

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700898

研究課題名（和文） 難治性消化管間葉系腫瘍に対する新規ワクチン療法の開発

研究課題名（英文） Hemoglobin-beta1 as cancer antigen against GIST

研究代表者

込田 英夫 (KOMITA HIDEO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90534561

研究成果の概要（和文）：

難治性消化管間葉系腫瘍(GIST)は、既存の治療では十分な効果が得られず新たな治療法が待たれる。腫瘍血管を標的とした免疫治療の誘導では、安定した、強い抗腫瘍免疫誘導が期待される。我々の基礎実験で腫瘍血管周細胞上に発現する HBB1 へのワクチン治療の有用性を報告してきた。免疫組織化学染色を用いた検討では、ヒト胃 GIST 腫瘍血管上には HBB1 の発現が認められた。免疫二重染色を用いた検討で、GIST 組織で周細胞マーカーと HBB1 の共染色陽性であり周細胞上に HBB1 の発現が示唆された。腫瘍血管周細胞に発現する HBB1 に対する抗腫瘍免疫誘導により GIST への強い抗腫瘍効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Gastrointestinal stromal tumor (GIST) is the most common mesenchymal tumor of the gastrointestinal tract. After surgical resection of primary tumor, tumor recurrence is frequent and 50% of patients died within 5 years of initial diagnosis. The KIT inhibitor imatinib mesylate is the reference treatment in the first line in advanced GISTs as adjuvant setting. However Imatinib mesylate is well tolerated in most patients. Second line, Sunitinib malate is also similar situation. Recent results and reports suggest cancer vaccine treatment targeting the tumor-associated vasculature. CD8+T cells in regressor mice showed strong reactivity against HPLC eluted peptides (HBB1) by acid elution from surgically removed CMS4 lesions. *In situ* imaging suggest GIST tumor vascular express HBB1 with pericyte markers(NG2, TEM1, RGS5, α SMA). TBVA vaccine against GIST should induce antipericytic Tc1 cells

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍免疫学

キーワード：GIST, Hemoglobin-beta1, 周細胞, Sutent

1. 研究開始当初の背景

消化管間葉系腫瘍(Gastrointestinal stromal tumor; GIST)は消化管筋層の介在細胞に由来する c-kit 及び CD34 蛋白陽性の腫瘍で、予後の悪い疾患である。外科手術ができない場合や術後再発した場合は分子標的薬 Imatinib mesylate が有効であるが、最近、薬剤耐性の GIST の問題が明らかになってきた。一方、Sunitinib malate は、GIST 治療の second line の治療法として推奨されているが治療成績は不良で、やはり耐性、副作用が問題である。我々は、基礎実験で樹状細胞ワクチン治療により腫瘍血管周細胞に対する細胞障害性 T 細胞(CTL)の誘導に成功し、その CTL の認識する抗原として Hemoglobin-beta1(HBB1)を同定した。難治性消化管間葉系腫瘍の腫瘍血管周細胞上に HBB1 が発現確認できれば、GIST に対して Sunitinib malate と HBB1 を標的とした免疫療法の併用により、副作用が少なく、有効な治療効果が期待される。

2. 研究の目的

難治性消化管間葉系腫瘍は、既存の治療では十分な効果が得られず新たな治療法の開発が待たれる。われわれは基礎実験にて肉腫移植腫瘍に対する強力な抗腫瘍効果を誘導する新規抗原として Hemoglobin-beta1(HBB1)を同定した。腫瘍血管に HBB1 発現を確認できれば、これを標的とした免疫療法は難治性消化管間葉系腫瘍に対する新規治療法になる可能性がある。

3. 研究の方法

- (1)、GIST における HBB1 の発現の検討: 過去に集積された GIST 病理組織標本を対象として、腫瘍血管における HBB1 発現の有無を免疫組織化学にて検討する。また、HBB1 発現症例の臨床的特徴[性別、病期、予後、組織分類など]を精査、解析行う。
- (2)、HBB1 の発現局在を知る目的で腫瘍血管周細胞マーカー[NG2, TEM1, RGS5, α SMA など]を用いて免疫二重染色を行う。
- (3)、上記(2)の結果で HBB1 の発現の局在を同定できなければ免疫電子顕微鏡による解析や *in situ* hybridization による解析も追加とする。
- (4)、GIST 腫瘍血管における HBB1 の発現局在と臨床的特徴を合わせて解析、検討、考察する。
- (5)、コンピューター解析により決定したヒト周細胞結合 CTL ペプチドを用いて HHD マウス(HLA-A2positive)にワクチン投与し、HLA-A2(-)腫瘍 B16 や MC38 を皮下移植し癌種に関わらず治療効果があるかなどを検討する。

