

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11392

研究課題名(和文) HPV関連癌に対する新規樹状細胞ワクチン治療の有効性の検証

研究課題名(英文) Efficacy of novel dendritic cell vaccine treatment for HPV-related cancer

研究代表者

上原 貴行 (Uehara, Takayuki)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00644402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)関連頭頸部癌に対する治療戦略として、樹状細胞(DC)を用いたがん免疫治療の開発を目的に研究を行った。ヒトの血液から抽出したCD14細胞及びCD8細胞を、至適のサイトカイン存在下に試験管培養を行い、DCおよび細胞障害性T細胞(CTL)の分化を誘導。さらに、HPVに起因するペプチドで刺激を行い特異的なDCを作成した。その後、HPV陽性頭頸部癌由来のHSC4細胞株と共培養し、腫瘍抑制効果を検討した。結果として、ある種のHPV由来の抗原であるHPV E6ペプチド配列の2種の刺激下で作成したDCおよびCTLにおいて、腫瘍抑制効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療においてがん免疫治療は重要な治療戦略と考えられており実用化が進んでいる。現在はPD-1やPDL-1を筆頭に、免疫チェックポイント阻害薬の適応拡大により癌治療の選択肢は広がりつつある。しかしながらその有効性は限定的で、より明確な効果を得るためには癌腫や患者に個別化した免疫治療、特に癌ワクチン治療は魅力的な治療法である。本研究ではHPV関連の頭頸部癌に標的をおき、樹状細胞を用いた癌ワクチン治療の有効性を検討し、これが将来的に実臨床での癌ワクチン治療へ応用することで更なる癌治療の選択肢を増加させ、将来がん治療の成績向上に寄与する可能性をもつ点で意義のある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We researched to develop a cancer immunotherapy using dendritic cells (DC) as a therapeutic strategy for human papillomavirus (HPV) -related head and neck cancer. In vitro culture of CD14 and CD8 cells extracted from human blood with necessary cytokines induces differentiation of DC and cytotoxic T cells (CTL). Furthermore, we stimulated with peptides derived from HPV to create antigen-specific DC. Then, the cells were co-cultured with HPV-positive head and neck cancer-derived HSC4 cell line, and the antitumor effect was examined. As a result, antitumor effect was suggested in DC and CTL prepared under the stimulations of two HPV E6 peptide sequences, which is a certain HPV-derived antigen.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：樹状細胞 癌ワクチン治療 ヒト乳頭腫ウイルス 頭頸部癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌の治療は、手術・放射線・化学療法を中心に治療成績の向上がなされてきたがここ数十年にわたって大きな生存率の改善には至っていない現状がある。また近年発癌機序の一因に中咽頭癌に代表されるようにヒト乳頭腫ウイルス感染に基づく発癌 (HPV 関連癌) の増加が重要なトピックとなっている。HPV 関連頭頸部癌については放射線化学療法への感受性や非関連癌との比較では予後良好とされるものの、未だ十分な治療が確立されているとはいえない。さらに全癌種を横断するように PD-1/PD-L1 抗体療法等に代表される癌免疫治療の進歩は目覚ましいものがある。しかしながら、その効果も限定的であり、今後より特異的・効果的ながん免疫療法の開発や既存の癌免疫治療と併用し高い効果を得る必要がある。そのため新たながん免疫療法の開発は意義が高いと考えられ、本研究を想起した。

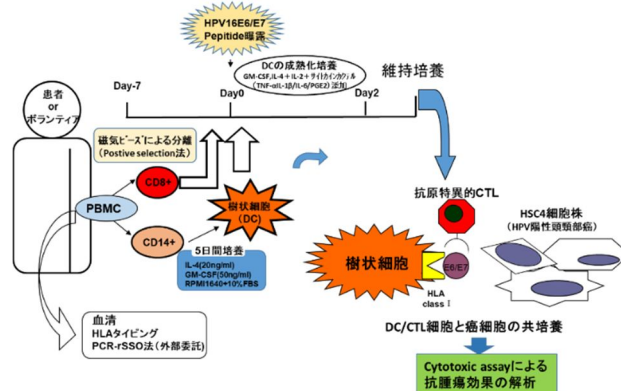
2. 研究の目的

我々は、近年注目されているヒトパピローマウイルス (HPV) 関連頭頸部癌に対する新たな治療戦略として樹状細胞 (Dendritic cell; 以下 DC) 免疫ワクチン治療の開発を目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

