

15 - 17 抗腫瘍抗原ペプチドの臨床への導入に関する研究

主任研究者 慶應義塾大学医学部 河上 裕

研究成果の要旨

各種網羅的遺伝子解析技術、cDNA サブトラクション、患者 T 細胞や抗体を用いた DNA クローニング法により、各種癌種でヒト腫瘍抗原を単離し、新規 HLA 結合ペプチド予測プログラム、*in vitro* T 細胞誘導法、新規開発 HLA 遺伝子導入マウスを用いて、日本人に頻度の高い HLA-A24 や-A2 結合 T 細胞エピトープを同定した。同定抗原の免疫原性の解析により個別化免疫療法の必要性を示した。同定ペプチドを用いた免疫の臨床試験を開始し、重篤な副作用なく一部の症例で免疫効果と抗腫瘍効果が認められた。投与抗原特異的 IgG 抗体が検出される例があり、その意義解明により、免疫療法の改良が考えられた。同種造血幹細胞移植により固形癌に対しても抗腫瘍効果が認められ、腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導が起りえることを確認した。T 細胞による癌細胞傷害機構の解析、ヒト T 細胞再構成マウスの作製、TCR 遺伝子導入による腫瘍反応性 T 細胞の作製、抗原遺伝子導入細胞や高感度 Q-dot HLA マルチマーを用いた免疫モニター法や Hsp90 ペプチド複合体による免疫法の開発など、免疫療法の改良に結びつく基礎研究成果をあげた。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
河上 裕	慶應義塾大学医学部 教授	各種遺伝子解析を用いたヒト腫瘍抗原の同定
珠玖 洋	三重大学医学部 教授	ヒト腫瘍抗原ペプチドの同定とその臨床応用
佐藤昇志	札幌医科大学医学部 教授	腫瘍抗原ペプチドの同定と CTL 癌ワクチンの臨床試験
原田 守	久留米大学医学部 助教授	再燃前立腺癌に対するペプチドワクチン療法に関する研究
安川正貴	愛媛大学医学部 助教授	造血器腫瘍に対するペプチドワクチン療法の開発
若杉 尋	*1 国立がんセンター 部長	ペプチドを用いた同種移植後の抗原特異的免疫回復の解析
平家勇司	*2 国立がんセンター 主任研究官	それをを用いた受動免疫療法の開発

*1：平成15年4月1日～平成16年3月31日

*2：平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、ヒト腫瘍抗原とT細胞エピトープを同定し、抗腫瘍免疫応答の解析と免疫療法の臨床試験の実

施・評価、その改良により、各種癌に対する抗原ペプチドを標的とした免疫療法の可能性を追究することである。同時に腫瘍抗原を用いた癌の診断法開発も検討する。

具体的には、1. 新規腫瘍抗原の同定では、網羅的遺伝子発現解析法や患者T細胞や抗体を用いたcDNA発現クローニング法などの各種方法を試み、改良を加えて腫瘍抗原を単離同定する。また既知候補分子が抗原になるかを検討する。2. T細胞エピトープの同定では、末梢血リンパ球を用いた *in vitro* T細胞誘導法を用いて、CD8⁺T細胞やCD4⁺T細胞が認識する抗原ペプチドを決定する。その際、新規開発HLA-A24結合ペプチド予測プログラムやHLA遺伝子導入マウスを用いたT細胞エピトープ推定も試みる。3. 抗腫瘍免疫応答の解明では、腫瘍抗原に対する免疫応答を、患者検体を用いて各種免疫アッセイにより検討する。また、T細胞による癌細胞認識傷害機構の解明を試み、免疫療法改良へと結びつける。4. 免疫療法・免疫モニタリング法の改良においては、新しい方法を開発し臨床試験に役立てる。5. 臨床試験の実施では、安全性、免疫誘導効果、抗腫瘍効果を評価することにより、免疫療法の問題点を明らかにし、改良法を考え、新たな免疫療法の開発を行う。

