特集：Human Immunology：疾患理解から治療へ

総 説

がんワクチン創薬への道程 ーがん抗原の同定から臨床試験までー

鳥越俊彦, 廣橋良彦, 塚原智英, 金関貴幸, Vitaly Kochin, 佐藤昇志

The path to innovative drug development of cancer vaccine: From discovery of tumor antigens to clinical trials

Toshihiko TORIGOE, Yoshihiko HIROHASHI, Tomohide TSUKAHARA, Takayuki KANASEKI,
Vitaly KOCHIN, and Noriyuki SATO

Department of Pathology I, Sapporo Medical University School of Medicine

(Accepted February 17, 2014)

summary

Tumor immunology has been advancing after the great discovery of tumor-specific antigen MAGE in 1991, and a number of tumor antigens have been reported to date. We have also found novel tumor antigens through various methodologies such as gene expression cloning, bioinformatics, reverse immunology, transcriptome analysis and peptidome analysis. Recently, we made a success of defining cancer stem cell-specific antigens. The fruits of our basic research have been applied to clinical trials of cancer vaccine. The long path and future perspectives of innovative immunotherapeutic drug development are described.

Key words——tumor antigen; cancer stem cell; peptide vaccine; CTL; immunotherapy

抄 録

1991年のMAGE抗原の発見以来、腫瘍免疫学は急速に発展し、数多くのヒト腫瘍特異抗原が報告されている。著者らも、遺伝子発現クローニング法、バイオインフォマティクス、Reverse immunology、Transcriptome解析、網羅的ペプチド解析などの方法を駆使して、多くのヒト腫瘍抗原を同定してきた。近年、ヒト固形腫瘍の根幹をなすがん幹細胞の分離によって、がん幹細胞特異抗原も明らかにしてきた。一方で、これら基礎研究成果を創薬につなげるために、T細胞エピトープペプチドを用いたがんワクチン臨床試験も推進している。臨床試験ではワクチンの安全性、腫瘍抑制効果、免疫効果を検証し、最適プロトコルとバイオマーカーを見出さなければならない。臨床試験の結果を基礎研究にフィードバックし、より効果の高いがんワクチンの実用化をめざす創薬の道程と展望について概説する。

はじめに

著者らは過去30年以上にわたり、ヒトがん免疫について基礎研究および臨床研究を進めてきた。近年、大学発の研究成果を創薬につなげるトランスレーショナルリサーチが積極的に推進され、医師主導治験が実施できる環境が整ってきた。本レビューでは、これまでどのようながん抗原が同定され、どのように分類され、どのような臨床試験が行われているのか、基礎研究から臨床試験まで、これまでの道程を概説し今後の展望を述べる。

1. がん抗原遺伝子と抗原ペプチドの同定

(1) 自家腫瘍細胞・CTLクローンペアの樹立と遺伝子発現クローニング

著者らはまず、がん患者さんの腫瘍組織からがん細胞株を樹立し、同じ患者さんの末梢血リンパ球と混合培養することによって、自家腫瘍細胞と細胞障害性T細胞(CTL)クローンのペアを樹立した¹⁾。この腫瘍細胞に発現する遺伝子のライブラリーを293T細胞にトランスフェクションし、CTLクローンの活性化を指標とした発現クローニング法によって、HLA-B*5502拘束性に提示される腫瘍抗原遺伝子をスクリーニングした(表1A)²⁾。

表 1 札幌医科大学において同定された抗原分子とペプチド

がん種	抗原ペプチド (提示分子)	抗原タンパク質	文献
A) 自家腫瘍・CTL ペア			
胃がん	F4.2 (A31)	c98	32)
骨肉腫	PBF-B55 (B55)	PBF	2)
骨肉腫	PBF-A24 (A24)	PBF	33)
骨肉腫	PBF-A2 (A02)	PBF	34)
B) バイオインフォマティクス			
種々	HIFPH3-8 (A24)	HIFPH3	7)
種々	CEP55-193 (A24)	CEP55 (C10orf3)	3)
前立腺がん	AMACR2 (A24)	AMACR	6)
前立腺がん	STEAP-B (A24)	STEAP1	5)
肺がん	Lengsin-A02, A24 (A02, A24)	Lengsin	4)
C) Reverse Immunology			
1) アポトーシス関連			
種々	SVN-2B (A24)	Survivin 2B	11)
種々	C58 (A24)	Survivin	35)
種々	L7 (A24)	Livin	12)
2) 染色体転座			
滑膜肉腫	A (A24)	SYT-SSX1	9)
滑膜肉腫	B (A24)	SYT-SSX1	9)
滑膜肉腫	K9I (A24)	SYT-SSX1	10)
D) がん幹細胞			
種々	SOX2-109 (A24)	SOX2	36)
大腸がん	OR7C1-93 (A24)	OR7C1	
腎・大腸がん	DNAJB8-A24 (A24)	DNAJB8	25)
大腸がん	SF9 (A24)	FAM83B	

