

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07082

研究課題名(和文) 口腔がんに対する、がん抗原由来長鎖ペプチドを用いたがんペプチドワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of peptide-based cancer immunotherapy using tumor antigen-derived long peptides for oral cancer patients

研究代表者

平山 真敏 (Hirayama, Masatoshi)

熊本大学・医学部附属病院・診療助手

研究者番号：50779171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔がん患者に対する、より有効性の高いがん免疫療法の開発を目指して、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞の両者を誘導・活性化するHLAクラスII分子拘束性の腫瘍抗原由来の長鎖ペプチドの同定、ペプチドワクチンの治療効果を予測するマーカーの開発について検討を行った。その結果、腫瘍抗原であるIMP-3、DEPDC1、MPHOSPH1由来の長鎖ペプチドを複数同定した。これらの長鎖ペプチドの一部は、ヘルパーT細胞のみならず細胞傷害性T細胞も活性化することができ、腫瘍免疫の活性化に有望であることが示唆された。また、これらの腫瘍抗原特異的ヘルパーT細胞のT細胞受容体の同定を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, to develop more effective cancer immunotherapy for oral cancer patients, we attempted to identify several HLA class II-restricted long peptides derived from some tumor antigens. We also tried to develop the biomarkers to predict the therapeutic effects of peptide-based cancer immunotherapy for oral cancer patients. As a result, we identified several long peptides derived from cancer antigens, such as IMP-3, DEPDC1, and MPHOSPH1. Some of these peptide could activate both helper T cells and cytotoxic T cells, suggesting that these peptides are useful for exhibiting stronger anti-tumor immune responses. In addition, we identified T cells receptors of these tumor antigen-specific helper T cells.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔がん がん免疫療法

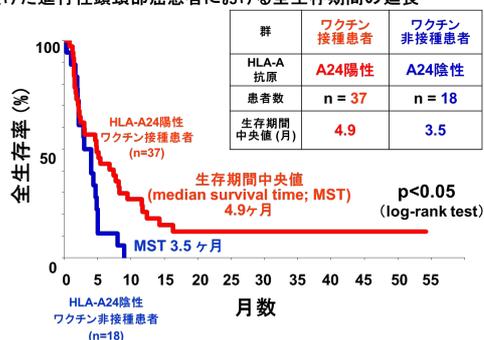
### 1. 研究開始当初の背景

近年、がん免疫療法が目覚ましい発展を遂げている。特に活性化 T 細胞に発現する免疫抑制分子である CTLA-4 や PD-1、ならびにがん細胞や免疫細胞を含むがん間質細胞に発現する PD-L1 に対する免疫チェックポイント阻害抗体療法が、悪性黒色腫や肺がん、頭頸部がんなど、多くの癌腫に対して著明な効果を示している (*New Engl. J. Med.* 366: 2443, 2012, *New Engl. J. Med.* 369: 122, 2013)。

われわれは、以前 cDNA microarray 解析により、口腔がんや食道がん、肺がんなど多様ながんを高発現する腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen; TAA) を複数同定した。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 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) を誘導する短鎖ペプチドを多数同定した。

われわれは、その研究成果を応用し、TAA である CDCA1、LY6K、IMP-3 に由来する HLA-A24 拘束性の短鎖ペプチドを用いたがんペプチドワクチン療法の第 II 相臨床試験を、進行口腔がん患者を対象に行った。その結果、安全性、およびワクチン非接種患者と比較してワクチン接種患者の生存期間の有意な延長を認めた (図 1) (*Clin. Can. Res.* 21: 312, 2015)。

図 1. CTL を誘導するがん抗原ペプチド 3 種混合ワクチンの接種を受けた進行性頭頸部癌患者における全生存期間の延長



一方で、進行がん患者に対するがん抗原短鎖ペプチドワクチンの単独療法に対して良好な治療効果を示す患者の割合はまだ一部に限られている。より強力な抗腫瘍免疫応答

を誘導するためには、CTL のみでなく 1 型ヘルパー T (Th1) 細胞の存在が重要であることが知られており、これらの Th1 細胞により産生される IL-2 や INF- $\gamma$  などのサイトカインの供給により、CTL の誘導と活性化が促進される (*Nature* 441: 890, 2006)。

また、短鎖ペプチドは、抗原提示細胞以外の体細胞の HLA クラス I 分子に結合することにより、CTL に免疫寛容を誘導することが報告されている (*Nat Rev Cancer.* 8: 351, 2008)。一方、長鎖ペプチドは抗原提示細胞内でプロセッシングされた後に HLA クラス II 分子、あるいはクロスプレゼンテーション経路を介して HLA クラス I 分子により提示され、TAA 特異的な Th 細胞のみならず、CTL も誘導できる。したがって、長鎖ペプチドを用いたがんペプチドワクチン療法は、より強力な抗腫瘍効果を誘導できるのみならず、免疫寛容の誘導を防ぐという点でも有用であると考えられる。

