビン遺伝子に着目し、アミノ酸配列より、日本人に最も多い HLA-A24 拘束性に抗腫瘍効果を発揮しうるサバイビン 2B ペプチドを合成した。サバイビン 2B ペプチドを用いた基礎研究において、HLA-A24 陽性の口腔がん患者末梢血リンパ球から効率に CTL が誘導されることを明らかにし、進行・再発口腔がんを対象にサバイビン 2B ペプチドワクチンの臨床試験を開始した。サバイビン 2B ペプチドワクチンの安全性および抗腫瘍効果をモニタリングする臨床的意義は大きく、さらなる新規がん抗原の同定とペプチドワクチンの開発により、効果的ながんペプチドワクチン療法が具現化するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

口腔がんに対する新規の抗悪性腫瘍治療薬としての“がんペプチドワクチン”の開発を目的とした。すなわち、分子免疫学的手法を用いてがんに対する T 細胞免疫応答を惹起する新規がん抗原ペプチドを同定し、がんペプチドワクチン療法の臨床応用に向けての基礎的・臨床的研究を遂行する。具体的には、これまでの研究成果を踏まえ、サバイビン 2B ペプチドに免疫応答増強剤として不完全フロイントアジュバント(IFA)、インターフェロン(IFN)- $\alpha$  を併用する臨床研究を実施し、さらなる臨床・免疫学的効果を追求すること、現在解析中の新規がん抗原を標的とした口腔がんペプチドワクチン療法の基礎研究を進展させることによりがんペプチドワクチン創薬化に向けての基盤確立を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) IFA と IFN- $\alpha$  を併用したサバイビン 2B ペプチドワクチン療法の安全性ならびに抗腫瘍効果の検討 (第 I 相臨床試験)

適応基準 (表 1) を満たした口腔がん患者を対象に IFA と IFN- $\alpha$  併用したサバイビン 2B ペプチドワクチン療法の臨床試験を施行した。IFN- $\alpha$  は IFN $\alpha$  (スミフェロン<sup>®</sup>) と PEG-IFN $\alpha$ -2a (ペガシス<sup>®</sup>) をそれぞれ 2 段階設定で投与した。症例数は、投与群ごとに以下の 4 つの研究グループを設定した。グループ 1 から投与を開始し、計画症例数終了後の評価で問題がなければ、次のグループの試験へと順次移行した。

**グループ 1:** ペプチド 1.0mg/1.0ml + IFA 1.0ml + IFN $\alpha$  150 万 IU, **グループ 2:** ペプチド 1.0mg/1.0ml + IFA 1.0ml + PEG-IFN $\alpha$ -2a 90 ug, **グループ 3:** ペプチド 1.0mg/1.0ml +

IFA 1.0ml + IFN $\alpha$  75 万 IU, **グループ 4:** ペプチド 1.0mg / 1.0ml + IFA 1.0ml + PEG-IFN $\alpha$ -2a 45 ug

表 1 適応基準

- ・組織学的に確定診断された口腔がんである。
- ・腫瘍が survivin を発現している。
- ・腫瘍が HLA-class I を発現している。
- ・HLA 型が HLA-A\*2402 である。
- ・根治手術が不可能である。
- ・年齢 20~90 歳, PS $\leq$ 3.
- ・直前 1 か月間に前治療 (化学療法, 免疫療法, 放射線療法, 外科手術など) を受けていない。受けていた場合には最低 1 か月以上の wash-out 期間を経過後に本臨床試験を開始する。

投与方法はペプチド 1.0mg を 1.0ml の生理食塩水に溶解し、さらに IFA 1.0ml を加えてエマルジョン化したペプチド溶液 2.0ml を 2 週間隔で腫瘍周囲の皮下あるいは粘膜下に注射した。各グループでの設定量で IFN $\alpha$  は週 2 回、PEG-IFN $\alpha$ -2a は週 1 回皮下注射した。ペプチドと IFA の混合液の注射日と IFN- $\alpha$  の注射日は 2 週間毎に同一曜日になるように設定し、その際は、IFN- $\alpha$  投与 15 分後に同部位にペプチドと IFA の混合液を投与した。以上の投与を 2 週間ごとに 4 コース施行し、有害事象判定と効果判定を行った。有害事象は米国国立がん研究所 (NCI) の共通毒性基準 (Common Toxicity Criteria) (NCI-CTC) により評価した。抗腫瘍効果は RECIST ガイドラインに基づいて判定した。腫瘍マーカーとして SCC 抗原値を測定した。注射局所の皮膚症状を除いて Grade3 または 4 の毒性を全く認められない場合には、次用量グループの投与を開始できるものとした。1 例でも Grade3 または 4 の毒性が認められた場合には、症状が改善するまで IFN- $\alpha$  の投与を控えるものとした。

