

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19950

研究課題名(和文) 浸潤規定遺伝子を用いた新規膵癌ペプチドワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel pancreatic cancer peptide vaccine therapy using invasion regulating gene

研究代表者

清水 敦史 (SHIMIZU, Atsushi)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00637910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：MUC16とMesothelinは膵癌の浸潤規定遺伝子であり、これらの遺伝子に対するエピトープペプチドの同定に関する研究を行った。BIMASデータベースを利用してMUC16とMesothelin由来のHLA-A2402に親和性のあるエピトープの候補となるアミノ酸配列をそれぞれ22種類、19種類想定し、健康人由来の末梢単核球(PBMC)を用いて細胞障害活性Tリンパ球(CTL)が誘導可能か検討すると、それぞれ2種類、2種類のペプチドで特異的CTLが誘導された。これらのCTLクローンが膵癌細胞株に対する細胞障害活性を有することが証明されれば有力な膵癌ペプチドワクチン療法が開発できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：MUC16 and Mesothelin are invasion regulatory genes for pancreatic cancer and research on the identification of epitope peptides for these genes was conducted. By using the BIMAS database, 22 kinds and 19 kinds of amino acid sequences as candidates for epitopes having affinity for MUC16 and Mesothelin-derived HLA-A2402 were assumed respectively, and using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from healthy volunteers It was investigated whether each cytotoxic T lymphocyte (CTL) could be induced or not. It was suggested that specific CTLs were induced in 2 (MUC16) and 5 (Mesothelin) kinds of peptides. If it is proved that these CTL clones have cytotoxic activity against pancreatic cancer cell line, it is considered that effective pancreatic cancer peptide vaccine therapy can be developed.

研究分野：膵癌治療

キーワード：MUC16 Mesothelin peptide vaccine therapy pancreas cancer

1. 研究開始当初の背景

難治癌のひとつである膵癌に対する新規治療の標的分子を開発する目的で、われわれは膵癌の浸潤過程に着目し、網羅的遺伝子発現解析を用いて膵癌浸潤規定遺伝子 18 遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中で、浸潤癌で最も高発現を認めた MUC16 とその ligand-receptor として報告されている mesothelin は膵癌の浸潤部にのみ高発現を認め、PanIN 病変や正常膵組織には発現を認めず、さらに両遺伝子の高発現は独立した予後不良因子であることを解明し、報告した (*Cancer Sci.* 2012)。

われわれの報告以降、膵癌における MUC16 の発現の検討やその機能解析が行われ、他施設より続々と報告されている (*Hum Pathol.* 2012, *Sci Rep.* 2013, *PLoS ONE* 2013 など)。Mesothelin に関しては膵癌での発現 (*Clin Cancer Res.* 2001) , その増殖能増強効果 (*Mol Cancer Res.* 2008) が報告されてきた。この 2 遺伝子が膵癌において非常に注目されている癌遺伝子である理由として、正常組織においてはその発現が限定されており、癌特異的に高発現するために、この遺伝子をターゲットとすることで副作用が少なく、かつ高い抗腫瘍効果が期待できることである。卵巣癌においては MUC16 を標的とした抗体療法が開発され、いくつかの臨床試験が行われてきたが、生存期間延長効果は認めなかったことが最近報告された。 (*J Clin Oncol.* 2013) その理由として、MUC16 は細胞内のリン酸化によって細胞外ドメインが切断・遊離されることが分かっており、その遊離型の抗原により抗体が補足されることで中和され、標的である腫瘍に届かないことが考えられており、抗体療法とは異なる治療法による腫瘍へのアプローチが必要であることが明らかとなった。

われわれの教室では、HLA (human leukocyte antigen) 拘束性に腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球 (Cytotoxic T lymphocyte; CTL) を

誘導する癌治療用ペプチドを用いた膵癌及び食道癌に対する多施設共同臨床試験 (治療) を行い報告してきた。 (*Miyazawa, Cancer Sci.* 2010; *Yamaue, Cancer Sci.* 2015) これらの癌ペプチドワクチン療法は、10 前後のアミノ酸残基からなるペプチドが種々の共刺激分子の補助により HLA クラス I 経路を介して CD8 陽性細胞を活性化し、腫瘍特異的 CTL が誘導されることで強力な細胞障害、抗腫瘍効果が得られる治療法である。また、ペプチドは、生体内でダイペプチダーゼなどにより急速に分解され、代謝産物による毒性発現の可能性が極めて低いことも特徴に挙げられる。われわれは、腫瘍新生血管を標的とした VEGFR2 由来ペプチドを用いた新規免疫療法を開発し (*Cancer Sci.* 2010)、切除不能膵癌患者を対象に第 I 相臨床試験を施行した結果、ペプチド投与群全患者の生存期間の延長は認めなかったが、ペプチド投与群のうち皮膚潰瘍を生じた (免疫応答が高かった) 患者の生存期間は有意に延長したことを報告してきた (*Cancer Sci.* 2015)

