

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390458

研究課題名(和文) 口腔癌における術後アジュバンドペプチドワクチン療法の臨床応用と治療効果の検討

研究課題名(英文) Clinical study of multiple peptide vaccination for postoperative oral cancer patients revealed induction of immune responses and improved prognosis.

研究代表者

篠原 正徳 (Shinohara, Masanori)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：90117127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：術後アジュバンドペプチドワクチン治療を行った群の方が術後の局所再発・後発転移の頻度は低かった。本療法で細胞障害性T細胞が誘導された症例はURLC10で81%、KOC1で38%、KOC1で71%であった。局所再発・後発転移した6例では、1種類に反応するキラーT細胞を誘導できた症例が4例、2種類に反応するキラーT細胞を誘導できた症例が2例であった。3種類に反応するキラーT細胞を誘導できた症例では局所再発・後発転移はみられなかった。以上より、本療法は患者の予後を改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this trial, we analyzed the immune response to and safety and efficacy of vaccine therapy. A total of 21 patients with oral cancer were enrolled in this trial of adjuvant peptide vaccine therapy, and PFS and immunological response were evaluated using enzyme-linked ImmunoSpot (ELISPOT) and pentamer assays. The peptides were subcutaneously administered weekly with IFA. Results: Adjuvant vaccine therapy was well tolerated. The incidence of local recurrence and postoperative metastasis of the A24(+) vaccinated group (n=21) was lower than that of the without this therapy group (n=165). In the A24(+) vaccinated group, the ELISPOT assay identified URLC10, CDCA1 and KOC1-specific CTL responses in 81%, 38% and 71% of the patients, respectively. The patients showing URLC10-, and CDCA1-specific CTL responses demonstrated a lower recurrence than those without CTL induction. The immune response induced by this vaccine may improve the prognosis of patients with advanced oral cancer.

研究分野：口腔外科学

キーワード：癌免疫療法 口腔癌 ペプチドワクチン 癌特異抗原

1. 研究開始当初の背景

がんワクチン療法は、1991年に Boon 博士らが腫瘍特異抗原を発見 (Science) したことから始まる。1995年に悪性黒色腫に対するペプチドワクチン療法が開始され、1998年には悪性黒色腫に対しての症例報告がなされ、樹状細胞との併用療法も開始されたが、有効な治療効果を得るには至らなかった。2004年、ペプチドワクチン療法の奏功率は数%であるが、体内で免疫応答は確実に惹起されているとの報告がなされた。そんな中で、2006年の ASCO にて、肺がんで術後の維持療法としてワクチン療法を施行したところ、有意に再発を抑制できたとの報告がなされた。また、2006年のサンアントニオ国際乳がん学会では、乳がんの術後の維持療法としてワクチン療法を施行したところ再発を約半分に抑える効果を認めたとの報告がなされた。これらの結果は、ペプチドワクチン療法の有効性を示唆するものである。また、当科においても、これまで3年間、標準療法不応の進行・再発口腔癌に対してペプチドワクチン療法を施行した結果、生体内にペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導され、その T 細胞は口腔癌細胞株に対して細胞傷害活性を有していることを確認した。また、ペプチドワクチンを投与することによって非投与群よりも、有意に生存期間および腫瘍の無増悪生存期間が延長する可能性が示唆された。すなわち、本ペプチドワクチンを皮下投与することによって生体内において口腔癌細胞特異的な T 細胞を活性化することができ、活性化した T 細胞は口腔癌細胞を標的とした細胞傷害活性を有し、その結果、腫瘍拒絶効果を示す可能性があることを示している。

そこで今回われわれは、口腔癌根治術後の患者にペプチドワクチンを投与することにより口腔癌細胞に対する免疫を活性化し、残存した微小口腔癌や新たに生じた口腔癌細胞、circulating oral cancer cell に対して

