

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591914

研究課題名(和文) 進行再発乳癌に対するテーラーメイド型癌ペプチドワクチン開発研究

研究課題名(英文) Clinical feasibility of personalized peptide vaccination for metastatic breast cancer patients

研究代表者

唐 宇飛 (Toh, Uhi)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60268901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来では乳癌が免疫原性の弱い癌種で、免疫的関与が少ないと考えられてきたが、われわれはこれまで研究成果を踏まえ、治療抵抗性進行再発乳癌に対するペプチドワクチン療法の臨床試験を行ってきた。標準治療抵抗性乳癌患者において中間無増悪生存期間7.5カ月、中間生存期間15.9カ月と現存な治療に比べ、遜色のない良好な効果が得られた。免疫反応性は乳癌サブタイプに関係なく、高率に抗腫瘍免疫が誘導された(ER+ :96.6%;トリプルネガティブ:100%;Her2+ :100%)。従って、当治療は標準化学内分泌療法と異なる作用機序が示唆され、従来の標準治療だけでは得られない治療効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Personalized peptide vaccination (PPV) therapy has been developed in Kurume University for various solid cancers, in which vaccines are selected from 31 different peptides before vaccination. In this study, we conducted a phase II trial for metastatic recurrent breast cancer (mrBC) patients to investigate the feasibility of PPV. 79 patients with mrBC who had failed standard chemo- and/or endocrine therapy were enrolled. Two to four HLA-matched peptides were selected and were subcutaneously administered. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) and IgG responses were measured and immune boosting was observed irrespectively with mrBC subtypes. No severe adverse events were observed. Response was 3 CR and 6 PR. The median progression-free survival time and median overall survival time were 7.5 and 15.9 months. PPV could be feasible for mrBC patients and the combination of chemo- or endocrine therapy might be a novel therapeutic strategy that predominantly targets the tumor-associated antigens.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：乳がん がんペプチドワクチン

1. 研究開始当初の背景

10 数年前より我々は食道癌を始め、高度進行再発癌(胃、大腸、乳腺、肺)患者に対し、その転移性所属リンパ節リンパ球と癌局所リンパ球の免疫状態について研究を行い、これらの部位から癌特異的に認識するキラーT細胞(CTL)が比較的高頻度に誘導されることを確認し、その臨床応用の可能性について検討してきた。(Nakao M etc, Cancer Reserch, 1995; Toh U etc, Cell. Immuno, 1997) 臨床的には自己癌細胞と末梢血リンパ球との混合培養により誘導した自己活性化リンパ球 (autologous tumor activated lymphocytes: AuTL) を用いて、癌局所投与による固形癌特異的免疫細胞療法を開発し、さらに、高度進行・難治性再発癌に対し、第I/II相臨床試験を施行し、その結果、癌局所における臨床的有効性を認め、他、遠隔転移巣での腫瘍退縮も確認できた(Toh U. et al, Int J Clin Oncol, 2002; Clini Ca Res, 2000)。また、継続的に日本学術振興会の科学研究費の支援を受け、難治進行性がん患者に対し、細胞免疫療法と化学療法の併用療法(非骨髄抑制性抗癌剤併用免疫細胞療法 non myelosuppressive chemo-immunocellular therapy)について検討し、その結果、臨床的には従来抗癌剤単独による化学療法よりも治療継続可能で高い反応性を得られた。一方では我々も含め国内外の研究結果と同様、消化器系など固形癌においては標準的化学療法に用いられる多くの抗癌剤投与により腫瘍局所の免疫環境が改善され、より強力な治療効果が得られることが確認された。化学療法と免疫療法との組み合わせにより、相乗(加)的な抗腫瘍効果を得られる可能性が示唆され、両者併用することにより抗癌剤の薬物耐性を克服する可能性も示唆された。In vitro の研究で HER2 受容体を分子標的とする Trastuzumab がもたらす免疫系を介した効果、特に腫瘍抗原特異的細胞性免疫に関与を示唆するデータが得られ、Trastuzumab による腫瘍抗原提示能の増強効果とそれにより腫瘍細胞特異的キラーT細胞(CTL)の誘導が増強されたことを突き止め、さらに、プロテアソーム阻害薬 Bortezomib により免疫活性化分子 TRAIL を介した各種固形癌のアポトーシス感受性が亢進する効果がわかった。従来、乳

癌が免疫原性の弱い癌種で、抗腫瘍効果には免疫的関与が少ないと考えられてきた、近年、腫瘍免疫が乳癌の治療効果に深く関与することが再認識された。難治性の転移再発乳がんに対し、新しい治療戦略としてがんペプチドワクチンによる免疫学的療法を開発するため、久留米大学で開発したテラーメイドペプチドワクチンを用いた臨床試験の実施を含め、臨床的及び基礎的にその可能性を検討した。

2. 研究の目的

これまでがんワクチン療法に用いるペプチドワクチンはヒト白血球抗原(HLA)型により異なるペプチドをそれぞれ医薬として開発する必要があるため、臨床的に実用化することが困難であった。そこで本研究では久留米大学で開発中の各種 HLA 型に対応可能な 31 種類のペプチドを用いて、ほぼ全ての乳癌患者に使用可能で、適切に投与するテラーメイド型ペプチドワクチンの臨床実用化に向けて基盤的研究を行うことを目的とする。

- (1) 臨床的にはペプチドワクチンと標準抗癌剤やホルモン療法薬との併用における安全性、免疫賦活レベル及び臨床効果について検討し、次相研究での併用療法の有用性について検証する。
- (2) ペプチド投与前及び投与後の進行性乳癌患者のがん免疫機能を解析する。取り分け標準治療薬の抗癌剤及びホルモン療法剤のがん免疫機能への影響及び前治療の内容や期間による生体癌免疫能に及ぼす差異について解析し、乳癌の生物学的特徴(ホルモン受容体・HER2・核異型度など)と生体の細胞性免疫能との関連などを明らかにする。がん免疫能検査としてはリンパ球サブセット(CD8陽性キラーT細胞、CD45RO陽性ヘルパーT細胞、CD25陽性抑制性T細胞など)及び投与予定ペプチドへの特異抗体量などを実施する。
- (3) 上記臨床試験におけるペプチド特異抗体増加などと全生存期間の間の相関性の有無を解析してテラーメイドがんペプチドワクチンの予後予測バイオマーカーについて検索する。またにて実施した免疫機能検査結果と生命予後の相関性についても解析して新しいバイオマーカーとし

て臨床的に実用する可能性を検討する。

3. 研究の方法

基礎・臨床試験附随研究:既に多くの方法については論文等にて発表済みであり以下概要を記す。

- (1) 特異抗体反応性解析:LUMNEX 法による高感度・迅速ペプチド特異抗体測定系を用いる。
- (2) HLA 拘束性ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL)誘導能解析:IFN-gamma 遊離法と Cr⁵¹ - 遊離法。
- (3) リンパ球サブセット:FACS などを用いての免疫染色法

臨床研究:臨床研究指針をはじめ各種の指導指針や学内規定に従って実施する。当該研究に関する臨床研究プロトコールは以下の 2 種類である。

- (1) 「標準治療抵抗性進行再発乳癌に対するテララーメイドがんペプチドワクチン療法の第 II 相臨床試験(承認番号 08178)。」
- (2) 「乳がんへのテララーメイドペプチドワクチン療法の第 II 相臨床試験」(承認番号 09191)

この二つの臨床試験を通じて

投与前の進行性乳癌患者免疫機能解析

ワクチン投与患者では投与後 6 回及び 12 回での免疫機能測定と解析した。ヒト組織適合抗原 (HLA) が進行再発乳癌患者における発現や、ペプチドワクチン療法による組織学的にがん関連抗原発現状況などへの影響を検討した。

臨床効果(全生存期間)とペプチド特異抗体増強の相関性解析、並びにホルモン受容体・HER2 発現、核異型度などと臨床効果(全生存期間)との相関性解析した。

サブグループ解析としては乳癌の生物学的特徴(ホルモン受容体・HER2・核異型度など)による免疫能の差異やペプチドワクチンへの反応性に注目して解析を行った。

前治療期間や治療内容(各種抗癌剤・ホルモン治療薬・放射線療法)の免疫能への影響について投与前歴において投与歴のありなしで差異があるか否か、さらには臨床試験において併用した場合とそうでない症例群について

解析した。

組織採取可能な進行再発乳癌症例についてペプチドワクチン療法後に組織学的効果やホルモン受容体・HER2 発現、核異型度などの変化を解析し、有効性のある症例の特徴を特定により臨床的に利用可能のペプチドワクチンの予後予測バイオマーカーについても検証を行った。

4. 研究成果

この 3 年間の臨床研究で、標準治療抵抗性進行乳癌に対するテララーメイドがんペプチドワクチン療法の第 II 相臨床試験の実施:全登録症例 100 例を超えた。

各種主な研究成果を以下に示す。

- (1) 進行性乳癌患者免疫機能解析:
全体治療前特異的 IgG 抗体価は 315.5 ± 52.8 FIU に対し、1 コース(ペプチドワクチン 6 回投与)と 2 コース(12 回投与)後は 2589.0 ± 515.5 ($p < 0.0001$)と 35740.4 ± 13345.5 ($p < 0.0001$)で有意に増強され、投与前 CTL 数(/10000cells)は 16.9 ± 5.4 に対し、1 コース(ペプチドワクチン 6 回投与)後は 110.7 ± 21.5 ($p = 0.0097$)と有意に増加し、IgG 抗体価との相関も認められた($p = 0.0025$)。治療後抗体価の上昇は早期乳がん患者が転移性乳がん患者よりも早く、CTL の誘導は両群の患者においてともに 1 コース後に見られた。
- (2) 進行再発乳がん組織におけるがん関連抗原の発現及びペプチドワクチンの適応状況
全患者において重複例を含め、HLA-A24+:55(67.9%); -A2+:23(28.4%); -A26+:12(14.8%) ; -A3/31/33/11:31 例(38.3%)で、31 種類ペプチドワクチンの中 Lck-488(11.4%),Lck-486(10.4%),SALT-2(9.2%)は最も高頻度に使用された。本試験で使用する 31 種類のペプチドワクチンはすべての HLA type の乳癌患者に対応可能であった。
- (3) 本ペプチドワクチン療法の臨床効果と生存期間及び各組織系との関連:
2014 年末で標準治療薬との併用症例も含め、完全奏効(CR):3 例; 部分奏効(PR): 6

例; 普遍例 (SD): 27 例を認め、病勢コントロール率は 56.3%に達した。解析した全症例(79 症例)での中間無増悪期間(PFS)は 7.5 ヶ月、中間生存期間(OS)は 15.9 ヶ月であった(図 1)。中でもトリプルネガティブ乳がんでは OS が 11.1 ヶ月と比較的良好であった。他の組織型においても同様に良好な臨床効果がみられた。

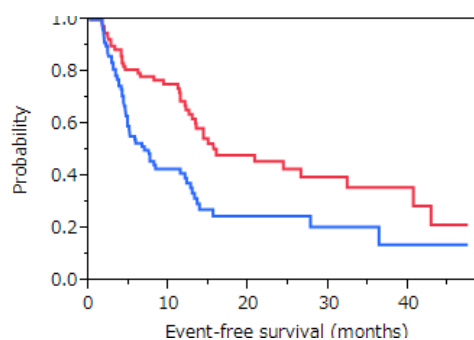


図 1: OS: 赤線; PFS: 青線

- (4) サブグループの免疫抗体反応と細胞性免疫反応と臨床成績との相関についての解析
ペプチドワクチン 6 回投与と 12 回投与後に、各種サブグループ間では Her2 陽性乳がんでは抗体反応 (IgG) 増強は有意に PFS, OS の延長を認めた ($p = 0.001$)、トリプルネガティブ乳がんでは細胞性免疫の増強 (CTL) は有意に OS の延長傾向を認めた ($p = 0.053$)。
- (5) 前治療期間や治療内容による免疫能への影響について
ペプチドワクチン療法を実施するまでの治療期間は 2 - 148 ヶ月 (中間は 12 ヶ月); 治療状態は 1 - 9 次治療を実施済み (中間 3 次治療) で、治療内容は各種標準化学療法、ホルモン療法を含まれる。以上のような治療背景を有する転移性乳がん患者においてペプチドワクチン投与後に抗体価 (IgG) 上昇例と CTL 反応増強例はそれぞれ 70/82(84%) と 33/82(40.2%)であった(高橋、唐ら、2014 年日本外科学会)。
- (6) ペプチドワクチン療法後に組織学的効果についての検討:
外科的切除した原発乳癌 20 例、再発乳癌 20 例に対し、パラフィン切片を作成後、ABC 法

による免疫組織化学を実施した。各種組織型の再発乳がんにおいて腫瘍抗原 (tumor associated antigen) の発現率は 30-100%であった。(唐ら、2013 年日本乳がん学会) また、治療後の乳がん組織内に免疫細胞 CD3CD8+T 細胞浸潤を認めた (図 2)。

