

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592342

研究課題名（和文）膀胱癌に対する再発予防がんワクチン療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of prophylactic vaccination for bladder cancer

研究代表者

北村 寛 (Kitamura, Hiroshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00404674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000 円、（間接経費） 1,200,000 円

研究成果の概要（和文）：アポトーシス抑制分子サバイビンを標的とした新規ロングペプチドワクチンを開発し、マウスモデルにおいて従来のMHCクラスI拘束性ショートペプチドワクチンよりも強力な免疫反応を誘導し、抗腫瘍効果が高いことが示された。さらに膀胱化学発癌を予防する効果も認められた。サバイビン2Bペプチドを用いた臨床試験を5例に実施し、解析が完了した4例中1例でエピソード特異細胞傷害性T細胞を誘導し、2年以上の無再発生存期間を得た。

研究成果の概要（英文）：Peptides SVNC-S, containing an MHC class I-restricted epitope, and SVNC-L, containing MHC class I- and II-restricted epitopes, were derived from the amino acid sequence of survivin. Vaccination with SVNC-L induced a more powerful immune response than that with SVNC-S. The SVNC-L vaccination resulted in more significant suppression of the tumour growth than vaccination with SVNC-S. The SVNC-L vaccination also prevented BBN-induced bladder carcinogenesis.

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：腫瘍学 がんワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは膀胱癌においてアポトーシス抑制分子サバイビンが高率に発現し、かつ癌抗原として患者の免疫系に認識されていること、進行尿路上皮癌患者に対する臨床第Ⅰ相試験で、サバイビン 2B ペプチドワクチンが免疫応答を誘導し、抗腫瘍効果をもたらし、忍容性に優れていることを確認した。一方、膀胱癌、特に筋層非浸潤性膀胱癌においては、易再発性の問題があり、抗癌剤や BCG の膀胱内注入療法を行っても再発を繰り返す例がしばしばあり、より有効な再発予防策の確立が望まれている。

## 2. 研究の目的

上記の知見をもとに、本研究ではサバイビンを標的としたがんワクチン療法の膀胱癌再発予防療法への応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) サバイビン 2B ペプチド (MHC class I 拘束性ペプチド) を用いたワクチンを凌駕する新規がんワクチンを選定し、免疫反応と抗原提示機構を明らかにする。樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞に効率的に取り込まれ、抗原提示されやすいワクチンを開発する。
- (2) ワクチンの免疫学的効果を最大限に生かすアジュバントを同定する。
- (3) 選定したワクチンの投与間隔および投与回数の至適プロトコルを明らかにする。
- (4) 基礎研究結果をもとに、臨床第Ⅰ相試験を行い、安全性と免疫反応、さらに再発予防効果を検討する。

## 4. 研究成果

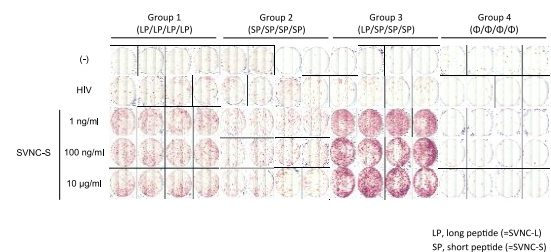
- (1) サバイビンを標的とした新規がんワクチンの開発  
研究初年度にはサバイビン 2B ペプチドをオリゴマノース・リポソームに包埋したワクチンを作成し、マウスモデルにおける免疫学的効果の検討を行った。しかし期待されたほどの免疫誘導が認められず、さらにワクチン合成会社の問題でワクチン提供が不可能となったため、次年度からは MHC クラスⅠとクラスⅡの両者のエピトープを含むロングペプチド SVNC-L (FIHCPTENEPDLAQCFKFELEGW) を開発し、実験を行った。その結果、従来の MHC クラスⅠ拘束性ショートペプチド SVNC-S (FFCFKFELEGW) を凌駕するエピトープ特異的免疫反応が誘導された (図 1)。さらにマウス腫瘍細胞皮下移植実験での腫瘍増殖抑制効果 (図 2) や、膀胱化学発癌モデルでの発癌抑制効果 (図 3) においても、SVNC-L が SVNC-S より優れた効果をもたらすことが示された。

- (2) ワクチンの免疫学的効果を引き出すアジュバント (免疫賦活剤) の検討  
本研究では臨床応用を見据えたアジュバ

ント開発を念頭においた。すなわち実験的に優れた免疫賦活効果が認められても、安全性に問題がある薬剤は検討から除外した。前項のロングペプチドワクチン (SVNC-L) は不完全フロイントアジュバント (IFA) との併用で十分な効果が得られたため、これ以上のアジュバント検索実験は行わず、SVNC-L + IFA の至適プロトコルに関する実験を進めた。