傷害作用を期待し、口腔癌に対する術後アジュバントペプチドワクチン療法を臨床研究として施行することを計画した

2. 研究の目的

われわれは、これまでに標準療法不応の進行・再発口腔癌患者に対し、口腔癌に高頻度に高発現する新規腫瘍抗原である URLC10、KOC1 ならびに CDCA1 由来の HLA-A24 拘束性エピトープペプチドを Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) と混和して患者の皮下に投与し、腫瘍特異的抗腫瘍効果を期待するペプチドワクチン療法の臨床研究を行ってきた。

(1) Up-regulated lung cancer 10 (URLC10) :

アミノ酸配列 : RYCNLEGPPI

蛋白の局在 : 細胞膜

機能 : 不明

発現 : 肺腺癌 ; 80%、肺扁平上皮癌 ; 100%

(2) IGF- mRNA binding protein 3 (KOC1)

アミノ酸配列 : 508-516 (KTVNELQNL)

(2) CDCA1 (NUF2)

アミノ酸配列 : 56-64 (VYGRLEHF)

発現 : 非小細胞肺癌、小細胞肺癌

本臨床研究でも同様の3種類のペプチドを用いて、口腔癌におけるアジュバントペプチドワクチン療法を行うこととした。

主目的は、1) 口腔癌根治術後患者に対するペプチドワクチン療法の安全性、再発・転移の抑制効果を検証することである。さらに、2) ペプチドワクチン投与によって非担癌状態となった生体に生じる免疫応答および臨床的有効性(再発・転移予防期間の延長)の評価である。

本研究を行うにあたっては、熊本大学大学院生命科学研究部の倫理委員会の承認を得て行われた。

3. 研究の方法

1. 口腔癌で高頻度に高発現している新規腫瘍抗原 URLC10、KOC1 ならびに CDCA1 を標的とする術後アジュバントペプチドワクチ

ン療法の施行：対象 1) 口腔癌患者で、その癌が根治的に切除されたと考えられる患者。なお、術後アジュバント療法の開始は、原則として術後 8 週間以内に開始した。開始が 8 週間を超える場合には、その時点で画像診断上再発所見がないことを確認した上でおこなった。2) Performance status (PS)が 0-1 である患者。3) 同意取得時の年齢が 20 歳以上 85 歳未満の患者。未成年者には両親の同意を得て実施した。4) 3 か月以上の生命予後が見込める患者。5) HLA-A*2402 を有する患者。6) 文書による同意の得られた患者。

2. 治療方法：

1) 対象癌患者の選択：対象患者は、HLA-A*2402 を保有した、根治的に切除 (R0) された口腔癌患者。

2) ペプチド及びアジュバントの投与量及び投与方法：合成した 3 種類の GMP グレードのペプチド各 1 mg を、不完全フロイントアジュバント (MONTANIDE*ISA51VG, SEPPIC, France) と混合し、エマルジョン化したものを、腋窩あるいは鼠径部付近の皮下に投与した。

3) ペプチドワクチンの投与スケジュール：5 回投与を 1 クールとし、2 クールまでは毎週投与し、以後は隔週で計 20 回以上投与した。

再発あるいは転移が生じるまでの期間を測定した。予備試験投与として、ワクチンを初回投与する前に 10 µg のペプチドを本投与する場所、領域外 (頸部より離れた) の皮下に投与して 30 分間経過観察した。Grade 3 以上の局所反応あるいは全身的有害事象がみられなければ、患者頸部、腋窩あるいは鼠径部付近の皮下に投与した。

3. ペプチドワクチンを投与した口腔癌患者における免疫動態の解析：ペプチドワクチン投与直前の免疫細胞の状態を確認した。その後は定期的にペプチドワクチン投与後の患者より採血を行い、免疫動態のモニタリングを行った。

(1)ペプチド刺激による exo vivo CTL (細

胞傷害性 T 細胞)の誘導：ペプチドワクチンを投与された患者の末梢血単核球をペプチドにて刺激し、IFN- γ 産生能を ELISPOT にて測定する。これによって、IFN- γ 産生細胞の変化や CTL 前駆細胞の変化を解析した。

