

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25日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659235

研究課題名（和文） 免疫逃避を制御するHDAC阻害剤併用によるワクチン療法の開発

研究課題名（英文） Development of the vaccinotherapy with HDAC inhibitor regulating immunoescape

研究代表者

平田公一（HIRATA KOUICHI）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50136959

研究成果の概要（和文）：

消化器領域あるいは乳腺領域の超進行切除不能癌あるいは再発癌に対し、サバイビン2Bペプチドを用いた癌ペプチド療法を8例に実施した。6例に明らかな免疫学的反応を認め、臨床効果については recist 基準では6例にSD、2例にPDであった。尚、注射局所反応を除くと、有害事象についてはグレードIの発熱以外に面倒なものを認めなかった。したがって全例でプロトコル上の臨床研究は可能であった。

一方、従来よりMHCクラスI発現が無いか極めて低い癌細胞のあることが知られており、それらについては、発現亢進のためにHDAC阻害剤の投与の有用性が動物実験的研究において知られていた。そこで適応症例については、ワクチン療法前にHDAC阻害剤の経口投与を試みた。登録症例研究計画期間終了直前に生じたことにより、現在、進行中であり、今後の分析対象とする。

研究については安全に実施できたと言えるが、登録症例数の円滑な増加がみられないことが課題として残った。

研究成果の概要（英文）：

Cancer vaccine therapy utilizing surviving 2B peptide had been indicated for the patients with unresectable advanced or recurrent cancers during recent two years between 2010 April and 2012 March. Totally, eight patients with gastrointestinal or mammary cancers had been registered and treated under the strict maintenance by the clinical research protocol. No reverse adverse effect had been experienced, but slight fever (grade II) was observed in two patients and typical skin reactions just on/in the dermal injection sites of peptide was mostly yielded but no severe allergic reaction and no ulcer formation was noted. Therefore, clinical trials by the protocol had been established. Immunological response was clearly admitted in most of patients. Clinical effect was SD in six patients and PD in two patients.

The low or negative expression of MHC class I in cancer cell wall indicated no immunological effect for those cells, as one of escape mechanisms. The HDAC inhibitors have the promotion effect on the expression of MHC class I, then HDAC inhibitor pretreatment before vaccine administration was tried. The patients with the indications were registered at the end of this protocol schedule, then now is ongoing as the phase I and II. Grade I adverse effects (nausea and elevation of hepatic transaminase) were noticed but it was possible to continue under this protocol.

Further investigation would be established within one year.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：癌ワクチン、腫瘍免疫、ペプチド、HDAC、癌治療

1. 研究開始当初の背景

リンパ球の中には癌細胞を特異的に識別し攻撃しうる細胞が存在する。この標的を**癌ワクチン**として患者に免疫するペプチドワクチン療法が近年試みられている。教室では多くの癌に高頻度に発現している細胞死抑制分子サバイビンが癌抗原として優れた性質を持っていることを明らかにし、この癌抗原由来の**抗原ペプチド“サバイビン 2B”を同定** (Clin Cancer Res 8: 1731-1739, 2002) することができた。また、さまざまな癌患者の抹消血にサバイビン特異的 CTL が高頻度に存在することも証明しえた (Clin Cancer Res 11: 1474-1482, 2005)。以上のような基礎的研究と並行して、平成 15 年 4 月より当院臨床研究審査委員会の承認を得た後、本邦にて頻度の高い進行・再発大腸癌および乳癌などを対象としてサバイビン 2B ペプチドによるペプチドワクチン療法・第一相臨床試験を開始した。本研究で使用する**サバイビン 2B ペプチドは本学オリジナル**であるため、あえてペプチド単剤での安全性および反応性を確認すべく、**ペプチド単剤での臨床試験**から開始した (J Transl Med 2: 19-29, 2004)。その後、対象疾患を全消化器癌および乳癌に広げ、より高い抗腫瘍効果を誘導しうる adjuvant 確立を目的に**サバイビン 2B ペプチドと IFA 併用 (J Transl Med 6:24-35, 2008)、サバイビン 2B ペプチドと IFA および IFN-a 併用の臨床試験 (J Transl Med 2009 submitted)**を展開してきた。免疫モニタリングとして、ELISPOT assay、Tetramer staining を行っている。**高頻度にペプチド特異的 CTL を誘導**することに成功したが、これらの症例において**必ずしも有効な臨床的抗腫瘍効果を誘導するには至らなかった。ペプチド特異的 CTL を誘導なしでもそれが臨床的抗腫瘍効果につながらない場合が多かった**。この原因として、腫瘍の免疫監視機構からのエスケープ機構の関与が強く示唆

