

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390419  
 研究課題名（和文） 腎癌に対するペプチドを用いたテーラーメイド癌ワクチン療法の開発  
 研究課題名（英文） Development of tailor-made peptide vaccines for renal cell carcinoma

研究代表者  
 植村 天受（UEMURA HIROTSUGU）  
 近畿大学・医学部・教授  
 研究者番号：90213397

研究成果の概要：新規ペプチドワクチン候補として、CA9、VEGFR1、EPOR についてスクリーニングを行った。CA9 については新規ペプチドに加え、改変ペプチドも合成し、MHC クラス I-binding affinity を調べ、5 種類に絞り、CTL アッセイを行い、他の 2 分子に関しては、ルミネックスをもちいて IgG 反応性を参考にして CTL アッセイを行い、4-6 種類に絞り込んだ。CA9 とインターフェロン併用の第 I・II 相臨床研究および VEGFR1 ペプチドワクチンの第 1 相臨床研究を開始した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍学

キーワード：腎癌、ペプチドワクチン療法、CA9、VEGFR、EPOR

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腎細胞癌は宿主免疫機能に深く関係したユニークな生物学的特性をもち、抗癌剤になる化学療法や放射線療法といった一般的な治療には、ほとんど効果を示さない難治性疾患である。それ故、転移性腎細胞癌の標準的治療はインターフェロン、インターロイキン-2 を中心とするサイトカイン療法（免疫療法）であるが、奏効率、奏効期間とも満足できるものではない。最近、血管内皮

増殖因子受容体（vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR）などをターゲットにした分子標的治療薬が開発され、腎細胞癌においても奏効することから期待されている。これは、腫瘍の新生血管を阻害することに加え、腎癌の発癌、増殖に重要な役割を担っている VHL-HIF-1 $\alpha$  pathway の標的分子である VEGF や PDGF のレセプターを阻害することで細胞質内における増殖シグナルが block されることも重要なメカニ

ズムと考えられる。われわれは、難治性腎癌に対して各種分子標的治療薬 (sorafenib、sunitinib、thalidomide) を用いた治療を経験しているが、Grade 3 以上の重篤な副作用が少なからず認められ、推奨容量による治療継続が困難であった。このような治療経験から難治性腎癌に対しては、治療効果だけでなく QOL も十分配慮した患者 benefit のある集学的治療が必要であり、サイトカインや分子標的治療薬を含む既存の治療に加え、新しい治療戦略の開発が望まれる。近年、数多くの癌関連抗原が同定され、それら抗原をターゲットにした新しい治療法 (薬) が開発されている。腫瘍免疫療法においては MHC クラス I 上に提示された癌関連抗原由来ペプチドを用いた癌ワクチン療法の有効性が各種癌に対する臨床研究で報告されている (Noguchi M, et al. Prostate 2003, Sato Y, et al. Cancer Sci 2003, Mine T, et al. Cancer Sci 2003, Tsuda N, et al. J Immunother 2004)。

(2) われわれは、腎細胞癌の約 90% に発現している Carbonic Anhydrase 9 (CA9) 抗原に着目し、診断および治療の標的分子としての有用性について検討してきた (Uemura H, et al. Br J Cancer 1999, Shimizu K, Uemura H, et al. Oncol Rep 2003)。そこで腎癌とくに淡明細胞癌に特異性の高い細胞性免疫を誘導する HLA-A24 拘束性ペプチドワクチン 3 種類 (CA9p219, p288, p323) を開発し、2002 年 7 月から 2004 年 12 月まで第 1 相臨床研究を行った。結果は 23 例の難治性腎癌患者のうち 16 例に特異的細胞性免疫 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) が誘導され、臨床的には 3 例が腫瘍縮小効果を 6 例が長期間 (6 ヶ月以上) の stable disease を示した。2005 年 10 月までの調査では、試験登録からの全患者生存期間の中央値は 21 ヶ月で、分子標的治療薬を含む既存の治療法と比べても全く遜色ない結果であった。また全症例で重篤な有害事象は認められず、QOL を損なうことなく治療が続けられ、安全と思われた (Uemura, et al, Clin Cancer Res, 2006)。しかしながら、特異的 CTL 誘導までに約 6 カ月間を要し、それに伴って臨床効果も早期には見込めないことから、病気の進行を考慮するとより免疫反応性の高いペプチドワクチンの開発が