(2)Flowcytometry による HLA-ペプチドに反応する CD8 陽性 T 細胞分画の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 検索症例

1) 今回の口腔癌術後のアジュバント療法の検索症例は 21 症例 (男性 ; 13 例、女性 8 例)であった。

2) 口腔癌の組織型では扁平上皮癌 (SCC) が 17 例、上顎歯肉部の血管肉腫が 1 例、舌下腺癌発の腺癌が 1 例、骨肉腫が 2 例であった。

3) 症例の平均年齢は 63.0 歳で、発症年齢分布は 19 歳から 81 歳であった。

4) ペプチドワクチン接種回数は平均 26.1 回で最小が 8 回、最多が 36 回であった。

5) 治療中での局所再発は 3 例、頸部リンパ節後発転移は 1 例、遠隔転移は 2 例であった。

(2) ペプチド別癌特異的抗原由来のキラー T 細胞誘導頻度

1) URLC10 癌特異的抗原由来のペプチドに反応する、キラー T 細胞の存在が確認できた患者は 17/21 (81%)であった。

2) KOC1 癌特異的抗原由来のペプチドに反応する、キラー T 細胞の存在が確認できた患者は 8/21 (38%)であった。

3) CDCA1 癌特異的抗原由来のペプチドに反応する、キラー T 細胞の存在が確認できた患者は 15/21 (71%)であった。

(3) 癌特異的抗原由来のペプチドに反応するキラー T 細胞の発現について

1) 3 種類の癌特異的抗原由来のペプチドに反応するキラー T 細胞の存在が確認できた患者は 5/21 (24%)であった。

2) 2 種類の癌特異的抗原由来のペプチド

に反応する、キラーT細胞の存在が確認できた患者は9/21 (43%)であった。

3) 1種類の癌特異的抗原由来のペプチドに反応する、キラーT細胞の存在が確認できた患者は7/21 (33%)であった。

(4) 局所再発・後発転移とキラーT細胞発現の関連性

局所再発・後発転移を起こした6症例では、2種類の癌特異的抗原由来のペプチドに反応する、キラーT細胞の存在が確認できた患者は2症例、1種類の癌特異的抗原由来のペプチドに反応する、キラーT細胞の存在が確認できた患者は4症例であった。

3種類の癌特異的抗原由来のペプチドに反応する、キラーT細胞の存在が確認できた症例では局所再発・後発転移は認められなかった。

(5) Flowcytometry による HLA-ペプチドに反応する CD8 陽性 T 細胞分画の変化

ペプチドワクチンを10回投与した時点頃から誘強いペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞の発現がみられた。これと呼応して細胞障害活性の増加が観察された。細胞障害活性が高い症例では局所再発や後発転移はみられなかった。

(6) 扁平上皮癌症例において本療法施行症例と施行しなかった症例(対照症例)との比較

対照症例：口腔の扁平上皮癌で術後のペプチドワクチンアジュバント療法を施行しなかった165症例である。

Adjuvant 治療をおこなった SCC17 症例とこれまでに当科でおこなった Adjuvant 治療なしの症例の予後を比べてみると、原発巣再発率、頸部リンパ節後発転移率、遠隔転移率共に (20.8% vs 29.2%, 5.9% vs 12.7%, 0% vs 5.4%) で、Adjuvant 治療を行った症例の方が低くなっており、本療法が術後の再発、転移抑制に有効である可能性が示唆された。未だ、症例が少なく今後のさらなる症例の積

み重ねが必要と考える。

	Non-adjyubant	adjyhubant
再発率	48/165(29.0%)	4/17(23.5%)
原発巣再発	21(29.2%)	3(20.8%)
頸部再発	19(12.7%)	1(5.9%)
遠隔転移	9(5.4%)	0(0%)

