

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) 新規がん抗原長鎖ペプチドを併用する複合がん免疫療法の開発  
(英語) Development of combined cancer immunotherapy using long peptides derived from novel tumor-associated antigens

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部  
免疫識別学分野 教授 西村泰治

所属 役職 氏名： (英語) Yasuharu Nishimura, M.D., Ph.D., Professor, Department of Immunogenetics,  
Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

実施期間： 平成28年 9月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) がん抗原長鎖ペプチドワクチンの開発と投与方法の改良  
開発課題名： (英語) Development of tumor-associated antigens-derived long peptides vaccine and improvement of methods for administration of vaccine

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部  
免疫識別学分野 教授 西村泰治

所属 役職 氏名： (英語) Yasuharu Nishimura, M.D., Ph.D., Professor, Department of Immunogenetics,  
Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

分担研究 (日本語) 口腔癌患者のがん抗原ペプチドに対する免疫応答の臨床研究  
開発課題名： (英語) Clinical study of immune response to tumor antigenic peptides in the patients with head and neck cancer

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部  
歯科口腔外科学分野 教授 中山秀樹

所属 役職 氏名： (英語) Hideki Nakayama, D.D.S., Ph.D., Professor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery,  
Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

分担研究 (日本語) がん患者における免疫抑制機構の解析と、その解除法の開発  
開発課題名 : (英 語) Analysis of the mechanism of immune-suppression in tumor-bearing hosts and  
the development of therapy for restoration of immune competency

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部  
免疫学分野 助教 塚本 (粟井) 博丈

所属 役職 氏名 : (英 語) Tsukamoto (Awai) Hirotake, Ph.D., Assistant Professor, Department of Immunology,  
Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究は、Genome-wide cDNA microarray 解析で同定された、成人の組織にはほとんど発現が認められず、頭頸部癌や膀胱癌ほかの多様ながん腫において高頻度に高発現する、がん精巣抗原やがん胎児性抗原を標的として、より有効性の高い複合がん免疫療法を開発することを目的とする。平成28年度に2名の分担研究者らと共に実施した、研究の成果を以下に記載する。

### 1) CTL/Th1 誘導性がん抗原長鎖ペプチドの開発

まず対象とする複数のがん抗原について、コンピューターアルゴリズムを用い、日本人で頻度が高い複数の HLA クラス II 分子 (HLA-II) に結合すると推定され、かつ細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導できる短鎖ペプチドを内包するものも含む、22~29 個のアミノ酸により構成される長鎖ペプチドを合成した。これらの、がん抗原長鎖ペプチドを末梢血単球より作成した樹状細胞に負荷し、これと末梢血由来の自己 CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-2 添加培養液中で培養することにより、ペプチド特異的なバルク Th1 細胞株ならびに Th1 細胞クローンを樹立した。さらに、これらのがん抗原長鎖ペプチドの刺激により誘導した Th1 細胞が、リコンビナントがん抗原を負荷した樹状細胞に免疫応答を示し、樹状細胞によるがん抗原タンパク質の分解により、長鎖ペプチドが産生されうることを確認した。これらの Th1 細胞に長鎖がん抗原ペプチドを提示する HLA-II を、抗 HLA-II 抗体による T 細胞応答の阻止実験ならびに、単一の HLA-II 遺伝子を強制発現させたマウス L 細胞による抗原提示を観察して決定した。こうして日本人で頻度が高い複数の HLA-II により提示され Th1 細胞を活性化できる、がん抗原長鎖ペプチドを多数同定した。長鎖ペプチド特異的 Th1 細胞の頻度は、がん患者への短鎖ペプチドワクチンの接種頻度に比例して増加した。