された。また、当施設での手術症例を対象とした癌原発巣での MHC クラス I 発現の程度と予後との相関を検討したところ、MHC クラス I が高発現していた症例は、MHC クラス I 低発現・消失群に比較し有意に無再発生存率が高いことが大腸癌、乳癌、膵臓癌において証明された。そこで、我々は、これらの機序のうち MHC クラス I 発現性の低下がありうるのではとの点に着目した。MHC クラス I のような分子に関してエピジェネティック制御を受けることの報告がなされ、さらに HDAC 阻害剤によりその制御を抑止可能であることも報告された (日経バイオビジネス 2006)。この基礎研究を臨床応用すべく、本研究では HDAC 阻害剤を併用しつつ発現低下した MHC クラス I 発現を再発現させ、より高い臨床的抗腫瘍効果を誘導しうる**新たなペプチドワクチン療法確立をサバイビン 2B ペプチドワクチン療法・第一相臨床試験において検証していきたい。**

2. 研究の目的

我々は平成 15 年 4 月より進行・再発消化器癌および乳癌を対象に“サバイビン 2B ペプチド”によるペプチドワクチン療法・第一相臨床試験を開始している。この間に、ペプチドに IFA および IFN-a を併用投与することにより、高頻度にペプチド特異的 CTL 誘導をなしえた。しかしながら、特異的 CTL の誘導という免疫学的反応が得られても必ずしも臨床学的抗腫瘍効果に直結しない症例を多く認めてきた。その原因の究明のひとつとして癌原発巣での MHC クラス I 分子の発現程度を免疫染色にて検討したところ、乳癌では高頻度に MHC クラス I の発現が低下・消失している症例が多かった。以上のことより、腫瘍細胞上の低下した MHC クラス I 発現を増強しえれば、更なる高い臨床学的抗腫瘍効果を誘導しうると思われる。近年、HDAC 阻害剤が乳癌細胞株上の MHC クラス

I 発現を増強することを確認した。そこで、本研究では、この基礎研究結果を臨床応用化し、進行・再発乳癌におけるサバイビン 2B ペプチドワクチン療法・第一相臨床試験において、**HDAC 阻害剤であるバルプロ酸併用投与により発現低下したMHCクラスI発現を再強発現させ、抗腫瘍効果を高率に誘導する次世代の新しいペプチドワクチン療法を樹立すること**を目指し、患者の受け入れ可能な臨床研究の実施を目的とする。

3. 研究の方法

I. 検討事項

以下の検討を行う。第一の検討事項、第二の検討事項のうち、臨床効果については通常保険診療行為として実施する範囲内で、患者さんとのインフォームドコンセントを得た上で実施する。免疫学的評価については、本研究費をあてて検討する。

第一の検討事項：毒性、有害事象

第二の検討事項：①臨床効果：画像評価（CT, MRI, シンチ）、腫瘍マーカー、理学所見②免疫学的評価：型過敏反応（DTH）、テトラマー解析、ELISPOT 解析、CTL 活性、Memory T cell 解析（CD27, CD28, CCR7, CD45RA, CD45RO を指標マーカーとする）

