HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on effective induction of cancer antigen-specific T cells and its application for cancer immunotherapy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大竹, 淳矢
Description	配架番号：2135
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11653号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59012
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Junya_Ohtake_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　大竹淳矢

学位論文題名

Studies on effective induction of cancer antigen-specific T cells and its application for cancer immunotherapy

（がん抗原特異的T細胞の効果的な誘導とがん免疫治療への応用に関する研究）

【背景と目的】がんは現在、化学療法・放射線治療・外科的切除が標準治療として行われ、医学の進歩により生命予後の著しい改善がなされてきたが、依然として日本人の死亡原因の一位である。1990 年代初頭に腫瘍特異的抗原が発見されて以来、標準がん治療に加わる新たながん治療法として、腫瘍抗原特異的免疫治療の開発を目指した基礎研究や臨床試験研究が行われている。これまで、主に腫瘍抗原特異的キラーT 細胞を活性化させる HLA クラス I 拘束性キラーペプチドを使用した、がんペプチドワクチン治療が行われてきたが、生命予後の延長といった一定の効果は散見されているものの、当初期待された腫瘍の完全退縮のような治療効果は限定的であり、未だ標準的な治療法までには至っていない。これはがん患者生体内での免疫状態の低下が素因として考えられている。この問題を解決するために、生体内でより抗腫瘍免疫を惹起できるワクチンペプチドの作出、治療前に臨床効果を予見し得る新規バイオバーカーの探索と同定、さらに治療前および治療過程におけるがん患者の免疫状態を評価する標準化されたモニタリング法の開発が必須であると考えられる。そこで本研究では、抗原特異的なヘルパーT(Th)細胞を効率良く誘導できるヘルパーエピトープを同定し、実際に進行・再発がん患者に対してペプチドワクチン臨床試験を実施するとともに、その際に得られた知見を基に、がん患者の免疫状態を評価・判定するバイオマーカーの探索と同定を行い、効果の高いがん免疫治療への応用を目指した。

【方法と結果】Survivin がん抗原の全アミノ酸配列よりオーバーラッピングペプチドを作出し、in vitro 培養系にて、多種類の Survivin 特異的 Th1 細胞を誘導した。さらに、樹立した各 Th1 細胞の反応性について詳細に検討した結果、ほぼ全ての日本人に適応できる各種 HLA クラス II 拘束性を持つ、多数のヘルパーエピトープを同定した。

次に、本研究で同定したヘルパーエピトープにキラーエピトープを結合したロングペプチド(LP)を作出し、従来型のショートペプチド(SP)に比べて、優れた抗腫瘍免疫を誘導できるかを検討した。本研究に同意の得られた健常人の末梢血単核球（PBMC）を用いた腫瘍抗原特異的 T 細胞誘導・評価方法を確立し、LP とそれを構成するヘルパー・キラーSP の混合物をそれぞれ抗原ペプチドとして使用して、腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導効率についての比較を行った。その結果、SP と比較して、LP を使用することで、より効率的に抗原特異的 T 細胞が誘導・活性化されること、さらに Th 細胞依存的にキラーT 細胞を誘導できることが明らかとなった。また、LP をパルスした樹状細胞は SP をパルスした樹状細胞に比べ、長時間にわたり抗原提示能を保持している事が示された。

さらに、北海道大学病院を含む多施設と連携し、腫瘍組織に Survivin あるいは MAGE-A4 が発現し、ヘルパーエピトープが結合し得る HLA クラス II 型を有し、標準治療に抵抗性の

がん患者を対象とした、探索的がんワクチン第 I 相臨床試験を実施した。所定の各適格基準を満たした被験者に、LP、OK-432、および Montanide からなるワクチン試験薬を腫瘍近傍皮下に 2 週間隔、4 回投与し、ワクチンの安全性を腫瘍エンドポイントとし、評価対象病変の画像評価、ならびに被験者 PBMC を用いてがん抗原特異的ヘルパー・キラーT 細胞の応答性、血清を用いてがん抗原特異的抗体価を副次エンドポイントとして解析・評価した。

