

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03794

研究課題名(和文)腎細胞癌に対するマルチペプチド癌ワクチンの開発、複合免疫療法としての有用性の検討

研究課題名(英文)Development of combination immunotherapy with peptide vaccines for renal cell carcinoma.

研究代表者

植村 天受(Uemura, Hirotsugu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90213397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はペプチドワクチン開発に着手し、5分子に対するワクチンを開発し、一部は特許申請を行い、2021年度に2つの特許(特許第6900610号、特許第6918333号)を取得し得た。今回の研究目的はペプチドワクチンと各IO-drugとの併用による抗腫瘍免疫増強効果について、実際の臨床検体を用いて検討することである。COVID-19禍の影響を受け十分なサンプル収集ができなかったが、腎癌担癌患者でIO-drug非投与患者、投与患者からのサンプルを用いてIO治療によるワクチン効果増強についてパイロット研究を行い検討してきた。なお、一連のCTL誘導に関する研究結果などについては特許の関係上公表していない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今、免疫チェックポイント阻害薬(IO-drug)の登場により、がん免疫療法の有用性が再認識されている。近い将来、癌治療は抗がん剤や分子標的薬を用いた単一療法から、IO-drugを併用する複合免疫療法の時代へと移行してきた。このような現状を鑑みると本研究のような新規ワクチン療法とIO-drugによる複合免疫療法の有用性を検討することは重要な課題と思われる。

研究成果の概要(英文)：We have been working on the development of new MHC Class-I restricted peptide vaccines for five independent therapeutic targets (CA9, VEGFR1, EPOR, PDL1, HIF1) and our studies have successfully resulted in two Japanese patents (#6900610, #6918333) in 2021. We are currently investigating immunological evaluations of our peptide vaccines with immune check point therapies using PBMCs from advanced RCC patients receiving IO-drugs. Most of the data such as ability of specific CTL induction are not reported in public due to patent.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎細胞癌 ペプチドワクチン 複合免疫療法 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

(2019年4月-10月)

転移性腎癌は Long dormancy や転移巣の自然縮小・消失など宿主免疫機能に深く関係したユニークな生物学的特性をしばしば示す反面、化学療法や放射線療法といった一般的な癌治療には、ほとんど効果を示さない難治性疾患である。それ故、転移性腎癌に対する免疫療法は腎癌の特性に適した治療法であり、以前はサイトカイン療法が標準的治療(現在も使用可能)であったが、奏効率、奏効期間とも満足できるものではなかった。2009年月中旬ごろから、血管内皮増殖因子受容体(vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR)などをターゲットにした sorafenib や sunitinib などの分子標的治療薬が登場し、当時の進行性腎癌の標準治療の一つとなった。これは、腎癌とくに淡明細胞癌の発生・増殖に重要な役割を担っている VHL-HIF-1 $\alpha$  pathway の標的分子である VEGF や PDGF のレセプターを阻害することで、細胞質内における増殖シグナル(PI3K-Akt-mTOR)を抑制することに加え、腫瘍血管の新生を抑制、退縮させることが抗腫瘍効果の重要なメカニズムと考えられる。2016年度に入り、癌免疫療法においてこれまでにない革新的な治療法が登場した。PD-1/PDL-1 の免疫抑制経路(免疫チェックポイント)を阻害する免疫チェックポイント阻害療法である。PD-1 や PDL-1 分子に対する抗体治療により PD-1/PDL-1 経路をブロックし、抑制されていた宿主(患者)の癌免疫(T細胞抗腫瘍免疫)を活性化し、癌細胞を攻撃することがメカニズムである。すでに腎癌においてはニボルマブ(抗 PD-1 抗体)やニボルマブ + イピリムマブ(抗 CTLA-4 抗体)併用療法が承認され使用されている。また、mRCC に対する 1st ライン治療として進行中の第 III 相試験として、JAVELIN Renal101 (アベルマブ + アキシチニブ ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02684006)、KEYNOTE 426 (ペンブロリツマブ + アキシチニブ ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02853331)、IM motion151 (アテゾリズマブ + ベバシズマブ ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02420821) の 3 試験があり、各試験ともに極めてプロミッシングな中間報告を出しており、いずれの試験も有効性が証明され、近い将来、承認される可能性が高いと思われた(実際にはアベルマブ + アキシチニブとペンブロリツマブ + アキシチニブの 2 療法が承認された)。このような状況を鑑みると、進行性腎がんに対する薬物治療において、IO-drug を用いた複合免疫療法が主流となる時代が目の前に来ており、mRCC に対して IO-drug の使用は避けて通れない存在になると思われた。しかし、これら IO-drug 療法に対して全く効果を示さない患者も多く認められ、免疫担当 T 細胞の弱小化がその原因の一つと考えられている。腫瘍免疫学の教科書的な考え方は、Naïve T 細胞→抗原曝露→CD8 陽性メモリー T 細胞→エフェクター T 細胞→キラー T 細胞となり、攻撃型 T 細胞に分化するためには、抗原刺激が必要となる。こうした状況のなか、放射線療法や化学療法によるネオアンチゲン誘導やがんワクチン療法などによる癌特異的免疫 T 細胞の誘導が免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果を惹起・増強する可能性が示唆されており、すでに第 III 相臨床試験として計画されていた。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに泌尿器癌(腎癌・膀胱癌・前立腺癌)に対して、MHC クラス I 拘束性ペプチドワクチン療法の臨床研究(医師主導および治験)を行い、プロミッシングな結果を得てきた。腎癌に関しては CA9 ワクチンおよび VEGFR1 ワクチンを用いた臨床研究を行い、前立腺癌や膀胱癌に対してはテラーメイドワクチン療法を行い、その安全性、有用性につ