望まれた。伊東らはこの問題を解決すべく 1 つの抗原に拘わらず、癌細胞に発現している関連抗原のペプチドを多数準備し、治療開始前の患者末梢リンパ球を用いた CTL スクリーニングによるテーラーメイド型ペプチドワクチン療法を行い、有望な結果を得ている (Noguchi et al. The Prostate, 2003, 2004, 2005)。われわれも伊東らとの共同研究で、再燃前立腺癌患者に対するテーラーメイドワクチン療法をトランスレショナルリサーチとして 2003 年 4 月より施行し、21 例の患者を 3-4 種類のペプチドワクチンで治療した。腎癌における CA9 ペプチドワクチン療法に比較して、ペプチド特異的 CTL 誘導ならびに IgG 誘導が速やかにかつ臨床効果も早期から現れ、有用な結果を得ている (植村天受 Urology View, 4:83-89, 2006)。

## 2. 研究の目的

腎細胞癌治療に有効と思われる標的抗原の中から CA9、VEGFR1、EPOR (エリスロポイエチンレセプター) の 3 分子を選択し、それらの MHC クラス I ペプチドのなかでワクチン療法に有効性を発揮すると思われるもの数種類を同定し、腎癌におけるテーラーメイドワクチン療法の有用性について基礎的・臨床的に検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Affinity assay: CA9 ペプチドワクチン候補に関しては、HLA-A2402 に対する affinity を HLA-A2402/K<sup>b</sup> 分子の増減を RMA-S-A2402/K<sup>b</sup> 細胞を用いて検証した。

(2) PBMC と血清のサンプリング  
近畿大学医学部倫理委員会の承認を得たうえで、本研究の内容についてインフォームドコンセントのうえ文書にて同意を得られた腎細胞癌担癌患者より末梢血 5cc を採取し、HLA-A の typing を anti-HLA-A24 monoclonal antibody (mAb), anti-HLA-A2 mAb を用いてフローサイトメトリー (FACS) にて検索すると共に、同時に外注検査 (SRL) にて HLA の locus を確定する。HLA-A2, -A24 陽性例をそれぞれ 10 例ずつ計 20 例を末梢リンパ球採取の candidate として予定する。各患者よりのサンプリングは 50 ml の末梢血を EDTA 入り真空管にて採血し、Ficoll-Conray 液による末梢血単核球細胞を遠心分離した

後採取細胞数を計算し、全サンプル、実験に使用するまで凍結保存する。なお、HLA-A24陰性かつ HLA-A2 陰性健常人サンプルを negative control として扱い、HLA-A24 および A2 陽性健常人サンプルもスクリーニングのサンプルとして用いる。

(3) ペプチド特異的 IgG 検出と CTL 誘導能 サンプリングした患者血漿中のペプチド特異的反応性 IgG を ELISA にて測定する。それぞれのペプチド (20 μg/well) を固相化した plate を用いて ELISA にて IgG 値を蛍光強度にて評価し 30 種類以下にペプチド候補を絞り込む。

ペプチド特異的 IgG 検出により選ばれたペプチド候補をさらに絞り込むため、末梢血単核球細胞からのペプチド特異的 CTL の誘導能を評価する。標的細胞としては、TAP deficient 細胞の CIR-A24, CIR-A2 あるいは T2 細胞に各ペプチドをパルスしたものをを用いる。2-4 日毎に培養液半量を除去しペプチド(20 μg/ml)と IL-2(100unit/ml)を含む新しい medium に計 5 回交換する。培養 12-15 日目で、培養された細胞を 4-6 well に分ける。そのうち 2-4 well は、それぞれ同種のペプチドで刺激された C1R-24 あるいは T-2 細胞と一緒に培養し、残る 2-well は HIV ペプチドで刺激された C1R-24 あるいは T-2 細胞と一緒に培養する。1 8 時間後、ELISA にて well 上澄みの IFN-γ を測定し HIV 群と比較し有意差を認めた場合ペプチド特異的 CTL の誘導を認めたと定義する。絞り込んだペプチドに関しては、<sup>51</sup>Cr release アッセイあるいは ELISPOT アッセイにて、CTL 誘導能をサイド検証する。

