

様式 C - 1 9

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010年度 ~ 2011年度
課題番号：22791505
研究課題名（和文） 前立腺癌患者に対する癌ワクチン療法に応用できる腫瘍関連抗原由来ペプチドの同定
研究課題名（英文） Identification of tumor antigen derived peptides having the potential to promise candidates for cancer vaccine therapy from prostate cancer patients
研究代表者 南 高文(MINAMI TAKAFUMI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：70340809

研究成果の概要（和文）:

前立腺癌患者より末梢血を採取し、末梢血単核球細胞を遠心分離と HLA-A を anti-HLA-A11,-A31,-A33 mAb を使用しフローサイトメトリーにて同定し HLA-A11,-A31,-A33 陽性のものを対象とした。3 種類の前立腺癌関連抗原のクラス 拘束性ペプチドを 1 抗原 3~5 種類合成し CTL assay にて EZHp₇₃₃₋₇₄₁ ペプチドにて特異的 CTL の誘導を確認し癌ワクチン療法に応用できるペプチド候補として予測される。

研究成果の概要（英文）:

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from prostate cancer patients. The PBMCs were prepared by Ficoll-Conray density gradient centrifugation. The expression of HLA-A11,-A31,and-A33 molecules on the PBMCs was determined by flow cytometry using these antibodies-anti-HLA-A11,-A31,-A33-and FITC-conjugated anti-mouse IgG monoclonal antibodies. 3 prostate cancer-related antigens prepared based on the binding motifs to the MHC-class alleles. It is predicted as a peptide candidate that be identified induction of specific CTL with EZHp₇₃₃₋₇₄₁ peptide in CTL assay, and can apply to a cancer vaccine treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 癌ワクチン HLA-A3 supertype alleles

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) 患者の平均生存期間は約 1 年と予後不良であり、有効な治療法がないのが現状である。最近の前向きランダム化臨床試験の結果から、ドセタキセルにエストラムスチンあるいはプレドニゾロンを併用した化学療法が CRPC の標準治療として行われるようになった。生存期間を数ヶ月延長させる効果はあるものの、骨髄抑制や食欲不振など化学療法剤としての毒性も無視できず、患者にとっての benefit が十分あるとは言えない。このような状況を鑑みると、CRPC に対する有効な患者 benefit のある治療法の開発が早急に必要である。近年、多くの腫瘍抗原が cytotoxic T lymphocytes(CTLs)を誘導することが確認されており、その腫瘍抗原のペプチドを利用した癌ペプチドワクチン療法の有効性が報告されている (Noguchi et al. The Prostate 63,2005/Hueman et al. Clin Cancer Res 11,2005)。ヒト腫瘍免疫療法において、MHC class に提示された腫瘍関連抗原由来ペプチドを認識することにより CD8⁺CTLs が腫瘍細胞を傷害することが実験的に確認されており、各種癌に対する臨床研究においても腫瘍特異的 CD8⁺CTLs の有効性が確認されている (van der Bruggen P et al. Science 254,1991/Kawakami Y et al. J Exp Med 180,1994)。

また T cell の腫瘍特異的 activation は十分な腫瘍関連ペプチドの提示に依存し、最も効果的な抗原性ペプチドの提示は樹状細胞に依存すると考えられている (Steinman, R.M. Annu. Rev. Immunol, 9, 1991/ Banchereau, J, et al. Nature, 392, 1998)。このような背景から、伊東らは前立腺癌に発現している各種癌関連抗原 (SART2,3, CypB, Her2, PSA, PSM, PAP, PSCA, Lck, PTH-rR,

EZH2, EGFR など)より、前立腺癌担癌患者の末梢リンパ球を用いた研究で、CTL 誘導可能な HLA-A2 および HLA-A24 拘束性の MHC クラス I ペプチド約 50 種類同定している (Matsueda et al. The Prostate, 60, 2004/Horiguchi Y et al. Clin Cancer Res, 8, 2002/Peshwa MV et al. The Prostate, 36, 1998/Harada et al. The Prostate, 57, 2003/Yao et al.

The Prostate, 62, 2005/Ogata et al. The Prostate, 60, 2004)。また野口らは、それらペプチドを用いて HLA-A2 および HLA-A24 陽性 CRPC 患者に対して、治療開始前の末梢リンパ球を用いた CTL スクリーニングによるテラーメイド型ペプチドワクチン療法の臨床研究を 50 症例以上行い、その有効性を示している (Noguchi et al. The Prostate, 57, 2003/ Noguchi et al. The Prostate, 60, 2004/ Noguchi et al. The Prostate, 63, 2005)。われわれの施設 (近畿大学医学部附属病院および奈良病院) においても、久留米大学医学部免疫学教室との共同研究で、HLA-A2 および HLA-A24 陽性 CRPC 患者に対し、独自のペプチドワクチン療法の第一相臨床研究を行い、その安全性・免疫反応性・臨床効果について検討した結果は多くの症例で特異的 CTL 誘導が確認され、重篤な有害事象は認められず、ほとんどの症例で QOL を損なうことなく治療が続けられ安全と思われた。臨床効果については約 20% において PSA 値の下降が認められ、エントリーからの平均生存期間は 19 ヶ月とドセタキセルをベースにした化学療法と比較しても遜色なく、むしろより有用であると思える結果となった。以上のようなエビデンスより、医薬品としての有用性を検討するため、厚生労働省医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構に申請のうえ、HLA-A24 陽性 CRPC 患

