

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 17日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2011

課題番号：22689041

研究課題名（和文） 骨軟部肉腫に対する宿主免疫応答の解析

研究課題名（英文） Immunological response against bone and soft tissue sarcoma

研究代表者

塚原 智英 (TSUKAHARA TOMOHIDE)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20404634

研究成果の概要（和文）：

骨肉腫抗原 PBF を標的とした骨肉腫患者に対するペプチドワクチン療法第 I 相臨床試験を行った。HLA-A24 拘束性 PBF ペプチドを 5 例に、HLA-A2 拘束性 PBF ペプチドを 2 例に、不完全フロイントアジュバントと共に接種した。HLA-A24 症例の 2 例および HLA-A2 症例の 1 例で、ペプチドワクチン接種後にペプチド特異的 CTL の増加が認められた。臨床効果はいずれも PD であった。今後さらに症例を重ねてペプチドワクチンの安全性と効果を検証し、臨床第 II 相試験計画の基盤とする。

また、我々は腫瘍における標的 HLA/ペプチド複合体の効率的な検出・定量を目指して、骨肉腫抗原 PBF をモデルとして HLA/ペプチド複合体特異的抗体（ナチュラルエпитープ抗体）の作製を試みた。ヒト末梢血単核球と摘出扁桃の RNA より scFv ファージディスプレイライブラリを作製した。次に scFv を発現するライブラリファージと抗原（HLA-A2/PBF ペプチド）のパニングを行った。パニングの後、scFv ファージ 94 クローンを ELISA でスクリーニングして HLA-A2/PBF ペプチドに反応する 1 クローンを同定した。この scFv クローンをヒト IgG1 サブタイプ (scFv-hIgG1) に変換した。scFv-hIgG1 はペプチドをパルスした T2 細胞を FACS 解析で認識し、また表面プラスモン共鳴解析で $10e-9$ M オーダーの強い親和性を示した。このナチュラルエпитープ抗体は、腫瘍細胞表面の HLAp を検出する上で今後有用と考えられた。またこれらの知見はナチュラルエпитープ抗体を発現する人工 CTL の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We performed phase I clinical peptide vaccination trial for patient with osteosarcoma. We used HLA-A24 or HLA-A2-restricted PBF-derived peptides as the vaccines with incomplete Freund' adjuvant. The peptide-specific CTL responses were observed in two HLA-A24+ and one HLA-A2+ patients. After the confirmation of safety and immunogenicity of the peptide vaccines, we will plan phase II trial as adjuvant therapy after operative resection combined with post-operative chemotherapy.

In addition, we generated artificial antibody against HLA/peptide complex recognized by CTL (natural epitope antibody). scFv phage display library was constructed from RNA derived from human naïve PBMC and tonsils, followed by biopanning using HLA-A2/PBF peptide complex. After panning, one scFv clone was obtained and converted into hIgG1 subtype (scFv-hIgG1). The scFv-hIgG1 recognized peptide-pulsed T2 cells by FACS and showed high affinity by SPR analysis. This natural epitope antibody might be useful for the detection of HLA/peptide complex on tumor cells and for the development of genetically engineered CTLs expressing natural epitope antibody for adoptive cell therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2011年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