また、免疫学的モニタリング・治療効果判定のバイオマーカーの開発として、CTL 活性測定、免疫組織学的検索、遅延型過敏反応 (DTH) 測定、HLA-A24/ペプチドテトラマー解析およびメモリー T 細胞解析、IFN- $\gamma$  エリスロットアッセイ、血清サバイビン抗体価の測定などを行った。

(2) 口腔がんの新規がん抗原同定と臨床応用に向けての研究

当科で樹立したヒト口腔扁平上皮癌細胞株 POT1 から ALDEFLUOR assay を用いて、アルデヒド脱水素酵 (ALDH) 1 陽性細胞と陰性細胞の分離を行った。分離した ALDH1 陽性細胞にがん幹細胞 (CSC) が enrich されているか否かを検討するために、浮遊細胞塊形成法、CSC 関連遺伝子の発現の有無、抗がん剤感受性試験および免疫不全動物における造腫瘍能に関して検討した。さらに、DNA マイクロアレイを用いて ALDH1 陽性細胞で発現している遺伝子の網羅的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 進行・再発口腔がんを対象としたサバイピン 2B ペプチドに IFA と IFN- $\alpha$  を併用した第 I 相臨床試験では予定症例数 10 例中 6 例が終了した。臨床効果は安定(SD) 3 例、部分奏効(PD) 3 例で、腫瘍マーカー(SCC 抗原値)は 2 例で低下がみられた。ワクチン投与後のテトラマー陽性 CTL 増加は 6 例全例に認められた。安全性に関しては、grade2 以下の発熱、注射部位の発赤・硬結、搔痒や AST・ALT 上昇などが認められたが、重篤な有害事象は発生しなかった(表 2)。免疫応答増強剤としての IFN- $\alpha$  の至適投与量を検討するため、次症例からは IFN- $\alpha$  を減量した臨床試験を予定している。サバイピン 2B ペプチド単剤投与と比較してペプチド特異的 CTL を効率良く誘導し、安全性も容認されることが示唆された。

表 2 IFA+IFN- $\alpha$  併用サバイピン2B ペプチドワクチン療法

Patient No.	年齢/性	PS	原発部位	再発・転移部位	投与量	投与方法	有害事象	Tetramer staining	腫瘍マーカー (CT)	臨床評価
1	68/F	1	舌	肺	1.0mg+IFN $\alpha$	皮下注	発熱, 発赤, 硬結, 搔痒	増加	不変	PD
2	85/F	2	下顎肉	局所, 頸部	1.0mg+PEG-IFN $\alpha$	局注	発赤, 硬結	増加	ND	SD
3	87/F	3	下顎肉	局所, 頸部	1.0mg+IFN $\alpha$	局注	発熱, 発赤, 硬結	増加	低下	SD
4	82/M	3	口底	局所, 頸部	1.0mg+IFN $\alpha$	局注	発赤, 硬結	増加	不変	PD
5	79/M	1	口咽頭	頸部, 肺	1.0mg+PEG-IFN $\alpha$	局注	発赤, 硬結	増加	上昇	PD
6	86/M	1	上顎肉	局所	1.0mg+PEG-IFN $\alpha$	皮下注	発赤, 硬結	増加	低下	SD

