

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462103

研究課題名(和文) Immune checkpointsを標的とした膵癌ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of pancreatic cancer vaccine targeted Immune checkpoints

研究代表者

和田 聡 (wada, satoshi)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：30420102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規同定された免疫チェックポイントが難治性膵癌において治療の標的となるか本研究にて評価を行った。複数ある免疫チェックポイントの膵癌組織での発現と予後との関係を解析した。その結果、特にB7-H3及びB7-H4の発現において予後との関係に有意な差が認められたが、各々の発現に有意な相関関係は認めなかった。この結果からそれぞれが独立した予後因子であると考えられた。またB7-H3においては癌細胞と癌間質での発現が逆発現パターンを呈しており、予後も正反対の結果となった。以上の結果から、新規免疫チェックポイントを標的とした治療が難治性膵癌において単独で行えるのと共に併用でも可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was evaluated in this experiment whether newly identified immune checkpoints were targets of treatment in refractory pancreatic cancer. It was analyzed the relationship between the expression and prognosis in pancreatic cancer tissue with multiple immune checkpoints. As a result, a significant difference in the relationship with the prognosis was observed in B7-H3 and B7-H4. However, a significant correlation for each expressions was not observed. This result was considered to be independent prognostic factors for each other's. In addition, B7-H3 expression showed a reverse expression pattern in cancer cells and cancer stroma. The prognosis also became the opposite result. From the above results, it was suggested that treatment targeting novel immune checkpoints is possible alone and also in combination for refractory pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍免疫学、腫瘍外科学

キーワード：腫瘍免疫 免疫チェックポイント cancer vaccine pancreatic cancer

1. 研究開始当初の背景

膵癌は近年増加傾向である最も予後不良の消化器癌で、唯一の根治療法である手術を行っても5年生存率は10-25%と低く生存期間中央値は10-20ヶ月に留まる。また早期発見の困難さから切除不能例が80%を占め、1997年にBurrisらが効果の有意性を示したgemcitabin(GEM)が標準治療として広く使用されているがその奏効率は10%程度と満足いくものではない。さらにはS-1がGEMとの非劣性試験にて2006年に保険適用され、GEMとの併用療法が模索されたが、2011年ASCOのAnnual meetingでの大規模臨床試験での結果では併用効果は認められなかった。また、近年様々な分子標的薬が開発され膵癌に対しても臨床試験が行われており、その中で唯一上皮成長因子受容体阻害剤であるErlotinibがGEMとの併用でGEM単独と比べ有意に予後を延長したと報告されたが(Moore MJ, 2007)、その全生存期間の差はわずか0.3ヶ月であり、十分に効果的であると言える分子標的薬はないというのが現状である。最近、転移性膵癌に対する第相臨床試験で4剤併用の化学療法(FOLFIRINOX)がGEM単独に比べ生存期間を約4ヶ月延長したことが報告されたが(Conroy T, 2011)、重篤な副作用も認められるため適応患者はある程度限定されると考えられる。超高齢化社会に向けて、高齢者の膵癌患者も増加傾向であるため、副作用が少なく有効な治療法の開発は急務である。そこで患者への負担が少ない癌免疫療法が新たな膵癌治療の手段として近年注目・期待されている。

癌抗原特異的免疫療法は、1991年にBoon Tらによって悪性黒色腫の癌抗原が発見されて以来、従来の手術・放射線・化学療法に加えた第4の新たな癌治療の手段として急速に研究が進み、特に21世紀に入って世界各国の多くの施設で臨床試験が行われている。日本においてもマイクロアレイの手技を用い

て腫瘍特異的抗原を同定し、そのエピトープペプチドを用いた臨床応用が多くの施設で行われている。申請者も癌ペプチドワクチン療法の開発に取り組み、エピトープペプチドを同定して報告している(Wada S, 2005; Uchida N, 2004; Ishizaki H, 2006)。このように腫瘍特異的なT細胞を体内で活性化させることが証明され、ワクチン療法としてアメリカだけでなく国内でも活発に行われるようになり、その一部には臨床効果が認められるものも出てきた。しかしその臨床試験のほとんどは決して臨床的に満足できる結果ではない。今年行われた膵癌に対する第相臨床試験(COMPETE-PC Study)では残念ながら有意性は認められなかった。その原因の最たるものは、癌細胞や癌患者の抑制性免疫細胞による免疫逃避/抑制のメカニズムによるものであると考えられる。現在癌細胞及び癌状態による腫瘍局所/全身における様々な免疫抑制機構が知られ、これら免疫抑制機構の制御が効果的な免疫治療を行う上で必須となっており、世界各国で盛んに研究がなされている。申請者も癌細胞による癌抗原やHLAの発現低下・消失に対する癌免疫療法の開発、細胞性免疫治療を増強させる効果的な抑制性T細胞の制御の研究を行い報告している(Wada S, 2005; Wada S, 2009; Getnet D, 2010; Olin K, 2011)。