者を対象に全国4施設において、現在、第一相臨床試験が進行中である。

HLA-A2は日本人の約40%、HLA-A24は約60%が陽性でmajorityを占めることから、現在、癌ワクチン療法の適応はHLA-A2,-A24陽性患者のみで臨床に応用できるHLA-A3 supertype alleles 拘束性の癌ペプチドは無いのが現状である。今回われわれは両分子とも陰性であったため、残念なことにペプチドワクチン療法を受けられなかった症例を少なからず経験した。この状況を打開するためには日本人の46%が陽性と思われる第3のMHCクラスI分子、HLA-A3 supertype 拘束性のペプチド同定が必要であると考えられる。

そこでわれわれはHLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者に対するMHCクラスIペプチドワクチンを開発すべく、HLA-A2,-A24 陽性前立腺癌患者において有効な癌ペプチドとして報告されているSART3 抗原由来ペプチドのなかで癌ワクチン療法に応用できるペプチドの同定を試みた。約20種類のSART3 MHCクラスIペプチドを作製し、各ペプチドに対するキラー前駆細胞の反応性をIFN- γ release アッセイおよび ^{51}Cr release アッセイで検討したところ、候補としてSART3p₅₁₁₋₅₁₉,SART3p₇₃₄₋₇₄₂にてペプチド特異的、cancer-reactive CTL誘導を認めた(Minami et al.Cancer Immunol. Immunother.2006.)。

2. 研究の目的

1での背景および結果から、われわれはSART3 以外の前立腺癌関連抗原においてもHLA-A3 supertype alleles 拘束性の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。HLA-A3 supertype alleles 陽性前立腺癌患者においても先に述べた腫瘍関連抗原由来ペプチドの発現が予想され現在まだ同定されていない、前立腺癌関連抗原においてそれぞれ由来のペプチドを使用しELISAによるIFN- γ 測定, ^{51}Cr 試験にてスクリーニングにて同定し癌ペプチドワクチン療法に応用できる候補と成り得るペプチドを同定する。今回の研究にてHLA-A3 supertype alleles 現在まで癌ワクチン療法を希望したホルモン不応再燃前立腺癌患者の中で日本人にもHLA-A3 supertype alleles 陽性者は46%でありHLA-A2,-A24 陰性の場合、治療は不可能であったが今回の研究にてHLA-A3 supertype alleles 陽性ホルモン不応再燃前立腺癌患者に対するペプチド同定にてテラーメイド癌ペプチドワクチン療法適応範囲拡大を担うと思われる。また、今回の研究が前立腺癌患者のみでなく、他臓器癌に対するHLA-A3 supertype alleles 陽性患者への癌ペプチドワクチン療法の基礎になるものと思われる。

3. 研究の方法

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 monoclonal 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(現時点で陽性例はそれぞれ2例ずつ計6例まで終了)。また全サンプル、実験に使用するまで凍結保存する。

cell line

LNCaPはHLA-A0201陽性前立腺癌cell lineである。LNCaPにHLA-A11,-A31,-A33分子を発現させる為に真核細胞の発現ベクターPcr3.1にHLA-A1101,-A3101,-A3303プラスミドcDNAを挿入し各HLAタイプ陽性のLNCaPトランスフェクタントを作成する。全cell lineはRPMI1640 with 10%FCSにて培養する。

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5mg合成(外注)しDMSOにて10mg/mlで溶解する。

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 μ lの培養液にてそれぞれのペプチドを20 μ l/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),0.1mM 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 μ g/ml)とIL-2(50unit/ml)を含む新しいmediumに計4回交換する。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-A11,C1R-A31,C1R-A33と一緒に培養し、残る2-wellはHIVペプチド刺激された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。各抗原ペプチドを2-3種類に絞り込みさらに最も有用と思われるペプチドを選定すべく以下のassayを行う。

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に対しての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。

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 またはペプチドを刺激した C1R-A11, C1R-A31, C1R-A33 を使用する。

4. 研究成果

HLA-A11,-A31,-A33 陽性例をそれぞれ 2 例ずつ計 6 例及び healthy donor 1 例にて末梢血単核球細胞からペプチド特異的 CTL の誘導の有無を確認すべく選定されたペプチドにて刺激培養を行い ELISA にて IFN- γ を測定した。刺激ペプチド 2wells の IFN- γ の各値が、ともにコントロールペプチドの 2wells の平均の 1.2 倍以上で net value が 50pg/mL 以上にて CTL 誘導陽性と定義した。結果 EZH2p733-741 にて 5 例陽性を確認した。EZH2p733-741 に target を絞り 6 時間 ⁵¹Cr release assay にて Cytotoxicity を確認することで癌ワクチン療法に応用できるペプチドの同定が期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 高文 (MINAMI TAKAFUMI)
近畿大学・医学部・助教

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：