II. 適応

II-1 適応基準

札幌医科大学第一外科に入院した癌患者のうち、以下の条件を満たすものとする。

- (i) 組織学的に確定診断された消化器癌および内分泌臓器癌である。ただし、生検困難な腫瘍においては、画像診断および腫瘍マーカーの明らかな上昇などによって診断が得られるものは、これらをもって代用可能とする。
- (ii) 腫瘍がサバイビン遺伝子を発現している（RT-PCR 法もしくは抗サバイビン抗体法を用いた免疫組織染色法により解析する）。
- (iii) 根治手術が不可能である（遠隔転移例、再発例）。
- (iv) 計測可能評価病変の有無は問わない。
- (v) HLA 型が HLA-A*2402 である（HLA の serotype を札幌医大医学部病理学第一講座教室で決定し、genotype を SRL 社あるいは塩野義製薬に依頼し同定する）。
- (vi) 年齢 20-85 歳
- (vii) Performance States (PS) ≤ 2
- (viii) 重篤な臓器不全がない（白血球 ≥ 3000、ヘモグロビン値 ≥ 8.0、血小板数 ≥ 10.0 万、血清クレアチニン値 ≤ 1.5、血清総ビリルビン値 ≤ 1.5、GOT, GPT ≤ 正常上限値の 2 倍）。
- (ix) 腫瘍での HLA class I 発現が低下している、あるいは発現を認めない（免疫染色にて解析する）。
- (x) 妊娠可能年齢の女性では、妊娠していないこと。

(xi) 本研究の概要を説明し、本人からインフォームドコンセントが得られている。

II-2 適応外基準

以下の場合には本研究に組み入れない。

- (i) 生命予後に影響を及ぼすような他の癌にすでに罹患している。
- (ii) 免疫不全状態にある。
- (iii) 脾摘術をうけている。
- (iv) ステロイド剤の投与（経口、静注）を必要とする。（但し、治療に伴う急性アレルギー症状の処置用に投与した場合を除く）。
- (v) 臨床的に重篤な心疾患を有する。
- (vi) 活動性の感染を有する。
- (vii) 血液凝固障害を有する。
- (viii) 授乳中である。
- (ix) 経過の評価ができない。
- (x) プロトコルに従う確約が得られない。
- (xi) 過去に重篤な薬剤アレルギーの既往がある。
- (xii) その他、担当医が不適切と判定した症例。

II-3 併用薬剤と治療

以下の薬剤はこの研究中には用いない。

- (i) ステロイド剤の全身投与（経口、静注）。但し、急性アレルギー反応の治療のために必要な場合を除く。
- (ii) 免疫抑制剤、その他の抗癌剤

III. 患者登録

本研究への患者登録は、研究の内容についてインフォームドコンセントが得られた後に、同意書に署名された時点で開始される。

IV. 投与

IV-1 薬剤投与量およびスケジュール

ペプチド：サバイビン 2B ペプチド (Multiple Peptide System 社製<米国>、GMP grade 合成ペプチド)。

IFA (不完全フロイントアジュバント) :

montanide ISA-51 (SEP. PIC 社<フランス>)

IFN- γ : スミフェン (住友製薬)

HDAC 阻害剤 (VPA) : デパケン R (協和発酵キリン)

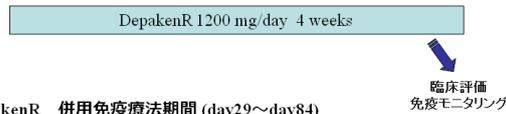
デパケン R は、1200mg/day を 3 回 (食後) に分けて内服する。免疫療法は、これまでわれわれが施行してきた臨床試験プロトコルに準じる。『サバイビン 2B ペプチド 1.0mg / 1ml + IFA 1ml + IFN- γ 300 万 IU』

免疫療法の投与方法はこれまでの臨床試験同様、ペプチド 1.0mg を 1.0ml の生理食塩水に溶解し、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 週間間隔で皮下注射する。免疫応答増強剤として IFN- γ (300 万 IU) を週 2 回皮下注射する。ペプチドと IFA の混合液の注射日と IFN- γ 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、ペプチドと IFA と IFN- γ を混合液として 3 剤

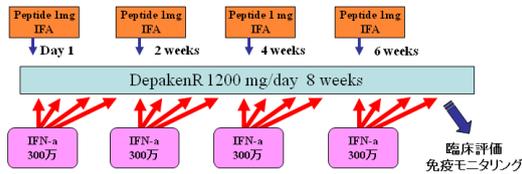
を一度に投与する（図1）。

図1 投与プロトコール

(1) DepakenR 前投与期間 (day1~day28)



