

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791698

研究課題名(和文) 悪性卵巣腫瘍における抗がん剤併用がん特異的免疫療法の基礎的・臨床的研究

研究課題名(英文) Immunological and clinical analysis of tumor antigen specific immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian cancer

研究代表者

鈴木 史朗 (SUZUKI, Shiro)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20612758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺がんにおける抗がん剤併用Glypican-3 (GPC3)ペプチドワクチン療法の検討として、ワクチン投与前後の末梢血単核球(PBMC)を用いたEx vivo IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイを施行し4症例中3例においてワクチン投与後でGPC3特異的CTLが末梢血中に増加していることを確認した。HLA-A24結合性GPC3ペプチドワクチン投与を行った患者9例の余剰PBMCをペプチド刺激培養した後のGPC3-Dextramer陽性T細胞をsingle cell sortingすることで2症例から複数のHLA-A24拘束性GPC3ペプチド特異的CTLクローンを樹立することができた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the efficacy of glypican-3 (GPC3) peptide vaccine therapy combined with chemotherapy, ovarian clear cell carcinoma (OCCC) patients with residual tumor after initial treatment were enrolled in our clinical trial. Seven OCCC patients were received GPC3-derived peptide vaccine combined with chemotherapy. Immunological responses were analyzed by ex vivo IFN- $\gamma$  enzyme-linked immunospot assay. In three out of four evaluable patients, the frequency of GPC3 peptide-specific CTLs after vaccination was slightly larger than that before vaccination. Concurrent standard-dose chemotherapy may impair GPC3 peptide vaccine-induced immunity. Moreover, we established several HLA-A24-restricted GPC3 peptide-specific CTL clones from peripheral blood mononuclear cells of two out of nine patients vaccinated with GPC3 peptide by single cell sorting using Dextramer antibody.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：悪性卵巣腫瘍 腫瘍免疫 婦人科腫瘍

1. 研究開始当初の背景

一般的に上皮性卵巣がんは自覚症状に乏しいため、診断時点で進行している場合が多く、婦人科悪性腫瘍の中でも予後不良である。治療として手術で病変を除去しきることが重要であるが、細胞レベルの病変や再発に対しては化学療法が主たる治療法となっている。我々は、現在の卵巣がん治療をふまえた新規治療法探索のひとつとして、「卵巣明細胞腺がんに対する HLA-A24 および A2 結合性 Glypican-3 (GPC3)由来ペプチドワクチン療法の臨床第 II 相試験」を実施している。

がん抗原特異的免疫療法は副作用が従来の化学療法に比して少ないと考えられるため単独治療だけでなく、他の様々な治療法との併用も期待されるところである。近年、様々ながん種においてがんワクチン療法と抗がん剤併用療法の有効性についての報告がなされてきてはいるものの、そのメカニズムに関しての報告はまだ限定的となっているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究での目的を卵巣がんにおける抗がん剤併用がん抗原特異的免疫療法、特に明細胞腺がんに対する GPC3 をターゲットとした抗がん剤併用療法の有効性を検討することとした。卵巣がんで使用される抗がん剤のうち、GPC3 ペプチドワクチン療法との併用によって有効性が期待できる抗がん剤の種類やその機序を明らかにする。

また、卵巣がん腹膜播種マウスモデルを用いて、卵巣がん腹膜播種病変に対する GPC3 を含めたがん抗原特異的免疫療法（細胞療法）単独および抗がん剤併用療法の有効性を基礎的に検討する。

3. 研究の方法

(1) 卵巣明細胞腺がんにおける抗がん剤併用 GPC3 ペプチドワクチン療法の基礎的・臨床的検討

ワクチン投与前後の末梢血単核球 (PBMC)を用いた *ex vivo* IFN- $\gamma$  ELISPOT アッセイによる免疫学的モニタリングや臨床効果から抗がん剤併用 GPC3 ペプチドワクチン療法の有効性を検証する。臨床的に有効な症例が得られれば、GPC3 ペプチドワクチン療法における至適併用抗がん剤の種類や投与量を評価し、その機序についても追加解析する。

