

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430176

研究課題名(和文)次世代経皮カクテルワクチンの開発基礎研究

研究課題名(英文)Development of next generation transdermal vaccine for cancer treatment

研究代表者

山田 亮(YAMADA, Akira)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究者番号：50158177

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)：がんペプチドワクチンではフロイント不完全アジュバントが汎用されているが、投与局所への残留性と刺激性・炎症惹起作用が問題となっている。そこで、本研究ではこれらの副作用がなく、かつ強力な免疫誘導能を有する次世代経皮カクテルワクチンの開発をめざした。その結果、経皮吸収アジュバントであるイミキモドとグリチルリチン併用によりワクチンによる免疫誘導が增强されること、他のHMGB1阻害剤にも同様の增强作用があることを見出した。さらに、移植腫瘍治療モデルにおいてペプチドワクチンで誘導される抗腫瘍作用を增强することも示した。本研究成果は今後の経皮ワクチン開発に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)： Freund's incomplete adjuvant, one of the most popularly used adjuvant for cancer vaccines, has several adverse effects such as long term retention and an induction of inflammation at the injection site. We attempted to develop a next generation of transdermal vaccine for cancer treatment with no or low such adverse effects. We found that glycyrrhizin augmented vaccine-induced immune response with transdermal adjuvant, and the augmenting effect of glycyrrhizin was also observed in other synthetic HMGB1 inhibitors. Thus the effects are common to the HMGB1 inhibitors. In a therapeutic vaccine model, glycyrrhizin inhibited the growth of transplanted tumors. These findings might be valuable for further development of transdermal vaccines.

研究分野：腫瘍免疫学、がん免疫療法

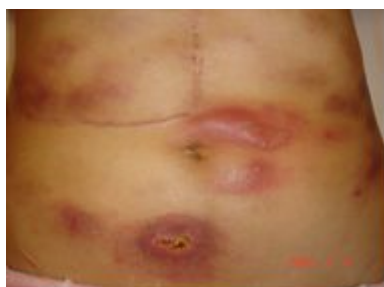
キーワード：がん 免疫療法 がんワクチン アジュバント 腫瘍 経皮免疫 ペプチドワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは細胞傷害性T細胞(CTL)の認識するがん抗原由来のペプチド分子を標的としたペプチドワクチン療法の開発を行っており、現在までに200個以上のがん抗原ペプチドの同定およびそれらを標的としたワクチン療法の臨床試験を実施中である。がん細胞の特質にのみ注目し、がん細胞に選択的かつ高発現するがん抗原ペプチドを選定して用いる従来型のペプチドワクチン療法では臨床効果を得るのが難しいことから、研究代表者らは患者側の免疫記憶にも対応したペプチドワクチン療法、すなわちテラーメイドがんペプチドワクチン療法を提唱してきた。患者のワクチン候補ペプチドに対する免疫反応性を事前に調べ、反応性の認められたペプチド数個を患者に同時に投与するというものであり、その安全性ならびにペプチド特異的免疫誘導能が確認されている。さらに、テラーメイドがんペプチドワクチン療法では、従来型のがんペプチドワクチンに比し、各段に高い臨床効果が得られるようになった。多くのがん種において抗がん剤との併用により、抗がん剤単独療法に比べ1.5ないし2倍の生存期間延長効果が認められている(Yamada et al., Cancer Science, 2012)。

しかしながら、個々の患者の多様性に対応するためには多くの種類のワクチン候補ペプチドを事前に用意しなければならず、また、HLA検査や免疫検査などの特殊検査が必要である。さらに数個のペプチドを別々の製剤としてフロイント不完全アジュバント(Montanide ISA51)とともに皮下投与するために、投与局所に長期間にわたって残留し、ほぼ全症例で局所の炎症を惹起し、時に潰瘍形成を起こし患者の苦痛およびQOL低下の原因となっている(写真参照)。そこで、テラーメイド

がんペプチドワクチンと同等以上の臨床効果を有し、**事前の特殊検査などを必要とせず、全てのHLA型患者に適応可能、かつ注射本数が少なく投与局所の炎症や痛みを伴わない患者にやさしいポストテラーメイドがんペプチドワクチンの開発が望まれている。**