いて報告してきた。2013 年度より、腎癌に対するマルチペプチドワクチンの開発に着手し（基盤研究 B：22390305、25293336、16H05466）CA9/EGFR-1,-2/EPOR/PDL-1/HIF-1 の 5 分子によるマルチペプチドワクチンを開発し、その一部は特許申請を行った（特願 2014 - 007671、特願 2014 - 189312、特願 2016-209180）。ワクチンによる癌免疫療法を行うにあたり、これまで行ってきたワクチン単独療法では宿主体内に抗腫瘍免疫は惹起できるものの臨床効果を引き出すのに限界があることも認識されている。近年、種々の固形癌に対し免疫チェックポイント阻害薬（IO-drug）の有効性が大きく示され、腎癌においては抗 PD-1 抗体/CTLA-4 抗体（承認済み）併用療法や TKI/IO-drug 併用療法の複合免疫療法の有用性が示され、近い将来、進行腎癌治療の主流となることが推察される。そこで今回の目的は、我々の開発したマルチペプチドワクチンと制御性 T 細胞除去を目的とした抗 CCR4 抗体（モガリツマブ：承認済み）や各 IO-drug との併用による複合免疫療法の有用性（抗腫瘍免疫増強効果）について、実際の臨床検体（免疫担当細胞）を用いて検討する

### 3. 研究の方法

（サンプル）近畿大学医学部附属病院倫理委員会ならびに臨床研究委員会より承認を得て、本研究に対し文書同意を得られた進行腎細胞癌患者より末梢血 5cc を採取し、Ficoll-Conray 液による末梢血単核球細胞（PBMC）を遠心分離と anti-HLA-A2, -A24 mAb を使用しフローサイトメトリーにて同定し HLA-A2,-A24 陽性のものを対象として末梢血 35ml から分離した PBMC と血清をサンプルとする。目的とする患者数は、IO-drug 非投与患者 10 例、投与患者 20 例の計 30 を予定する。同一患者における IO-drug 投与前・後のサンプルを最重要サンプルとし、全サンプル、実験に使用するまで液体窒素内で凍結保存する。また、手術によって得られた余剰組織検体がある場合、腫瘍浸潤免疫担当細胞は、gentleMACS システム(Milteny Biotec 社、購入済)を用いて分離・分散したうえで保存する。今回はペプチドワクチンの完成度の関係と免疫学的アッセイの煩雑さから、HLA-A24 陽性例を優先的に研究対象とし研究をスタートし、研究の進行度合いにより、随時 HLA-A2 陽性例へと移行する。

（培養細胞・ペプチド）日本人由来の腎癌 cell line を全国の 4 大学泌尿器科より協力いただき、今回以下の如く、HLA-A2・A24 拘束性のペプチドスクリーニングに positive/negative cell line を提供いただいた。いずれの細胞も VEGFR および EPOR 分子は、強発現していた。次に KPK13(A2+/24-)・KMRC13(A2+/24+)・KK-RCC6(A2-/24-)は、CA9、VEGFR、EPOR、PDL1、HIF1 すべてを強発現しており、KK-RCC4(A2-/24-)は CA9、PDL1、HIF1 陰性の細胞である。これらの細胞は endogenous に各抗原を発現していることから 51Cr release assay に用い、direct killing の強度について検討する。ペプチド特異的 CTL アッセイ（IFN- $\gamma$  release, LDH release assay）には、TAP deficient 細胞 CIR-A24(A24+), T2(A2+)細胞を用いる。Negative control のペプチドは HIV を用い、cell line としては PHA T cell を用いる。

（各 PBMC からペプチド特異的 CTL の誘導について）

モガリツマブ併用による抗腫瘍効果の増強を証明すべく、モガリツマブ投与サンプル、非投与サンプルで IO-drug 暴露・非暴露 PBMC からのペプチド特異的 CTL の誘導能を評価する。PBMC ( $5 \times 10^4$  cells/well) は U 型ボトム 96 穴マイクロプレートにて 200 $\mu$ l の培養液にてそれぞれのペプチドを 20 $\mu$ l/ml を加え quadruplicate にて培養する。培養液成分は 45%RPMI1640, 45%AIM-V medium, 10%FCS, IL-2(50units/ml), 0.1mmol/L MEM

nonessential amino acid solutionである。3,4日毎に培養液半量を除去しペプチド(20 $\mu$ g/ml)と IL-2(50unit/ml)を含む新しい medium に計 4 回交換する。また 4 回目の medium 交換時にモガムリズマブ投与群にはモガムリズマブ 1 $\mu$ g/ml(Tanaka et al. Clin Cancer Res,22,2016)を投与する。培養 16 日目で、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-A24 と一緒に培養し、残る 2-well は HIV ペプチドで刺激された C1R-A24 と一緒に培養する。18 時間後、ELISA にて IFN- $\gamma$  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。またモガムリズマブ投与、非投与を比較し投与群でペプチド特異的 CTL の誘導能の上昇率が高いペプチドを同定する。次に、ワクチン単独 vs ワクチン複合免疫療法の殺細胞効果を比較すべく以下の CTL assay を行う。