2. 研究の目的

臨床応用を念頭に膵臓癌に対して有用性が期待されている MUC16 および Mesothelin を標的とするがんペプチドワクチン療法を開発するため、MUC16 および Mesothelin に対するエピトープペプチドの同定に関する研究を行う。

3. 研究の方法

1) 健常人由来の末梢単核球 (PBMC) を用いた細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導

特定の HLA に結合するペプチドの構造モチーフ探索データベース BIMAS (<http://www-bimas.cit.nih.gov/>) を利用し、MUC16 と Mesothelin 由来の HLA-A2402 拘束性のペプチドをそれぞれ binding score の高いものから選択し、CTL 誘導を行う。HLA-A2402 陽性の健常ボランティアより末梢血を採取し、Ficoll-Paque 法にて PBMC を分

離する。また同時に浮遊細胞を回収し、MACS separation system を用いて CD8 陽性細胞を単離し、保存する。末梢血から得られた血清は非動化し、自己血清としてその後の PBMC 培養に用いる。得られた PBMC のうち 3/4 はストックし、1/4 を 10cm dish で over night で培養する。Dish の付着細胞には 2 日目に IL-4, GM-CSF を加え、樹状細胞(DC)を誘導する。5 日目には誘導した DC にピシバニールを加えて成熟化させる。培養開始後 7 日目に、成熟 DC を回収しペプチドパルスを行い、20Gy の X 線を照射し不活化する。ペプチドパルス前日に、保存していた CD8 陽性細胞を起こし、IL-7 を加えおく。ペプチドパルスした DC と CD8 陽性細胞とを合わせ、IL-2 を加えて培養し、CTL を誘導する。また同日、ストックしていた PBMC1/4 をおこし、10cm dish で over night で培養し、同様の方法で DC2 を誘導し、2 回目のペプチドパルスを行う。2 回目のペプチドパルス同日に PBMC 残りの 2/4 を起こし、同様の方法で DC3 を誘導し、3 回目のペプチドパルスを行う。誘導した CTL の IFN- γ 産生を ELISPOT(enzyme-linked immunospot) アッセイにより測定する。Stimulater cell として T1SI 細胞(HLA-A 24 を発現しているリンパ芽球様細胞株)にペプチドを加えた細胞、ペプチドを加えていない細胞を準備する。誘導した CTL を抗 IFN- γ 抗体を固相化した ELISPOT plate を入れ、さらに stimulator を加えて co-culture を over night 行う。IFN- γ 産生 CTL の数に相関するスポット数の検出は、検出キットのプロトコールに準じて行う。

2) CTL 拡大培養、CTL ライン樹立とクローニング

ELISPOT アッセイの結果により得られた CTL を用いて拡大培養を行う。B リンパ球細胞株 EB-3, Jiyoye をそれぞれ mitomycin C で処理し、抗 CD3 抗体を加えた後、CTL と coculture する。coculture 後、第 1,5,8,11 日目に IL-2 を添加し、第 14 日目に IFN-

ELISA にてアッセイを行う。第 12 日目に stimulator にペプチドを加えた細胞、ペプチドを加えていない細胞をそれぞれ準備し、第 13 日目に CTL と stimulator を co-culture する。抗 IFN- γ 抗体を固相化したプレートに co-culture したサンプルを加え、キットプロトコールに準じてアッセイを行う。拡大培養した CTL から、限界希釈法にてクローニングを行う。EB-3, Jiyoye をそれぞれ mitomycin C で処理し、抗 CD3 抗体、IL-2 を加えて cell mix を作成する。拡大培養した CTL を段階希釈し、それぞれに用意した cell mix を加えて培養する。培養後 10 日目に IL-2 を添加し、14 日目に ELISPOT アッセイを行う。ELISPOT アッセイの結果により得られた CTL を拡大培養し、14 日目に IFN- γ ELISA アッセイにて評価する。