ワクチン投与部位の炎症・潰瘍

投与部位における抗原の長期残留はワクチンで誘導されたCTLを投与部位に集積させ、がん局所への動員を妨げるとの報告もマウスでなされている(Hailemichael et al, Nat

Med, 2013)ことから、**フロイント不完全アジュバントに代わる新規アジュバント並びに新規投与法の開発も望まれている。**

研究代表者らは、これまでに事前の特殊検査不要で全てのHLA型患者に適応可能、かつ1本の注射で済むカクテルワクチンの開発を行ってきた。10ないし20種のペプチドをフロイント不完全アジュバントとともにエマルジョン製剤としたもので、個々の成分抗原の各種がん組織における発現解析を行うとともに、GLP下での反復投与毒性試験を実施し、前立腺がんおよび消化管がん患者を対象とした臨床試験を実施してきた(CIMT:2013年マインツ、日本癌学会:2013年横浜)。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれらの研究成果をもとにカクテルワクチンの構成ペプチドの再検討を行うとともに、**フロイント不完全アジュバントを用いない経皮ワクチンの開発**の基礎的研究を行う。さらに、得られた基礎研究データに基づき別資金でヒトでの探索的臨床研究を実施し、検証を行うとともに基礎研究にフィードバックし、さらなる改良を加え、**ポストテラーメイドペプチドワクチン**の開発基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

### 1) 経皮ワクチン用免疫増強物質の探索

**免疫方法及び薬剤投与方法:** 1~3日前に毛を剃ったC57BL/6マウスの背部皮膚に5%イミキモド(ベセルナクリーム;約25mg/匹)を麻酔下で塗布し、30分後にOVAペプチド(SIINFEKL)溶液を同部位に皮下投与した。グリチルリチン(20μg/匹)、あるいは他のHMGB1阻害剤(200μg/匹)は抗原溶液に混合して投与した。

**免疫増強作用の評価:** OVAペプチド特異的T細胞レセプター導入OT-1マウスの脾細胞をCFSEで標識し、C57BL/6マウスに移入した。その後、OT-1脾細胞移入マウス背部にイミキモドを塗布し、同部位に抗原溶液を皮下投与した。抗原投与2日ないし3日後に脾細胞を採取し、CD8陽性OT-1細胞の増殖をフローサイトメーターで解析した。CTL応答は、IFN-ELISPOTアッセイにより評価した。

### 2) 抗腫瘍効果

OVAを発現するEG.7-OVA細胞をC57BL/6マウスに皮下移植し、腫瘍塊の形成が確認されたのちにイミキモドとOVAペプチド、及びグリチルリチンを7日後に2ないし3回投与し、腫瘍の増殖抑制効果を検討した。抗原特異性の検討は、EG.7の親株であるEL-4細胞皮下移植モデルとの比較で行った。CTL誘導はIFN-産生細胞数をELISPOTアッセイで計測し評価を行った。

### 3) 免疫増強機序の解明

投与局所の皮膚、脾臓、及びリンパ節における各種免疫関連遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR で測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 経皮ワクチン用免疫増強物質の探索

フロイント不完全アジュバントに代わるアジュバントとして自然免疫レセプター関連アジュバントの実用化が進められている。我々は経皮ワクチンに応用可能な低分子自然免疫レセプター関連アジュバントであるイミキモドの作用を増強する経皮吸収可能な低分子化合物の探索を行った。イミキモドの副作用として局所における炎症誘導作用が知られているが、免疫増強作用と局所炎症反応を乖離させることが可能であれば副作用の少ない安全な経皮ワクチンが開発可能となる。そこで、抗炎症作用を有し、皮膚科外用剤や化粧品に使用されるグリチルリチンに注目し、検討を行った。グリチルリチンは生薬甘草の成分で肝炎やアレルギーの治療薬として使用されており、ダメージ関連分子パターン HMGB1 を阻害することが知られている。卵白アルブミン (OVA) 由来 CTL エピトープペプチドをモデル抗原として使用し、経皮アジュバントとしてイミキモドを使用した。抗原ペプチドを皮内の抗原提示細胞に送達するには、角質層を透過させるための工夫が必要であることから、その前段階として、抗原ペプチドは皮下投与により検討した。グリチルリチンはペプチド溶液に混合し、OT-1 脾細胞移入マウスを用いて抗原特異的 T 細胞応答を調べた。その結果、グリチルリチンにはワクチン塗布部位の炎症反応 (発赤) を抑制し、かつ、抗原特異的 CD8T 細胞増殖応答を増強することが判明した。この作用はイミキモド以外にも、リピッド A 誘導体 (MPL) や CpG オリゴヌクレオチド等の他の自然免疫レセプター関連アジュバント併用によっても認められたが、アジュバントを併用しない場合には免疫増強効果は認められなかった。すなわち、グリチルリチンにはそれ自体アジュバント活性はなく、他のアジュバントとの併用により免疫増強作用を示すコアジュバントであることが示された。

##### 2) 抗腫瘍効果

抗原特異的 CD8T 細胞増殖反応のみならず、CTL 誘導も増強することが IFN- ELISPOT アッセイにより示された。そこで、次に EG.7 - OVA 細胞を C57BL/6 マウスに皮下移植し、イミキモドと OVA ペプチド、及びグリチルリチン投与による腫瘍増殖抑制効果を検討した。その結果、EG.7 - OVA 細胞の増殖はグリチルリチン非併用時に比べ併用により強く抑制された。EL-4 細胞に対する増殖抑制効果は認められなかったことより、ワクチン投与

による増殖抑制効果は抗原特異的であることが示された。

##### 3) 免疫増強機序の解明

グリチルリチンで認められた免疫増強作用は、他の HMGB1 阻害剤でも認められたことから、HMGB1 阻害によるものであることが示唆された。次に、投与局所の皮膚及び脾臓における免疫関連遺伝子の発現プロファイル調べた。その結果、グリチルリチン投与により IL-1 と IFN- の発現が皮膚では抑制され、脾臓では亢進していた。これらの遺伝子発現レベルは皮膚に比べ脾臓では 10~100 倍 高いことから、脾臓での IL-1 と IFN- の発現亢進が免疫増強の主たる機序であると考えられた。また、HMGB1 により誘導される免疫抑制が解除されることもその機序の一つであることが判明した (Cancer Sci, 2016)。

##### 4) 抗原ペプチドの皮膚透過性亢進法の予備的検討

ワクチンペプチドの分子量は 1000 ダルトン前後であり、皮膚の抗原提示細胞に到達させるためには、角質バリアーを通過させる必要がある。そこで、化学的に角質層を除去する方法を用いた塗布ワクチンの開発を試み、乳酸溶液に界面活性剤及び高分子ポリマー基剤を混合することにより、効果的かつ低侵襲性に角質層の除去が可能であり、OVA ペプチドの塗布により OVA 特異的 T 細胞の増殖を誘導できることが判明した。

これらの研究により、経皮ワクチンの開発が今後飛躍的に進むことが期待される。

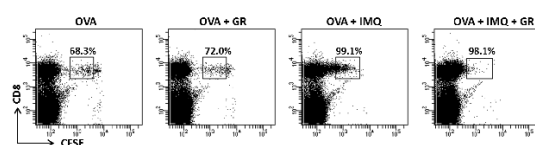


図 1. グリチルリチンによる抗原特異的 CD8T 細胞増殖応答の増強。GR, グリチルリチン; IMQ, イミキモド

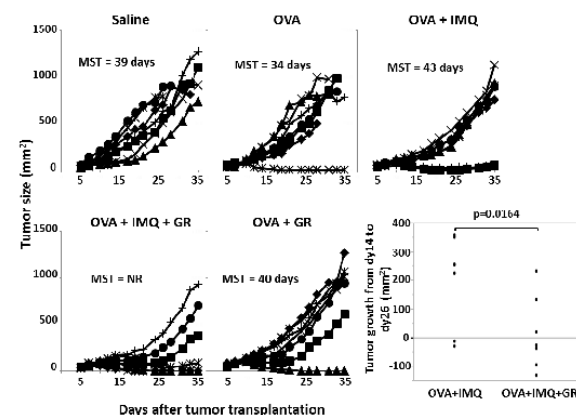


図 2. グリチルリチンによる腫瘍増殖抑制効果の増強。B6 マウスに EG.7 - OVA 細胞を皮下移植し、イミキモドと OVA ペプチド、及びグ

リチルリチン投与による腫瘍増殖抑制効果を検討した。

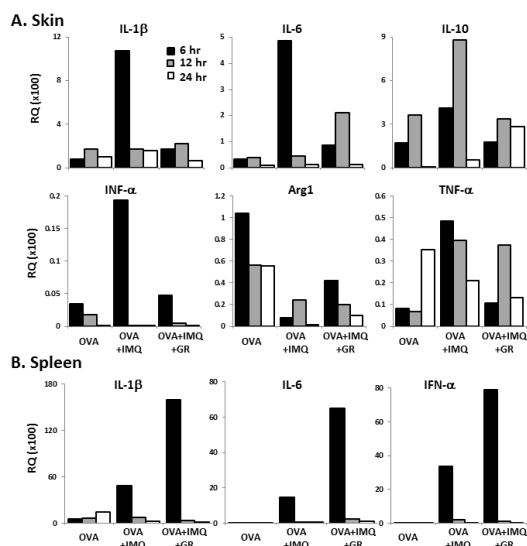


図 3. 投与部位の皮膚及び脾臓における免疫関連遺伝子の発現

## 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28件)

Waki K, Kawano K, Yamada A. 他3名6番目. Plasma Levels of High-Mobility Group Box 1 during Peptide Vaccination in Patients with Recurrent Ovarian Cancer. Journal of Immunology Research, vol. 2017, Article ID 1423683, 8 pages, 2017. doi:10.1155/2017/1423683. [査読有]

Waki K, Yamada A. Blockade of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) augments anti-tumor T-cell response induced by peptide vaccination as a co-adjuvant. Cancer Sci. 2016 Dec;107(12):1721-1729. doi: 10.1111/cas.13084. [査読有]

Iwasa S, Yamada Y, Heike Y, Yamada A. 他12名8番目. Phase I study of a new cancer vaccine of ten mixed peptides for advanced cancer patients. Cancer Sci. 2016 May;107(5):590-600. doi: 10.1111/cas.12919. [査読有]

唐宇飛、朔周子、岡部実奈、山田亮 他7名8番目 トリプルネガティブ乳がんに対する混合ペプチドワクチン(KRM-19)療法の臨床的検討 癌と化学療法 第43巻 第10号 1249-1251頁 [査読有]

和氣加容子、山田亮 急速に発展する免疫療法：がんワクチンの新展開 BIO INDUSTRY 第33巻 第5号 11-18頁[査読無]

Noguchi M, Arai G, Yamada A. 他9名10番目. Phase I trial of a cancer vaccine consisting of 20 mixed peptides in patients with castration-resistant prostate cancer: dose-related immune boosting and suppression. Cancer Immunol Immunother. 2015Apr; 64(4):493-505. doi: 10.1007/s00262-015-1660-1. [査読有]

[学会発表](計22件)

和氣加容子、山田亮 HMGB1 阻害剤はコアアジュバントとしてペプチドワクチンで誘導される抗腫瘍免疫を増強する 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6-8日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 和氣加容子、山田亮 High mobility group box 1 (HMGB1) 阻害剤はコアアジュバントとしてペプチドワクチンで誘導される抗腫瘍免疫を増強する 第20回日本がん免疫学会総会 2016年7月27-29日 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

Noguchi M, Arai G, Matsumoto K, Naito S, Moriya F, Suekane S, Komatsu N, Matsueda S, Sasada T, Yamada A, Itoh K. Phase I trial of a cancer vaccine consisting of 20 mixed peptides in patients with castration-resistant prostate cancer: dose-related immune boosting and suppression. 2014 WCC 2014年12月3-6日 Melbourne, Australia

山田亮 去勢抵抗性前立腺がんを対象としたマルチペプチド混合カクテルワクチン KRM20 の第 相試験 第18回日本がん免疫学会総会 2014年7月31日 ひめぎんホール(愛媛県・松山市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: コアアジュバント組成物およびこれを含むワクチン組成物

発明者: 山田 亮、和氣 加容子

権利者: 学校法人 久留米大学

種類: 特許

番号: 特許願 2016-156299

出願年月日: 2016年8月9日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/index.html> (久留米大学先端癌治療研究センター)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 亮 (YAMADA AKIRA)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究者番号: 50158177