(7) 有害事象

以下の4症状以外の有害事象は認められなかった。

Any immune-related event	17/21(81%)
Drug fever	1/21(4%)
Injection site reaction	16/21(76%)
Pruritus	15/21(71%)

重篤な有害事象は認められなかった。

まとめ

1) HLA-A24 遺伝子を持つ口腔癌患者群 (n=21) には術後の Amjyuvant 治療として癌抗原ペプチドワクチンを投与し、癌抗原ペプチドワクチンを投与していない口腔癌患者群 (n=165) とで、術後の局所再発・後発転移の頻度を比較した。その結果、術後のアジュバント治療を行った群の方が術後の局所再発・後発転移の頻度は低かった。

2) URLC1 癌特異的抗原由来のペプチドに反応するキラーT細胞の存在が確認できた症例は81%であり、KOC1 癌特異的抗原由来のペプチドに反応するキラーT細胞の存在が確認できた症例は38%であり、CDCA1 癌特異的抗原由来のペプチドに反応するキラーT細胞の存在が確認できた症例は71%であった。

3) 今回の症例で局所再発・後発転移がみられた6例では、1種類に反応するキラーT細胞を誘導できた症例が4例、2種類に反応するキラーT細胞を誘導できた症例が2例であった。

4) 一方、3種類すべてに反応するキラーT細胞を誘導できた5症例では局所再発・後発転移みられなかった。この結果より、より多くのペプチドに対して特異的なキラーT細胞を誘導できた患者の方が、局所再発・後発転

移が抑えられることが示唆された。

5)本ペプチドワクチン投与により、重篤な有害事象は認めなかった。

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 6 件)

- 1) Yoshihiro Yoshitake, Yasuharu Nishimura, Yusuke Nakamura, Masanori Shinohara. : A clinical trial of multiple peptides vaccination for advanced head and neck cancer patients induced immune responses and prolonged OS. **Oncoimmunology** 2015 in press 査読有
- 2) Nishimura Yasuharu, Tomita Yusuke, Yuno Akira, Yoshitake Yoshihiro, Shinohara Masanori. : Cancer immunotherapy using novel tumor-associated antigenic peptides identified by genome-wide cDNA microarray analyses. **Cancer Science** 2015 in press 査読有
- 3) Yoshihiro Yoshitake, Akinobu Hamada, Koji Yoshida, Yasuharu Nishimura, Yusuke Nakamura, and Masanori Shinohara. : Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients with induced immune responses and a prolonged OS. **Clin. Can. Res.** 15: 312-321, 2015 査読有
- 4) Yusuke Tomita, Akinobu Hamada, Yoshihiro Yoshitake, Yusuke Nakamura, Masanori Shinohara, Yasuharu Nishimura.: LY6K-specific CD4+ T-cell immunity in patients with malignant tumor: Identification of LY6K long peptide encompassing both CD4+ and CD8+ T-cell epitopes. **OncoImmunology** 2015 in press. 査読有
- 5) Yusuke Tomita*, Akinobu Hamada, Yoshihiro Yoshitake, Yusuke Nakamura, Masanori Shinohara, Yasuharu Nishimura.: Identification

of CDCA1-derived long peptides bearing both CD4+ and CD8+ T-cell epitopes: CDCA1-specific CD4+ T-cell immunity in cancer patients. **Int. J. Cancer** 134(2): 352-366 2014 査読有