(2) 新規がんペプチドワクチン療法の確立に向けた研究では、口腔がんの CSC の分離・機能解析を行った。すなわち POT1 から ALDEFLUOR assay を用いて ALDH1 陽性細胞と陰性細胞の分離を行った。ALDH1 陽性細胞は、特定の培養条件下において浮遊細胞塊を形成し、CSC 関連遺伝子(SOX2、POU5F1、NANOG)を高発現していた。また、ALDH1 陽性細胞は抗がん剤に対し抵抗性を示し、免疫不全動物において高い造腫瘍能を示した。ALDH1 陽性細胞には CSC が濃縮されていることが示唆された。以上のことから、ALDH1 陽性細胞には CSC が enrich されていることが示唆された。現在、CSC を標的としたがんペプチドワクチン療法の確立に向けて、DNA マイクロアレイの結果を基に ALDH1 陽性細胞に高発現している分子を同定し、その機能を解析している。

#### 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 5 件)

① 小林淳一, 宮崎晃亘, 山本 崇, 道振義貴, 佐々木敬則, 山口 晃, 仲盛健治, 荻 和弘,

永井 格, 鳥越俊彦, 廣橋良彦, 佐藤昇志, 平塚博義. 進行・再発口腔がんに対するサバイピン 2B ペプチドワクチン療法の第 I 相臨床試験. 北海道頭頸部腫瘍研究会々誌 査読無, 2012, 37:8-11.

② 宮崎晃亘, 平塚博義. 口腔悪性腫瘍. 医学と薬学 査読無, 2012, 67:799-805.

③ Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, Fujino J, Asanuma H, Tamura Y, Nakamori K, Hasegawa T, Hiratsuka H, Sato N. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. Pathol Int 査読有, 2012, 62:684-689.

DOI:10.1111/j.1440-1827.2012.02851.x.

④ 宮崎晃亘, 小林淳一, 山本 崇, 道振義貴, 佐々木敬則, 仲盛健治, 廣橋良彦, 鳥越俊彦, 佐藤昇志, 平塚博義. 口腔がん患者に対する survivin-2B ペプチドを用いたがんワクチン療法 -第 I 相臨床試験-. 日口腔腫瘍会誌 査読有, 2011, 23:117-122.

⑤ Miyazaki A, Kobayashi J, Torigoe T, Hirohashi Y, Yamamoto T, Yamaguchi A, Asanuma H, Takahashi A, Michifuri Y, Nakamori K, Nagai I, Sato N, Hiratsuka H. Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer. Cancer Sci 査読有, 2011, 102:324-329.

DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01789.x.

[学会発表] (計 25 件)

① 佐々木敬則. The stressed cells are potential targets for CD8<sup>+</sup> T cell recognition in vivo. 第 41 回 日本免疫学会学術集会. 2012 年 12 月 5 日~7 日. 京都.

② 宮崎晃亘. Survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer - Phase I clinical trial. 第 71 回 日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月 19 日~21 日. 札幌.

③ 佐々木敬則. 細胞ストレスにより提示される MHC I 抗原ペプチド. 第 16 回 日本がん免疫学会総会. 2012 年 7 月 26 日~28 日. 札幌.

④ 佐々木敬則. 小胞体ストレス下で提示される新規 MHC I 抗原ペプチド群の解析. 第 66 回 日本口腔科学会学術集会. 2012 年 5 月 17 日, 18 日. 広島.

⑤ 宮崎晃亘. 口腔がんに対するアジュバント併用 survivin-2B ペプチドワクチン療法の臨床・免疫学的効果 (優秀ポスター賞). 第 66 回 日本口腔科学会学術集会. 2012 年 5 月 17 日, 18 日. 広島.