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：骨・軟部腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫に代表される骨軟部悪性腫瘍は予後不良であり、新しい治療法が強く求められている。我々は骨肉腫抗原を標的としたペプチド癌ワクチンを目指した研究を行ってきた。まず骨肉腫細胞株と自家CTLクローンを樹立し、cDNAライブラリ発現クローニング法により世界で初めての骨肉腫抗原 PBF を同定した(Tsukahara et al. Cancer Res 2004)。PBFは Zn finger domain を持つ転写調節因子であり、結合蛋白 Scythe/BAT3 と共に骨肉腫細胞のアポトーシスを制御している(Tsukahara et al. Cancer Sci 2009)。PBF mRNA の発現は骨軟部肉腫の80%で見られ、上皮系癌でも70%に発現が見られた。また骨軟部肉腫パラフィン包埋切片におけるPBFの発現を免疫染色で解析したところ、PBF蛋白は約80%で発現が見られた。またPBF陽性の骨肉腫患者の予後は、PBF陰性患者に比べて有意に不良であった(Tsukahara et al. Cancer Sci 2008)。以上より、PBFは予後不良骨肉腫患者における治療標的分子となり得ると考えた。そこで我々はHLA-A24及びHLA-A2拘束性PBFペプチドの一次構造を設計し、これらのペプチド(PBF A24.2, PBF A2.2)に対する骨肉腫患者の免疫応答を詳細に解析した。その結果、患者末梢血におけるPBF A24.2 およびPBF A2.2ペプチド特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の存在頻度はそれぞれ平均 3×10^{-6} , 2×10^{-6} であった。これは代表的なメラノーマ抗原 MAGE3.A1 特異的 CTL の存在頻度 (10^{-7} 以下)と比べて同等の結果であった。そしてHLA-A24/PBF A24.2及びHLA-A2/PBF A2.2 ペプチドテトラマー特異的 CTL クローンを作製してその機能を解析した(Tsukahara et al. Cancer Sci 2008, J Transl Med 2009)。

2. 研究の目的

(1) 骨肉腫抗原 PBF を標的とした癌ワクチン療法による骨軟部肉腫の増殖制御

上記の研究背景をふまえて、本研究では骨肉腫抗原 PBF を標的とした癌ワクチンによる骨肉腫患者の免疫応答を解析し、腫瘍増殖の制御を目指す。本学附属病院倫理委員会の承認のもと、HLA-A2拘束性またはHLA-A24拘束性 PBF ペプチドを用いた骨肉腫患者における癌ワクチン療法の第1相臨床試験を開始した (Clinical trial registration: UMIN000001632, UMIN000001633)。エンドポイントは安全性の確認であるが、同時に次のプロトコル作製のために患者末梢血におけるワクチン特異的 CTL の存在頻度と機能を明らかにする。

(2) ファージディスプレイ抗体ライブラリを用いた T 細胞受容体類似抗体の開発

一方、癌ワクチン療法において腫瘍の免疫逃避が問題となる。我々はこれまでに骨肉腫パラフィン包埋切片における HLA class I 分子の発現を解析し、非ワクチン患者において HLA class I 分子の発現が低下していると予後が有意に不良であることを見いだしており(Tsukahara et al. Cancer Sci 2006)、宿主免疫に対する骨肉腫の抗原提示能の重要性が示唆されている。しかし癌ワクチン標的分子である HLA class I 分子と PBF ペプチドの複合体そのものの発現を特異的に評価することは HLA class I 抗体では不可能である。そこで我々は現在開発しているヒト由来 Variable fragment single chain(scFv)ファージディスプレイ抗体ライブラリによる抗 HLA class I・PBF 抗原ペプチド複合体特異的抗体の樹立を試みる。そして腫瘍における HLA/PBF ペプチド複合体の発現解析をして、癌ワクチン療法における腫瘍の免疫逃避機構を解明する。また本抗体はエピトープが本来は細胞傷害性Tリンパ球(CTL)のT細胞受容体(TCR)の認識部位が酷似する T 細胞受容体類似抗体 (TCR-like antibody)とみなすことができる。そのため TCR-like antibody を種々の毒素と組み

合わせて新規の抗体療法開発に、また抗体を末梢血単核球に遺伝子導入することで新規のエフェクター細胞の開発につなげていく。

3. 研究の方法

(1) 骨肉腫抗原 PBF を標的とした癌ワクチン療法による骨軟部肉腫の増殖制御

骨肉腫抗原 PBF を標的とした HLA-A24 および HLA-A2 拘束性ペプチド癌ワクチン療法の臨床試験を実施し、安全性と臨床的・免疫学的効果を検討する。アジュバントには不完全フロイントアジュバント(IFA)およびインターフェロン α を用いる。本学倫理委員会の承認を受け、試験を開始した。臨床評価は RECIST 基準によって判定する。免疫学的効果は、in vitro 抗原刺激(Mixed Lymphocyte-Peptide Culture; MLPC)を併用したテトラマー染色と ELISPOT を用いる。HLA-A24 9 例, HLA-A2 12 例の患者エントリーを目指す。