エントリー患者 25 名の内、適格基準を満たした 16 名にワクチンを投与し、その安全性を評価した。また三回以上ワクチン投与した 11 名を免疫応答の評価対象症例として解析した。その結果、有害事象については、ほとんどの症例がワクチン接種部位の発赤、硬結(Grade 1) のみであり、1 名のみ制御可能な Grade3 の発熱を認められたが、その他本試験を中止すべき重篤な有害事象はなかった。がん抗原特異的抗体価 (Total IgG) は,ワクチン接種 2〜3 回目以降の早期からの上昇が見られ (9/11)、特に Th1 依存的補体結合性 IgG1, IgG3 の上昇が認められた。細胞性免疫応答では、Th1 型の免疫反応(7/11)、Th2 型の免疫反応(5/11)の両者が認められた。RECIST に準拠した臨床効果は、評価可能病変を持つ 10 名中 7 名が PD、1 名が SD であったが、1 名の乳癌症例の頸部リンパ節転移巣は画像上消失した(CR)。

また、被験者の免疫状態を評価・判定するために、Th1/Th2 型免疫応答と関連する血清 microRNA の探索と同定を行った。ワクチン治療後に Th1 および Th2 型の免疫応答を示したがん患者の投与前血清を用いて、microRNA の解析を行った結果、miR-224 および miR-635 は Th1 型の免疫応答を示した被験者の血清で高値を示し、miR-20b は Th2 型の被験者で高値であった。これらの microRNA について、mimic と inhibitor 分子を作出し、健常人由来 PBMC に抗 CD3 抗体刺激を行なう過程で培養系に加え、Th1/Th2 サイトカイン産生に及ぼす影響を検証した。その結果、miR-20b は Th1 サイトカインを減弱し、Th2 型サイトカイン産生を増強した。一方、miR-224 と miR-635 は Th2 サイトカイン産生を減弱し、Th1 サイトカイン産生を増強した。

【考察】本研究で同定した新規がん抗原ヘルパーエピトープと既存のキラーエピトープと結合した LP は、樹状細胞により持続的に提示され、抗原特異的ヘルパーT 細胞とキラーT 細胞を効率的に誘導・活性化することが示唆された。さらに LP を使用したがんワクチン治療は、探索的臨床試験により安全性の確認と、がん患者生体内での早期免疫応答の惹起、さらに一部の症例に有益な知見が得られた。しかしながら、ワクチン投与後に誘導された抗腫瘍免疫応答が臨床効果に直接結びつかない症例や、ワクチンの頻回投与による抗腫瘍免疫応答の疲弊が生じた症例も認めたことから、予め個々のがん患者の血清 microRNA や、がんワクチン治療過程での Th1/Th2 型免疫応答性について解析を行い、より詳細な被験者の免疫状態を評価し、被験者の選択・治療の判断基準として活用することで、さらなる治療効果の改善が期待できると考えられる。血清 microRNA の解析により得られた結果は、今後、被験者の背景、ワクチン治療による抗腫瘍免疫応答と抗腫瘍効果との相関をより精査するとともに、microRNA による Th1/Th2 免疫応答制御に関する作用機序を解明することで、より精度の高いがんワクチン治療への応用に貢献できると考えられる。

【結語】ヘルパーエピトープを含む LP は、効率的にがん抗原特異的ヘルパー・キラーT 細胞を誘導・活性化することが判明した。LP を使用したがんワクチン治療は安全性が確認されるとともに、がん患者生体内の抗腫瘍免疫応答を惹起した。血清 microRNA は、被験者の免疫状態の判定に有用なバイオマーカーであることが示唆され、より精度・効果の高いがん免疫治療の開発に繋がるものと期待される。