(2) 卵巣明細胞腺がんにおける抗がん剤併用 GPC3 特異的細胞療法の基礎的検討

卵巣明細胞腺がん腹膜播種マウスモデルに対する GPC3 特異的細胞療法単独および抗がん剤併用療法が有効であるかどうかを検討する。また、これまでに樹立できていない HLA-A24 結合性 GPC3 ペプチドに対する高親和性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) クローンについて樹立を試みる。具体的には PBMC を *in vitro* にてペプチド刺激培養後の

CD107a 陽性 T 細胞、培養なしの *ex vivo* GPC3-Dextramer 陽性 T 細胞などをそれぞれ single cell sorting するといった様々な CTL クローン樹立方法を用意することによって、より高親和性である CTL クローンの作製を行う。HLA-A24 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンが樹立されれば、機能解析として GPC3-Dextramer 再解析や IFN- $\gamma$  ELISPOT アッセイ、さらに細胞傷害性試験を行い評価する。

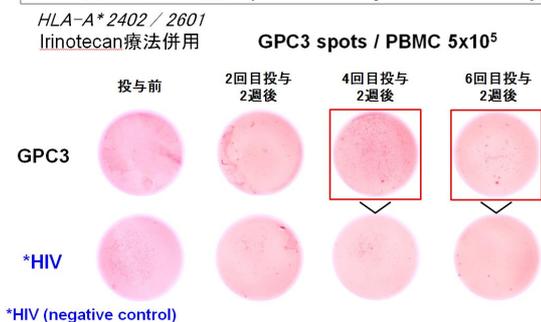
4. 研究成果

(1) 卵巣明細胞腺がんにおける抗がん剤併用 GPC3 ペプチドワクチン療法の基礎的・臨床的検討

初回治療後の残存腫瘍に対して Second-line 化学療法が予定された非寛解群への GPC3 ワクチン療法併用症例は研究期間内に 7 例（併用された化学療法 regimen：Irinotecan 療法 3 例，Irinotecan 療法→Gemcitabine 療法 1 例，Gemcitabine 療法 1 例，Paclitaxel +Carboplatin 療法 1 例，Pegylated liposomal doxorubicin 療法 1 例）であった。7 例中の 1 例において、1 年半以上にわたり stable disease を継続できた有効症例（Irinotecan 療法→Gemcitabine 療法症例）が得られた。全体として症例数に限りがあったものの有害事象により治療中止となった症例がなかったことから、抗がん剤併用 GPC3 ペプチドワクチン療法の一定の安全性が確認された。しかし、GPC3 ペプチドワクチン療法における至適併用抗がん剤の種類や投与量といった臨床的評価の点においては症例数に限りから十分に行うことができなかった。

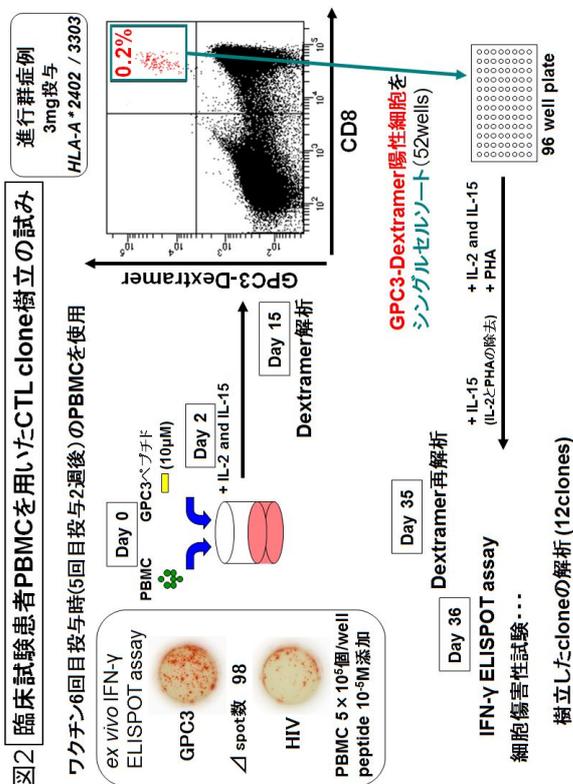
6 回以上ワクチンを抗がん剤と併用投与できた 4 症例（A24 ワクチン投与症例：Irinotecan 療法 1 例，Irinotecan 療法→Gemcitabine 療法 1 例，Paclitaxel +Carboplatin 療法 1 例，A2 ワクチン投与症例：Pegylated liposomal doxorubicin 療法 1 例）について、GPC3 特異的 CTL が誘導されたかどうかを確認するために、ワクチン投与前後の PBMC を用いた *ex vivo* IFN- $\gamma$  ELISPOT アッセイを施行した。4 症例中 3 例においてワクチン投与前に比べ少ないながらもワクチン投与後で GPC3 特異的 CTL が末梢血中に増加していることが確認された（図 1）。

