

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10612

研究課題名(和文) 前立腺癌に対する癌ワクチン療法に応用しうるペプチドの同定

研究課題名(英文) Identification of peptides which can be applied to cancer vaccine therapy for patients with prostate cancer

研究代表者

南 高文(MINAMI, Takafumi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70340809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：3種類の前立腺癌関連抗原(PTH-rP, EGFR, EZH2) HLA-A3拘束性ペプチドを1抗原3～5種類合成した。前立腺癌12例に対し各ペプチドにてCTL assayを施行したところEZH2ペプチドの1種のEZH2733-741に対し最もペプチド特異的CTLの誘導を確認した。次にCTLの誘導を認めたEZH2733-741にて刺激されたCD8+CTLsにて6時間⁵¹Cr release assayでHLA-A11, -A31, -A33陽性患者各2例にてHLA-A3拘束性ペプチド特異的cytotoxicityを確認した。

研究成果の概要(英文)：3-5 prostate cancer-associated antigens (PTH-rP, EGFR, EZH2) -derived peptides that were prepared based on the binding motif to the HLA-A3 supertype alleles (HLA-A11, -A31, and -A33) were functionally screened for their potential to induce peptide-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 12 HLA-A3 supertype allele+ prostate cancer patients. As a result, EZH2733-741 peptide was found to efficiently induce peptide-specific CTLs. To test cytotoxicity of CTLs by a standard 6-h ⁵¹Cr-release assay, CD8+ T cells were purified from EZH2733-741 peptide-stimulated PBMCs. The EZH2733-741 peptide-stimulated and purified CD8+ T cells from PBMCs of HLA-A3 supertype allele+ prostate cancer patients showed higher cytotoxicity against HLA-A3 supertype allele-expressing LNCaP prostate cancer cells than against parental LNCaP cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ペプチドワクチン

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は老年期男性に多い癌である。前立腺癌にはアンドロゲン除去療法が一過性に奏功するが、去勢抵抗性または骨転移性前立腺癌として再発した場合に有効な治療法はない。このような患者にとって特異的免疫療法は有望な選択肢となりうる。これまで前立腺癌患者に対する特異的免疫療法に利用可能な癌抗原ペプチドは多く同定されている。しかしながら HLA-A2 および-A24 アレルの頻度が世界的に高いことから、従来の癌抗原ペプチドは HLA-A2 または-A24 アレルが陽性の患者に対するものがほとんどであった。HLA クラス アレルには、その構造的相溶性およびペプチド結合モチーフ解析に基づき HLA-A2,-A3,-B7 および-B44 スーパータイプアレルが提唱されている。それらのうち HLA-A3 スーパータイプアレルはコーカサス人の 38%、中国人の 53%、日本人の 46%および北米アフリカ系アメリカ人およびヒスパニックの 43%に認める。それにも関わらず HLA-A3 スーパータイプアレル陽性前立腺癌患者の治療に使用できる癌抗原ペプチドは限られている。

2. 研究の目的

HLA-A3 supertype alleles 拘束性の前立腺癌ペプチドワクチンの開発が必要と考え、HLA-A2 および HLA-A24CRPC 患者の臨床研究で有用であった各癌関連抗原について、新しい HLA-A3 supertype alleles 拘束性ペプチドの同定を目的として本研究を計画した。具体的には、3 種類の前立腺癌関連抗原 (PTH-rP, EGFR, EZH2) のクラス I 拘束性ペプチドを HLA-A3 supertype alleles に対して affinity の高いペプチドを 1 抗原 3-5 種類合成し、1 抗原ずつスクリーニングし、癌ワクチン療法に使用可能なペプチドを同定する。

3. 研究の方法

(1) 患者サンプリング: 当院倫理委員会より

承認を得て、本研究に対し同意を得た HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者より末梢血 50cc を採取し、Ficoll-Conray 液による末梢血単核球細胞を遠心分離と HLA-A を anti-HLA-A11 mono clonal antibody, anti-HLA-A31 mAb と anti-HLA-A33 mAb を使用しフローサイトメトリーにて同定し HLA-A3 supertype alleles のうち HLA-A11,-A31,-A33 陽性のものを対象とする。HLA-A11,-A31,-A33 陽性例をそれぞれ 5 例ずつ計 15 例を予定する。また全サンプル、実験に使用するまで凍結保存する。

(2) Peptide の選定 : PTH-rP, EGFR, EZH2 抗原各由来ペプチドの中で HLA-A3 supertype alleles に対する affinity の高いペプチド (PTH-rP_{p12-20 17-25 94-102 167-175}, EGFR_{p523-531 673-681 833-841}, EZH2_{p23-31 70-78 73-81 699-707 733-741}) を使用。各抗原由来ペプチドを 95%以上の純度で各 5 mg 合成 (外注) し DMSO にて 10mg/ml で溶解する。

(3) 末梢血単核球細胞からペプチド特異的 CTL の誘導 : HLA-A3 supertype alleles に対する affinity によって選ばれたペプチド候補をさらに絞り込むため、末梢血単核球細胞からのペプチド特異的 CTL の誘導能を評価する。

末梢血単核球細胞 (PBMC) (5×10^4 cells/well) は U-bottomed-type 96-well microculture plate にて $200 \mu\ell$ の培養液にてそれぞれのペプチドを $20 \mu\ell/ml$ を加え quadruplicate にて培養する。培養液成分は 45%RPMI1640, 45%AIM-medium, 10%FCS, IL-2(50units/ml), 0.1 mmol/L MEM nonessential amino acid solution である。培養液半量を除去しペプチド ($20 \mu\text{g/ml}$) と IL-2(50unit/ml) を含む新しい medium に交換する。培養され

た細胞を 4-well に分ける。そのうち 2-well は、それぞれ同種のペプチドで刺激された C1R-A11,C1R-A31,C1R-A33 と一緒に培養し、残る 2-well は HIV ペプチドで刺激された C1R-A11,C1R-A31,C1R-A33 と一緒に培養する。18時間後、ELISA にて IFN- γ を測定し HIV 群と比較し有意差を認めた場合ペプチド特異的 CTL の誘導を認めたと定義する。

(4) Cytotoxicity assay :

ペプチド特異的 CTL の誘導を認めたペプチドを pulse pulse された CD8⁺CTLs は 6 時間 ⁵¹Cr release assay にて LNCaP,LNCaP-A11,LNCaP-A31,LNCaP-A33 に対する cytotoxicity を確認する。Phytohemagglutinin-activated T cell は negative control として使用した。U-bottomed-type 96-well microculture plate に 2×10^3 ⁵¹Cr-labeled cells/well で培養し、同wellに E/T比調整した effector cell を加える。Cytotoxicity assay 直前に Peptide pulse 群 PBMC を CD8-positive Isolation Kit を使用し CD8⁺CTLs を分離する。特異的 ⁵¹Cr release は test cpm-spontaneous cpm にて計算する。Spontaneous release は effector cell を加えない sample にて測定し、Total release は 1%Triton 100-X を加えた sample にて測定する。

(5) Cold inhibition assay : ペプチド刺激された CTLs の特異性を cold inhibition assay にて確認する。⁵¹Cr-labeled target cells (2×10^3 /well) を 2×10^4 effector cell と 2×10^4 cold target cell と共に培養する。cold target cell として HIV またはペプチド刺激した C1R-A11,C1R-A31,C1R-A33 を使用する。

4 . 研究成果

今回の研究ではペプチドワクチン療法の選択肢を増やすために HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者に対する癌ワクチン療法に有用な EZH2 由来ペプチド同定を行った。EZH2 由来ペプチドは全て HLA-A3 supertype alleles 分子に対する結合モチーフに基づき調整し HLA クラス I 分子からの解離予測半減期に基づき計算された結合スコアより 5 種類の EZH2 由来ペプチドを候補とした。次に 5 種類の EZH2 由来ペプチドが HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者の PBMC からペプチド特異的 CTL を誘導できるかについて調べた。具体的には In vitro において各 EZH2 由来ペプチドまたは対照ペプチドにて PBMC を刺激し、刺激後の細胞が対応ペプチドをパルスした C1R-A3 supertype alleles 細胞に反応して IFN- γ を産生するかを調べ、その結果 EZH2₇₃₃₋₇₄₁ ペプチドにより 6 人の HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者のうち 4 人の PBMC からペプチド反応性 CTL が誘導された。次に In vitro において HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者由来の PBMC を EZH2₇₃₃₋₇₄₁ ペプチドにて刺激し、それにより誘導されたペプチド反応性 CTL が前立腺癌細胞株に対して細胞傷害活性を示すことができるかを調べた (図 2)。In vitro で EZH2₇₃₃₋₇₄₁ ペプチドにて刺激した HLA-A3 supertype alleles 陽性患者由来の PBMC は、HLA-A3 supertype alleles 陰性前立腺癌細胞株 (LNCaP) および HLA-A3 supertype alleles 陽性幼弱 T 細胞 (PHA-blast) に対してよりも HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌細胞株 (LNCaP-A11,-A31,-A33) に対して高いレベルの細胞傷害活性を示した。この結果は In vitro において EZH2₇₃₃₋₇₄₁ ペプチドにて刺激された PBMC は、前立腺癌細胞に対して HLA-A3 supertype alleles 拘束性に

細胞傷害活性を發揮することを示す。さらにペプチド刺激 PBMC の細胞傷害活性に関与する細胞のタイプの同定を試みた。図 3 に示すように EZH2⁷³³⁻⁷⁴¹ ペプチドにて刺激した HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者由来の PBMC の LNCaP-A11,-A31,-A33 に対する細胞傷害活性は EZH2⁷³³⁻⁷⁴¹ ペプチドをパルスした非標識の C1R-A11,-A31,-A33 細胞の添加によって有意に抑制されたが HIV ペプチドをパルスした非標識の C1R-A11,-A31,-A33 細胞によっては抑制されなかった。このコールド阻害試験の結果はペプチド刺激 PBMC の HLA-A24 陽性前立腺癌細胞株に対する細胞傷害活性がペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞による可能性が高いことを示す。以上の結果は EZH2 由来ペプチドが HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者において前立腺癌反応性 CTL を誘導でき特異的免疫療法、特に癌ワクチン療法に有用であることを示す。また、PTH-rP, EGFR においても数種のペプチドにて特異的 CTL の誘導を確認しており、今後 Cytotoxicity assay を施行したい。

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 1 件)

New polycomb group protein enhancer of zeste homolog(EZH) 2-derived peptide with the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles

International Immunopharmacology
26 (2015) 133-138

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: HLA-A3 スーパータイプアレル陽性前立腺癌患者に対する癌ワクチン療法に有用な EZH2 由来ペプチド

発明者: 植村 天受、南 高文
権利者: 学校法人 近畿大学
種類: (日本) 特許出願
番号: 2014-196099
出願年月日: 2014 年 9 月 26 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 高文 (MINAMI, Takafumi)

近畿大学・泌尿器科・講師

研究者番号: 70340809

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()