( Cytotoxicity アッセイ )

今回使用する 5 種類のマルチペプチドワクチンを pulse された CD8+CTLs は 6 時間 51Cr release assay にて KPK-13 または KMRC-20 に対する殺細胞効果を確認する。PHA-activated T cell は陰性 control として使用する。U 型ボトム 96 穴マイクロプレートに 2 $\times$ 10<sup>3</sup> 51Cr-labeled cells/well で培養し、同 well に E/T 比調整した effector 細胞を加える。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 細胞を加えない sample にて測定し、Total release は 1%Triton 100-X を加えた sample にて測定する。この手順でモガムリズマブ投与・非投与および IO-drug 投与・非投与での HLA 拘束性ペプチド特異的 CTL の抗腫瘍効果上昇率を比較検討する。

( 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 $\times$ 10<sup>3</sup>/well)を 2 $\times$ 10<sup>4</sup> effector cell と 2 $\times$ 10<sup>4</sup> cold target cell と共に培養する。cold target cell として HIV またはペプチドを刺激した C1R-A24 を使用する。

( ワクチン効果と免疫学的プロファイルの関連について )

マルチペプチドワクチンの有効性 ( CTL 誘導能 ) と免疫担当細胞・免疫関連分子の変化との関係について、末梢血免疫担当細胞 ( DC、リンパ球など )、液性因子のプロファイルおよび手術腫瘍検体に浸潤している腫瘍浸潤免疫担当細胞のプロファイルや免疫関連分子の発現状況を検討する。各治療のポイントにおいて、PBMC、血清、腫瘍浸潤 TIL などの免疫学的プロファイルを FICS ( BC foetessa ) や ELISA ( MSD ) を用いて測定し、ペプチドによる CTL 誘導能+各種治療 ( TKI・IO-drug ) のとの関連について検証する。

#### 4 . 研究成果

IO-drug ( 抗 PD-1、抗 PDL-1 抗体や抗 CTLA4 抗体 ) との併用による併用免疫療法の有用性 ( 抗腫瘍免疫増強効果 ) について、腎癌担癌患者の血液サンプルが必須であることから、現在もなお血液サンプルの収集を行ってきた。当初、IO-drug 非投与患者 10 例、投与患者 20 例の計 30 を予定していたが、COVID-19 流行の影響を強く受け、約 20 例の患者からのサンプル収集にとどまった。同一患者における IO-drug 投与前・後のサンプルを最重要サンプルとし、全サンプル、研究に使用するまで凍結保存し、検討する免疫関連分子についてパイロット研究を行った。また、転移巣切除や原発巣切除に伴う腫瘍浸潤免疫細胞についても数例サンプリングし、検討した。なお、2019、2020 年度の実績報告にも記載したが、CCR4

抗体（モガリズマブ）に関しては、AMED（上田班）で遂行していた、モガムリズマブ+IO 臨床試験において、免疫学的な有効性が示されなかったことから、血液サンプルの採取が困難な状況を踏まえ、モガムリズマブによる免疫賦活効果の研究を打ち切り、IO 治療によるワクチン効果増強についてのみ検討してきた。

最終的な研究目的は、ペプチドワクチンと各 IO-drug との併用による抗腫瘍免疫増強効果について、実際の臨床検体（免疫担当細胞）を用いて抗腫瘍効果（CTL 誘導能など）や免疫学的プロファイル変化を *in vitro* で検討することで、パイロットスタディの結果を踏まえた研究内容を変更して得られた結果について、特許を前提に解析を進めている。これまでの一連の腎癌に関するワクチン開発研究の結果、2021 年度に 2 つの特許（特許第 6900610 号および特許第 6918333 号）を取得し得た。なお、特許の関係上、今回得られたほとんどの成果については学会論文などに公表していない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harada M, Iida Y, Kotani H, Minami T, Komohara Y, Eto M, Yoshikawa K, Uemura H.	4. 巻 71
2. 論文標題 T-cell responses and combined immunotherapy against human carbonic anhydrase 9-expressing mouse renal cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 339-352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-02992-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 HIF-1 由来ペプチド、及びそれを含む金細胞がんワクチン	発明者 植村天受	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 実用新案、特願2016-209180	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	デベラスコ マルコ (De Velasco Marco) (20449838)	近畿大学・医学部・助教  (34419)	
研究分担者	原田 守 (Harada Mamoru) (50260716)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授  (15201)	
研究分担者	南 高文 (Minami Takafumi) (70340809)	近畿大学・医学部・講師  (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------