### 2. 研究の目的

前述したように、腫瘍抗原由来の短鎖ペプチドワクチンの単独療法の治療効果は非常に限定的である。より有効性の高いがん免疫療法の開発を目的とし、① ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) が認識する、HLA クラス II 分子拘束性の腫瘍抗原由来長鎖ペプチドの同定と、その抗腫瘍効果の検討、② ペプチドワクチン療法の治療効果を予測できるバイオマーカーの開発を前臨床的に検討した。

### 3. 研究の方法

HLA クラス II 分子拘束性の Th 細胞誘導性長鎖ペプチドの同定

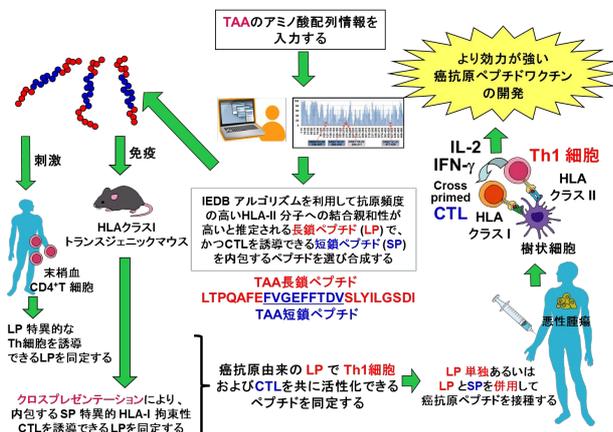
最初に、上記の進行口腔がん患者を対象とした CTL 誘導性短鎖ペプチドワクチン療法の臨床試験の際に標的となった TAA の一つである IMP-3、さらにそれ以外の TAA である DEPDC1、MPHOSPH1 を対象として、Th 細

胞誘導性の長鎖ペプチドの同定を行った。

まず、HLA クラス II 分子に結合するペプチドを推定するコンピュータアルゴリズムを利用して、日本人に高頻度に発現する HLA クラス II 分子に高親和性を示す長鎖ペプチドを上記 6 種類の TAA を用いて推定、合成した。次に、日本人集団中で頻度が高い数種類の HLA クラス II 遺伝子を有する健常人、および口腔がん患者の末梢血単核細胞を、これらの合成した長鎖ペプチドを用いて刺激し、抗原特異的な Th 細胞の誘導能を検討した。特異的 Th 細胞の誘導は、IFN- $\gamma$  ELISPOT 解析を用いて検討した。その結果、実際に Th 細胞誘導能を有していた長鎖ペプチドをその後の実験に用いた。

同定した長鎖ペプチドのうち、既知の CTL 誘導性短鎖ペプチドを内包するものについて、プロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞による cross-presentation を介して抗原特異的 CTL を活性化あるいは誘導することができるか否か *in vitro* 及び *in vivo* 実験で検討した。*in vitro* 実験については、IFN- $\gamma$  ELISPOT 解析およびテトラマー解析を用いて検討した。*in vivo* 実験については、HLA クラス I (A2 および A24) Tgm を用いて、長鎖ペプチドのクロスプライミング活性の解析を行った (図 2)。

図 2. CTLエピーブを自然配列として内包するTh1細胞エピーブを用いた、がん抗原由来長鎖ペプチドワクチン療法の開発



さらに、上記の TAA 特異的 Th 細胞クローンを樹立し、バルクの Th 細胞と Th 細胞クローンの T 細胞受容体 (T-cell receptor; TCR) の遺伝子解析を行った。

② ペプチドワクチン療法の治療効果を予測できるバイオマーカーの開発

進行口腔がん患者を対象とした CTL 誘導性短鎖ペプチドワクチン療法の臨床試験の際に採取した血清サンプルを用いて、IL-6 濃度と soluble IL-6 receptor の濃度を、ELISA を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

IMP-3、DEPDC1、および MPHOSPH1 由来の Th 細胞誘導性の長鎖ペプチドを複数同定した。これらの長鎖ペプチド特異的 Th 細胞は Th1 サイトカインを有意に分泌した。

また、これらの長鎖ペプチドのうち、CTL エピーブを内包するペプチドは、cross-presentation を介して Th 細胞のみならず CTL も誘導・活性化することが *in vitro* 実験および *in vivo* 実験で示された。これらの実験結果により、同定した TAA 特異的長鎖ペプチドが、抗腫瘍免疫応答の誘導・活性化に有用である可能性が示唆された。

DEPDC 1 と MPHOSPH1 に特異的なバルクの Th 細胞と Th 細胞クローンの T 細胞受容体 (T-cell receptor; TCR) の遺伝子解析を行った。その結果、バルクの Th 細胞の TCR はペプチド刺激を繰り返すのにしたがって特定の TCR に収束していった。さらに Th 細胞クローンについても TCR の同定を行った。

進行口腔がん患者を対象とした CTL 誘導性短鎖ペプチドワクチン療法の臨床試験の際に採取した血清サンプル中の IL-6 濃度と soluble IL-6 receptor の濃度を測定した。その結果、ワクチン回数が増えるごとに血清中の