図1 GPC3特異的CTLの検出 (*ex vivo* IFN- $\gamma$  ELISPOT assay)



(2) 卵巣明細胞腺がんにおける抗がん剤併用 GPC3 特異的細胞療法の基礎的検討

HLA-A24 結合性 GPC3 ペプチドワクチン投与を行った卵巣明細胞腺がん患者のうち臨床的に有効であった 1 症例を含む 9 例の余剰 PBMC を用いて、HLA-A24 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの樹立を行った。方法としては PBMC を *in vitro* にてペプチド刺激培養後 (GPC3 ペプチド濃度や添加する各種サイトカイン濃度といった刺激培養条件の至適条件を検討した後に設定) の GPC3-Dextramer 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞、培養なしの *ex vivo* GPC3-Dextramer 陽性 T 細胞をそれぞれ single cell sorting もしくは限界希釈する方法を検討した。そのなかで、ペプチド刺激培養後の GPC3-Dextramer 陽性 T 細胞を single cell sorting する方法で 2 症例の PBMC から複数の CTL クローンを樹立することができた (図 2)。



樹立された CTL クローン (症例 1 から 12 クローンおよび症例 2 から 10 クローンの計 22 クローン) はいずれも GPC3 ペプチド特異性が確認できたものの (図 3, 4) 高親和性なクローンはみられず十分な細胞傷害性を示すことができなかった。

抗がん剤併用 GPC3 特異的細胞療法の基礎的検討に関しては、HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンが繰り返しの expansion の影響により増殖不良に陥ってしまったことで、HLA-A2 陽性および GPC3 陽性である卵巣明細胞腺がんの腹膜播種マウスモデル (ヌードマウス) に対する HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを併用した細胞療法単独療法および抗がん剤併

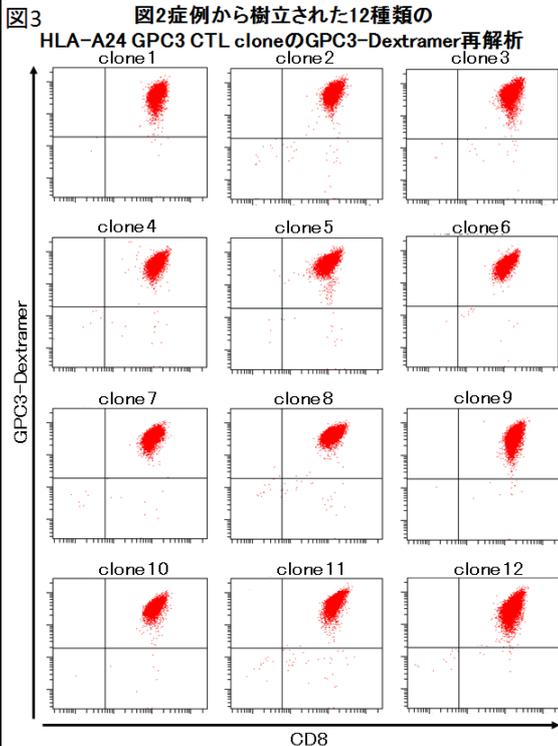
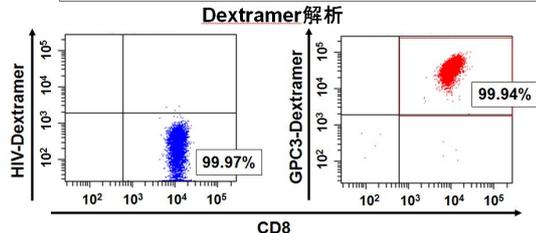