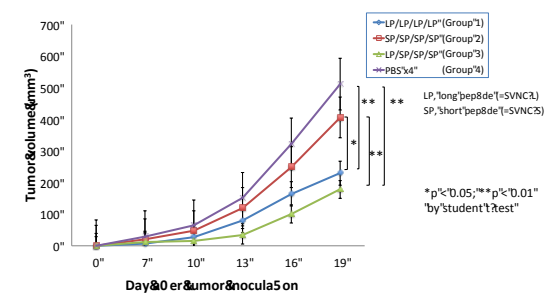
## (3) SVNC-L を用いたがんワクチンの至適プロトコルの検討

SVNC-L および SVNC-S ペプチドと IFA によるワクチンを 2 週間ごとマウスに行い、十分なエピトープ特異的免疫反応が得られる回数の検討を ELISPOT assay により行った。また SVNC-L と SVNC-S を組み合わせたワクチンプロトコルの検討も行った。その結果、SVNC-L を初回投与し、2 回目以降 SVNC-S を投与する方法がもっとも強力な免疫反応を誘導することや、最大効果を得るためには 4 回のワクチン接種が必要であることが明らかとなった (図 1)。



図(1) SVNC-L および SVNC-S 接種後の ELISPOT assay

そこで、マウス腫瘍細胞皮下移植実験と膀胱化学発癌抑制実験を、①SVNC-L を 4 回接種、②SVNC-S を 4 回接種、③初回 SVNC-L 接種、2 回目から 4 回目までは SVNC-S 接種、④negative control (PBS + IFA)、の 4 群を設定して行った。これらの in vivo 実験では、③は①と同様の抗腫瘍効果を示した。従って、初回に MHA クラスⅡエピトープを含むロングペプチドワクチンを投与することが重要であり、2 回目以降は MHC クラスⅠ拘束性のショートペプチドでも MHA クラスⅡエピトープを含むロングペプチドでもよいことが明らかとなった (図 2, 3)。



図(2) マウス腫瘍細胞皮下移植モデルにおける SVNC-L および SVNC-S ワクチンの抗腫瘍効果

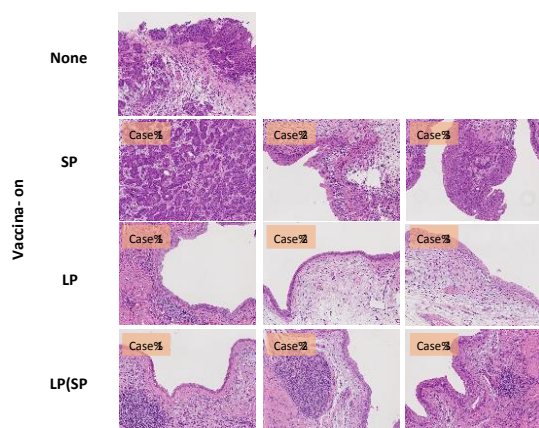


図 (3) マウス BBN 化学発癌モデルにおける SVNC-L および SVNC-S ワクチンの発癌予防効果

#### (4) 臨床試験

前述の通り、MHA クラス I およびクラス II エピトープを含むロングペプチドワクチンは有望と考えられるが、in vivo 実験結果が明らかになったのが 3 年次であったため、臨床試験は従来の MHC クラス I 拘束性サバイビン 2B ペプチドを用いて行った。

筋層非浸潤性膀胱癌の再発例で、1) 病理組織学的診断が尿路上皮癌で pTa-1NOM0、2) HLA 型が HLA-A\*2402、3) 腫瘍細胞がサバイビンを発現、などの条件を満たす患者を対象とした。サバイビン 2B ペプチド 1.0 mg を 1.0 ml の生理食塩水に溶解し、さらに不完全フロイントアジュバント 1.0 ml を加えてエマルジョン化したペプチド溶液を 2 週間間隔で計 6 回皮下注射した。2 週目、6 週目、12 週目において末梢血リンパ球を採取してテトラマー解析を行った。

これまでに登録した 5 例中、4 例でテトラマー解析を終了した。1 例でエピトープ特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導され (図 4)、2 年以上の無再発生存期間が得られている。一方、特異的免疫細胞の誘導が認められなかった症例においては、6 ヶ月以内に膀胱内再発を来した (表)。

以上より、サバイビン 2B ペプチドワクチン療法により、エピトープ特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されれば、再発予防効果が得られる可能性が示唆された。このような免疫誘導を高率に行うことが今後の課題と考えられ、基礎実験で有望であったロングペプチドワクチンの臨床応用を実現したいと考えている。

| Pt | Prior treatment | Tetramer-positive CTL | ELISPOT | RFS | Outcome |
|----|-----------------|-----------------------|---------|-----|---------|
| 1  | BCG, THP        | NC                    | +       | 6   | Rec     |
| 2  | BCG,            | NC                    | -       | 2   | Rec     |

|   | THP |    |   |    |     |
|---|-----|----|---|----|-----|
| 3 | BCG | +  | + | 24 | NED |
| 4 | BCG | NC | ± | 3  | Rec |
| 5 | BCG | +  | - | 6  | Rec |