さらに、がん抗原長鎖ペプチドに内包された短鎖ペプチドを合成してヒト樹状細胞に負荷した後に、ヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞と培養して短鎖ペプチド特異的 CTL を誘導した。上記の長鎖ペプチドを樹状細胞に負荷した後に、先の短鎖ペプチド特異的 CTL と *in vitro* で培養して CTL の免疫応答を検出することにより、樹状細胞による CTL への Cross-presentation を誘導できる長鎖ペプチドを複数同定した。また HLA-A2 または HLA-A24-transgenic mouse に、短鎖ペプチドを内包する長鎖ペプチドをアジュバントと共に免疫した。このマウスのリンパ節より分離した CD8<sup>+</sup>T 細胞と当該短鎖ペプチドを負荷した樹状細胞を培養して、CTL の免疫応答を検出することにより、*in vivo* における長鎖ペプチドによる HLA クラス I 拘束性 CTL の Cross priming が生じていることを確認できた。また短鎖抗原ペプチドを負荷した樹状細胞で、ヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T 細胞を刺激して CTL を誘導する *in vitro* 培養系に、がん抗原長鎖ペプチドと当該ペプチド特異的 Th1 細胞を添加すると、CTL の誘導効率が非常に高まることを観察した。

### 2) がん抗原長鎖ペプチドの効果を増強する免疫方法と、特異的 T 細胞のモニタリング法の開発

誘導した長鎖ペプチドに特異的なバルク Th1 細胞株と Th1 細胞クローンが発現する TCR 遺伝子の cDNA の多様性を、次世代シーケンサーを用いた Deep sequencing により解析した。その結果、バルク Th1 細胞株に発現する TCR- $\alpha$  鎖および TCR- $\beta$  鎖遺伝子ともに 1 種類のみが優勢を占めていた。さらに同バルク Th1 細胞株より単離した Th1 細胞クローンも、同一の TCR- $\alpha$  鎖および TCR- $\beta$  鎖遺伝子を発現しており、この TCR- $\alpha$  鎖および TCR- $\beta$  鎖のペアが、がん抗原特異性と HLA-II 拘束性を担っていることが確認された。このようにして同定された TCR 遺伝子は、がん抗原ペプチド免疫療法のモニタリングや、当該 TCR 遺伝子を導入したナイーブ T 細胞の養子がん免疫療法に応用できる可能性が期待できる。

がん抗原特異的 T 細胞をがん抗原ペプチドで活性化し、抗腫瘍免疫応答を誘導するためには、樹状細胞の利用が最も有効であるが、その大量培養は難しい。ヒト末梢血中の CD14<sup>+</sup>単球に *cMYC*、*BM11* および *Bcl-2* 遺伝子を導入して、GM-CSF と M-CSF の共存下に優れた増殖特性を示すミエロイド系細胞株 (CD14-ML) を樹立した。さらに CD14-ML を IL-4 と OK432 と共培養することにより、優れた抗原の処理と提示能を有する樹状細胞を得て、これにがん抗原長鎖ペプチドを負荷して、自己の末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養することにより Th1 細胞を樹立できた。この方法の導入により、特に採血量に制約がある、がん患者の T 細胞応答の研究を加速できた。

### 3) 免疫抑制解除療法との併用による、がん抗原長鎖ペプチド効果増強法の開発

短鎖抗原ペプチドを負荷した樹状細胞でヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T 細胞を刺激して、CTL を誘導する *in vitro* 培養系に抗 PD-1 抗体を添加すると、僅かに CTL の誘導能が増強した。抗 PD-1 抗体の非存在下に CTL を誘導する培養系に、がん抗原長鎖ペプチドと当該ペプチド特異的 Th1 細胞を添加すると、CTL の誘導効率が非常に高まった。さらに、この培養系への抗 PD-1 抗体の添加により、CTL の誘導効率が格段に増強された。したがって、少なくともヒト T 細胞の *in vitro* 培養系に関する限りは、がん抗原長鎖ペプチドと抗 PD-1 抗体療法の併用は、がん抗原短鎖ペプチドに特異的 CTL の誘導について、劇的な相乗効果をもたらすことを観察した。ヒトがん組織における免疫抑制性の分子や細胞の発現解析については、現在検討中であり成果は次年度以降に得られる予定である。

We have previously identified novel tumor-associated antigens (TAAs) frequently overexpressed in head and neck cancer (HNC), hepatocellular carcinoma (HCC) and other malignancies by using genome-wide cDNA microarray analyses. We identified these TAAs-derived short peptides (SPs) consisting of 9 or 10 amino acids that can activate tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes (CTLs) *in vivo* to prolong survival of HNC and HCC patients in the phase I/II clinical trials.