(2) ファージディスプレイライブラリを用いた T 細胞受容体類似抗体(TCR-like antibody)の開発

(i) ナイブドナー由来大規模 scFv ファージディスプレイライブラリの構築

汎用性を高めるために、ヒトナイブドナー由来のライブラリを構築する。このライブラリはあらゆる抗原蛋白複合体に対応可能で、マウス由来モノクローナル抗体を作製する際に必要な免疫を要しない点が特徴である。健康者 31 人の末梢血単核球を収集し、total RNA を抽出する。これらより oilgo dT カラムを用いて mRNA を精製し、IgM 特異的オリゴプライマーを用いて抗体由来の 1st-strand cDNA を合成する。可変領域重鎖(Variable region of heavy chain; VH)および可変領域軽鎖(Variable region of light chain; VL)特異的プライマーセット(合計 5 4 種)を用いた PCR により VH, VL 領域を増幅する。これらの PCR 断片を全て独立した gel extraction を行って精製する。精製した PCR 産物の 1/10 をテンプレートとして Secondary PCR により制限酵素認識部位を導入する。制限酵素処理をしたのちに、これらを我々が pMod1(Pansri et al. BMC Biotechnol 2009)より改変した phagemid vector に VL, VH の順にクローニングする。VH と VL のクローニングサイトの間には Likner peptide (Gly4Ser) 3 をあらかじめ挿入する。VH, VL グループの組み合わせを変えて合計 1 4 個の sublibrary を構築して大腸菌に形質転換し、Sublibrary あたり 1×10^7 クロネンを含む合計 1×10^8 規模のナイブドナー由来の scFv ファージディスプレイライブラリを構築する。なお、これらの方法

は McCafferty らの報告を適宜改変したものである(Schofield et al. BMC Genome Biology, 2007)。

構築したライブラリにヘルパーファージと共感染することでファージ G3 蛋白に抗体断片 scFv を提示するファージ抗体を得ることができる。

得られた抗 HLA/ペプチド複合体 scFv の特異性を ELISA, FACS, 表面プラスモン共鳴で解析する。

4. 研究成果

(1) 骨肉腫抗原 PBF(papillomavirus binding factor)を標的とした HLA-A24 および HLA-A2 陽性骨肉腫患者に対するペプチドワクチン第 1 相臨床試験を行った。HLA-A24 陽性患者 5 例(ペプチド 1mg+IFA 3 例, ペプチド 10mg+IFA 2 例)HLA-A2 陽性患者 2 例(ペプチド 1mg+IFA)にワクチン接種を行った。転帰はいずれも PD であったが、HLA-A2 陽性の 1 例はワクチン接種により末梢血におけるペプチド特異的 CTL の増加が ELISPOT で認められた。この症例はペプチドワクチンの接種を継続しており、現在 10 か月を経過して生存中である。ペプチドワクチン 6 回接種後に切除した皮膚転移巣には CD8 陽性 T 細胞の浸潤が認められた。また腫瘍組織は標的抗原 PBF 強陽性, HLA class I 分子強陽性を示した。

(2) ファージディスプレイ scFv 人工抗体ライブラリを構築し、CTL の標的となる骨肉腫抗原 PBF ペプチドと HLA class I 分子の複合体を特異的に認識するナチュラルエピトープ抗体を樹立した。次に、scFv クローン#1 を 2 価のヒト型 IgG1 に変換した #1scFv-hIgG1 を得た。#1scFv-hIgG1 抗体は細胞表面上の HLA-A2 に提示される PBF A2.2 ペプチドを特異的に認識し、FACS で検出可能であった。また #1scFv-hIgG1 をテトラマー化することで FACS 解析における特異的シグナルを増強させることができた。#1scFv-hIgG1 の結合親和性を表面プラスモン共鳴解析で検討した。抗体の親和性を示す KD 値は $10e-9M$ レベルであった。同様の特異性を持つ T 細胞受容体レコンビナント蛋白で一般に $10e-5M$ レベルと報告されており、本抗体の抗原親和性は極めて高い事がわかった。この人工抗体により、骨肉腫の細胞表面上に提示されるペプチドと HLA class I (A2 アレル)の複合体を直接検出できる可能性がある。また scFv より chimeric antigenic receptor 遺伝子を構築し、現在リンパ球へ導入している。これらの研究成果が新しいエフェクター細胞の開発につながる可能性がある。

