

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04311

研究課題名(和文) 長鎖癌抗原ペプチドと免疫抑制解除の併用による強力な癌免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer immunotherapy using tumor-associated antigen-derived long peptides and liberation from immune suppression mediated through IL-6 signaling

研究代表者

西村 泰治 (Nishimura, Yasuharu)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・シニア教授

研究者番号：10156119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：健常人とがん患者より、CTLとTh1細胞を誘導できる腫瘍関連抗原由来の短鎖および長鎖ペプチドで、頻度が高い複数のHLA分子により提示されるものを多数同定した。またHLA発現マウスに長鎖ペプチドを免疫し、内包された短鎖ペプチドに特異的なCTLを交差抗原提示により誘導できた。担がんマウスとがん患者では、骨髄球系細胞が産生するIL-6と可溶性IL-6受容体が増加し、IL-6シグナルによりTh1細胞分化とCTLを介した腫瘍免疫が減弱するが、抗IL-6抗体投与により腫瘍免疫を回復できた。腫瘍関連抗原の能動免疫とIL-6シグナル抑制を併用する、新しいがん免疫療法の開発に資する研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We previously identified novel tumor-associated antigens (TAAs) frequently overexpressed in various cancers. In this study we identified these TAAs-derived long peptides (LPs) that can induce both Th1 cells restricted by common HLA class II molecules, and tumor-reactive CTLs specific to SPs included in LPs by cross-presentation in both human in vitro culture and HLA-transgenic mice in vivo. These LPs were naturally presented by DC and these TAA-LPs-specific Th cells were observed in cancer patients suggesting usefulness of these peptides for cancer immunotherapy. We demonstrated that tumor-specific Th1 cells was attenuated in tumor-bearing mice and cancer patients in an IL-6 and soluble IL-6 receptor (sIL-6R)-dependent manner. Abundant IL-6/sIL-6R was produced by myeloid cells in tumor-bearing mice and inhibition of IL-6-mediated signals restored the T cell-mediated tumor immunity suggesting that IL-6/sIL-6R is a rational target to augment T-cell-mediated cancer immunotherapy.

研究分野：免疫学

キーワード：腫瘍免疫 腫瘍関連抗原 抗原ペプチド 細胞傷害性T細胞 ヘルパーT細胞 IL-6シグナル 免疫抑制的腫瘍微小環境 免疫抑制解除

1. 研究開始当初の背景

申請者らはがんと正常組織のゲノムワイド cDNA マイクロアレイ解析により、口腔・食道、膀胱、肺、膵臓、肝臓ほかのがんに高頻度に高発現し、精巣などの免疫系から隔離された臓器や胎生期臓器以外の成人臓器には発現しない、新規がん胎児性抗原とがん精巣抗原を9種類同定した。さらに日本人で頻度が高い HLA-A24 あるいは A2 分子に結合して、がん細胞を傷害する細胞傷害性 T 細胞(CTL)を誘導する短鎖ペプチドを多数同定した。

我々が開発した CTL を誘導する CACA1、IMP3 および LY6K の3種類の腫瘍関連抗原由来の短鎖抗原ペプチドの能動免疫療法に関する医師主導臨床研究において、進行性口腔がん43症例で重篤な有害事象もなく QOL を損なうこともなく、生存期間の有意な延長が観察された。さらに1症例ではあるが他の療法に不応のがん患者のがんの主病巣と転移巣が、5年以上に渡って消滅する Complete Response (CR) が得られた。

また我々はヒト iPS 細胞よりミエロイド系細胞を経て、樹状細胞 (iPS-ML-DC) を樹立することに成功した。さらに CD14⁺単球にレンチウイルスベクターを用いて、*cMYC* と *BM11* 遺伝子を同時に発現させることにより、1,000 倍以上に増殖するミエロイド系細胞を樹立し CD14-ML と命名した。CD14-ML は M-CSF と GM-CSF 依存性に増殖し、単球と同様に IL-4 存在下で優れた抗原提示機能を有する樹状細胞(CD14-ML-DC)に分化する。CD14-ML-DC は iPS 細胞の作製を経由しないので、前述の iPS-ML-DC より遥かに短期間で作成可能であり、本研究でもこれを利用することにした。

さらに我々は担がんマウスにおいて増加する、ミエロイド系抑制性細胞(MDSC)が産生する IL-6 が、腫瘍関連抗原特異的 Th1 細胞の分化を抑制することにより、CTL を介した腫瘍免疫を抑制することを発見した。そこで IL-6 シグナルの阻止により、長鎖腫瘍関連抗原ペプチドによるヒト Th1 細胞の誘導効率を、増強できるか否かについて検討することにした。

