

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893206

研究課題名(和文)腫瘍特異的CTLとヘルパーT細胞を活性化するがんペプチドワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of cancer peptide vaccine that can induce tumor-specific CTLs and Th cells.

研究代表者

湯野 晃 (Yuno, Akira)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40738473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がんの治療法として免疫療法が見直されている。その一つにがんワクチン療法があり、一部のがんにおいてキラーT細胞を活性化するペプチドワクチン療法の効果が報告されている。T細胞には、他にキラーT細胞を助けるヘルパーT細胞が存在し、がん免疫療法においてその重要性が報告されている。本研究において、我々はこの両者を活性化するより効果的ながんペプチドワクチンの開発・免疫学的検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Recently, it is reported the efficacy of cancer immunotherapy including cancer peptide vaccine. Many reports show cancer peptide vaccine can induce CTL. There are not only CTL but also Th cells in the T cell subset and they roll important function for eradication of tumor. So we tried to identify the epitope can induce both CTL and Th cells and conduct immunological analysis.

研究分野：がんペプチドワクチン療法

キーワード：がんペプチドワクチン療法 キラーT細胞 ヘルパーT細胞 腫瘍免疫

### 1. 研究開始当初の背景

細胞傷害性T細胞 (CTL)を活性化する、がん抗原を用いた免疫療法においては、他に治療のない進行がん患者を対象としていることもあり、一部の患者においては腫瘍縮小効果かを認めるものの、未だに標準的な治療法として確立されたものはない。しかし、他の研究者らにより、女性性器がん患者におけるHPVおよび前立腺がん患者におけるPAP (FDA認可)を標的抗原とする、T細胞誘導がん免疫療法の臨床研究において、患者の生存期間の延長や病変の消失が観察され(*New Engl.J.Med.* 361: 1838, 2009, 363: 411, 2010)、がん抗原でT細胞性腫瘍免疫を誘導する免疫療法の臨床応用が見直されつつある。

免疫療法の特徴は、患者への副作用が少なく、初期の腫瘍縮小効果は抗がん剤には及ばないが、数年後の生存期間 (Over all survival; OS) の改善に効果を認める特徴のあることが、次第に認識されつつある。また、Doxorubicinおよび Oxaliplatinなどの抗がん剤の効果の発現の一部には腫瘍免疫が関与しており(*Nat. Med.* 13: 1050, 2007, *Cell* 140: 798, 2010)、免疫療法とこれらの抗がん剤との併用により、顕著な臨床効果が認められた症例の報告が相次いである。さらに、米国FDAが腫瘍抗原特異的T細胞を活性化するがん免疫療法は、免疫系のまだ健全な早期がん患者や治癒的がん治療のなされた患者の術後アジュバント療法に適用されるべきであるとのガイダンスを公示し、今後の発展が期待できるがん治療法として再び注目されつつある。

現行の臨床試験では、T細胞性がん免疫応答の誘導には安全かつ安価である、がん抗原由来のCTL認識ペプチドが多用されているが、ナイーブCTLから腫瘍拒絶に重要な、がん抗原特異的メモリーCTLを誘導するには、Th1細胞の産生する様々なサイトカインの存在が重要であることが、動物実験により証明され

ている(*Nature* 441: 890, 2006, *J. Immunol.* 181: 7445, 2008)。したがって、がん特異抗原のCTLエピトープのみならずTh1細胞エピトープを同定して、これを同時投与することが望ましいと想定される。さらにCTLとTh細胞エピトープを連結したペプチドの有効性も報告されている。

### 2. 研究の目的

既に同定されている理想的な新規がん抗原であるCDCA1, KIF20AおよびIMP-3由来の癌細胞を傷害するHLA-A2あるいはA24拘束性CTLを誘導するペプチドは、がん免疫療法の臨床研究にすでに供され、腫瘍縮小効果が観察されている。

さらに治療効果のある癌免疫療法を開発するため、日本人集団で頻度の高い複数のHLA-II分子によりCD4陽性Th1細胞に提示され、かつCTL誘導活性を併せ持つヘルパーエピトープペプチドを、がん抗原蛋白由来の合成ロングペプチドを利用して同定し、可能なものから倫理審査を経て臨床研究に供する。さらに、CTLエピトープペプチドワクチン接種前・後の担癌患者における、同定したヘルパーエピトープペプチドに対する特異的なTh1細胞の存在の有無を解析し、特異的なTh1細胞の存在が併用化学療法の効果に与える影響や、生命予後との関連、および検出された腫瘍特異的Th1細胞の機能解析を行う。

### 3. 研究の方法

まずCTLエピトープペプチドが、がん免疫療法の臨床研究で腫瘍縮小効果が確認されている、口腔癌に高発現するがん抗原CDCA1, LY6K, KIF20AについてTh1細胞エピトープを同定した。人類集団中で頻度の高い数種類のHLA-II遺伝子を有する健常人および、CTLエピトープペプチドワクチンの接種を受けた頭頸癌患者の末梢血単核細胞を、20~26アミノ酸からなる、がん抗原由来の合成ロングペプチドを用いて刺激して抗原特異的なTh1細胞の

誘導能を検討した。エピトープの同定には、HLA-II結合ペプチド推定アルゴリズムを利用してペプチドを合成し、CTLエピトープ配列を自然配列として含むTh1細胞エピトープの同定を行った。