4. 研究成果

GIST に対する分子標的薬 Sunitinib malate は腫瘍血管を標的とした multikinase inhibitor であるが、腫瘍血管を標的とした免疫治療に関しては報告はまだない。過去の慈恵医大外科手術摘出標本を用いて、HBB1 の発現を免疫組織化学染色にて検討を行ったところ、GIST, CD117 陽性組織ではほぼ全例 HBB1 の発現が認められた。また、境界型 GIST では HBB1 の発現を弱く、悪性型では HBB1 の発現が強くみられる傾向にあった。一方で、GIST の診断で手術し、CD117 陽性であっても組織学的に良性型のものでは HBB1 の発現は弱い傾向にあった。

また、HBB1 の発現部位を同定する目的で腫瘍血管周細胞マーカー[RGS5, TEM1, NG2, α SMA など]との免疫二重染色を行ったところ、悪性型で周細胞と HBB1 の共発現がほぼ認められた。また、腫瘍血管内皮細胞マーカー CD31 と HBB1 の免疫二重染色でも共発現が認められ周細胞及び血管内皮細胞とともに HBB1 発現が確認された。[周細胞>血管内皮細胞]一方で、胃正常粘膜血管や大腸癌、大腸正常粘膜血管には HBB1 の発現は認められなかった。

また、腫瘍血管周細胞上に発現する治療標的抗原ペプチドを用いて、HHD(HLA-A2transgenic mouse)を用いた基礎実験も行った。HLA-A2 上に結合しやすいと考えられる周細胞上のペプチド、EphA2, DLK1, RGS5, TEM1, NRP1, VEGFR1, VEGFR2, PDGFR β 、NG2 などを選定し、HHD[HLA-A2positive]マウスを用いて、移植腫瘍予防モデルや治療モデルにより治療効果の検討を行った。MC38 大腸癌(HLA-A2negative)を用いた移植腫瘍予防モデルでは上記周細胞ペプチド投与により腫瘍拒絶反応が見られた。B16メラノーマ細胞[HLA-A2negative]を用いた移植腫瘍治療モデルでは、EphA2, DLK1, NRP1, RGS5, TEM1, HBB1 などで治療効果が認められ治療効果のあったマウスにB16とは異なる腫瘍MC38大腸癌(HLA-A2negative)の移植腫瘍を行っても腫瘍生着は見られなかった。

上記の結果は腫瘍血管に対する免疫治療の可能性を示唆し、TKI や VEGF/VEGFR antagonists との相乗効果が期待される。今後 GIST 術後組織にて腫瘍血管上に上記ペプチド抗原の発現を免疫組織にて行う。また、HBB1 の発現に関して他の腫瘍[膵臓癌、肺癌、胃癌、肝癌、繊維肉腫]についても検討予定である。

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 9 件)

- (1) Vaccines targeting tumor blood vessel antigens promote CD8(+) T cell-dependent tumor eradication or dormancy in HLA-A2 transgenic mice. Zhao X, Bose A, Komita H, Taylor JL, Chi N, Lowe DB, Okada H, Cao Y, Mukhopahyay D, Cohen PA, Storkus WJ. *J Immunol.* 2012; 188(4): 1782-1788. doi: 10.4049/jimmunol.1101644.
- (2) Immunotherapy synergizes with chemotherapy targeting pancreatic cancer. Koido S, Homma S, Takahara A, Namiki Y, Komita H, Uchiyama K, Ito M, Gong J, Ohkusa T, Tajiri H. *Immunotherapy.* 2012; 4(1):5-7. Doi: 10.2217/imt.11.150.
- (3) Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. Koido S, Homma S, Takahara A, Namiki Y, Tsukinaga S, Mitobe J, Odahara S, Yukawa T, Matsudaira H, Nagatsuma K, Uchiyama K, Satoh K, Ito M, Komita H, Arakawa H, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. *Clin Dev immunol.* 2011; 2011:267539. Doi: 10.1155/2011/267539.
- (4) Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific Tcell-mediated antitumor immune response. Takahara A, Koido S, Ito M, Nagasaki E, Sagawa Y, Iwamoto T, Komita H, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Mineno J, Shiku H, Nishida S, Sugiyama H, Tajiri H, Homma S. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60(9): 1289-1297. Doi: 10.1007/s00262-011-1033-3.
- (5) Immunologic monitoring of cellular responses by dendritic/tumor cell fusion vaccines. Koido S, Homma S, Takahara A, Namiki Y, Komita H, Nagasaki E, Ito M, Nagatsuma K, Uchiyama K, Satoh K, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:910836. doi: 10.1155/2011/910836.