In this study, we further identified these TAAs-derived promiscuous long peptides (LPs) consisting of 22~29 amino acids that can induce both T helper 1 (Th1) cells restricted by several frequently observed HLA class II molecules, and tumor-reactive and SPs-specific CTLs restricted by frequently observed HLA class I molecules. These promiscuous HLA class II-binding LPs were predicted by using publically available algorithm and they were synthesized. Some of these LPs harbor SPs previously identified to be recognized by tumor-reactive and HLA class I-restricted CTLs. Human peripheral naive CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with monocyte-derived dendritic cells (DCs) pulsed with LPs to generate LPs-specific Th cells and restriction HLA class II molecules were identified by using blocking of T cell response with anti-HLA class II antibody or by using mouse L cells expressing single species of HLA class II molecules encoded for by transgenes as antigen presenting cells. We identified many LPs that can induce Th1 cells restricted by promiscuous and frequently observed HLA class II molecules. These LPs were naturally processed from TAA proteins and presented by DCs to activate Th1 cells generated by stimulation with the LPs. In addition, some of these LPs-derived SPs were cross-presented in the context of HLA class I molecule to activate CTLs in both human *in vitro* culture system and HLA-class I transgenic mice immunized *in vivo* with the LPs. Induction of the TAA-derived SPs-specific CTL by the stimulation of CD8<sup>+</sup> naive human T cells with these SPs in the presence of Th1 cells and their cognate LPs markedly enhanced induction of TAA-derived SPs-specific CTLs *in vitro*. Furthermore, significant increase of TAA-specific CTL induction was observed by addition of immune checkpoint blockade anti-PD-1 antibody into the culture.

We analyzed the base sequences of TCR- $\alpha$ - and  $\beta$ -chain cDNA isolated from those LPs-specific bulk Th1 cell lines and Th1 cell clones to identify predominantly expressed TCR- $\alpha$ - and  $\beta$ -chain genes. These TCR genes may well be useful for monitoring of the LP-specific Th1 cells as well as for adoptive transfer cancer immunotherapy of naive peripheral blood CD4<sup>+</sup>T cells transduced with these pairs of TCR- $\alpha$ - and  $\beta$ -chain genes.

We have also succeeded in generation of a large number of DCs from the myeloid cell lines (CD14-ML) that was generated by introducing *cMYC*, *BMI1* and *Bcl-2* genes into CD14<sup>+</sup> human peripheral monocytes. These CD14-ML proliferated very well in the presence of GM-CSF and M-CSF, and mature DCs can be induced from CD14-ML by the stimulation with IL-4 and OK432. These DCs can process TAA and present TAA-derived peptides to both CTLs and Th1 cells in both healthy donors and cancer patients, and they are very useful to obtain immune-competent DCs especially from cancer patients from whom it is difficult to obtain a large amount of peripheral blood.

Th1 cells were observed in many cancer patients after vaccination with TAA-SPs and the frequency of Th1 cells often increased after repeated vaccination of SPs. These results suggest the usefulness of these TAA-SPs and LPs in combination with immune checkpoint blockade for cancer immunotherapy. We also showed the usefulness of artificial DCs established by us for the generation and maintenance of TAA-specific T cells.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2件、国際誌 4件) \*Corresponding author