(2) 網羅的遺伝子発現解析と Reverse Immunology

2000 年代に DNA microarray 解析法や遺伝子発現データベースが発達したおかげで、網羅的な遺伝子発現解析が可能となった。著者らは正常組織と腫瘍組織にそれぞれ発現する遺伝子を比較し、正常組織には発現がほとんどなく、腫瘍組織に高発現する遺伝子群をスクリーニングすることによって、数種類の腫瘍抗原遺伝子を同定した (表 1 B)³⁻⁸⁾。

また滑膜肉腫には、遺伝子転座によって融合遺伝子産物 SYT-SSX1 が発現していることから、HLA 結合モチーフ検索によって HLA-A*2402 拘束性に提示される抗原ペプチドを同定した^{9, 10)}。同様に、腫瘍特異的に発現する Inhibitor of apoptosis protein family 分子 Survivin, Livin から HLA-A*2402 拘束性抗原ペプチドを同定した (表 1 C)^{11, 12)}。このように、既知のがん抗原から HLA 結合モチーフ検索によって抗原ペプチドをスクリーニングする方法は Reverse Immunology 法とよばれる^{13, 14)}。

(3) 網羅的 HLA 結合ペプチド解析

さらに近年著者らは、腫瘍細胞表面の HLA/ペプ

チド complex を免疫沈降し、マスマスペクトル解析によって HLA 結合ペプチドのアミノ酸配列を網羅的に分析する手法を確立した。ペプチドのアミノ酸配列情報から、親抗原タンパク質を推測することができる。推測された抗原遺伝子のなかから、腫瘍細胞に特異的発現を示す遺伝子を選別することによって、新たながん抗原遺伝子と抗原ペプチドを同定することに成功した (表 1 SF9/FAM83B)。Reverse Immunology 法によって同定される抗原ペプチドは、HLA 結合モチーフによって予測された仮想抗原ペプチド (Virtual Antigenic Peptide) であるのに対し、本方法によって同定されるペプチドは、実際に腫瘍細胞表面に提示されているナチュラル抗原ペプチド (Natural Antigenic Peptide, NAP) であることが特徴である。

2. がん抗原の種類とワクチン療法

(1) がん抗原の種類

このようにして多くのがん抗原遺伝子・ペプチドを同定してみると、がん抗原は大きく 3 種類に分類できることが判明した^{15, 16)}。1 つは SYT-SSX1 融合

遺伝子産物に代表されるような腫瘍細胞特異的な遺伝子変異・染色体転座に由来する抗原である。がん特異性という点では極めて理想的な抗原であるが、多くのヒト固形腫瘍では未知のままである。2つめは腫瘍細胞において過剰発現している抗原で、がん細胞の悪性形質と関連した機能をもつ分子が多く、アポトーシスを阻害する IAP family 抗原や、シグナル伝達分子、細胞増殖・細胞周期関連分子が含まれる。これらの抗原は低レベルではあるが正常組織にも発現しており、免疫寛容のために抗原性が低いという欠点がある。3つめのグループは、Cancer-Testis (CT) antigens で、1991 年に Thierry Boon らによって発見された MAGE-A1 がその代表である¹⁷⁾。正常組織では精巣にしか発現していない抗原で、現在までに CT1.1~CT136 まで 150 種類以上の CT antigens が登録されている (GeneCards V3)。

近年著者らは、CT antigens の一部がヒト固形腫瘍のがん幹細胞に高発現しており、がん幹細胞標的抗原として免疫治療に有用であるばかりでなく、機能的にもがん幹細胞の造腫瘍性に重要な役割を果たしていることを見出している (表 1 D)^{18, 19)}。著者らは、がん幹細胞特異的発現を示す CT antigens を、がん・精巣・幹細胞抗原 (Cancer-Testis-Stem, CTS antigens) と呼び、現在がん幹細胞標的ワクチンを開発中である。

(2) がんワクチン療法の治療標的

がん幹細胞は、幹細胞様形質と高い造腫瘍能をもつ少数のがん細胞亜集団で、がんの治療抵抗性や再発・転移の主犯細胞であると考えられており、がん幹細胞を標的とした治療法の開発が現在世界中で進められている^{16, 20)}。がん抗原をがん幹細胞の観点から分類すると、がん幹細胞・非幹細胞共通抗原とそれぞれに特異的ながん抗原、正常幹細胞にも発現する抗原とに分類される (図 1)^{21, 22)}。どのような抗原を標的としたワクチンが最も効果的であろうか？著者らは動物モデルを用いてがん予防モデル実験とがん治療モデル実験とを行った。その結果、いずれのモデルにおいてもがん幹細胞特異抗原を標的とする免疫治療でより高い腫瘍抑制効果が得られた (図 2)²³⁾。抗がん剤に耐性をもつがん幹細胞も、細胞障害性 T 細胞 (CTL) によって細胞障害を受けることが確認されており^{21, 24, 25)}、進行がんの治療および再発予防ワクチンとしての臨床効果が期待される。

図 1 がん幹細胞の観点から分類したがん抗原の種類
がん幹細胞、分化がん細胞および正常幹細胞における発現パターンから、がん抗原は大きく 3 種類に分類される。このうちアンダーラインをつけた抗原分子は、がん・精巣抗原である。

3. がんワクチン療法臨床試験

(1) 臨床試験の概要と結果

著者らは、これまでの基礎研究成果を創薬につなげるために、2004 年からペプチドワクチンの臨床試験を開始した (図 3)。Survivin 由来の HLA-A*2402 拘束性 CTL エピトープ SVN-2B ペプチドを 2 週間毎に 4 回皮下注射するワクチン試験では、RECIST 判定によって腫瘍抑制効果を検証し、HLA/ペプチドテトラマー解析と ELISPOT 解析によって免疫効果を検証した²⁶⁾。免疫補助剤には、不完全フロイドアジュバンドと Interferon- α (IFN) を使用した²⁷⁻³⁰⁾。

進行大腸がん (主に腺がん) と進行口腔がん (主に扁平上皮がん) のいずれを対象とした試験においても、IFN を併用した場合において、有意に高い腫瘍抑制効果と免疫効果 (テトラマー解析) が得られることが判明した (表 2)。IFN 併用ワクチンを受けた術後再発進行膵臓がんの患者は 8 年間経過した現在も試験を継続中である。2012 年より厚労省補助金を受けて医師主導治験を実施。「有効な治療法のない進行消化器がんを対象とした SVN-2B 単独投与の第 1 相臨床試験」の結果、病勢コントロール率は 53% (15 例) で、そのうち進行膵臓がん 10 例を追跡調査した結果、全生存期間中央値は 8.8 ヶ月と延長が認められた。2013 年より、「有効な治療法のない進行膵臓がんを対象としたプラセボ、SVN-2B 単独投与、SVN-2B/IFN 併用投与の二重盲検群間比較試験」を実施中である。

図2 がんワクチンのがん予防モデル実験

Survivin または DNAJB8 をコードする発現 Plasmid DNA を BALB/c マウスに 2 回免疫した後、同系腎がん細胞株 RenCa を移植した。がん幹細胞特異抗原 DNAJB8 を免疫した群で、有意に高い腫瘍抑制効果が認められた¹⁸⁾。

図3 がんワクチンの腫瘍抑制効果メカニズム

ペプチドワクチンを皮下注射すると、局所および所属リンパ節の樹状細胞の働きによってペプチド特異的 CTL が誘導され、体内で増殖する。CTL は抗原ペプチドを発現している腫瘍細胞を認識し、細胞障害活性を発揮する。インターフェロンは樹状細胞の活性化と腫瘍細胞の HLA class I 発現を促進する。

(2) がんワクチン療法のバイオマーカー

CTL エピトープペプチドを用いたワクチンの特質の一つとして、ELISPOT 解析やテトラマー解析によってワクチン特異的 CTL 応答をモニタリングできるという特徴があげられる。実際に、SVN-2B

ペプチドワクチン試験を受けた被験者のテトラマー解析結果と腫瘍抑制効果とを比較したところ、ワクチン投与前のテトラマー陽性 T 細胞が低い被験者に、比較的高い免疫効果と腫瘍抑制効果が認められることが判明した。

表2 SVN-2B 臨床試験の結果 (自主臨床研究)

がん種とプロトコール	副作用	評価 症例数	腫瘍抑制効果 (PR, SD割合)	テトラマー解析 特異的CTL増加%
大腸がん				
SVN-2Bのみ	無	15	27% (4/15)	13% (2/15)
SVN-2B + IFA	無	5	20% (1/5)	0% (0/5)
SVN-2B + IFA + IFN α	発熱	8	50% (4/8)	75% (6/8)
IFN α のみ	発熱	3	0% (0/3)	0% (0/3)
膵臓がん				
SVN-2B + IFA + IFN α	発熱	6	66% (4/6)	66% (4/6)
口腔がん				
SVN-2Bのみ	無	8	12% (1/8)	75% (6/8)
SVN-2B + IFA + IFN α	発熱	6	50% (3/6)	100% (6/6)
膀胱がん				
SVN-2B + IFA	発熱	9	22% (2/9)	56% (5/9)

腫瘍抑制効果はCT画像をRECISTに基づいて評価した。テトラマー解析は、ワクチン前と比較してワクチン後のテトラマー陽性CTL数が1.5倍以上増加した症例をCTL増加症例とした。IFA: 不完全フロイドアジュバンド。
IFN α : Interferon- α

また、ホルマリン固定組織標本のHLA class I発現を免疫染色によって検出できる単クローン抗体EMR8-5を樹立し³¹⁾、原発腫瘍組織の発現レベルと腫瘍抑制効果とを比較したところ、HLA class I陰性と判定された被験者は、癌種にかかわらず全例で腫瘍抑制効果が認められなかった¹⁴⁾。がんワクチン療法の効果予測マーカーとして、テトラマー解析法とHLA class I免疫組織染色法は極めて有用であると考えられた。

4. 今後の展望

臨床試験の先行しているがん抗原Survivinはがん幹細胞・非幹細胞共通抗原であり、一方でがん幹細胞特異抗原(CTS antigens)の1つOR7C1を標的とするワクチンの臨床試験を現在準備中である。ヒトの臨床試験においても動物モデル試験と同様の結果が認められるのかどうか、大変興味深い。CTLエピートープだけでなく、ヘルパーペプチドの有用性を検証する臨床試験も重要である。また、不完全フロイドアジュバンドやIFNよりも有効性の高い免疫補助剤を開発することも今後の重要な課題である。

第1世代がんワクチンの安全性と有効性を治験によって正確かつ客観的に実証することが求められているが、どのような抗原を標的として、何をモニタリングしながら、どのような投与方法・投与間隔で、どのような構造のペプチドを投与すれば良いのか、課題が多く残されている。臨床試験の結果を基礎研究にフィードバックしながら、次世代がんワクチンの開発を急ぎたい。

文 献

- 1) Nabeta, Y., et al.: Recognition by cellular and humoral autologous immunity in a human osteosarcoma cell line. *J Orthop Sci.* **8**: 554-559, 2003.
- 2) Tsukahara, T., et al.: Identification of human autologous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor. *Cancer Res.* **64**: 5442-5448, 2004.
- 3) Inoda, S., et al.: Cep55/c10orf3, a tumor antigen derived from a centrosome residing protein in breast carcinoma. *J Immunother.* **32**: 474-485, 2009.
- 4) Nakatsugawa, M., et al.: Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lengsin splicing variant 4. *Cancer Sci.* **100**: 1485-1493, 2009.
- 5) Yamamoto, T., et al.: Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 plays a role for in vivo tumor growth via intercellular communication. *Experimental cell research.* **17**: 2617-2626, 2013.
- 6) Honma, I., et al.: Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostate cancer. *J Transl Med.* **7**: 103, 2009.
- 7) Sato, E., et al.: Identification of an immunogenic CTL epitope of HIFPH3 for immunotherapy of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* **14**: 6916-6923, 2008.
- 8) Nakatsugawa, M., et al.: Identification of an HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from the lung carcinoma antigen, Lengsin. *Int J Oncol.* **39**: 1041-1049, 2011.
- 9) Sato, Y., et al.: Detection and induction of CTLs specific for SYT-SSX-derived peptides in HLA-A24(+) patients with synovial sarcoma. *J Immunol.* **169**: 1611-1618, 2002.
- 10) Ida, K., et al.: Crisscross CTL induction by SYT-SSX junction peptide and its HLA-A*2402 anchor substitute. *J Immunol.* **173**: 1436-1443, 2004.
- 11) Hirohashi, Y., et al.: An HLA-A24-restricted Cytotoxic T Lymphocyte Epitope of a Tumor-associated Protein, Survivin. *Clin Cancer Res.* **8**: 1731-1739, 2002.
- 12) Hariu, H., et al.: Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res.* **11**: 1000-1009, 2005.
- 13) Hirohashi, Y., et al.: The functioning antigens: beyond just as the immunological targets. *Cancer*

- Sci.* **100**: 798–806, 2009.
- 14) Sato, N., et al.: Molecular pathological approaches to human tumor immunology. *Pathol Int.* **59**: 205–217, 2009.
 - 15) Hirohashi, Y., et al.: Cytotoxic T lymphocytes: Sniping cancer stem cells. *Oncoimmunology.* **1**: 123–125, 2012.
 - 16) Hirohashi, Y., et al.: Immune response against tumor antigens expressed on human cancer stem-like cells/tumor-initiating cells. *Immunotherapy.* **2**: 201–211, 2010.
 - 17) van der Bruggen, P., et al.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, NY).* **254**: 1643–1647, 1991.
 - 18) Nishizawa, S., et al.: HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res.* **72**: 2844–2854, 2012.
 - 19) Yamada, R., et al.: Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue antigens.* **81**: 428–434, 2013.
 - 20) Saijo, H., et al.: Cytotoxic T lymphocytes: the future of cancer stem cell eradication? *Immunotherapy.* **5**: 549–551, 2013.
 - 21) Inoda, S., et al.: Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *The American journal of pathology.* **178**: 1805–1813, 2011.
 - 22) Mori, T., et al.: Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population. *Exp Mol Pathol.* **92**: 27–32, 2012.
 - 23) Nishizawa, S., et al.: Heat shock protein DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res.* 2012.
 - 24) Kano, M., et al.: Autologous CTL response against cancer stem-like cells/cancer-initiating cells of bone malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Sci.* **102**: 1443–1447, 2011.
 - 25) Morita, R., et al.: Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells. *Cancer Sci.* 2014 (in press).
 - 26) Tsuruma, T., et al.: Clinical and immunological evaluation of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine in phase I clinical study for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Transl Med.* **6**: 24, 2008.
 - 27) Honma, I., et al.: Phase I clinical study of anti-apoptosis protein survivin-derived peptide vaccination for patients with advanced or recurrent urothelial cancer. *Cancer Immunol Immunother.* **58**: 1801–1807, 2009.
 - 28) Miyazaki, A., et al.: Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer. *Cancer Sci.* **102**: 324–329, 2011.
 - 29) Kameshima, H., et al.: Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* **102**: 1181–1187, 2011.
 - 30) Kameshima, H., et al.: Immunotherapeutic benefit of alpha-interferon (IFN α) in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Sci.* **104**: 124–129, 2013.
 - 31) Torigoe, T., et al.: Establishment of a monoclonal anti-pan HLA class I antibody suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue: Unusually high frequency of down-regulation in breast cancer tissues. *Pathol Int.* **62**: 303–308, 2012.
 - 32) Sahara, H., et al.: A Gene Encoding Human Gastric Signet Ring Cell Carcinoma Antigen Recognized by HLA-A31-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes. *J Immunother.* **25**: 235–242, 2002.
 - 33) Tsukahara, T., et al.: Prognostic impact and immunogenicity of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor, in patients with osteosarcoma. *Cancer Sci.* **99**: 368–375, 2008.
 - 34) Tsukahara, T., et al.: HLA-A*0201-restricted CTL epitope of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor. *J Transl Med.* **7**: 44, 2009.
 - 35) Kobayashi, J., et al.: Comparative study on the immunogenicity between an HLA-A24-restricted cytotoxic T-cell epitope derived from survivin and that from its splice variant survivin-2B in oral cancer patients. *J Transl Med.* **7**: 1, 2009.
 - 36) Nakatsugawa M, et al.: SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumorigenicity. *Laboratory investigation.* **91**: 1796–1804, 2011.