(2) DepakenR 併用免疫療法期間 (day29~day84)



注射部位は、原則的に患側の側腹部である。また $10 \cdot g$ のペプチドを $0.1ml$ の生理食塩水に溶解したものを皮下注と同側の前腕に皮内注射し、遅延型過敏反応検査をする。上肢を選択することが不可能な場合にはいずれの注射も左右いずれかの大腿に行く。以上の投与を2週間ごとに4クール施行し、その後に効果判定を施行し本治療を終了とする。

IV-2 併用療法

以下の併用療法は研究期間中には行わない。

- ・急性アレルギー反応に対する場合を除くステロイド剤の全身投与
- ・免疫抑制剤

研究計画を遂行する上で問題点に対する配慮、問題が生じた時の対応策

臨床研究を遂行する上で、Grade3以上の重篤な有害事象が生じた場合には、**当院効果安全性評価委員会に速やかに報告し、今後の対応について審査を受ける。**本臨床試験は第一相臨床試験であることから、**安全対策には十分注意**していく必要がある。

4. 研究成果

2010年4月より2012年3月までサバイピン2Bペプチドによるワクチン療法を、再発膵癌3例、再発胆管癌1例、再発乳癌1例、切除不能胆管癌1例、再発十二指腸癌1例、再発大腸癌1例に施行した。いずれも有害事象はグレード1にとどまる発熱2例で、大きな有害な生体反応はなく、予定のプロトコールを全例で遂行できた。膵癌1例と再発十二指腸癌の1例以外の6例にペプチド特異的リンパ球の誘導を認め、当ワクチンに対する免疫学的反応が認められた。臨床効果はリンパ球の誘導がみられた6例中5例に、いずれもRECIST上のSDならびに腫瘍マーカー値の上昇抑制がみられ、腫瘍増大抑制効果が認められた。しかし膵癌1例と十二指腸癌の1例ではPDであった。これまでの同ワクチン療法を施行してきた主な概要としては、その臨床

効果は免疫学的反応とほぼ一致しているものの、必ずしもそうでなく有用な例も少なからず存在していた。リンパ球の誘導と臨床効果の相関関係は大腸癌66%、乳癌33%、膵癌100%であった。そこで免疫逃避機構の一つとしてMHCクラスI発現低下に注目したところ、抗原提示分子であるMHC class I分子発現は大腸癌66%、乳癌17%、膵癌100%と乳癌で低率であった。乳癌においてはHDAC阻害剤がMHCクラスI発現増強させることをin vivoで確認しており、これを臨床的に確認すべくHDAC阻害剤併用のワクチン療法の臨床試験を行った。上記期間に乳癌術後鎖骨上リンパ節再発の患者1例が登録された。症例がMHC class I分子発現低下例であることを確認し、HDAC阻害剤(®デパケンR 1200mg/day)を1カ月内服させ、その後併用しつつペプチドワクチン投与を行った。結果、有害事象はG-1の肝機能障害、嘔気のみで臨床試験遂行可能であった。HDAC阻害剤単独投与後にはみられなかったリンパ球誘導は、ワクチン投与後に確認され、臨床効果として明らかな腫瘍増大は認めず、現在投与継続中である。

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12件)

1. Matsuzaki J, Torigoe T, Hirohashi Y, Kamiguchi K, Tamura Y, Tsukahara T, Kubo T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Takahashi S, Sato N. ECRG4 is a negative regulator of caspase-8-mediated apoptosis in human T-leukemia cells. *Carcinogenesis*. 2012 Mar 12. [Epub ahead of print] 査読有り
2. Mizuuchi M, Hirohashi Y, Torigoe T, Kuroda T, Yasuda K, Shimizu Y, Saito T, Sato N. Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):185-90. Epub 2011 Oct 15. 査読有り
3. Mori T, Nishizawa S, Hirohashi Y, Torigoe T, Tamura Y, Takahashi A, Kochin V, Fujii R, Kondo T, Greene MI, Hara I, Sato N. Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):27-32. Epub 2011 Oct 2. 査読有り