6) Tomita Y*, Yuno A*, Yoshitake Y, Nakamura Y, Shinohara M, Nishimura Y.: Identification of Promiscuous KIF20A Long Peptides Bearing Both CD4+ and CD8+ T-cell Epitopes: KIF20A-Specific CD4+ T-cell Immunity in Patients with Malignant Tumor. **Clin Cancer Res.** 19(16):4508-20 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 吉武義泰、福岡大喜、湯野晃、平山真敏、城野博史、濱田哲暢、西村泰治、中村祐輔、篠原正徳：進行再発頭頸部癌患者に対する本ペプチドワクチン療法の有効性の検討 第 11 回日本免疫治療学研究会 2014.2.22 東京ガーデンパレス(東京)
- 2) Yoshihiro Yoshitake, Hirofumi Jono, Yasuharu Nishimura, Yusuke Nakamura, Masanori Shinohara: Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients with induced immune responses and a prolonged OS. 第 50 回 ASCO Annual Meeting 2014.5.30-6.3. Chicago
- 3) 吉武義泰、城野博史、西村泰治、中村祐輔、篠原正徳：頭頸部扁平上皮癌に対するペプチドワクチン療法による免疫誘導と OS 延長に関する検討 第 52 回日本癌治療学会 2014.8.28-31 パシフィコ横浜会議センター
- 4) 吉武義泰、西村泰治、中村祐輔、篠原正徳：頭頸部扁平上皮癌に対する 3 種類のペプチドを mix したワクチン療法の有効性の検討 第 12 回日本免疫治療学研究会 2015.2.28 東京ガーデンパレス
- 5) Tomita Y, Yoshitake Y, Nakamura Y, Shinohara M, Nishimura Y.: Promiscuous HLA

class II-restricted T helper 1(Th1) cell epitopes of LY6K can stimulate LY6K-specific CTL 第16回日本がん免疫学会 2012年7月26~28日 北海道大学学術交流会館

6) Tomita Y, Yoshitake Y, Nakamura Y, Shinohara M, Nishimura Y: CDCA1 and KIF20A-derived promiscuous HLA class II-restricted helper T cell epitopes can induce cytotoxic T lymphocytes 第16回日本がん免疫学会 2012年7月26~28日 北海道大学学術交流会館

7) Yuno A, Daigo Y., Nakamura Y, Shinohara M, Nishimura Y.: Promiscuous HLA class II-restricted T helper 1(Th1) cell epitopes of LY6K can stimulate LY6K-specific CTL 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19~21日 口イオン札幌

8) 吉武義泰、西村泰治、中村祐輔、篠原正徳: 口腔癌術後患者に対する Adjuvant ペプチドワクチン療法の第 I 相臨床試験に関する検討: 第57回日本口腔外科学会総会 2012年10月19~21日 パシフィコ横浜

9) 吉武義泰、西村泰治、中村祐輔、篠原正徳: 標準療法不応口腔癌患者に対するペプチドワクチン療法の第 I/II 相臨床試験の報告 第57回日本口腔外科学会総会 2012年10月19~21日 パシフィコ横浜

10) TOMITA Y, NAKAMURA Y, YOSHITAKE Y, SHINOHARA M, NISHIMURA Y: Identification of a promiscuous CDCA1- derived CD4+ T cell epitope that can induce CTLs both in vitro and in vivo

第41回日本免疫学会 2012年12月5~7日 神戸国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特別講演

Shinohara M: Current status on the diagnosis and treatment of oral cancer. Symposium of ROC Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 中華民國口腔顎顔面外科学会学術大会 2013年3月2日(台北、中華民國) 2013

報告(誌上) その他

1) 篠原正徳、西村泰治: 「ペプチド」でがん治療 熊本日日新聞 2014 11 13

2) 篠原正徳、西村泰治: 頭頸部がんワクチン効果 読売新聞 2014 11 13

3) 篠原正徳、西村泰治: ペプチドワクチン 頸部がんの有効 日刊工業新聞 2014 11 27

4) 篠原正徳、西村泰治: がん治療ペプチド 3種混合効果 特別講演熊本日日新聞 2014 12

5. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 正徳 (SHINOHARA Masanori)
熊本大学医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 90117127

(2) 研究分担者

吉武 義泰 (YOSHITAKE Yoshiyasu)
熊本大学医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 00423682

平木 昭光 (HIRAKI Akimitsu)
熊本大学大学院生命科学研究部・講師
研究者番号: 60404034

中山 秀樹 (NAKAYAMA Hideki)
熊本大学大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 70381001

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号: