

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861165

研究課題名(和文) 抗HER2抗体エピトープペプチドワクチンのヒト化マウスを用いた有効性の検討

研究課題名(英文) Examination of the effectiveness using the humanized mouse of the antiHER2 antibody epitope peptide vaccine.

研究代表者

津田 万里 (TSUDA, Banri)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：30514533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌患者PBMC(31名)をCH401MAPでin vitro刺激し特異抗体の産生を健常人と比較したところ、患者群では未刺激でも有意に産生が高かったが、刺激による変化は観察されなかった。患者PBMCを同マウスに輸注しCH401MAPで免疫したところヒトIL-2の産生を認めヒト免疫系を構築できた。GVHDは1例も生じなかった。免疫系を観察する上での前臨床試験マウスとしての有用性が示された。同マウスへ2名の乳癌患者の癌組織片を移植したが生着不可能であった。ヒト乳癌細胞株SKBR3を移植したが生着は不可能であった。さらに条件検討をする必要性が示された。

研究成果の概要(英文)： After in vitro stimulating breast cancer patient PBMC (31) in CH401MAP, and comparing the production of the specific antibody with the physically unimpaired person, production was significantly high by non-stimulation in the patient group, but the change by the stimulation was not observed. After transfusing patient PBMC into the mouse, and immunising it in CH401MAP, I was able to build human immune system in acknowledgment of production of human IL-2. One GVHD did not occur. The usefulness as the preclinical test mouse on observing immune system was shown. I transplanted a cancer tissue piece of two breast cancer patients, but was not able to engraft into the mouse. I ported human breast cancer cell strain SKBR3, but the survival was impossible. Furthermore, the need to make condition examination was shown.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳癌 ペプチドワクチン CH401MAP

1. 研究開始当初の背景

乳癌はわが国では女性における罹患率が悪性疾患において1位であり、死亡数は3位である。この疾患は今後も増加傾向であるとされ、手術例でも術後10年以内に約30%が再発し、中でもHer-2/neuの過剰発現している症例は悪性度が高いとされている。トラスツズマブの登場にて奏功率に改善を認めているものの、耐性、副作用の問題も少なくない(Shak Sら、Semin Oncol. 1999)。そのためにも現在腫瘍に対する分子標的療法として、腫瘍特異的モノクローナル抗体作製やペプチドワクチンなどが欧米を中心に開発されており、ある程度の成果も報告されている。

ペプチドワクチンが効果を示すためにはHLA型とペプチドが親和性を示すことが必要である。たとえばGP2とAE37はHLA-A2を、E75はHLA-Class IIをターゲットとしている。しかしこれらは乳癌患者に頻見されるHLA型を元に製作されているため、HLA型が一致する限られた患者のみが対象となる。われわれはHER2抗原を投与したマウスの抗HER2抗体をマッピングし、CH401という抗体エピトープを同定し、20merのペプチドである、B細胞エピトープ由来のCH401MAPペプチドを作成した。同ペプチドとヒトHLAとの親和性を3つのコンピューターアルゴリズムを用いてsimulationしてみると、実に97.1%の日本人乳癌患者のHLAに対し中程度の親和性が予測された。このペプチドがHER2を導入したマウスリンフォーマセルラインのA20を移植したマウスの系において、腫瘍の縮小および特異抗体の産生を認めた(Miyako et al 2011)。しかもペプチド由来と思われる合併症は認めなかった。同ペプチドで実際の乳癌患者末梢血単核球を刺激するとリンパ球の増殖、IL-2、IL-4、IFN- γ のサイトカインの産生の亢進、CD4、CD8および活性化CD4、CD8の比率の上昇を認めた(論文投稿中)。以上より、HER2を発現している乳癌患者に対し、HLAを限定せずにワクチンとして使用できる可能性が示唆された。

一方、今後CH401MAPペプチドを臨床導入するためにはvivoにおいて、本ペプチドが特異抗体を産生するか否かを確認することが望まれる。特異抗体産生が認められれば抗腫瘍効果を生じる可能性があるため、それらを効率よく誘導したいが、1自己抗原なので抗体産生が誘導されにくい可能性がある、2MAP peptideという人工的ペプチドを用いるため、予測不可能な有害事象をひきおこす抗体産生を生じるかもしれないなどの問題がある。この理由からペプチドの抗体産生能について臨床導入の前に詳細に検討することが重要である。TGN1412試験は、抗体療法の前臨床試験で

通常のマウス、ラットなどを用いた時点では明らかな異常を示さなかったにもかかわらず、ヒトに投与した際に予測していなかったサイトカインストームを生じた。本ペプチドも抗体を誘導する能力を有す可能性があり、ヒトにおいて抗腫瘍効果を期待する半面、過剰な免疫応答により、TGN1412試験に類似の副作用を生じる可能性も否定できない。しかし、実験動物であるマウスは免疫学的な進化の距離がヒトと大きく異なる。比較的免疫学的な進化の距離の近い霊長類のサルを用いたとしても、サルMHCはヒトHLAと配列が一致しないため、反応を予測することは困難である。そこで重度免疫不全マウス(NOGマウス)にヒト幹細胞や末梢血を移植してヒト免疫系を再構築したヒト化マウスが開発されてきた。しかしNOGマウスにヒト末梢血を移植すると、いずれGVHDを生じ、死に至るため、長期間にわたる特異抗体の測定は不可能である。我々はNOGマウスに臍帯血の造血幹細胞を移植してヒト免疫系を再構築したマウス(CB-NOGマウス)に、マウスのリンフォーマセルラインA-20にHER2を導入した細胞を移植し、同ペプチドで免疫したところ、ペプチド投与群は非投与群と比較し、有意差を持って腫瘍の縮小効果を認め、IgM、IgGの特異抗体の産生を認めた。しかし、通常のヒト免疫系ではIgMはIgGよりはるかに低値を示すものであるが、結果はIgMの産生量はIgGの産生量よりもはるかに高値を示し、結果として造血幹細胞を移植しても完全なヒト免疫系は構築されなかった。そのため、ヒトの末梢血を移植してもGVHDを生じにくく、長期間免疫反応を観察することが可能であるとの結果を得ている(未公開データ)、ヒトのIL-4を遺伝子導入したNOGマウス(hIL-4TgNOG)を用いて患者末梢血再構築マウスの作製を試みたところ、パイロット実験で同マウスにヒト末梢血が生着し、ヒトIL-2が産生されたことを確認した。このマウスにおいてヒト特異抗体が産生されるかについて、現在確認中である。これらの結果より、このマウスは臨床試験に移行した際、通常の実験動物を用いた前臨床試験で予測できない、抗体産生に関連した副作用を防ぐことができる可能性を秘めていると考えられる。

2. 研究の目的

hIL-4TgNOGマウスに未治療の乳癌患者PBMCを移植し、同時に背部に患者がん細胞を移植し、担癌状態の患者免疫環境を忠実に再現することを試みる。その後、担癌状態の患者免疫系を再構築したhIL-4TgNOGマウスにCH401MAPペプチドを投与し、Tリンパ球の反応性について

in vitro と in vivo の結果が一致するかを確認すると共に抗体誘導能を解析し、BALB/c マウスや CB-NOG マウスで生じなかった副作用が hIL-4TgNOG マウスによって生じずに安全に臨床試験へ移行できる薬物であるか評価する。またこの系がより質の高い前臨床試験の一つのツールになりうるか、同マウスの前臨床モデルマウスとしての有用性を評価する。

3. 研究の方法

本研究は 2 年間の研究計画からなる。本研究を遂行する上で、最も重要なことは研究材料を得ることである。本研究で使用する hIL-4TgNOG マウスはすでに実験動物中央研究所より提供され、すでに準備が完了している。また、使用する患者血液および癌組織検体はすべて初発乳がん、ほかの悪性疾患の既往のない、術前治療を行っていない女性乳癌患者で、本研究の同意の得られた患者を対象とした。以下に示す実験計画を遂行する

手術当日の朝に 7.5ml 採血を行う。採血管は ACD-A 液入り真空密封型採血管 (NIPRO 社製) を用いる。7.5ml の血液のうち、500 μ l を HLA タイピングに用い、残りの血液は比重遠心分離し、リンパ球層を抽出する。

HLA 解析は PCR-rSSO 法に基づいて HLA 遺伝子のタイピングを行う。LABType SS0 Class I A Locus kit (One Lambda) を用いる。まず DNA サンプルを PCR 増幅する。PCR 産物をアルカリ変性させ一本鎖化し、LABType ビーズのプロープとハイブリダイズする。蛍光標識物質によりハイブリダイズされたビーズのみをラベリングし、ビーズの蛍光強度を LABScan100 で測定する。得られた各ビーズの蛍光強度、反応パターン、プロープの特異性等に基づき、専用解析ソフト HLA Fusion2.0 を用いて解析する。エピトープペプチド CH401 が患者 HLA に提示される可能性について、SYFPEITHI, BIMAS, IEDB analysis の score を求め、推定する。

抽出したリンパ球は in vitro の系と in vivo の系に分けて使用する。

(1) in vitro

A サイトカイン産生を確認する 96 ウェルプレートに PBMC を 5x10⁵ 個/500 μ l で 3 well に播種し、PBS (陰性コントロール)、CH401MAP ペプチド、TSST-1 (陽性コントロール) で刺激する。CO₂ インキュベーターにて培養し、開始後 24 時間、48 時間でサンプル上清を回収し、血漿中の抗 HER2 抗体、抗エピトープペプチド IgM 抗体、IgG 抗体、IL-2 および IFN- γ の力価をサンドイッチ ELISA 法にて測定する。

B フローサイトメトリーにてリンパ球動態

の解析を行う 患者 PBMC を分離直後に蛍光標識抗ヒト CD4, CD8, CD3, CD20, CD25 抗体を用いて flow cytometry にてリンパ球の解析を行う。96 ウェルプレートに PBMC を 5x10⁵ 個/500 μ l で 3 well に播種し、PBS、CH401MAP ペプチド、TSST-1 で刺激する。週に 1 度再刺激及び IL-2 を添加し、セルカウントを行う。

3 週後に蛍光標識抗ヒト CD4, CD8, CD3, CD25 抗体を用いて flow cytometry にてリンパ球の解析を行う。また、サンドイッチ ELISA 法にて抗エピトープペプチド IgG 抗体の測定を行う。

最終病理診断の HER2 発現レベルで症例を分類し、ペプチドの効果と HER2 発現レベル、HLA の親和性の関連性を解析する。

(2) in vivo 抽出標本をコラゲナーゼ処理し、セルサスペンションを作成する。

hIL-4TgNOG マウスに患者 PBMC を 5x10⁵ ずつ経静脈的に移植し、背部に抽出標本のがん細胞を 1x10⁷ 個皮下移植する。エピトープペプチド CH401 を Montanide をフロイントアジュバントとして腹腔内投与し免疫する。2 週間毎に Freund's incomplete adjuvant をアジュバントとして追加免疫を行う。コントロールのマウスには PBS を投与する。腫瘍の大きさを 1 週ごとに測定する。移植後 0 日、7 日、14 日、21 日、28 日、35 日に採血し、血漿中の抗エピトープペプチド IgM および IgG の力価を ELISA 法、ELISPOT assay にて測定する。また、PBMC を比重遠心法により分離し、蛍光標識抗ヒト CD4, CD8, CD3, CD25 抗体を用いて FACS にてリンパ球の動態に対する解析を行う。移植後 35 日目に sacrifice し腫瘍、脾臓およびリンパ節を摘出し、心採血を行う。腫瘍は径および重量を測定し、一部をホルマリン固定する。腫瘍、脾臓、リンパ節細胞を懸濁し、蛍光標識抗ヒト CD4, CD8, CD3, CD25 抗体を用いて flow cytometry にてリンパ球の解析を行う。さらに脾細胞を 5x10⁵ 個ずつ CH401MAP ペプチドで in vitro 刺激し、サイトカイン (human IL-2, human IL-4, human IFN- γ) を ELISA にて確認する。

ペプチド投与/非投与群で比較し、ペプチドの抗腫瘍効果を判定する。

以上 1、2 の結果を比較し、ヒト免疫系における抗体療法の効果の予測、加えて臨床試験をより安全に遂行するために hIL-4TgNOG の前臨床腫瘍モデルが有用であるか、評価する。

統計解析は東海大学教育研究支援センター情報管理部門で行う。

4. 研究成果

(1) 乳癌患者 PBMC (31 名) を CH401MAP で in vitro 刺激し特異抗体の産生を健常人と比較したところ、患者群では未刺激でも有意

に産生が高かったが、刺激による変化は観察されなかった。

(2) 乳癌患者 PBMC を同マウスに輸注し CH401MAP で免疫した系ではヒト IL-2 の産生を認めた。同マウスでヒト免疫系を構築できたことが確認できた。また、通常の免疫不全マウスであれば長期間の観察で GVHD を生じることがほとんどであるが、本研究においては 1 例も生じることなく、移植 4 週間後に特異抗体の検出が可能である事が明らかとなった。免疫系を観察する上での前臨床試験マウスとしての有用性が示された。

(3) hIL-4TgNOG マウスへ 2 名の乳癌患者の癌組織片を移植したところ、生着は観察されなかった。ついでヒト乳癌細胞株 SKBR3 を移植したがやはり生着は観察されなかった。腫瘍浸潤性リンパ球が影響した可能性、もしくは癌の組織型が増殖の遅いタイプであった可能性が考えられ、さらに条件検討をする必要性が示された。

以上の結果、抗体産生能の評価は invitro 刺激ではなく IL-4-Tg-NOG マウスへの PBMC 移植により可能となった為、今後はさらに臨床検体数を増やしてペプチドワクチンの患者候補の選定に用いる事を検討している。一方、腫瘍組織の移植については、乳がん組織片の生着の条件検討を行う予定である。

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 2 件)

1. 著者名; Banri Tsuda, Yoshie Kametani, Asuka Miyamoto, Hirohito Miyako, Nobue Kumaki, Rin Ogiya, Risa Oshitanai, Mayako Terao, Toru Morioka, Naoki Niikura, Takuho Okamura, Yuki Saito, Yasuhiro Suzuki and Yutaka Tokuda. 論文標題; The Effect of Peptide Treatment on the HLA-Binding and Antibody Production in Peripheral Blood Mononuclear Cells Obtained from Japanese Breast Cancer Patients. 雑誌名; Vaccine & Vaccination. 査読の有無; 有. 巻; 6. 発行年; 2015 年. ページ; 1-8

2. 著者名; Goto Y, Kametani Y, Kikugawa A, Tsuda B, Miyazawa M, Kajiwara H, Terao Y, Takekoshi S, Nakamura N, Takeda S, Mikami M. 論文標題; Defect of tropomyosin-related kinase B isotype expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. 雑誌名; BioScience Trends. 査読の有無; 有. 巻; 8. 発行年; 2014 年. ページ; 93-100.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 発表者; 津田万里、発表標題; Her2 ペプチドワクチンの効果予測因子としての

CH401MAP 反応性の検討、学会名; 第 22 回日本乳癌学会学術総会、発表年月日; 2014 年 7 月 10 日、発表場所; 大阪国際会議場 大阪府、大阪市)

2. 発表者; Miyamoto Asuka, Tsuda Banri, Tokuda Yutaka, Kametani Yoshie. 発表標題; Analysis of the humoral immunity of breast cancer patients as the candidates of a new Her2 peptide vaccine CH401MAP. 学会名; The 43rd Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 発表年月日; 2014 年 12 月 10 日、発表場所; Kyoto International Conference center. 京都府京都市.

3. 発表者; Kikuchi Yusuke, Miyamoto Asuka, Tsuda Banri, Katano Ikumi, Tokuda Yutaka, Ito Mamoru, Kametani Yoshie. 発表標題; Analysis of the human immune system reconstructed in the hIL4-Tg NOG mouse. 学会名; The 43rd Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 発表年月日; 2014 年 12 月 10 日、発表場所; Kyoto International Conference center. 京都府京都市.

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 万里 (TSUDA, Banri)
東海大学・医学部・助教
研究者番号: 30514533