2. 研究の目的

本研究では、以下の研究により有効性が高い長鎖腫瘍関連抗原ペプチドならびに新規の免疫抑制解除療法を開発して、がん免疫療法の前臨床研究を行い、その成果を臨床応用に資することを目的とする。

(1) 臨床研究で有望な CTL 誘導性短鎖ペプチドを自然配列として内包し、HLA クラス II 分子(HLA-II)により提示され Th1 細胞が認識する長鎖腫瘍関連抗原ペプチドを同定して、その CTL/Th1 細胞誘導能を検討し臨床応用に適するものを同定する。

(2) 人工樹状細胞(CD14-ML-DC)の利用や、リポソームへの包埋などにより、長鎖腫瘍関連抗原ペプチドの CTL/Th1 細胞誘導効率を増強する方法を開発する。

(3) T細胞に免疫抑制状態を誘導する IL-6 シグナルあるいは CTLA4, PD-1/PD-L1 を阻止する抗体との併用により、長鎖腫瘍関連抗原ペプチドの抗腫瘍効果を増強する併用療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) CTL 誘導性短鎖ペプチドを内包する、Th1 細胞誘導性長鎖腫瘍関連抗原ペプチドの同定

最新の HLA-II 結合性ペプチドの推定アルゴリズムで候補ペプチドを探索し合成した。健常人あるいはペプチドワクチン接種前後の口腔癌または膀胱癌患者の末梢血単核細胞(PBMC)を刺激して、Th1 細胞を誘導する長鎖ペプチドと抗原提示に関わる HLA-II を同定した。さらに長鎖ペプチドを樹状細胞に負荷した際に、交差抗原提示能により内包された短鎖ペプチドに特異的な、CTL を活性化するものを探索した。またペプチド特異的な CTL と Th1 細胞の *in vitro* における協調作用について検討した。同時にペプチドで刺激したマウスやヒト PBMC に、毒性や有害作用がないか検討した。

(2) 人工樹状細胞とリポソームを利用した CTL/Th1 細胞誘導効率の増強法の開発

健常人とがん患者より CD14-ML-DC を樹立し、これに長鎖腫瘍抗原ペプチドを負荷して、抗原のプロセッシングおよび交差抗原提示を含む抗原提示能を有し、腫瘍関連抗原ペプチド特異的な CTL と Th1 細胞を活性化できるか否かを検証した。

分担研究者の河野らが開発した、pH 応答性ポリマー脂質を組み込んだリポソームで、エンドソームに取り込まれた後に、その内容物を細胞質に送達できるものを利用して、長鎖腫瘍抗原ペプチドによる交差抗原提示を介した、CTL 誘導効率の向上の有無について検討した。

(3) 担がん個体における IL-6 シグナルを介した免疫抑制誘導機序の解明と解除法の開発

T細胞に免疫抑制状態を誘導する、IL-6 あるいは免疫チェックポイント分子を介したシグナルを阻止する抗体の存在下における、腫瘍関連抗原ペプチド刺激で誘導される T細胞の抗腫瘍免疫応答の変化について検討した。

4. 研究成果

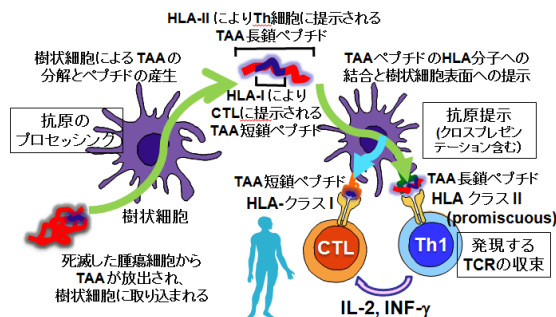
(1) CTL 誘導性短鎖ペプチドを内包する、Th1 細胞誘導性長鎖腫瘍関連抗原ペプチドの同定