表 再発膀胱癌患者に対するサバイビン 2B ペプチドワクチン療法の効果

注：CTL, cytotoxic T lymphocyte; RFS, recurrence-free survival; THP, pirarubicin; NC, no change; NED, no evidence of disease

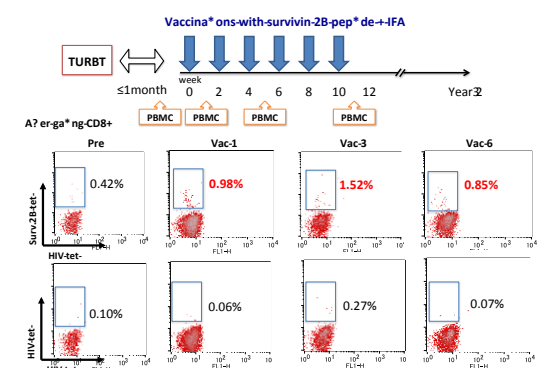


図 (4) 症例 3 のテトラマー解析結果

#### 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) Nishiyama N, Kitamura H, Maeda T, Takahashi S, Masumori N, Hasegawa T and Tsukamoto T: Clinicopathological analysis of patients with non-muscle-invasive bladder cancer: Prognostic value and clinical reliability of the 2004 WHO classification system. Jpn J Clin Oncol 43; 1124-1131, 2013. 査読有、DOI: 10.1093/jjco/hyt120.
- 2) 北村 寛、舩森直哉. 尿路上皮癌に対する治療の最前線. 細胞 45; 654-657, 2013. 査読無. DOI 及び URL なし.
- 3) Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Asanuma H, Inoue R, Nishida S, Tanaka T, Masumori N, Sato N, Tsukamoto T. Nuclear, but not cytoplasmic, localization of survivin as a negative prognostic factor for survival in upper urinary tract urothelial carcinoma. Virchows Arch 462; 101-107, 2013. 査読有、DOI: 10.1007/s00428-012-1343-7.
- 4) Tanaka T, Kitamura H, Inoue R, Nishida S, Takahashi-Takaya A, Kawami S, Torigoe S, Hirohashi Y, Tsukamoto T, Sato N, Masumori N. Potential survival benefit of anti-

apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine with and without interferon alpha therapy for patients with advanced or recurrent urothelial cancer: results from phase I clinical trials. Clin Dev Immunol 2013; 262967, 2013. 査読有、 DOI : 10.1155 /2013 /262967

- 5) Nishiyama N, Kitamura H, Mutoh M, Yanase M, Iwaki H, Hasegawa T, Tsukamoto T. Clinicopathological analysis of patients with nonmuscle-invasive bladder cancer who underwent radical cystectomy. Surg Sci 3; 347-352, 2012. 査読有、 DOI: 10.4236/ss.2012.37068

〔学会発表〕 (計 6 件)

- 1) 北村 寛、田中俊明：再発膀胱癌患者に対する HLA-A24 拘束性サバイビンペプチドワクチン予防投与。第 26 回日本バイオセラピー学会学術集会総会。2013 年 12 月 5-6 日、盛岡市。
- 2) 田中俊明、北村 寛：転移性尿路上皮癌に対する HLA A24 拘束性サバイビンペプチドワクチン療法の効果と治療前全身炎症反応に基づいた予後スコアについての検討。第 26 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2013 年 12 月 5-6 日、盛岡市。
- 3) Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Kawami S, Inoue R, Nishida S, Tanaka T, Masumori N, Sato N: Preclinical study of a novel immunotherapy for renal cell carcinoma: combination of long and short peptides. 5th European Multidisciplinary Meeting on Urological Cancers. Nov. 15-17, 2013, Marseille, France.
- 4) 西山直隆、堀田 裕、高橋 敦、柳瀬雅裕、伊藤直樹、立木 仁、宮尾則臣、松川雅則、国島康晴、田口圭介、北村 寛、舩森直哉：BCG failure をきたした筋層非浸潤性膀胱癌の予後に関する後ろ向き・多施設共同研究。第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月 24-26 日、京都市。
- 5) Nishiyama N, Kitamura H, Masumori N, Hasegawa T, Tsukamoto T: Clinicopathological analysis of patients with nonmuscle-invasive bladder cancer: Prognostic value and clinical reliability of the WHO grading system of 2004. AUA Annual Meeting. May 4-8, 2013, San Diego, USA.
- 6) 北村 寛：〈シンポジウム〉局所進行・有転移尿路上皮癌“尿路上皮癌に対する化学療法：一次、二次化学療法さらには

unfit 症例に対する治療をどうするか？”．第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013 年 4 月 25-28 日、札幌市。

〔図書〕 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

札幌医科大学医学部泌尿器科学講座：臨床試験

( <http://web.sapmed.ac.jp/uro/advancedmedicine/index.html> )

札幌医科大学医学部泌尿器科学講座：研究紹介

( <http://web.sapmed.ac.jp/uro/research/index.html> )

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 寛 (KITAMURA HIROSHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00404674

### (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

舩森 直哉 (MASUMORI NAOYA)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20295356