4. Nakatsugawa M, Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Murase M, Asanuma H, Tamura Y, Morita R, Michifuri Y, Kondo T, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N. SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumorigenicity. *Lab Invest.* 2011 Dec;91(12):1796-804. doi: 10.1038/labinvest.2011.140. Epub 2011 Sep 19. 査読有り
5. Hirohashi Y, Sato N. Tumor-associated dendritic cells: molecular mechanisms to suppress antitumor immunity. *Immunotherapy.* 2011 Aug;3(8):945-7. 査読有り
6. Kano M, Tsukahara T, Emori M, Murase M, 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 Aug;102(8):1443-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01962.x. Epub 2011 May 31. 査読有り
7. Tanaka T, Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Masumori N, Sato N, and Tsukamoto T. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2011 May;137(5):789-94. Epub 2010 Jul 31. 査読有り
8. Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Morita R, Takahashi A, Asanuma H, Nakatsugawa M, Nishizawa S, Tamura Y, Tsuruma T, Terui T, Kondo T, Ishitani K, Hasegawa T, Hirata K, Sato N. Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *Am J Pathol.* 2011 Apr;178(4):1805-13. 査読有り
9. Oura J, Tamura Y, Kamiguchi K, Kutomi G, Sahara H, Torigoe T, Himi T, Sato N. Extracellular heat shock protein 90 plays a role in translocating chaperoned antigen from endosome to proteasome for generating antigenic peptide to be cross-presented by dendritic cells. *Int Immunol.* 2011 Apr;23(4):223-37. Epub 2011 Mar 18. 査読有り
10. Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Kiriyama K, Tamura Y, Sato E, Takahashi H, Sato N. Comparison of speedy PCR-ssp method and serological typing of HLA-A24 for Japanese cancer patients. *J Immunoassay Immunochem.* 2011 Apr;32(2):93-102. 査読有り
11. Kameshima H, Tsuruma T, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Ichimiya S, Kanaseki T, Iwayama Y, Sato N, Hirata K. Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* 2011 Jun;102(6):1181-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01 査読有り
12. Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G, Nakanishi K, Kamiguchi K, Torigoe T, Sato N. Tumor-produced secreted form of binding of immunoglobulin protein elicits antigen-specific tumor immunity. *J Immunol.* 2011 Apr 1;186(7):4325-30. Epub 2011 Feb 21. 査読有り
- [学会発表] (計6件)
- 鳥越俊彦, がん幹細胞の免疫学的特性とワクチンの開発, 第13回癌治療増感研究シンポジウム, 2011年2月11日, 奈良
- 鳥越俊彦, がん組織の微小環境と免疫, 第100回日本病理学会学術集会シンポジウム, 2011年4月28日, 横浜
- 鳥越俊彦, 難治がんに対するペプチドワクチン療法: 現状と課題, 北海道癌談話会シンポジウム, 2011年6月25日, 札幌
- 鳥越俊彦, がん幹細胞の免疫学的特性とワクチンの開発, がん免疫学会シンポジウム, 2011年6月30日, 大阪
- 九富五郎, 進行・再発膀胱癌に対するサバイビン2Bペプチドによるワクチン療法, 第49回日本癌治療学会, 2011年10月29日, 名古屋
- 九富五郎, HSP-癌ペプチド複合体ワクチンの高CTL誘導性機構の解析と治療への応用, 第24回日本バイオセラピー学会, 2011年12月1日, 和歌山
- [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：

研究者番号：

○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

平田 公一 (HIRATA KOICHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50136959

(2) 研究分担者

佐藤 昇志 (SATO NORIYUKI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50158937
鳥越 俊彦 (TORIGOE TOSHIHIKO)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20301400
古畑 智久 (FURUHATA TOMOHISA)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80359992
大村 東生 (OHMURA TOSEI)
札幌医科大学・医学部・特任准教授
研究者番号：30295349
亀嶋 秀和 (KAMESHIMA HIDEKAZU)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：80517912
木村 康利 (KIMURA YASUTOSHI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80311893
九富 五郎 (KUTOMI GORO)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：10404625

(3) 連携研究者

()