2 研究成果

1. 新規腫瘍抗原の同定

1) 腫瘍反応性T細胞を用いた腫瘍抗原の単離同定

自家骨肉腫特異的CTLを用いて、骨肉腫やユーイング肉腫など各種肉腫に発現する抗原PBFを単離同定し、T細胞エピトープを決定した。HLA-A31拘束性胃癌抗原C98を単離した。この遺伝子のスプライシングバリエーションは腫瘍特異的に発現し正常組織での発現は認めなかった。

2) 癌患者血清抗体を用いた腫瘍抗原の単離同定 (SEREX法)

膀胱癌患者血清を用いて自家膀胱癌細胞株cDNAライブラリーをスクリーニングし、膀胱癌組織に発現する抗原KU-BL2を単離した。KU-BL2特異的IgG抗体は膀胱癌患者血清に検出されたが健常人では認められなかった。合成KU-BL2ペプチドを用いてHLA-A24拘束性膀胱癌反応性CTLを誘導できた。

3) cDNAサブトラクションによる腫瘍抗原同定

i) Differential display法

高悪性度非ホジキンリンパ腫に高発現するAurora-Aを同定した。Aurora-Aは正常細胞にはほとんど発現せず、非ホジキンリンパ腫など各種腫瘍細胞に高発現する。Aurora-Aペプチドで腫瘍細胞傷害性CTLが誘導された。リンパ腫細胞株へのアンチセンス導入により、細胞周期はG0/G1期に止まり増殖抑制が認められ、新たな分子標的療

法の標的にもなりうることが判明した。

ii) RDA法

RDA法を用いて濃縮した精巢特異的cDNAの中から、癌細胞にも発現する分子をRT-PCR法で検索し、癌精巢特異的発現を示すKU-CT4を同定した。悪性黒色腫患者血清中には、大腸菌組換えKU-CT4蛋白を認識するIgG抗体が認められ、新規癌精巢抗原であることが確認された。

iii) SAGE法

SAGE法を用いて悪性黒色腫細胞cDNAプロファイルを解析し、色素細胞と悪性黒色腫に特異的に発現するPAX3を同定した。悪性黒色腫患者血清中には大腸菌組換えPAX3蛋白を認識するIgG抗体が検出され、腫瘍抗原であることが確認された。

iv) DNAチップ法

DNAチップによる各種組織cDNAプロファイルの比較とESTデータベースを用いて、新規ヒト腫瘍抗原(悪性黒色腫抗原FCRL、FABP7、腎癌抗原KU-RCC1、種々の癌細胞に高発現するKU-CT3、KU-CT6、KU-CR1)を同定した。それぞれの大腸菌組換え蛋白に対するIgG抗体が癌患者血清中に検出され、患者に免疫原性がある腫瘍抗原であることが確認された。また、別のDNAチップセットを用いて、正常組織に発現が極めて低く、癌組織に過剰発現する腫瘍抗原候補17種類を同定した。

以上のように、各種分子生物学的、免疫学的手法を用いて多数の腫瘍抗原を同定した。癌患者におけるIgG抗体の存在は、同じ腫瘍抗原に対するCD4⁺T細胞が活性化されていることを意味し、CD4⁺T細胞抗原として免疫療法に応用できる可能性を示す。膀胱癌抗原では、腫瘍反応性CD8⁺CTLの誘導が可能であった。同定腫瘍抗原の診断への応用に関しては、治療後予後が良い患者では血清抗体が消失する例があり、予後診断あるいは早期診断にも応用できる可能性があり、今後、多数検体を用いた臨床的検討が必要である。