1. Hirayama M and Nishimura Y\*: [ Review ] The present status and future prospects of peptide-based cancer vaccines. *Int. Immunol.* 2016, 28: 319-328.
2. Hirayama M, Tomita Y, Yuno A, Tsukamoto H, Senju S, Imamura Y, Sayem M A, Irie A, Yoshitake Y, Fukuma D, Shinohara M, Hamada A, Jono H, Yuba E, Kono K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakayama H, and Nishimura Y\*: An oncofetal antigen, IMP-3-derived long peptides induce immune responses of both helper T cells and CTLs. *OncoImmunology* 2016, 5: e1123368.
3. Imamura Y, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Ikeda T, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Mizuta H, Nishimura Y, and Senju S\*; Generation of large numbers of antigen-expressing human dendritic cells using CD14-ML technology. *PLoS ONE* 2016, 11: e0152384.
4. Sayem M A, Tomita Y, Yuno A, Hirayama M, Irie A, Tsukamoto H, Senju S, Yuba E, Yoshikawa T, Kono K, Nakatsura T and Nishimura Y\*: Identification of Glypican-3-derived long peptides activating both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells; Prolonged overall survival in cancer patients with Th cell response. *OncoImmunology* 2016, 5: e1062209.
5. 平山真敏、西村泰治: がん抗原ワクチン療法の現状と展望「特集 がん免疫療法のブレークスルー」西村泰治 編集、医学のあゆみ (医歯薬出版 株式会社), 2016, 256: 817~822.
6. 平山真敏、西村泰治: がん抗原ワクチン療法の現状と展望「がん免疫療法 腫瘍免疫学の最新知見から治療法のアップデートまで」河上 裕 編集、実験医学 (株式会社 羊土社), 2016, 増刊第 34 巻 第 12 号: 148~155.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Is there a revival of the cancer vaccine? 口頭発表, Yasuharu Nishimura, Educational Session: What you should know about cancer immunotherapy, The European Society of Medical Oncology (ESMO) Asia 2016, Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre, Singapore, Dec. 16~19 (presented on 16), 2016, 国外招待講演
2. 患者で上昇する可溶性 IL-6 受容体 (soluble IL-6 receptor; sIL-6R) が Th1 細胞の分化に及ぼす影響の検討, 口頭+ポスター発表、藤枝 浩司、塚本 博丈、千住 覚、平山 真敏、湯野 晃、中山 秀樹、西村 泰治. 第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪国際交流センター)、2016 年 7 月 27~29 日 (28 日発表)、国内一般口演
3. Next generation combined cancer vaccines. 「次世代複合がんワクチンの開発を目指して」、口頭発表(英語)、Yasuharu Nishimura, Masatoshi Hirayama, Mohammad Abu Sayem, Yuya Imamura, Satoru Senju, Akira Yuno, Yusuke Tomita, Yoshihiro Yoshitake, Kenji Kono, Tetsuya Nakatsura, Yusuke Nakamura, Masanori Shinohara and Hideki Nakayama. The Core Symposia 2 "Beyond the immune checkpoint blockade", The 75th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Pacifico Yokohama, Yokohama Kanagawa, Oct. 6~8 (presented on 7), 2017. 国内招待講演
4. Immune-suppressive role of IL-6/sIL-6R signaling in CD4 T cell-mediated anti-tumor immunity., 「CD4 T 細胞を介した抗腫瘍免疫応答における IL-6/sIL-6R の免疫抑制活性」、口頭発表(英語)、Hirotake Tsukamoto, Koji Fujieda, Keiko Matsumura, Satoru Senju and Yasuharu Nishimura. The International Session "New era of cancer immunotherapy", The 75th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Pacifico Yokohama, Yokohama Kanagawa, Oct. 6~8 (presented on 8), 2016. 国内招待講演

5. HLA 拘束性 T 細胞を活性化するがん抗原ペプチドワクチンの開発、口頭発表、西村 泰治、平山 真敏、Mohammad Abu Sayem、湯野 晃、富田 雄介、今村 悠哉、千住 覚、塚本 (栗井) 博丈、入江 厚、河野 健司、吉武 義泰、中村 祐輔、中面 哲也、篠原 正徳、中山 秀樹. 第 25 回日本組織適合性学会大会 シンポジウム 3「MHC を視点とした免疫異常・感染症治療戦略の新展開」、北海道大学学術交流会館、北海道札幌市、2016 年 10 月 22~24 日 (24 日発表)、国内招待講演
6. Identification of cancer-testis antigen (DEPDC1 and MPHOSP1)-derived long peptides encompassing both CTL and HLA class II-restricted Th cell epitopes. 口頭 + ポスター発表、Miki Nakane、Masatoshi Hirayama、Shohei Ueda、Mohammad Abu Sayem、Junji Yatsuda、Atsushi Irie、Satoru Senju、Masatoshi Eto、Hideki Nakayama and Yasuharu Nishimura. 第 45 回日本免疫学会学術集会、沖縄コンベンションセンター&ラグナガーデンホテル、沖縄県宜野湾市、2016 年 12 月 5~7 日 (5 日発表)、国内一般口演

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

公開対象なし