HLA クラス II 分子(HLA-II)に結合するペプチドを推定する最新のアルゴリズムで、候補ペプチドを探索して合成し、健常人あるいは

ペプチドワクチン接種前後の口腔がんまたは膀胱がん患者の末梢血単核細胞(PBMC)を刺激して、Th1 細胞を誘導する長鎖ペプチドと抗原提示に關与する HLA-II を同定した。その結果、日本人で頻度が高い複数の HLA- に結合して、主に Th1 細胞を誘導できる長鎖ペプチドを、GPC3、IMP3 ならびに DEPDC1 について複数同定できた。さらに長鎖ペプチドを樹状細胞に負荷した際に、短鎖 CTL エピトープが産生され、CTL を活性化するものを同定した。また一部の長鎖ペプチド特異的な Th1 細胞が、*in vitro* において CTL の抗腫瘍免疫応答を増強できることを確認した(図1)。

さらに合成腫瘍関連抗原長鎖ペプチドで誘導した Th 細胞が、リコンビナント腫瘍関連抗原タンパク質を取り込ませた樹状細胞に反応することを確認した。また、これらの長鎖ペプチドの中から、樹状細胞に取り込まれ分解されて出来た短鎖ペプチドにより、CTL をも同時に活性化できるものを多数同定した。このような現象を、複数の健常人とがん患者の血液サンプルを用いて観察できた。また試験管内の培養系に T 細胞の免疫抑制を解除する PD-1 に対する抗体を添加することにより、CTL と Th1 細胞の腫瘍関連抗原に対する免疫反応が増強されることを観察した(図1)。

図1. CTL およびTh1細胞を共に活性化して腫瘍免疫を誘導する多数の腫瘍関連抗原(TAA)長鎖ペプチドの同定



我々の従来の研究成果と、本研究で同定された CTL/Th1 細胞を共に活性化できる長鎖腫瘍関連抗原ペプチドは、樹状細胞によってのみ CTL に交差抗原提示され、下記の細胞質送達性のリポソームとの併用により、CTL による優れた抗腫瘍効果を発現すると期待できる。

(2) 人工樹状細胞とリポソームを利用した CTL/Th1 細胞の誘導効率増強法の開発

CD14 陽性のヒト単球に、細胞増殖を促進あるいは細胞死を抑制する遺伝子を導入して発現させ、増殖特性が優れたミエロイド系細胞株(CD14-ML)を樹立して、同細胞株より大量の樹状細胞(CD14-ML-DC)を分化誘導する方法を開発した。この CD14-ML-DC に上記の腫瘍関連抗原由来の短鎖および長鎖ペプチドを負荷し、ヒト末梢血 T 細胞を刺激したところ、効率良く CTL および Th 細胞を誘導できた。

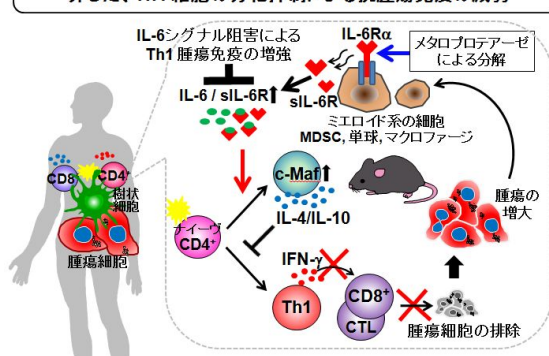
さらに、CTL エピトープ短鎖ペプチドを内包する腫瘍関連抗原長鎖ペプチドを、pH 応答性ポリマー修飾リポソームに包埋しヒト樹状細胞に負荷したところ、交差抗原提示による CTL 誘導効率が著明に増加した。

(3) 担がん個体における IL-6 シグナルを介した免疫抑制誘導機序の解明と解除法の開発

我々は従来の研究により、担がんマウスにおいて増加するミエロイド系細胞が産生する IL-6 が、腫瘍関連抗原特異的 Th1 細胞の分化を抑制することにより、CTL を介した腫瘍免疫を抑制することを発見した。本研究では担がんマウスのミエロイド系細胞の膜表面より遊離した、IL-6 受容体(sIL-6R)と IL-6 複合体を介したシグナルに起因する、CD4⁺T 細胞における C-Maf の発現増加が Th1 細胞の分化を抑制することを明らかにした(図2)。

さらに口腔がん患者では健常人と比較して、血清 IL-6 および sIL-6R の濃度が増加し、血清 sIL-6R が高値を示す患者では、ミエロイド系細胞表面における IL-6R の発現が減少していることを観察した。また口腔がん患者の CD14⁺ ミエロイド系細胞が分泌する IL-6/sIL-6R が、ヒト CD4⁺T 細胞からの Th1 細胞の分化誘導を c-Maf の発現増強を介して、抑制していることを発見した。つまり、がん患者でも担がんマウスと同様の機序により、IL-6/sIL-6R シグナルを介して Th1 細胞の分化が抑制されていることを明らかにした。