2. T細胞認識エピトープペプチドの同定

1) *In vitro* T細胞誘導法による同定

i) 前立腺癌抗原

前立腺癌患者末梢血リンパ球から *in vitro* T細胞誘導法で前立腺癌反応性CTLを誘導できるHLA-A24、-A2、-A11、-A31、-A33等に拘束される前立腺関連抗原(PSA、PSMA、PAP、PSCA)ペプチドを同定した。抗原ペプチドによっては液性免疫も誘導することが判明した。ホルモン抵抗性前立腺癌や骨転移性前立腺癌に発現する分子の免疫原性を検討し、骨転移癌病変に関わるPTHrP由来のHLA-A24、-A2結合エピトープとpolycomb蛋白EZH2由来HLA-A24結合エピトープを同定した。

ii) 子宮頸癌関連 HPV type 16

子宮頸癌発症に関わる HPV type 16 の E6 と E7 において、子宮頸癌細胞反応性 CTL を誘導できる HLA-A24 結合 T 細胞エピトープを同定した。

各種癌に発現する survivin と livin 抗原と滑膜肉種抗原 SYT-SSX

in vitro CTL 誘導法により、survivin と livin および滑膜肉種抗原 SYT-SSX の HLA-A24 結合性 T 細胞エピトープを同定した。Survivin 2 B ペプチドはほとんどの HLA-A24⁺ 患者リンパ球から CTL 誘導が可能であった。

) CD4⁺T細胞認識 WT1 ヘルパー T 細胞エピトープ

WT1 全長に対して 10 アミノ酸重複 20 アミノ酸ペプチドを 43 種類合成し、*in vitro* T 細胞誘導法により、Th1 タイプの HLA-DP5 拘束性 WT1 特異的 CD4⁺T 細胞を誘導した。この CD4⁺T 細胞は、HLA-DP5 拘束性に WT1 発現白血球細胞を直接傷害し、concanamycin A によって細胞傷害性が抑制されたことから、パーフォリン依存性経路による細胞傷害性をもつことが明らかとなった。

2) HLA-A24 遺伝子導入マウスの作製と遺伝子銃や新規 HLA-A24 結合ペプチド予測プログラムを用いた T 細胞エピトープの同定

i) 遺伝子銃を用いる方法

2 ミクログロブリンとキメラ MHC (ヒト HLA-A24 1 と 2 とマウス 3) を連結した遺伝子導入マウスと 2 ミクログロブリン欠損マウスを用いてマウス H-2 発現のない HLA-A24 遺伝子導入マウスを作製した。このマウスに抗原候補 cDNA を遺伝子銃で免疫し、脾細胞中 CD8⁺T 細胞の反応性を ELISPOT 法で検討することにより、癌精巢抗原 SAGE と MAGE-A4 の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープを同定した。この T 細胞エピトープを用いてヒト末梢血から癌細胞反応性 T 細胞を誘導することができた。

ii) 新規 HLA-A24 結合ペプチド予測プログラムで同定した候補ペプチドを用いる方法

HLA 結合実験と予測を繰り返す能動学習によって開発された HLA-A24 結合ペプチド予測アルゴリズムを用いて決定した候補ペプチドを HLA-A24 遺伝子導入マウスに免疫することにより、腫瘍抗原 FCRL、PAX3、CAGE の T 細胞エピトープを同定した。新規アルゴリズムにより、既存のプログラムでは見落とすペプチドを同定できることが判明した。

3. 抗腫瘍免疫応答の解明

1) 同定腫瘍抗原に対する免疫応答

同定腫瘍抗原の多数患者における免疫原性を血清 IgG

抗体の存在により検討したところ、個々の患者により異なることが判明した。個々の患者における腫瘍抗原発現量、HLA タイプ を含む患者免疫応答能により免疫原性が規定されていると考えられ、共通抗原でも癌細胞と患者の両者を考慮した個別化免疫療法の必要性が示唆された。

2) ペプチド免疫により誘導される特異的 IgG 抗体の意義解明

ペプチド免疫において IgG 抗体誘導と臨床効果に正の相関が認められたが、PSA ペプチド特異的 IgG 抗体が誘導された症例では、ペプチド特異的 CD4⁺陽性 T 細胞および PSA 蛋白反応性 IgG 抗体と CD4⁺陽性 T 細胞も誘導されていることが判明した。免疫複合体が検出できる例もあり、B 細胞を介したエピトープスプレディングが起こった可能性を示唆しており、免疫療法後の免疫動態の解明、また、効果的な免疫プロトコルの作成において重要な知見である。