3) CTL クローンによる Cell line に対する細胞傷害活性の確認

MUC16 および mesothelin を発現している膵癌細胞株 PK9, Capan-2 と非発現細胞株 MIAPaCa2, Panc1 における HLA-A2402 の発現を確認する。それぞれに対して上記で作成した CTL クローンをを用いて Killing assay を行う。Killing は 24hr-Cr release assay にて評価する。この実験にて MUC16 および Mesothelin を発現し、かつ HLA-A2402 が陽性の cell line に対してのみ選択的に細胞傷害を示す CTL クローンが誘導されれば、そのペプチド配列を持ってエピトープペプチドと同定する。

4. 研究成果

1) MUC16, Mesothelin の CTL エピトープの予測

BIMAS (<http://www-bimas.cit.nih.gov/>) を利用し、MUC16 と Mesothelin 由来 HLA-A2402 拘束性の 9 個ないし 10 個のアミノ酸からなる CTL ペプチドをそれぞれ binding score の高いものから予測選択し、MUC16 は 22 種類、Mesothelin は 19 種類のエピトープ

の候補となるアミノ酸、ペプチドを人工合成した。

2) 健康人由来の末梢単核球(PBMC)を用いた細胞障害性Tリンパ球(CTL)の誘導

エピトープ候補となったペプチドを用いて健康人由来 PBMC を用いて CTL を誘導し、その INF- γ 産生を ELISPOT アッセイにて測定した。この結果、MUC16 では 2 種類のペプチドが、また、Mesothelin では 5 種類のペプチドで特異的 CTL が誘導されたことが示唆された。(図 1)

(図 1) Candidate peptides derived from MUC16/Mesothelin restricted with HLA-A2402

Peptide name	Amino acid sequence	mer	Biding score
MUC16			
MUC-9-6	GYKSQSSVL	9	200
MUC-9-53	HYALDNDSL	9	200
Mesothelin			
Mes-9-4	RFVKGRGQL	9	60
Mes-9-8	KAREIDESL	9	13
Mes-10-3	RFVAESAEVL	10	60
Mes-10-7	KNVKLSTEQL	10	12
Mes-10-8	KWNVTSLETL	10	12

3) CTL 拡大培養およびクローニング

上記で得られた CTL の拡大培養を行い、INF- γ 産生の確認を ELISA にて行った後、限界希釈法にてクローニングを行った。これらで得られた CTL クローンを確立し、それぞれの INF- γ 産生を ELISPOT アッセイにて行った。

4) CTL クローンによる Cell line に対する細胞傷害活性の確認

それぞれの CTL クローンを用いて膵癌細胞株に対する細胞障害活性を 24hr-Cr release assay にて確認する。これらの検討は現在進行中である。

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 5 件)

1. Shimizu A, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Miyazawa M, Kitahata Y, Ueno M, Hayami S, Miyamoto A, Kimoto Y, Shimokawa T, Yamaue H: Postoperative Visceral Tissue Edema Assessed by Computed Tomography Is a Predictor for Severe Complications After Pancreaticoduodenectomy. J Gastrointest Surg. 22(1):77-87, 2018

2. Okada KI, Hirono S, Kawai M, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Hayami S, Shimokawa T, Yamaue H: Prospective validation of patient fatigue questionnaire (FACIT-F) for fatigue assessment in nab-paclitaxel plus gemcitabine therapy. Mol Clin Oncol. 8(1):121-126. 2018

3. Yamaue H, Shimizu A, Hagiwara Y, Sho M, Yanagimoto H, Nakamori S, Ueno H, Ishii H, Kitano M, Sugimori K, Maguchi H, Ohkawa S, Imaoka H, Hashimoto D, Ueda K, Nebiki H, Nagakawa T, Isayama H, Yokota I, Ohashi Y, Shirasaka T: Multicenter, randomized, open-label Phase II study comparing S-1 alternate-day oral therapy with the standard daily regimen as a first-line treatment in patients with unresectable advanced pancreatic cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 79(4):813-823, 2017

4. Okasa KI, Hirono S, Kawai M, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Hayami S, Kojima F, Yamaue H: Value of apparent diffusion coefficient prior to neoadjuvant therapy is a predictor of histologic response in patients with borderline resectable pancreatic carcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 24(3):161-168, 2017

5. Hirono S, Kawai M, Okada KI, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Yamaue H: Treatment Strategy for Borderline Resectable Pancreatic Cancer With Radiographic Artery Involvement. Pancreas. 45(10):1438-1446, 2016

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 敦史 (SHIMIZU, ATSUSHI)

和歌山県立医大・第 2 外科学講座・博士研究員

研究者番号: 00637910