(4) 臨床研究の成果について

CA9 p219, p288, p323 とインターフェロン α を併用した phase- I 臨床研究と、VEGFR1 p770, p1084 を用いた phase- I 自主研究を転移性、難治性腎細胞癌患者に対して、近畿大学医学部倫理委員会の承認のもとスタートさせた。これまでに各研究とも 10 例以上の患者にワクチン治療を施行し、免疫学的データを入手、解析した。

#### 4. 研究成果

(1) Affinity assay について

CA9 ペプチドワクチン候補については、HLA-A24 binding affinity アッセイを施行し

た (下図)。候補ペプチドは、改変型ペプチドも含め 20 種類で、affinity が高いと考えられる CA9-423, -288, -414, -22, -24, -423F の 6 ペプチドを 2 次スクリーニングの CTL IFN-γ release アッセイ候補とした。同様に CA9 の HLA-A2, A3, VEGFR の HLA-A2, A24, EPOR の HLA-A2, A24 候補ペプチドも affinity を調べ、2 次スクリーニング絞込みのデータとした。

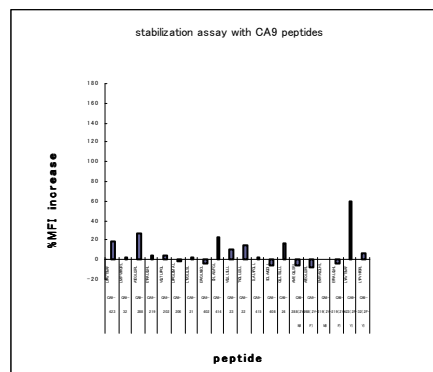
表 1. MHC stabilization assay with CA9 peptides

Peptide name	Sequence	MFI	%MFI increase
CA9-423	LFAVTSVAF	124.5	18.6
CA9-32	LMPVHPQRL	107.3	2.3
CA9-288	AYEQLLSRL	134.1	27.8
CA9-219	EYRALQLHL	110.4	5.2
CA9-202	VQLTLPPGL	110.2	5.1
CA9-206	LPPGLEMAL	103.8	-1.1
CA9-21	LTVQLLSL	107.9	2.8
CA9-402	EPVQLNSCL	101.0	-3.8
CA9-414	DILALVFGL	129.3	23.2
CA9-23	VQLLSLLL	115.7	10.3
CA9-22	TVQLLSLL	120.0	14.4
CA9-415	ILALVFGLL	107.6	2.6
CA9-408	SCLAAGDIL	98.9	-5.8
CA9-24	QLLSLLLL	122.9	17.1
CA9-288(2Y-M)	AMEQLLSRL	98.2	-6.4
CA9-288(2Y-F)	AFEQLLSRL	97.1	-7.4
CA9-219(2Y-M)	EMRALQLHL	104.5	-0.4
CA9-219(2Y-F)	EFRALQLHL	101.0	-3.7
CA9-423(2F-Y)	LYAVTSVAF	166.7	58.9
CA9-32(2F-Y)	LYPVHPQRL	111.5	6.3

\*Percent MFI increase of HLA-A2402/K\* molecules on RMA-S-A2402/K\* cells.

Percent MFI increase=(MFI with sample peptide-MFI without peptide)/MFI without peptide × 100

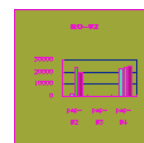
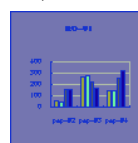
図-1

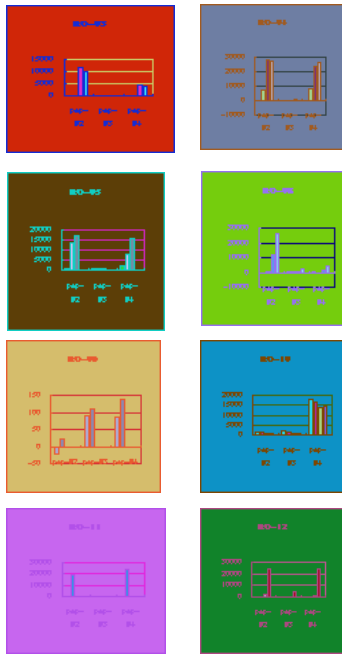


(2) ペプチド反応性 IgG の検出(図 2)