最近では、Immune checkpointsであるnegative co-signaling moleculesが着目され、その一つであるCytotoxic

T-Lymphocyte-associated Antigen 4 (CTLA4)に対する阻害抗体 ipilimumab (イピリムマブ, 商品名: Yerboy®) が2011年にアメリカで悪性黒色腫に対して承認された。これは攻撃側のT細胞活性化後の無力化に対する治療法であり、癌細胞や抑制性T細胞による免疫抑制機構だけでなく、新たな免疫制御の一つと考えられて注目を浴びている。またImmune checkpointsの一つであるPD1及び

PDL1 に対する阻害抗体を用いた Phase 試験がアメリカで行われ、それぞれ 200 人を超える癌患者に対して抗 PD1 抗体又は抗 PDL1 抗体が投与され、Objective response がそれぞれ 20-25%、6-17% に認められた (Topalian SL, 2012; Brahmer JR, 2012)。更に今年我々のグループは、二つの immune checkpoints (LAG3, PD1) を同時に阻害することにより相乗効果が得られることを報告した (Woo SR, 2012)。

2. 研究の目的

本研究では免疫逃避機構の一つである Immune checkpoints に着目し、膵癌組織中の発現プロファイルを解析し、更には癌組織 microenvironment における抗腫瘍免疫細胞との相互作用を明らかにすることにより各々の発現役割を明確にし、その機序に基づいた効果的な免疫治療へ発展させることを最終目的とする。具体的には新規同定された因子 (B7H3・B7H4・GAL9) 等を含めた immune checkpoints の発現を膵癌臨床組織検体を用いて網羅的に解析し、更にマウスモデルを用いて併用療法を含めた新しい免疫治療法の可能性について検証する。また immune checkpoints 自身の抗原性にも踏み込んで解析し標的となりうるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 膵癌臨床サンプルを用いて immune checkpoints 及び抗腫瘍免疫パラメータの癌組織での発現と臨床/病理学的因子との相関の解明

過去 10 年の膵癌 200 例のパラフィン包埋病理サンプル連続切片において、immune checkpoints の発現及び CD8, CD4, T-reg, MDSCs, TAM, Dendritic Cells (DCs) の発現を免疫組織化学染色によって調べる。更に IL-10 や TGF- β などの免疫抑制性サイトカイン産生や、IFN- γ を中心とした Th1 サイトカ

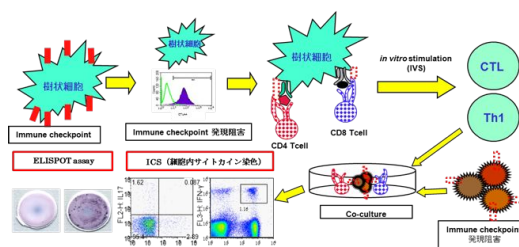
イン産生を免疫染色にて評価することにより癌組織の microenvironment における免疫細胞とのダイナミックな相互作用を明らかにする。

患者末梢血中リンパ球の抗腫瘍免疫応答を調べ、その結果と の結果をそれぞれ臨床/病理学的パラメータ及び予後因子と照らし合わせて相関を明らかにする。

(2) 膵癌細胞株・樹状細胞における immune checkpoints の発現解析及び抗原特異的免疫応答の誘導 (induction phase と effector phase に分けて解析)

膵癌細胞株及び健常人樹状細胞において GAL9, B7H4 を含めた immune checkpoints の発現を網羅的に調べ、発現を認めない場合は遺伝子導入による強制発現を行い、発現を認める場合には RNAi による発現阻害を行う。

次に抗腫瘍免疫応答との関わりを functional に評価する。Induction phase の系では強制発現又は発現阻害した DC を用いて健常人 CD4+/CD8+ T 細胞と *in vitro* stimulation (IVS) を行う。誘導された抗原特異的 T 細胞の特異的免疫応答を、ELISPOT assay や ICS (細胞内サイトカイン染色) により評価する。Effector phase では抗原特異的な T 細胞と強制発現又は発現阻害した腫瘍細胞とを co-culture し、ELISPOT assay や ICS (細胞内サイトカイン染色)、細胞障害活性により評価する。



(3) mouse *in vivo* model での抗腫瘍免疫応答の解析及び新規癌ワクチン治療モデルの確立

マウス膵癌細胞株で immune checkpoints 発現株と非発現株とを用いて皮

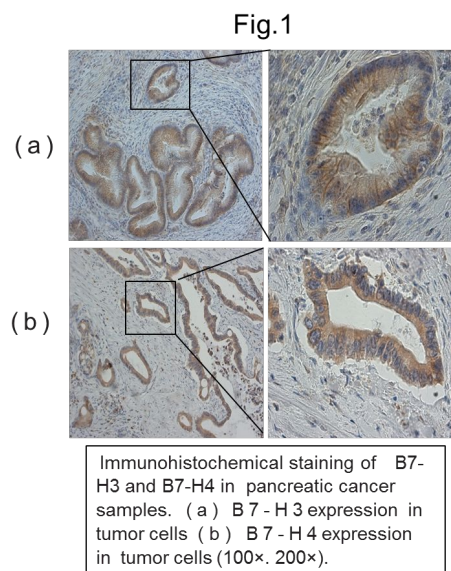
下腫瘍又は肝転移・肺転移モデルを作成し、腫瘍増殖曲線及び survival curve を検証する。次に in vivo 抗腫瘍免疫応答を我々がこれまでマウスモデルで使用してきた GM-CSF 産生細胞ワクチンを用いて行う。すなわち B78H1GM 細胞と膵癌細胞とを 5000rad にて照射後マウスのリンパ節周囲の皮下に摂取する。一週間後に in vivo での細胞障害活性の評価を今まで我々が行ってきた in vivo killing assay を用い、target cell を immune checkpoints 発現株と非発現株とに分け、細胞障害活性 (effector phase での活性) について評価する。更には腫瘍接種し GM-CSF 産生細胞ワクチンしたあとの癌組織での抗腫瘍免疫応答を immune checkpoints 発現株と非発現株とに分けて解析し、抗腫瘍効果を検証する。その際にも我々が行ってきた解析方法を用いて検証する。すなわち、TCR トランスジェニックマウス(TGM)からの CD8 細胞を腫瘍接種マウスに移入し、その移入細胞の癌組織での活性を FACS にて解析して評価する。

immune checkpoints の抗原性について我々が今まで行ってきた epitope peptide 同定法にて評価し、epitope peptide を同定できれば A24TGM を用いて in vivo での抗腫瘍効果を検証する。

4 . 研究成果

Immune checkpoints を標的とすることが膵癌の予後に反映するかという大きな疑問があり、それを確認するべく我々はまず immune checkpoints の膵癌組織での発現と予後との関係を解析した。方法としては根治切除可能な膵癌組織を手術により摘出し、摘出標本の病理切片を免疫組織染色にて解析した。その結果多数の Immune checkpoints の中でも特に B7-H3 及び B7-H4 の発現において、発現の強度及び発現範囲で検討を行うと予後との関係に有意な差が認められた (Fig.1) この結果から今回のテーマである膵癌において

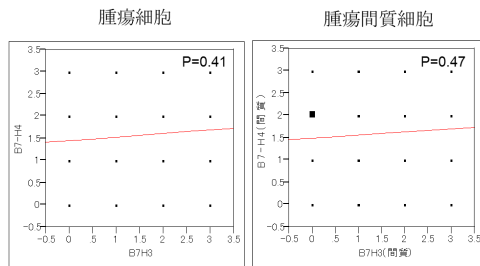
immune checkpoints を標的として治療することは、少なくとも B7-H3 及び B7-H4 においては予後を改善させる可能性があると考えられた。



今までの報告では散発的に一つの Immune checkpoint について解析されているものが主であり、Immune checkpoints 間での関係について特にがん患者の標本を用いて解析されたものがない。そこで各々の Immune checkpoint の発現が予後因子において相関しているかを解析した。少なくとも今回膵癌で予後に関わる因子として同定した B7-H3、B7-H4 に関しては有意な相関関係は認められなかった (Fig.2)。この結果からそれぞれの checkpoint は独立した予後因子であると考えられた。これは非常に興味深く重要な情報であり、同じ癌種でありながら治療対象者が異なることから、それぞれの治療が単独で行えるのは勿論の事、併用治療も有り得ることが示唆された。

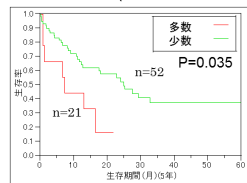
更に興味深い結果として、癌細胞での発現と癌間質での発現とが、特に B7-H3 において全くの逆発現パターンを呈しており、また予後も全く正反対の結果となった。我々は間質の特に fibroblast に関与している所までは判明したが詳細な機能については現在も解析中である。

Fig.2 B7-H3とB7-H4との相関関係

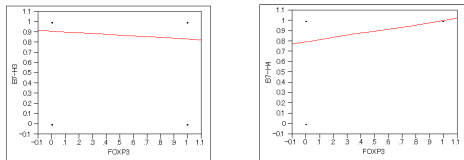


また他の免疫学的因子において解析を行うと、FOXP3 発現が予後において有意な相関を示したが、B7-H3・B7-H4 とは明らかな相関関係は認められなかった (Fig.3)。

Fig.3 FOXP3発現 (overall survival)



B7-H3とFOXP3との相関関係 B7-H4とFOXP3との相関関係



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Tsukagoshi M, Wada S, Yokobori T, Altan B, Ishii N, Watanabe A, Kubo N, Saito F, Araki K, Suzuki H, Hosouchi Y, Kuwano H. Overexpression of natural killer group 2 member D ligands predicts favorable prognosis in cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 107(2):116-22. doi:10.1111/cas.12853. Epub 2016 Feb 2. 査読有
2. Ohtake J, Wada S, Yada E, Fujimoto Y, Uchiyama H, Yoshida S, Itoh K, Sasada T. Personalized immunotherapy in colorectal cancer. *Expert Rev of Prec Med and Drug Develop.* 2016 in press. 査読有
doi:10.1080/23808993.2016.1174060
3. Suzuki H, Wada S, Araki K, Kubo N, Watanabe A, Tsukagoshi M, Kuwano H.

Xanthogranulomatous cholecystitis:

Difficulty in differentiating from gallbladder cancer. *World J Gastroenterol.* Sep 21;21(35):10166-73. 2015 doi:

10.3748/wjg.v21.i35.10166. 査読有

4. Suzuki H, Komuta M, Bolog A, Yokobori T, Wada S, Araki K, Kubo N, Watanabe A, Tsukagoshi M, Kuwano H. Relationship between 18-F-fluoro-deoxy-d-glucose uptake and expression of glucose transporter 1 and pyruvate kinase M2 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Dig*

Liver Dis. ; Jul;47(7):590-6. 2015. doi: 10.1016/j.dld.2015.03.017. 査読有

5. Watanabe A, Suzuki H, Yokobori T, Tsukagoshi M, Altan B, Kubo N, Suzuki S, Araki K, Wada S, Kashiwabara K, Hosouchi Y, Kuwano H. Stathmin1 regulates p27 expression, proliferation, and drug resistance, resulting in poor clinical prognosis in cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.*; 105(6):690-6, 2014 doi:

10.1111/cas.12417. 査読有

6. Suzuki H, Shimura T, Mochida Y, Wada S, Araki K, Kubo N, Watanabe A, Kuwano H. To Stent or Not To Stent

Hepaticojejunostomy--Analysis of Risk Factors for Postoperative Bile Leaks and Surgical Complication.

Hepatogastroenterology 61: 920-926, 2014.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26158142>. 査読有

7. Suzuki H, Fujii T, Asao T, Tsutsumi S, Wada S, Araki K, Kubo N, Watanabe A, Tsukagoshi M, Kuwano H. Extracapsular Lymph Node Involvement is Associated With Colorectal Liver Metastases and Impact Outcome After Hepatectomy for Colorectal Metastases. *World J Surg.*;38(8):2079-88,

2014. Doi.1007/s00268-014-2488-0. 査読有

[学会発表](計5件)

1. Wada S, Tsukagoshi M, Watanabe A, Kubo N, Araki K, Suzuki H, Kuwano H. Analysis of the immune suppression mechanism in extra- hepatic cholangiocarcinoma. AACR (American Association for Cancer Research) 106th Annual Meeting, April/18-22/2015, Philadelphia, USA.

2. Wada S, Tsukagoshi M, Watanabe A, Kubo N, Araki K, Suzuki H, Kuwano H.

Clinicopathological implications of newly defined immune checkpoints in Extra-Hepatic CholangioCarcinoma. ASCO (American Society of Clinical Oncology) 51th Annual Meeting, May-June/29-2/2015, Chicago, USA.

3. 和田聡、塚越真理子、渡辺亮、久保憲生、新木健一郎、柏原賢治、細内康男、鈴木秀樹、桑野博行。膵癌に対する新規免疫治療の開発及び群馬大学での取り組み。第32回群馬消化器病研究会，2014年1月18日，群馬。

4. 和田聡。免疫抑制機構を制御し細胞性免疫反応を増強させる癌免疫療法の開発。第11回日本免疫治療学研究会，2014年2月22日，東京。

5. 和田聡，塚越真梨子，渡辺亮，金泉，久保憲生，鈴木秀樹，桑野博行。Immune checkpoints の膵癌組織における発現とその意義，第17回日本がん免疫学会，2013年7/3-5，山口。

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 聡 (WADA SATOSHI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：30420102

(2)研究分担者

久保 憲生 (KUBO NORIO)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10464744

鈴木 秀樹 (SUZUKI HIDEKI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20322018

桑野 博行 (KUWANO HIROYUKI)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90186560