図2. 担がん個体または高齢個体における IL-6/sIL-6R シグナルを介した、Th1 細胞の分化抑制による抗腫瘍免疫の減弱



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)すべて査読あり。

Tsuruta M, (7名), Irie A, (2名), Eto M, Nakayama H, Nishimura Y*, Bladder cancer-associated cancer-testis antigen-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes induced CD4⁺ T cells expressing converged T-cell receptor genes *in vitro*. *OncImmunology* 2018, 7: e1415687, doi: 10.1080/2162402X.2017.1415687.

Tsukamoto H*, (4 名), Nishimura Y*, [Review] Immune-suppressive effects of IL-6 on T-cell-mediated anti-tumor immunity *Cancer Science* 2018, 109(3): 523-530, doi: 10.1111/cas.13433.

Tsukamoto H[#]*, Fujieda K[#], (9 名), Nishimura Y*, Soluble IL-6R expressed by myeloid cells reduces tumor-specific Th1 differentiation and drives tumor progression. ([#]equal contribution) *Cancer Research* 2017, 77: 2279-2291, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2446.

Hirayama M, (6 名), Irie A, (6 名), Kono K, (2 名), Nakayama H, Nishimura Y*, An oncofetal antigen, IMP-3-derived long peptides induce immune responses of both helper T cells and CTLs. *OncImmunity* 5:e1123368. 2016., doi: 10.1080/2162402X.2015.1123368.

Imamura Y, (6 名), Nakayama H, (1 名), Nishimura Y, Senju S*, Generation of large numbers of antigen-expressing human dendritic cells using CD14-ML technology. *PLoS ONE* 11, e0152384, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0152384.

Hirayama M and Nishimura Y*, [Review] The present status and future prospects of peptide-based cancer vaccines. *International Immunology* 2016, 28: 319-328, doi: 10.1093/intimm/dxw027.

Sayem MA, (3 名), Irie A, (4 名), Kono K, (1 名), Nishimura Y*, Identification of Glypican-3-derived long peptides activating both CD8⁺ and CD4⁺ T-cells; Prolonged overall survival in cancer patients with Th cell response. *OncImmunity* 5: e1062209., 2016. doi: 10.1080/2162402X.2015.1062209

Tsukamoto H*, (3 名), Nishimura Y*, IL-6-mediated environmental conditioning of defective Th1 differentiation dampens anti-tumor immune responses in old age. *Nature Communications* 6: e6702, 2015. doi: 10.1038/ncomms7702.

Yoshitake Y*, Nishimura Y, Nakamura Y, Shinohara M, [Authors' View] A clinical trial of multiple peptides vaccination for advanced head and neck cancer patients induced immune responses and prolonged OS. *OncImmunity* 4:e1022307, 2015. doi: 10.1080/2162402X.2015.1022307.

Nishimura Y*, (3 名), Shinohara M, [Review] Cancer immunotherapy using novel tumor-associated antigenic peptides identified by genome-wide cDNA microarray analyses. *Cancer Science* 106: 505-511, 2015. doi: 10.1111/cas.12650.

[学会発表] (計 53 件: 国際 12 件, 国内 41 件)

国際学会での発表 (計 12 件)

Nishimura Y, (ほか 15 名), Identification of bladder cancer-associated cancer-testis antigens-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class

II-restricted Th cell epitopes. The American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2018, Apr. 18, 2018, McCormick Place, Chicago, IL, (U.S.A.)

Nishimura Y, (ほか 5 名), A possible Th1 cell-activating combination cancer immunotherapy using active immunization and IL-6 signaling blockade. The 36th Sapporo International Cancer Symposium, June 24, 2017. Loyton Hotel, Sapporo, (Japan)

Nishimura Y, Educational Session: "Is there a revival of the cancer vaccine?", , The European Society of Medical Oncology (ESMO) Asia 2016, Dec. 16, 2016, Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre, Singapore, (Singapore)

Sayem MA, (4 名), Kono K, (2 名), Nishimura Y. Identification of oncofetal antigen Glypican-3-derived long peptides encompassing CTL and multiple HLA class II-restricted Th cell epitopes 13th CIMT (Cancer Immunotherapy) Annual Meeting, May 12, 2015. Rheingold Halle Congress Center, Mainz, (Germany)