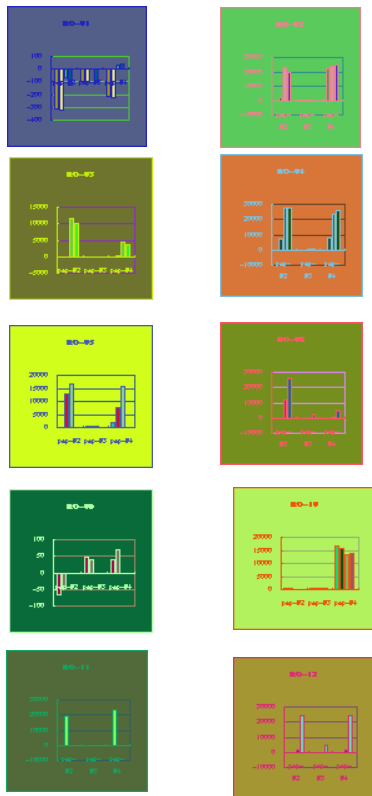
10 人の CA9 陽性腎癌担癌患者の plasma を用いてスクリーニングした図に一部ペプチドのデータを示す。この方法により各患者 plasma 中に存在する各ペプチド反応性の IgG を定量化し、抗体価が高くかつ、反応性 IgG 検出頻度の高いペプチドを CTL2 次スクリーニングの候補ペプチドとして参考にした。

<plasma のネガコンで補正>





<plasma+peptide のネガコンで補正>



(3) CTL アッセイ(表 2)

INF- $\gamma$  release アッセイを HLA タイプに合わせて TAP deficient 細胞を用いて各ペプチドをパルスした細胞を effector として同時に endogeneous に親抗原が発現している細胞および negative control として HIV ペプチドパルス細胞、全く発現がない腎癌培養細胞を用いた。図の如く 3つの E/T ratio で CTL

誘導能を検討し、最終的な候補ペプチドを決定した。

	5	10	20		10	20	40
SW620	62	68	72	SW620	40	52	59
CIR-p1	20	41	60	CIR-p1	7	15	20
CIR-p2	20	42	66	CIR-p2	8	12	24
CIR-p3	19	34	62	CIR-p3			
CIR-HIV	18	26	32	CIR-HIV	9	15	19
PHA	9	11	17	PHA	2	2	5
SKRC-44	32	36	51	SKRC-44	5	6	29

	5	10	20		10	20	40
SW620	69	75	80	SW620	50	61	71
CIR-p1	22	48	70	CIR-p1	20	40	58
CIR-p2	25	46	72	CIR-p2	25	48	63
CIR-p3	21	43	66	CIR-p3			
CIR-HIV	18	27	30	CIR-HIV	15	24	21
PHA	6	8	21	PHA	-3	4	1
SKRC-44	23	39	52	SKRC-44	21	31	33

	10	20	40		10	20	40
SW620	36	52	64	SW620	51	60	66
CIR-p1	14	33	50	CIR-p1	15	41	70
CIR-p2	12	30	43	CIR-p2	13	34	60
CIR-p3				CIR-p3			
CIR-HIV	-3	1	6	CIR-HIV	2	4	10
PHA	-6	-1	-2	PHA	-4	-1	2
SKRC-44	12	22	25	SKRC-44	11	29	40

(4) 各分子におけるペプチドワクチン候補の選択(表 3)

上記の affinity assay、反応性 IgG 検出、CTL 反応 (INF- $\gamma$  release) により下記(表 3)にワクチン候補として、最終スクリーニング(CTL 誘導能:ELISPOT および  $^{51}\text{Cr}$  release アッセイ)を施行(一部は現在進行中)したペプチドシーケンスを示す。VEGFR1 ペプチドに関しては、現在のところ VEGFR1-A2p770 と p1087 を A0201 拘束性ペプチドワクチンとして、VEGFR1-A24p1084 を A24 拘束性ペプチドワクチンとして臨床応用している。

CA9-A02-1	QLLLSLLLLV	EPO-A02-1	YQLEDEPWKL
CA9-A02-2	LLLSLLLLV	EPO-A02-2	VLLDAPVGL

CA9-A02-3	VWTVFNQTV	EPO-A02-3	ILTSLILV
CA9-A02-4	ALVFGLLFAV	EPO-A02-4	VLLTVLALL
CA9-A02-5	LVFGLLFAV	EPO-A02-5	VLSERCWGT
CA9-A02-6	GLLFAVTSV	EPO-A02-6	YLVLDKWL
CA9-A3-1	LLVPVHPQR	EPO-A3-1	RLHQAPTAR
CA9-A3-2	QLPLPELR	EPO-A3-2	TVLALLSHR
CA9-A3-3	SAYEQLLSR	EPO-A3-3	VLALLSHRR
CA9-A3-4	ALLPSDFSR	EPO-A3-4	VLDKWLPR
CA9-A3-5	TLWGPGDSR	EPO-A24-1	KFESKAALL
CA9-A3-6	SVAFLVQMR	EPO-A24-2	CFTERLEDL
CA9-A24-1	LFAVTSVAF	EPO-A24-3	RYTFAVRARM
CA9-A24-2	DILALVFGL	EPO-A24-4	TYLVLDKWL
CA9-A24-3	TVQLLSLL	EPO-A24-5	LYLVVSDSGI
CA9-A24-4	LYAVTSVAF		

以上のペプチドに関して、最終スクリーニングによるワクチン候補とした。

(5) 臨床研究成果 (図 3, 4)

①CA9+IFN $\alpha$ と②VEGFR1による phase-I スタディをスタートした。免疫学的パラメータと臨床効果について中間解析を図 3, 4に示す。①のCA9とIFN療法では、80%の患者においてペプチド特異的CTLとIgGの誘導を認め、一部の患者で腫瘍縮小効果を認めた。②のVEGFR1ワクチン療法では、解析できた5人全員にCTL誘導が認められたが、腫瘍に対する縮小効果は認められなかった。いずれの臨床研究においても重篤な有害反応は認められず安全と思われた。

図 3

	P	Gender		Age	P		Previous	
		M	F		0	1	IF	IFN+IL
CA9-P	2	1	7	61.	2	3	1	5
CA9-IFN	1	1	3	62.	1	0	1	3
VEGFR	8	7	1	60.	7	1	8	3

	vaccination	CTL	DTH	Best response				Median
				CR	PR	PD	PD	
CA9 (n=23)	18	20	7	0	3	6	14	20.0
CA9-IFN (n=18)	16	13	5	1	1	7	9	16.3
VEGFR1 (n=8)	10	6	-	0	0	4	4	7.6

図4 VEGFR1 (A24) ワクチン症例

投与peptide=VEGFR1-A24-9-1084

投与量	症例No.	コース	コース	CTL反応	
				R1	R2
0.5mg	1	PD	IFN $\alpha$	+	+
			IFN $\beta$	+	+
			IFN $\gamma$	++	++
0.5mg	2	SD	IFN $\alpha$	++	++
			IFN $\beta$	++	++
			IFN $\gamma$	+	+
0.5mg	3	PD	IFN $\alpha$	+	+
			IFN $\beta$	+	+
			IFN $\gamma$	+	+
1mg	4	PD	IFN $\alpha$	+	+
			IFN $\beta$	+	+
			IFN $\gamma$	+	+
1mg	5	SD	IFN $\alpha$	++	++
			IFN $\beta$	++	++
			IFN $\gamma$	+	+

\* CTL反応『+++』のNo.2はSD症例であり、SD症例はCTL反応『+++』以上であった

\* 『+』以上では臨床評価による違いは認められなかった(全ての症例で『+』以上)

臨床評価		
SD	100%	2/2
PD	33%	1/3
全体	20%	1/5

CTL反応『+++』以上		
SD	100%	2/2
PD	33%	1/3
全体	60%	3/5

CTL誘導率50%以上		
SD	100%	2/2
PD	100%	3/3
全体	100%	5/5

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 9 件)