図 3 樹立された CTL clone は GPC3 ペプチド特異的である



用療法についての *in vivo* 実験を十分行うだけの CTL クローン確保が困難となった。代案としてマウス卵巣がん細胞株 ID8 (米国の研究室より分与) および HM-1 の腹膜播種モデルを用いた腫瘍抗原特異的療法の検討を行うこととした。ID8 および HM-1 のいずれ細胞株においても mGPC3 を mRNA レベルで発現していないことが確認されたため、mGPC3 強制発現株を樹立した。マウス卵巣がん細胞株 ID8 についてマウス MHC class (H-2Db および H-2Kb) の発現を FACS で確認したところ発現低下がみられたが、その発現は IFN- $\gamma$  刺激を行うことで増強することができた。また、ID8 の腹腔内接種後に形成された腹膜播種を繰り返し *in vivo* 継代することで低 ~ 高へと段階的に異なる腹膜播種転移能を獲得した sub-clone 細胞株を樹立した。

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンが、軽度の増殖抑制はおこすもののアポトーシスはきたさない程度の subtoxic な抗がん剤用量であっても *in vitro*

での前治療を併用することで CTL による細胞傷害効果の上乗せがみられることの機序に関する検討では、subtoxic 用量によって標的がん細胞の GPC3 や HLA class の有意な発現上昇は認められなかった。また、マンノース-6 リン酸化 (M6P) タンパク質であるグランザイム B は、標的細胞表面上の受容体に結合してパーフォリンと共に標的細胞に取り込まれるが、同様な subtoxic 用量によって標的がん細胞の M6P レセプターの有意な発現上昇も認められなかったため、作用機序の解明についてはさらなる検討を要すると考えられた。

#### 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 11 件)

Luo C, Shibata K, Suzuki S, Kajiyama H, Senga T, Koya Y, Daimon M, Yamashita M, Kikkawa F. GPC3 expression in mouse ovarian cancer induces GPC3-specific T cell-mediated immune response through M1 macrophages and suppresses tumor growth. *Oncol Rep.* 2014; 32(3):913-21.

査読有, DOI: 10.3892/or.2014.3300.

Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Significant clinical response of progressive recurrent ovarian clear cell carcinoma to glypican-3-derived peptide vaccine therapy: Two case reports. *Hum Vaccin Immunother.* 2014; 10(2):338-43.

査読有, DOI: 10.4161/hv.27217.

Nobuoka D, Yoshikawa T, Takahashi M, Iwama T, Horie K, Shimomura M, Suzuki S, Sakemura N, Nakatsugawa M, Sadamori H, Yagi T, Fujiwara T, Nakatsura T. Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62(4):639-52. 査読有, DOI:

10.1007/s00262-012-1366-6.

〔学会発表〕(計 13 件)

鈴木史朗, 三井寛子, 関谷龍一郎, 水野美香, 梶山広明, 柴田清住, 吉川史隆 Clinical and immunological analysis in clinical study of glypican-3 peptide vaccine for patients with ovarian clear cell carcinoma in first clinical remission. The 15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2014), 2014年11月8日~11月11日, Melbourne, Australia

鈴木史朗, 柴田清住, 吉川史隆, 中面哲也 Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy combined with Chemotherapy against Progressive Ovarian Clear Cell Carcinoma. 1st International Symposium on Immunotherapy, 2013年10月11日~10月12日, London, England

鈴木史朗, 柴田清住, 梅津朋和, 水野美香, 梶山広明, 吉川史隆, 中面哲也 ワークショップ 2: 卵巣明細胞腺癌の予後改善を目指して 進行卵巣明細胞腺癌に対する Glypican3 ペプチドワクチン療法 ~ 抗腫瘍効果が得られた 2 例を中心に ~ 第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 2013年7月19日~7月21日, ホテルグランパシフィック LE DAIBA, 東京都港区

鈴木史朗, 柴田清住, 吉川聡明, 中面哲也, 吉川史隆 卵巣明細胞腺癌に対する GPC3 ペプチドワクチン療法における免疫モニタリングおよび GPC3 ペプチド特異的 CTL の誘導 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日~9月21日, ロイトン札幌, 北海道札幌市

〔その他〕

研究のご紹介

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/research/tumor/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 史朗 (SUZUKI Shiro)

名古屋大学医学部附属病院・助教

研究者番号: 20612758

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

国立がん研究センター 先端医療開発センター 医薬品開発グループ 免疫療法開発分野長(柏) 中面 哲也