- (6) Intratumoral Il-12 gene therapy results in the crosspriming of Tc1 cells reactive against tumor associated stromal antigens. Zhao X, Bose A, Komita H, Taylor JL, Kawabe M, Chi N, Spokas L, Lowe DB, Goldbach C, Alber S, Watkins SC, Butterfield LH, Kalinski P, Kirkwood JM, Storkus WJ. *Mol Ther.* 2011;19(4):805-814. doi: 10.1038/mt.2010.295.
- (7) [膵癌診療と研究の最先端] 進行膵癌に対する gemcitanbine 併用 WT1 標的免疫療法の意味(解説/特集) 小井戸薫雄、本間定、高原映崇、込田英夫、大草敏史、田尻久雄. 胆と膵 32 巻 9 号 887-891[2011.09].
- (8) Regulation of tumor immunity by tumor/dendritic cell fusions. Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Takahara A, Komita H, Nagasaki E, Ito M, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. 201;2010:516768. doi: 10.1155/2010/516768.
- (9) Dendritic/pancreatic carcinoma fusions for clinical use: Comparative functional analysis of healthy-versus patient-derived fusions. Koido S, Hara E, Homma S, Namiki Y, Komita H, Takahara A, Nagasaki E, Ito M, Sagawa Y, Mitsunaga M, Uchiyama K, Satoh K, Arihiro S, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. *Clin Immunol.* 2010;135(3):384-400. doi: 10.1016/j-clim.2010.02.003.

[学会発表] (計 5 件)

- (1)、消化器癌の免疫学的解析と治療 腫瘍血管ペリサイトを標的とした新たながん免疫療法と GIST 治療への応用 込田英夫、小井戸薫雄、本間定. 日本消化器病学会雑誌 109 巻臨時増総会 pageA175(2012. 03)
- (2)、膵癌に対するゲムシタビン併用 WT1 ペプチドワクチン療法の臨床効果と免疫誘導 (Memory WT1-CTLs is a useful marker to predict the clinical outcome: WT1 vaccine in the combination with gemcitabine) 西田純幸、小井戸薫雄、原一馬、森本創世子、坪井昭博、本間定、武田裕、込田英夫、永野裕昭、岡芳弘、大草敏史、田尻久雄、杉山治夫. 日本癌学会総会記事 70 回

page395(201.09)

(3)、iPS細胞から腫瘍血管を標的とした癌ワクチンの開発 (Generation of a cancer vaccine targeting tumor vessel from iPS cells) 本間定、佐川由紀子、伊藤正紀、永崎栄次郎、高原映崇、込田英夫、小井戸薫雄. 日本癌学会総会記事 70回 Page82(2011.09)

(4)、iPS細胞から腫瘍血管を標的とした癌ワクチン療法の作製 本間定、佐川由紀子、伊藤正紀、永崎栄次郎、高原映崇、込田英夫、小井戸薫雄. 日本がん免疫学会総会プログラム 15回 Page105(2011.06).

(5)、WT1ペプチドがん免疫療法の現状と将来 膵がんに対するWT1ペプチド免疫療法 本間定、小井戸薫定、込田英夫、高原映崇、大草敏史、西田純幸、武田裕、岡芳弘、伊藤濤記、坪井昭博、杉山治夫. 日本癌治療学会誌 45巻2号 Page450(2010.09)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

込田 英夫 (KOMITA HIDEO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90534561