国内学会での発表 (計 41 件)

西村 泰治, がん免疫療法を理解するための基礎免疫学、第 76 回日本がん学会学術総会、2017 年 9 月 30 日、パシフィコ横浜、(横浜市)

Nishimura Y, (他 12 名), Next generation combined cancer vaccines, The Core Symposia 2 "Beyond the immune checkpoint blockade", The 75th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Oct. 7, 2016, Pacifico Yokohama, (Yokohama Kanagawa)

Nishimura Y, Antigen recognition and immune response of human T cells, The Award Lecture for Human Immunology, The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Nov.22, 2015. Sapporo Convention Center, (Sapporo)

[図書] (計 11 件)

西村 泰治 「がん能動免疫療法の将来展望」臨床婦人科産科 (医学書院) 2018 年, 第 72 巻 6 号, p592-599.

鶴田 未季、西村 泰治 「がん免疫療法における腫瘍関連抗原ワクチン療法の現状と展望」, MHC (日本組織適合性学会誌) 2018 年, 第 25 巻 1 号, p40-49.

平山 真敏、西村 泰治 「CTL と Th 細胞を共に活性化できるがんペプチドワクチン療法の開発」 遺伝子医学 MOOK (メデイカルドウ社) 2017 年, 第 31 号, p110-116.

西村 泰治 「がん免疫療法に重要な抗原認識と腫瘍抗原を理解する」 Tips on Immuno-Oncology (医科学出版社) 2017 年, p33-37.

平山 真敏、西村 泰治: 腫瘍関連抗原ワクチン療法の現状と展望「特集 がん免疫療法のブレークスルー」西村 泰治 編集、医

学のあゆみ(医歯薬出版 株式会社), 2016年, 256: 817~822.

平山 真敏、西村 泰治: 腫瘍関連抗原ワクチン療法の現状と展望「がん免疫療法 腫瘍免疫学の最新知見から治療法のアップデートまで」河上 裕 編集、実験医学(株式会社 羊土社), 2016年, 増刊 第34巻 第12号: 148~155.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

(1)名称: DEPDC1 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

発明者: 西村 泰治、平山 真敏、中根 未季、山下(吉村)祥子

権利者: オンコセラピー・サイエンス株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2016-224624 号,

PCT/JP2017/ 040888

出願年月日: 2016年 11月 18日

国内外の別: 国内および国外

(2)名称: MPHOSPH1 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

発明者: 西村 泰治、平山 真敏、中根 未季、山下(吉村)祥子

権利者: オンコセラピー・サイエンス株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2016-224625 号,

PCT/JP2017/ 040889

出願年月日: 2016年 11月 18日

国内外の別: 国内および国外

取得状況(計10件)

(1) 名称: IMP-3 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

発明者: 西村 泰治、富田 雄介、平山 真敏、大沢 龍司

権利者: オンコセラピー・サイエンス株式会社

種類: 特許

番号: 9770498 米国

取得年月日: 2017年 9月 26日

国内外の別: 国外

(2) 名称: KIF20A EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

発明者: 西村 泰治、富田 雄介、大沢 龍司

権利者: オンコセラピー・サイエンス株式会社

種類: 特許

番号: 9561265 米国

取得年月日: 2017年 2月 7日

国内外の別: 国外

(3) 名称: LY6K EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

発明者: 西村 泰治、富田 雄介、大沢 龍司

権利者: オンコセラピー・サイエンス株式会社

種類: 特許

番号: 9644010 米国

取得年月日: 2017年 5月 9日

国内外の別: 国外

(4) 名称: CDCA1 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME

発明者: 西村 泰治、富田 雄介、大沢 龍司

権利者: オンコセラピー・サイエンス株式会社

種類: 特許

番号: 9687538 米国

取得年月日: 2017年 6月 27日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ: <http://www.immgenet.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 泰治 (Nishimura Yasuharu)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・シニア教授

研究者番号: 10156119

(2) 研究分担者

河野 健司 (Kono Kenji)

大阪府立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 90215187

(平成 28年 12月 4日に御逝去)

(3) 研究分担者

入江 厚 (Irie Atsushi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号: 30250343

(4) 連携研究者

江藤 正俊 (Eto Masatoshi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 90315078

(5) 連携研究者

中山 秀樹 (Nakayama Hideki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 70381001

(6) 研究協力者

塚本(粟井) 博文

(Tsukamoto (Awai) Hirotake)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号: 10433020