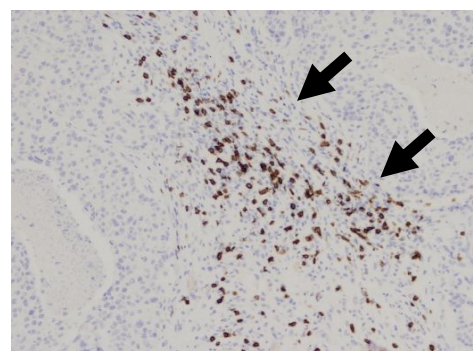


図 2: T 細胞浸潤 (矢印)

また、ペプチドワクチン治療の予後予測 (不良) 因子として、前化学療法レジメン数 (≥ 4 レジメン)、PS 1 以上、免疫反応性 (特異的抗体反応性) が示唆された。(高橋、唐ら、2014 年日本外科学会)

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 14 件)

1. Oba MS, Imoto S, Toh U, Wada N, Kawada M, Kitada M, Masuda N, Taguchi T, Minami S, Jinno H, Sakamoto J, Morita S; Japanese Society for Sentinel Node Navigation Surgery. Observational study of axilla treatment for breast cancer patients with 1-3 positive micrometastases or macrometastases in sentinel lymph nodes. *Jpn J Clin Oncol*. 2014 Sep; 44(9):876-9. (査読あり)
2. Mishima M, Toh U, Iwakuma N, Takenaka M, Furukawa M, Akagi Y. Evaluation of contrast Sonazoid-enhanced ultrasonography for the detection of hepatic metastases in breast cancer. *Breast Cancer*. 2014 Aug PMID: 25143060(査読あり)
3. Takahashi R, Toh U, Iwakuma N, Takenaka M, Otsuka H, Furukawa M, Fujii T, Seki N, Kawahara A, Kage M, Matsueda S, Akagi Y, Yamada A, Itoh K, Sasada T. Feasibility study of

- personalized peptide vaccination for metastatic recurrent triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2014 Jul 3; 16(4):R70. (査読あり)
4. Yokoyama T, Yamaguchi R, Itoh T, Toh U, Nakagawa S, Kage M. Detection of Demodex folliculorum from nipple discharge. *Diagn Cytopathol.* 2014 Mar;42(3):236-7. (査読あり)
 5. Muroya D, Toh U, Iwakuma N, Nakagawa S, Mishima M, Takahashi R, Takenaka M, Shirouzu K, Agaki Y Primary breast peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified: report of a case. *Surg Today.* 2014 Jan PMID:25030214(査読あり)
 6. Takahashi R, Toh U, Iwakuma N, Mishima M, Fujii T, Takenaka M, Koura K, Seki N, Kawahara A, Kage M, Ogo E, Shirouzu K. Treatment outcome in patients with stage III breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Exp Ther Med.* 2013 Nov; 6(5):1089-1095. (査読あり)
 7. Takahashi H, Fujii T, Nakagawa S, Inoue Y, Akashi M, Toh U, Iwakuma N, Takahashi R, Takenaka M, Fukuma E, Shirouzu K. Usefulness of endoscopic breast-conserving surgery for breast cancer. *Surg Today.* 2013 Oct 24. PMID:24150099. (査読あり)
 8. Otsuka H, Fujii T, Toh U, Iwakuma N, Takahashi R, Mishima M, Takenaka M, Kakuma T, Tanaka M, Shirouzu K. Phase II clinical trial of metronomic chemotherapy with combined irinotecan and tegafur-gimeracil-oteracil potassium in metastatic and recurrent breast cancer. *Breast Cancer.* 2013 Jul 5. PMID:23827973 (査読あり)
 9. Takenaka M, Seki N, Toh U, Hattori S, Kawahara A, Yamaguchi T, Koura K, Takahashi R, Otsuka H, Takahashi H, Iwakuma N, Nakagawa S, Fujii T, Sasada T, Yamaguchi R, Yano H, Shirouzu K, Kage M. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Mol Clin Oncol.* 2013 Jul;1(4):625-632. (査読あり)
 10. Kaida H, Toh U, Hayakawa M, Hattori S, Fujii T, Kurata S, Kawahara A, Hirose Y, Kage M, Ishibashi M. The relationship between 18F-FDG metabolic volumetric parameters and clinicopathological factors of breast cancer. *Nucl Med Commun.* 2013 Jun; 34(6):562-70. (査読あり)
 11. Seki N, Toh U, Kawaguchi K, Ninomiya M, Koketsu M, Watanabe K, Aoki M, Fujii T, Nakamura A, Akagi Y, Kusukawa J, Kage M, Shirouzu K, Yamana H. Tricin inhibits proliferation of human hepatic stellate cells in vitro by blocking tyrosine phosphorylation of PDGF receptor and its signaling pathways. *J Cell Biochem.* 2012 Jul;113(7):2346-55.(査読あり)
 12. 岩熊伸高, 唐 宇飛, 高良慶子, 三島麻衣, 竹中美貴, 高橋龍司, 白水雄, Stephen R Grobmyer 乳がん診療へのがんナノテクノロジー—研究の応用 臨床と研究 90(4): 491 -495 2013(査読なし)
 13. 岩熊 伸高, 唐 宇飛, 高良 慶子, 白水 和雄, Grobmyer Stephen R. 機能的イメージングを応用した治療の個別化 ナノテクノロジーによる乳がんの診断と治療(解説/特集) 腫瘍内科 2012年 vol.2 No.10(査読なし)
 14. 唐 宇飛, 田山光介, 田中真紀, 白水和雄 病診連携の実際 連携施設の実情に基づく乳がん地域診療体制の構築とネットワークの充実 外来癌化学療法 2011年10月号 vol.2 No.3(査読なし)
- [学会発表](計 105 件)
- 1) Toh U, Iwakuma N, Mishima M, Takenaka M, Furukawa M, Ogo E, Tanaka M, Akagi Y Safety and immunologic efficacy of personalized multiple HLA class I-restricted peptide vaccines for breast cancer patients in the adjuvant setting. The 50th Annual Meeting of the American

- Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago
USA 2014.5.30-6..3
- 2) Toh U., Iwakuma N, Mishima M, Takenaka M, Furukawa M, Akagi Y, Tanaka M. The New Color Charge Coupled Device Camera System (HyperEye Medical System) for Intraoperative Detection of Sentinel Lymph Node from Breast Cancer 3rd International Breast Cancer Symposium, Korea 2014/4/24-26
- 3) Toh U., Iwakuma N, Mishima M, Takenaka M, Takahashi R, Koura K, Fujii T, Nakagawa S, Ogo E, Tanaka M, Sasada T, Itoh K, Shirouzu K. Personalized peptide vaccines in combination with conventional chemo- or endocrine therapy for metastatic breast cancer: A single-arm phase II study. 36th San Antonio Breast Cancer Symposium 2013, San Antonio, USA. 2013.12.10
- 4) Toh U. The clinical experience of immunotherapy combined chemo-or endocrine therapy for treating refractory advanced cancer. 3rd ICCTI ANNUAL CONFERENCE Cell therapy and clinical trials. Brno, Czech.2013.11.7
- 5) Toh U., Shirouzu K. The clinical experiences using a new color charge coupled device(CCD) camera system (HyperEye medical system) for detecting sentinel lymph nodes of breast cancer. The 15th Joint Surgical Meeting of Korea University and Kurume University, Seoul, Korea. 2013.10.12
- 6) Toh U., Iwakuma N, Shirouzu K. The clinical experiences using sonazoid-enhanced ultrasonography for diagnosis of hepatic metastases of breast cancer. ISW2013 International Surgical Week, Helsinki, Finland. 2013.8.25-29
- 7) Toh U., Iwakuma N, Takahashi R, Otsuka H, Matsueda S, Shichijo S, Sasada T, Itoh K, Shirouzu K. Phase II study of personalized peptide vaccine for refractory breast cancer patients. The 48th Annual Meeting of the

American Society of Clinical Oncology (ASCO)
(USA) 2012.6.1-5

- 8) Toh U., Iwakuma N, Otsuka H, Takenaka H, Ogo E, Fujii T, Tanaka M, Shirouzu K. A multicenter phase study of S-1 combined with irinotecan(CPT-11) for patients with advanced/recurrent breast cancer. 2011 ASCO (The American Society of Clinical Oncology) Annual Meeting, Chicago, USA. 2011.6.3-7

他 97 件

〔図書〕(計 1 件)

Uhi Toh 他、Springer 出版、Cancer Immunology, 2015, In press.

〔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：
出願年月日：
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

唐 宇飛 (Toh, Uhi)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：60268901

(2) 研究分担者

小松 誠和 (Komatsu, Nobukazu)
研究者番号：50343687

久留米大学・医学部・講師

(3) 連携研究者

関 直子 (Seki, Naoko)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：40226634