- ⑥ 道振義貴. ヒト口腔扁平上皮癌における癌幹細胞様細胞の解析. 第30回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2012年1月26日, 27日. さいたま.
- ⑦ 宮崎晃亘. 進行・再発口腔がんに対するIFN- $\alpha$ 併用 survivin-2B ペプチドワクチン療法第I相臨床試験. 第30回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2012年1月26日, 27日. さいたま.
- ⑧ Sasaki T. The cells under the ER stress present novel pMHC I and elicit CD8<sup>+</sup> T cell responses. 第40回 日本免疫学会学術集会. 2011年11月27日~29日. 千葉.
- ⑨ 佐々木敬則. 小胞体ストレス下で提示される新規 MHC I 抗原ペプチド群の解析. 第56回 日本口腔外科学会総会・学術大会. 2011年10月21日~23日. 大阪.
- ⑩ Sasaki T. The cells under the ER stress present novel pMHC I and elicit CD8<sup>+</sup> T cell responses. 第70回 日本癌学会学術総会・学術大会. 2011年10月3日~5日. 名古屋.
- ⑪ Michifuri Y. SPRR1B is overexpressed in ALDH1 bright cancer stem-like oral squamous cell carcinoma and related to its maintenance. 第70回 日本癌学会学術総会・学術大会. 2011年10月3日~5日. 名古屋.
- ⑫ Miyazaki A. A phase I study of survivin-2B peptide vaccine therapy in combination with interferon- $\alpha$  for patients with oral cancer. 第70回 日本癌学会学術総会・学術大会. 2011年10月3日~5日. 名古屋.
- ⑬ 佐々木敬則. 小胞体ストレス下で提示される新規 MHC I 抗原ペプチド群の解析. 第44回 北海道病理談話会. 2011年9月10日. 旭川.
- ⑭ Sasaki T. The cells under the ER stress present novel pMHC I and elicit CD8<sup>+</sup> T cell responses. The 2011 CSSI Congress. 2011年8月21日~25日. ケベック (カナダ).
- ⑮ 佐々木敬則. 小胞体ストレス下で提示される新規 MHC I 抗原ペプチド群の解析. 第8回 病理学会カンファレンス. 2011年8月5日, 6日. 長野.
- ⑯ 佐々木敬則. 小胞体ストレス下で提示される新規 MHC I 抗原ペプチド群の解析. 第15回 日本がん免疫学会総会. 2011年6月30日~7月1日. 大阪.
- ⑰ 宮崎晃亘. 進行・再発口腔がんに対するIFN- $\alpha$ を併用した survivin-2B ペプチドワクチン療法の第I相臨床試験. 第7回 北海道癌免疫制御研究会. 2011年6月11日. 札幌.
- ⑱ 佐々木敬則. 小胞体ストレスによる MHC クラス I 抗原プロセッシングの分子機構と病態. 第49回 日本口腔科学会北日本地方会. 2011年5月21日, 22日. 新潟.
- ⑲ 道振義貴. 口腔がんにおけるがん幹細胞

特異的分子の同定. 第100回 日本病理学会総会. 2011年4月28日~30日. 横浜.

⑳ 佐々木敬則. 小胞体ストレスによる MHC クラス I 抗原プロセッシングの分子機構と病態. 第100回 日本病理学会総会. 2011年4月28日~30日. 横浜.

㉑ 宮崎晃亘. 口腔癌に対する癌ワクチン療法の現状と展望: survivin-2B ペプチドを用いた癌ワクチン療法 ~臨床試験について~. (シンポジウム1). 第29回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2011年1月27日, 28日. 熊本.

㉒ 宮崎晃亘. 進行・再発口腔がんに対する survivin-2B ペプチドワクチン療法の第1相臨床試験. 第48回 日本癌治療学会総会. 2010年10月28日~30日. 京都.

㉓ 道振義貴. 口腔癌患者 CD8 陽性 T 細胞に認識される HLA-A24 拘束性癌抗原ペプチドの解析. 第55回 日本口腔外科学会総会・学術大会. 2010年10月16日~18日. 千葉.

㉔ 宮崎晃亘. 口腔癌に対するサバイビン 2B ペプチドワクチン療法の第1相臨床試験. 第69回 日本癌学会学術総会. 2010年9月22日~24日. 大阪.

㉕ 道振義貴. 口腔癌患者 CD8 陽性 T 細胞に認識される HLA-A24 拘束性癌抗原ペプチドの解析. 第64回 日本口腔科学会総会・学術大会. 2010年6月24日, 25日. 札幌.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

宮崎 晃亘 (MIYAZAKI AKIHIRO)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10305237

(2) 研究分担者

山口 晃 (YAMAGUCHI AKIRA)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10210353  
小林 淳一 (KOBAYASHI JYUNICHI)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80404739  
山本 崇 (YAMAMOTO TAKASHI)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：50448594  
道振 義貴  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：00457722  
佐々木 敬則  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：50548732  
藤野 準己  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：60620945

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：