IL-6 濃度が低下する傾向を認めたが、統計学的に明らかな有意差は認めなかった。

これらの研究成果は特許取得後に学会発表を行い、論文発表した。今後、これらの研究成果が、TAA 由来の長鎖ペプチドを用いたがんペプチドワクチン療法の臨床試験に応用され、新薬として用いられることが本研究の最終的な意義と考える。さらに、近年注目を浴びている免疫チェックポイント阻害療法とペプチドワクチン療法の併用により、より強力で経済的な複合的がん免疫療法の開発につながることを期待される。

また、現時点では、がん免疫療法の治療効果を予測・判断するためのバイオマーカーは、ほとんど存在しない。本研究では、IL-6 に着目したが、さらに別のサイトカインやケモカインに注目しながらバイオマーカーの開発に取り組みたい。

#### 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. M. Tsuruta, M. Hirayama, Y. Nishimura. (16 名中 8 番目) Bladder cancer-associated cancer-testis antigen-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes induced CD4<sup>+</sup> T cells expressing converged T-cell receptor genes *in vitro*. *OncoImmunology*. 7(4): e1415687, 2018. doi: 10.1080/2162402X.2017.1415687.
2. J. Sakata, M. Hirayama, H. Nakayama. (16 名中 9 番目) Predictive value of the combination of SMAD4 expression and lymphocyte infiltration in malignant transformation of oral leukoplakia. *Cancer Medicine*. 6(4): 730-738, 2017. doi: 10.1002/cam4.1005.
3. H. Tsukamoto, M. Hirayama, Y. Nishimura. (12 名中 3 番目) Myeloid cell-derived soluble IL-6 receptor diminishes the differentiation of tumor-specific Th1 cells to exacerbate tumor progression. *Cancer Research*. 77(9): 2279-2291, 2017. doi:10.1158/0008-5472.
4. M. Hirayama, Y. Nishimura. (18 名中 1 番目) An oncofetal antigen, IMP-3-derived long peptides induce immune responses of both helper T cells and CTLs. *OncoImmunology*. 5(6): e1123368-1-14, 2016. doi:10.1080/2162402X.2015.1123368.

5. M. Hirayama, Y. Nishimura. The present status and future prospects of peptide-based cancer vaccines. *International Immunology*. 28(7): 319-28, 2016. doi: 10.1093/intimm/dxw027.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 鶴田未季、「膀胱癌関連がん精巣抗原由来の長鎖ペプチドに特異的な HLA 拘束性 T 細胞の免疫応答と TCR の解析」(学術奨励賞獲得)  
第 26 回日本組織適合性学会大会、2017 年 10 月 27 日～29 日、JMS アステールプラザ、広島
2. 平山真敏、「口腔癌術後患者に対する Adjuvant ペプチドワクチン療法の臨床試験に関する検討」  
第 55 回日本癌治療学会学術集会 2017 年 10 月 20 日～22 日、パシフィコ横浜、横浜
3. 平山 真敏、「腫瘍関連抗原 IMP-3 由来の CTL と Th 細胞の誘導活性を併せ持つ長鎖ペプチドの同定」(優秀ポスター受賞)  
第 61 回日本口腔外科学会総会・学術集会、2016 年 11 月 25 日～27 日、幕張メッセ、千葉

〔図書〕(計 2 件)

1. 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 (洋土社) 第 31 号、2017 年
2. 平山真敏、西村泰治、「がん抗原ワクチン療法の現状と展望」, 実験医学 (洋土社) 第 34 巻第 12 号、p2002-2009、2016 年

〔産業財産権〕

取得状況（計3件）

1. 名称：DEPDC1 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME  
発明者：Y. Nhisimura, M. Hirayama, M. Nakane, S. Yamashita.  
権利者：Y. Nhisimura, M. Hirayama, M. Nakane, S. Yamashita.  
種類：特許  
番号：特願 2016-224624  
取得年月日：2016/11/18  
国内外の別： 国外
  
2. 名称：MPHOSPH1 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME  
発明者：Y. Nhisimura, M. Hirayama, M. Nakane, S. Yamashita.  
権利者：Y. Nhisimura, M. Hirayama, M. Nakane, S. Yamashita.  
種類：特許  
番号：特願 2016-224625  
取得年月日：2016/11/18  
国内外の別： 国外
  
3. 名称：IMP-3 EPITOPE PEPTIDES FOR TH1 CELLS AND VACCINES CONTAINING THE SAME  
発明者：Y. Nhisimura, Y. Tomita, M. Hirayama, R. OSAWA  
権利者：Y. Nhisimura, Y. Tomita, M. Hirayama, R. OSAWA  
種類：特許  
番号：WO2014/188721 A1  
取得年月日：2014/11/27  
国内外の別： 国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 真敏 (HIRAYAMA Masatoshi)

熊本大学医学部附属病院 診療助手

研究者番号：50779171