1. Uemura H., Minami T., Tanaka M.(他 4 名, 1 番目). Phase I/II study of individualized peptide vaccines for HLA-A2/24 positive patients with hormone-refractory prostate cancer. J.Clin.Oncol.,26:suppl,2008. (査読無)
2. Uemura H., De Velasco M. Tumor vaccines in renal cell carcinoma. World J.Urol.,26:147-154,2008. (査読有)
3. Tomioka A., Tanaka M., De Velasco M. Uemura H.(他 7 名, 6 番目). Delivery of PTEN via a novel gene microcapsule sensitizes prostate cancer cells to irradiation. Mol Cancer Ther: 7: 1864-1870, 2008. (査読有)
4. De Velasco M., Tanaka M., Uemura H.(他 3 名, 6 番目). GFP image analysis in the mouse orthotopic bladder cancer model. Oncol Rep: 20: 537-542, 2008. (査読有)
5. 植村天受. 泌尿器腫瘍と癌抑制因子. 泌尿紀要 54 : 49-52,2008. (査読有)
6. 植村天受, 野澤昌弘. 腎細胞癌に対する免疫療法の新しい可能性. Urology View,6:73-77,2008. (査読無)
7. Ito N., Uemura H.(他 18 名, 9 番目). STAT3 polymorphism predicts interferon-alfa response in patients with metastatic renal cell carcinoma. J.Clin.Oncol.,25:2785-2791,2007. (査読有)
8. Minami T., Uemura H., Harada M.(他 5 名, 8 番目). Identification of SART3-derived peptides having the potential to induce cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. Cancer Immunol.Immunother.,56:689-698,2007. (査読有)
9. 植村天受. 腎癌に対する CA9 ペプチドワクチン療法. 泌尿器外科 20 : 17-23,2007. (査読無)

[学会発表] (計 11 件)

1. Uemura H. A phase-II study of CA9 peptide vaccines in combination with interferon-alpha in advanced renal cell carcinoma. American Society for Clinical Oncology, Genitourinary Cancer

Symposium, 2009. 2.27. Orland USA.

2. Uemura H. Insights into treatment efficacy in Japanese metastatic renal cell carcinoma patients. The 24<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association of Urology, 2009. 3.17. Stockholm Sweden.

3. Uemura H. A phase II study of the efficacy and safety of sunitinib in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). The 24<sup>th</sup> Annual Meeting of Urological Research Society, 2008. 9.19. Amsterdam The Netherlands.

4. Uemura H. Phase I/II study of individualized peptide vaccines for HLA-A2/A24 positive patients with hormone-refractory prostate cancer. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Clinical Oncology, 2008.5.31. Chicago USA.

5. 植村天受. 転移性腎細胞癌に対する新規分子標的薬による治療経験. 第46回日本癌治療学会総会.2008.10.31. (名古屋市).

6. 植村天受. 難治性腎細胞癌に対するペプチドワクチン療法. 第21回日本バイオセラピー学術集会総会.2008.11.18. (東京).

7. Uemura H. CA9 peptide vaccination in combination with interferon-alpha in HLA-A24 positive patients with cytokine refractory renal cell carcinoma. The 24<sup>th</sup> Annual Meeting of Urological Research Society, 2007.10.26. CA USA.

8. Uemura H. Phase-I/II trial of CA9 peptide vaccination in combination with interferon-alpha in HLA-A24 positive patients with cytokine refractory renal cell carcinoma. Annual Meeting of American Urological Association, 2007.5.20. Anaheim USA.

9. Uemura H. A phase I trial of vaccination of personalized peptides for HLA-A2/A24 positive patients with hormone-refractory prostate cancer. Annual Meeting of American Urological Association, 2007.5.20. Anaheim USA.

10. 植村天受. サイトカイン療法抵抗性腎癌に対する新しい治療戦略. 第37回日本腎臓学会西部学術大会.2007.10.20. (福井市).

11. 植村天受. 難治性腎細胞癌に対する分子標的治療薬の使用経験. 第45回日本癌治療学会総会.2007.10.24. (京都市).

[図書] (計2件)

1. 植村天受 (著書). Cancer Treatment Navigator 腎癌の分子標的治療. Pp185-191, メディカルレビュー社,2008.

2. 植村天受 (著書). Year Book of RCC 2008. RCC に対する癌ワクチン療法のトピックス. Pp149-156,メディカルレビュー社,2008.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

植村 天受 (HIROTSUGU UEMURA)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 90213397

### (2) 研究分担者

田中 基幹 (MOTOYOSHI TANAKA)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 30347562

野澤 昌弘 (MASAHIRO NOZAWA)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 00441080

南 高文 (TAKAFUMI MINAMI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 70340809

上島 成也 (SHIGEYA UEJIMA)

近畿大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 60213336

### (3) 連携研究者