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 5 件)

- ①. Matsuzaki J, Torigoe T, Hirohashi Y, Kamiguchi K, Tamura Y, Tsukahara T, Kubo T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Yasuda K, Takahashi S, Sato N. ECRG4 is a negative regulator of caspase-8-mediated apoptosis in human T-leukemia cells. *Carcinogenesis*, 33: 996-1003, 2012. doi: 10.1093/carcin/bgs118 (査読あり)
- 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. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01962.x. (査読あり)
- ③. 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. doi: 10.1002/jso.21829. (査読あり)
- ④. 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 interferon α of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Sci* 2011, 102: 1181-1187. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01918.x. (査読あり)
- ⑤. 江森誠人, 塚原智英, 川口哲, 和田卓郎. 骨軟部肉腫に対するペプチドワクチン療法. *日本臨床*, 9:1670-1673, 2011. doiなし (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

- ①. 日本免疫学会総会 於 ; 大阪
第 40 回 平成 23 年 11 月 27-29 日
Generation of TCR-like antibody against HLA/peptide complex of an osteosarcoma

antigen PBF「ワークショップ 48: がん免疫療法」

札幌医科大学第一病理

塚原智英, 鳥越俊彦, 佐藤昇志

札幌医科大学整形外科

和田卓郎

- ②. 日本癌学会学術総会 於 ; 名古屋
第 70 回 平成 23 年 10 月 3-5 日
Generation of TCR-like antibody against HLA/peptide complex of an osteosarcoma antigen PBF
札幌医科大学第一病理
塚原智英, 鳥越俊彦, 佐藤昇志
札幌医科大学整形外科
和田卓郎
- ③. 日本臨床免疫学会総会 於 ; 東京
第 39 回 平成 23 年 9 月 15-17 日
骨肉腫抗原を標的とした TCR 類似抗体の開発「MWS ワークショップ」
札幌医科大学第一病理
塚原智英, 鳥越俊彦, 佐藤昇志
札幌医科大学整形外科
和田卓郎
- ④. 日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
於 ; 京都
第 44 回 平成 23 年 7 月 14-15 日
骨軟部肉腫における癌幹細胞を標的とする免疫療法「パネルディスカッション I 幹細胞研究の骨・軟部腫瘍学への応用」
札幌医科大学第一病理
塚原智英, 佐藤昇志
札幌医科大学整形外科
嘉野真允, 江森誠, 山下敏彦, 和田卓郎
- ⑤. 日本がん免疫学会総会 於 ; 大阪
第 15 回 平成 23 年 6 月 30-7 月 1 日
Generation of TCR-like antibody against HLA/peptide complex of an osteosarcoma antigen PBF
札幌医科大学第一病理
塚原智英, 鳥越俊彦, 佐藤昇志
札幌医科大学整形外科
和田卓郎
- ⑥. 14th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting: 2010 Nov 11-13, Paris, France,
Scythe/BAT3 regulates apoptotic cell death induced by the osteosarcoma antigen PBF in human osteosarcoma

Departments of Orthopaedic Surgery and Pathology, Sapporo Medical University
Tomohide Tsukahara, Shigeharu Kimura, Shingo Ichimiya, Satoshi Kawaguchi, Masanobu Kano, Takuro Wada, Toshihiko Torigoe, Toshihiko Yamashita, Noriyuki Sato,

⑦. Immunology: 2010 Aug. 22-27, Kobe, Japan.

Development of peptide vaccination therapy targeting apoptosis regulator protein PBF for patients with osteosarcoma
Departments of Orthopaedic Surgery and Pathology, Sapporo Medical University
Tomohide Tsukahara, Satoshi Kawaguchi, Toshihiko Torigoe, Shingo Ichimiya, Masanobu Kano, Akari Takahashi, Satoshi Nagoya, Takuro Wada, Toshihiko Yamashita, Noriyuki Sato

〔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：

○取得状況（計 1 件）

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：同上
種類：特許
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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 智英 (TSUKAHARA TOMOHIDE)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：20404634