3) ヒト CTL 癌細胞傷害機構の解明

Fas 欠損家系 (ALPS) と perforin 欠損家系 (FHL) 由来細胞を用いて、CTL の細胞傷害機構を解析したところ、ヒト CD4⁺CTL も主要な細胞傷害機構は perforin/granzyme によることが判明した。また、CD4⁺CTL は perforin が発現しない状況では、Fas を介した細胞傷害性を示すことを明らかにした。また、CD8⁺CTL は細胞周期に関わらず恒常的に perforin 発現が認められ細胞傷害活性にも大きな変化は認められないが、CD4⁺CTL では細胞傷害活性と perforin 発現は G2/M 期に上昇することが判明した。Perforin 発現は転写レベルで調節されており、活性化に伴って perforin プロモーターへの stat 5 の結合活性上昇が認められた。

骨髓腫患者末梢血中にも WT1 特異的 CTL が存在し、骨髓腫細胞を傷害することをみいだしたが、骨髓腫細胞はリンパ腫細胞に比べて精製パーフォリンに対して高感受性であることを明らかにし、細胞傷害抵抗性においては、CTL 由来細胞傷害分子に対する感受性も重要であることを明らかにした。

4) 免疫不全マウスを用いたヒトワクチン開発モデルマウスの確立

重症免疫不全マウス NOD/scid/common γ -null と nude/NOD/scid マウスにヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞を移植すると、成熟 T 細胞と B 細胞の出現が認められ、OVA 免疫により、OVA 特異的 IgM、IgG 抗体産生が確認され、さらにアロ抗原特異的 CTL の誘導も観察され、本マウスはワクチン開発に有用であることが示唆された。

4. 免疫療法・免疫モニター法の改良

1) 抗原 mRNA 導入細胞を用いた免疫モニター

複数の抗原ペプチド（同定および未同定抗原）に対する免疫モニターを可能にする方法を、抗原mRNA導入リンパ球を用いて開発した。本法は、多価性癌ワクチンの臨床試験に使用できる。

2) Q-dotを用いた高感度HLAマルチマーの作製

Q-dotを用いることにより通常のHLAテトラマーより感度の高いMHCマルチマーの作製に成功した。HLAテトラマーに比して5~10倍の感度増強が認められ、今後、臨床試験における免疫モニターに使用する予定である。

3) T細胞受容体遺伝子導入による腫瘍反応性T細胞作製

HLA-A24拘束性WT1ペプチド特異的CTLクローンからT細胞レセプター鎖と鎖遺伝子をクローニングし、レンチウイルスベクターを用いて正常CD4⁺とCD8⁺T細胞に遺伝子導入して、Th1サイトカイン産生性のヘルパー活性の期待できるHLA-A24拘束性WT1特異的腫瘍反応性CD4⁺T細胞を作製することができ、養子免疫療法への臨床応用が考えられた。

4) 抗原ペプチド hsp90 複合体による免疫誘導効果増強

腫瘍抗原ペプチド hsp90 複合体による免疫はCTLを効率よく誘導することを明らかにし、免疫療法に有用と考えられた。この複合体は樹状細胞に取り込まれた後、非TAP経路でCTLにクロスプレゼントされる。

5. 臨床試験実施と免疫モニターによる科学的評価

1) 滑膜肉腫に対するSYT-SSXペプチド免疫

HLA-A24結合SYT-SSXペプチドを用いた免疫の臨床試験を実施し、重篤な副作用なく、肺転移巣の増殖が停止した症例が認められたが、明らかなMRにはならなかった。免疫誘導効果は、HLAテトラマーを用いた解析により、実施6例中、肺転移のある患者2例でCTL前駆細胞の上昇を認めた。