次に、CTLエピトープ配列を自然配列として含むロングペプチドであるTh1細胞エピトープが、CTLの誘導活性を有しているか否かを、健康人および癌患者由来の末梢血単核球細胞を用いて検討した。特異的Th1細胞の誘導は、IFN- $\gamma$  ELISPOT解析を用いて検討した。

さらに、同定したTh1細胞エピトープが、プロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞によるcross-presentationを介してCTLエピトープが産生され、抗原特異的CTLを活性化あるいは誘導することができるか否かIFN- $\gamma$  ELISPOT解析およびテトラマー解析を用いて検討した。

また、HLAクラスI(A2およびA24)Tgmを用いて、ロングペプチドであるTh1細胞エピトープのin vivoにおけるクロスプライミング活性の解析を行った。すなわち、ロングペプチドを用いて免疫することによるCTL誘導能を検討した。

さらに、同定したTh1細胞エピトープペプチドの、in vitroにおける腫瘍抗原特異的CTLの誘導に対する相乗効果を検討した。

最後に、CTLエピトープペプチドワクチンの接種を受けた患者の末梢血単核球細胞を分離し、in vitroにおいて同定したTh1細胞エピトープペプチドが、CTLエピトープペプチドワクチンによって誘導された抗原特異的CTLの誘導を増強するか検討を行った。CTLエピトープペプチドワクチンの接種前・後の患者から末梢血単核球細胞を採取し、in vitroで同定したTh1細胞エピトープペプチドで短期間(7日間)刺激を行い、IFN- $\gamma$  ELISPOT解析を用い

て抗原特異的Th1細胞を検出することにより、ワクチン接種前・後における同定したロングペプチドに特異的なTh1細胞の存在の有無を解析し、モニタリングを行った。

#### 4. 研究成果

コンピューターアルゴリズムを用いて、口腔癌に高発現するがん抗原CDCA1, LY6K, KIF20AについてTh1細胞エピトープを同定した。

その際に人類集団中で頻度の高い数種類のHLA-IIを対象とすることで、より多くのがん患者を対象とすることを考慮した。その結果、複数のHLAを対象とするプロミスカスなエピトープを含んだロングペプチドを同定することができた。このことは対象患者に限られるというペプチドワクチン療法の欠点を補填する重要な成果と思われる。

また、CTLエピトープ配列を自然配列として内包させる点は独創的であり、CTLとTh1細胞の両者を活性化させ、より効果的な抗腫瘍効果を期待できる結果を得ることができた。また、自然配列であるため人工エピトープに比べ臨床応用に関しても期待される。

本研究成果は、新薬としての可能性を持ち特許権取得後に、国内外の学会において発表され、論文発表されている。近年、免疫チェックポイント療法を始めとし腫瘍免疫療法は非常に注目を集めており、それらとの併用療法等今後の展望が注目される。

#### 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9件)

Yoshitake Y, Fukuma D, Yuno A, Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS. *Clin.*

*Cancer Res.* 21: 312-21,2015.( 査読あり )

Nishimura Y, Tomita Y, Yuno A, Yoshitake Y, Shinohara M. Cancer immunotherapy using novel tumor-associated antigenic peptides identified by genome-wide cDNA microarray analyses. *Cancer Science*. 106: 505-11, 2015. ( 査読あり )

Mohammad Abu Sayem, Tomita Y, Yuno A. Identification of Glypican-3-Derived Long Peptides Activating both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells; Prolonged Overall Survival in Cancer Patients with Th Cell Response. *Oncoimmunology*. 2015 in press. ( 査読あり )

**湯野晃**, 富田雄介, 西村泰治 「免疫ワクチン療法の現状と今後の展望」 がん分子標的治療 Vol.12 No.1 メディカルレビュー社 (大阪) 2014. ( 査読なし )

Tomita Y, Yuno A (co-first author), Identification of CDCA1-derived long peptides bearing both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes: CDCA1-specific CD4<sup>+</sup> T-cell immunity in cancer patients. *Int. J. Cancer* 134(2): 352-366, 2014. ( 査読あり )

Tomita Y, Yuno A (co-first author), LY6K-specific CD4<sup>+</sup> T-cell immunity in patients with malignant tumor: Identification of LY6K long peptide encompassing both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes. *OncoImmunology* 3(1):e28100, 2014. ( 査読あり )

Tomita Y, Yuno A (co-first author), Identification of Promiscuous KIF20A Long Peptides Bearing Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell Epitopes: KIF20A-Specific CD4<sup>+</sup> T-cell Immunity in Patients with Malignant Tumor. *Clin Cancer Res.* 19(16):4508-20, 2013. ( 査読あり )

Yatsuda J, Irie A, Harada K, Michibata Y, Tsukamoto H, Senju S, Tomita Y, Yuno A, Establishment of HLA-DR4 transgenic mice for the identification of CD4<sup>+</sup> T cell epitopes of tumor-associated antigens. *PLoS One*. 8(12):e84908, 2013 18:228-240, 2013. ( 査読あり )

Haruta M, Tomita Y, Yuno A, TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen-presenting cells. *Gene Ther.* 20(5):504-13, 2013. ( 査読あり )

[学会発表](計 11 件)

湯野 晃 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 北海道

湯野 晃 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 2012 年 9 月 19~21 日 ロイトン札幌 他 北海道

湯野 晃 Identification of a promiscuous LY6K-derived CD4<sup>+</sup> 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 他 兵庫

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯野 晃 (YUNO, Akira)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40738473