抗原特異的なDCワクチンを作製するために、細胞性免疫応答 (主として細胞障害性Tリンパ球; CTLによる) を規定する重要な因子であるヒト適合抗原 (以下HLA) として日本人に最多のHLA A*2402陽性者を対象に、適合する血液ドナーを探索し、現在まで目的とする適合者として健常ボランティア2例 (全7例中) を抽出した。In vitro下のDCワクチンの作製方法として、Miltenyi社の磁気ビーズを用いたPositive selection法により、CD14陽性細胞およびCD8陽性細胞 (CTL分画) の分離を行い、CD14陽性細胞においては、IL-4/GM-CSFやその他各種サイトカイン (TNF, IL-1, IL-6, PGE2) を用いて維持培養しDCへの分化・成熟化を誘導した。また、Jangらが報告したHPVE6, E7蛋白のうちHLA A24拘束性を有するペプチド計6種を外注にて人工合成し、これを各々DCに曝露することで抗原特異的DCワクチンを作製した。さらに、本DCワクチンおよびCTLを当科にて所有しているHLA A*2402陽性頭頸部癌細胞株 (HSC4細胞株) にCTLとともに混合培養し、細胞障害性試験での解析を行った (図1)。

図1. 研究プロトコル (概要)



4. 研究成果

HSC4細胞株に対し、in vitro下に各種のペプチド抗原で刺激した特異的樹状細胞 (DC) を作製に併せてCTL (CD8陽性T細胞) を共培養し、HSC4細胞に対する細胞障害活性・腫瘍増殖抑制効果を検討している。当初はDCとCD8陽性細胞を別途で同時にHSC4細胞へ曝露、共培養して行っていたが有効性は認められなかった。そのため、あらかじめDC細胞の抗原提示、成熟化培養に併せてCD8陽性細胞を共培養しておき、抗原特異的なCTLを増殖させ、これを癌細胞 (HSC4細胞) に曝露したうえでの細胞障害性試験での検討をする様、プロトコルを変更した。その結果、HPV関連癌におけるHPVE6, E7の各癌遺伝子産物中、HLA*A2402拘束性ペプチドとして6種類の配列 (図2) につき検討した。結果、細胞障害性試験 (Cytotoxic assay) において、E6 (49-57) およびE6 (98-106) の2種のペプチド刺激下においてCTLによるHSC4細胞での細胞障害活性が示唆された (図3)。E7 (67-76) の配列についても検討では細胞障害活性が示唆される結果であったが、使用した免疫エフェクター細胞 (主としてCTL細胞) の肉眼的増殖不良があり、有意な結果とはいえないと判断した。

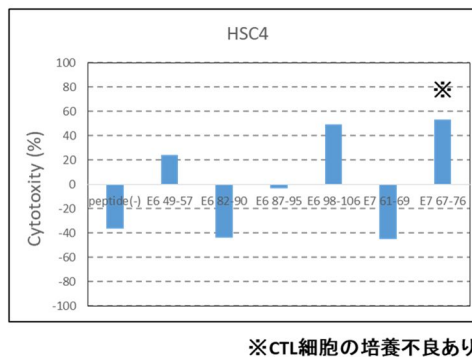
図2.HPV関連癌における抗原ペプチド候補

HLA拘束性	Peptide配列
・HLA-A*2402	HPV16E6(49-57) (82-90) (87-95) (98-106) HPV16E7(61-69) (67-76)
・HLA-A*0201	HPV16E7(11-20) (82-90) (86-93)
・HLA DR15	HPV16E7(43-62) (48-62)
・HLA DR4 or 15	(1-12) (62-75)

今回の結果から、HPV関連頭頸部癌に対しin vitroの解析で、HPVウイルスのE6蛋白の一部で抗原提示した樹状細胞およびCTL細胞を用い、HLAの発現条件が合致した癌細胞株に関し

ては一定の抗腫瘍効果を示すことができた。実験手法の課題としては、細胞障害性試験としてLDH法放出試験でnon-RIで対応可能なPromega社のCytotoxic assayを使用し検討を行ったが、DCおよびCTLの2種の免疫担当細胞と実際の癌細胞株の混合培養のもとで癌細胞株のみの細胞障害活性を評価する必要があり、実際的にはCTLの維持培養や細胞障害性試験の再現性を得る点などで苦慮した。また、当初予定していた免疫チェックポイント阻害剤や頭頸部癌の従来殺細胞抗癌剤（シスプラチン等）との併用効果、相乗効果の有無の評価やマウスを用いたin vivoでの抗腫瘍効果の検討にはいたらず課題が残った。

図3. 細胞障害性試験 (Cytotoxic assay) の結果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池上 太郎 (Ikegami Taro) (00754409)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	
研究分担者	近藤 俊輔 (Kondou Shunsuke) (90596363)	琉球大学・医学部附属病院・医員 (18001)	