2) 大腸癌、乳癌、肺癌、口腔癌、リンパ腫に対する survivinペプチド免疫

HLA-A24結合 survivinペプチド免疫の臨床試験を実施中であるが、いずれの癌種でも重篤な副作用は認めず、腫瘍マーカー低下が大腸癌 7/15、乳癌 4/14、肺癌 3/6、口腔癌 0/4 に認められた。しかしCT上でMRは大腸癌1例のみであり、他症例では腫瘍増大停止が見られた例はあるが、MRにはならなかった。免疫誘導効果は、大腸癌ではHLAテトラマー解析でCTL前駆細胞の上昇を検出したが、臨床効果との明らかな相関は認められなかった。

3) 前立腺癌に対するPSA, PSMA, PSCAペプチド免疫

広く癌に発現する腫瘍抗原に加え、本研究で同定した前立腺関連抗原ペプチドを候補に含めたペプチド免疫をHLA-A24陽性ホルモン抵抗性前立腺癌患者に実施した。ペプチド単独で臨床効果が認められない場合、エストラ

ムチン半量投与を併用し、6例で50%以上の血中PSAレベルの低下が認められた。副作用のほとんどはペプチド投与部局所症状であったが、エストラムチン併用が原因と思われる脳梗塞が1例に認められた。免疫誘導効果は、ペプチド単独では、14例中10例でペプチド特異的CTLが誘導され、14例中7例でペプチド特異的IgG抗体が誘導され、ペプチド免疫により液性免疫も誘導されることが明らかになった。エストラムチン半量投与併用例では、8例中6例にペプチド特異的CTLが誘導され、12例中10例でペプチド特異的IgG抗体が誘導された。

4) WT1とhTERTペプチド免疫

WT1あるいはhTERTペプチド免疫の臨床試験(WT1 6名、hTERT 9名)を実施中である。対象疾患は、WT1は急性骨髄性・リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病急性転化、骨髄異形成症候群、肺癌であり、hTERTは腎癌、前立腺癌、悪性リンパ腫である。ペプチド+IFAを2週間毎に0.5-1.0-2.0mgと3名ずつ増量投与した。hTERTペプチド免疫では、Grade3以上の有害事象は認めず、全身転移腎がん患者2名において進行が停止し、微小肺転移巣の消失が認められ、患者末梢血からhTERT特異的CTLが誘導された。WT1ペプチド免疫では、骨髄異形成症候群患者1例で、赤血球輸血の必要がなくなる程度の貧血改善と血小板数の上昇が認められ、WT1特異的CTL誘導が確認された。臨床効果が認められなかった患者の多くからはCTL誘導が確認されなかった。

5) 同種造血幹細胞移植後の腫瘍抗原特異的T細胞誘導

同種造血幹細胞移植により、固形腫瘍においても抗腫瘍効果(GVT効果)が認められることを確認した。機序解明のために、移植後の腫瘍抗原(CEA、WT1、PRAME、TERT)特異的T細胞の変化をELISPOT法とHLAテトラマー法で解析したところ、大腸癌1例では移植後のCEA特異的CTL増加、また、急性骨髄性白血病等の造血器腫瘍と腎がん症例2例においてWT1特異的T細胞の増加が検出された。腫瘍抗原特異的T細胞の治療効果への関与については、さらなる検討が必要であるが、ミニ移植にペプチドや樹状細胞免疫、リンパ球投与を組み合わせた治療を今後計画予定である。

3 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、臨床検体は提供施設の倫理委員会の規定に基づき、本研究の趣旨を十分に説明し、文書での同意を得た上で提供された。必要に応じて、本研究の目的、方法、試料提供者にもたらされる利益および不利益、個人情報の保護、結果の開示、研究結果の公表、研究結果から生じる知的財産権の帰属、解析研究終了後の試料の取り扱いの方針、研究協力の任意性と撤回の自由、および費用負担に関する事項などにつき明確にした。本研究に関しては、臨床試験も含めて、すでに各研究施設における倫理委員会の承認を得て実施している。