

2 ゲムシタピンとの併用

- アンスラサイクリンとタキサン既治療例に対して、カペシタピン単剤投与とビノレルピン+ゲムシタピンの併用療法を比較した第Ⅲ相試験において、ビノレルピン+ゲムシタピンの病勢進行までの期間は5.4ヵ月、生存期間中央値は20.4ヵ月、奏効率は28.4%でいずれもカペシタピン単剤療法と同等であった⁶⁾。いずれのオプションも選択可であるものの、経口剤の単剤治療の簡便性からカペシタピンが勧められると報告された。アンスラサイクリン既治療例に対してビノレルピン+ゲムシタピン、ゲムシタピン+シスプラチン、ゲムシタピン+カペシタピンを比較した第Ⅱ相試験では奏効率はそれぞれ39.9%、47.7%、34.7%であった⁷⁾。Grade3/4の血液毒性はビノレルピン+ゲムシタピンの併用療法で高かった。

3 ベバシズマブとの併用

- HER2陽性乳癌に対して、トラスツズマブ+ビノレルピン+ベバシズマブの併用療法の第Ⅱ相試験（一次治療22例、二次治療7例）の報告では、治療開始から1年の時点で無増悪生存が一次治療で36%、二次治療で29%、無増悪期間中央値がそれぞれ9.9ヵ月と7.8ヵ月、奏効率が73%と71%であった。奏効率が高かったものの、Grade3/4の有害事象が予想よりも高く、試験は中止された⁸⁾。

■ ビノレルピン投与の実際

● 単剤投与

25mg/m² day 1, 8 i.v. 3週ごと投与

● トラスツズマブとの併用

ビノレルピン 25mg/m² day 1, 8 i.v. 3週ごと投与

トラスツズマブ 初回8mg/kg, 2回目以降6mg/m² 3週ごと投与 または
初回4mg/m², 2回目以降2mg/m² 毎週投与

■ ビノレルピンの有害作用とその対策

- ビノレルピンはASCOのガイドラインでも嘔気・嘔吐が少ないとされる薬剤であり、また脱毛が少ない薬剤である。dose limiting toxicityは骨髄抑制である。単剤投与におけるGrade3/4の有害事象の頻度を表4に示す。Grade1/2を合わせると、倦怠感約70%の患者に出現し、また神経毒性から便秘は注意すべき有害事象である。またビノレルピンはvesicant drugに分類され、少量の血管外漏出でも重篤な皮膚障害を起こし得るため、投与に際しては注意が必要である。以下に代表的な有害事象とその対策を記す (表4)。

表4 ビノレルピンのGrade 3/4 有害事象発現頻度

	有害事象	発現頻度
血液毒性	好中球減少症	44～74%
	発熱性好中球減少症	6～12%
	白血球減少症	46～75%
	貧血	5～14%
非血液毒性	脱毛	0～19%
	倦怠感・無力症	3～17%
	嘔気・嘔吐	0～13%
	便秘	2～14%

- ・ **好中球減少症**：好中球減少は3～4週後でも起こることがある。患者状態が良好で発熱がなければ特に処置は不要であるが、投与日における白血球や好中球の確認は毎回行うほうが望ましい。day1においても回復遅延がみられることはしばしばであるためである。
- ・ **倦怠感・無力症**：特に対処はないが、病状の進行による症状ではないかと患者が不安に陥らないよう説明は必要であろう。病状が許せば減量や休薬も選択肢になると思われる。
- ・ **便秘**：ビンORELBINは便秘の起こる薬剤であるから、当初より緩下剤などの処方 considering。
- ・ **血管外漏出**：ビンORELBIN投与に際しては、血管外漏出に十分注意して、よい静脈路を確保することが重要である。化学療法歴が長期にわたる場合は、よい静脈路の確保も困難である場合がしばしばあるため、必要であればCVポート留置も考慮すべきである。血管外漏出が疑われたときは、vesicant drugの血管外漏出の一般的な処置と同様、直ちにビンORELBINの投与を中止し、漏出が疑われる範囲よりも広範囲に生食・ステロイドの注入を行う。また、ビンORELBINが漏出したときは局所を温めた方がよい。

■ まとめ

- ビンORELBINは比較的有害事象が軽度で奏効率の高い薬剤である。
- 特にトラスツズマブとの併用療法で高い奏効率を示し、HER2陽性進行再発乳癌に対して、トラスツズマブ+タキサンと同程度の有効性を示すデータがある。
- ビンORELBINは単剤あるいは併用（特にカペシタビンとの併用やトラスツズマブとの併用）で有効な薬剤である。
- 主な有害事象は骨髄毒性、倦怠感・無力症、便秘などである。
- vesicant drugであるため、血管外漏出には注意が必要である。

(菰池佳史)

■ 参考文献

- 1) Burstein H, et al : Trastuzumab and Vinorelbine as First-Line Therapy for HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer: Multicenter Phase II Trial With Clinical Outcomes, Analysis of Serum Tumor Markers as Predictive Factors, and Cardiac Surveillance Algorithm. *J Clin Oncol*, 21: 2889-2895, 2003.
- 2) Burstein H, et al : Trastuzumab Plus Vinorelbine or Taxane Chemotherapy for HER2-overexpressing Metastatic Breast Cancer: The Trastuzumab and Vinorelbine or Taxane Study. *Cancer*, 110: 965-972, 2007.
- 3) Andersson M, et al : Phase III Randomized Study Comparing Docetaxel Plus Trastuzumab With Vinorelbine Plus Trastuzumab As First-Line Therapy of Metastatic or Locally Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: The HERNATA Study. *J Clin Oncol*, 29: 264-271, 2010.
- 4) Zhang J, et al : Vinorelbine and capecitabine in anthracycline- and/or taxanepretreated metastatic breast cancer: sequential or combinational?. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71: 103-113, 2013.
- 5) Tan WW, et al : Phase II Interventional Study (N0337) of Capecitabine in Combination With Vinorelbine and Trastuzumab for First- or Second-Line Treatment of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: A North Central Cancer Treatment Group Trial. *Clin Breast Cancer*, 12, 81-86, 2012.
- 6) Pallis AG, et al : A multicenter randomized phase III trial of vinorelbine/gemcitabine doublet versus capecitabine monotherapy in anthracycline- and taxane-pretreated women with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*, 23 (5): 1164-1169, 2012
- 7) Stemmler HJ, et al : Randomised phase II trial of gemcitabine plus vinorelbine vs gemcitabine plus cisplatin vs gemcitabine plus capecitabine in patients with pretreated metastatic breast cancer. *Br J Cancer*, 29; 104 (7): 1071-1078, 2011
- 8) Lin NU, et al : A phase II study of bevacizumab in combination with vinorelbine and trastuzumab in HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 139 (2): 403-410, 2013

術後内分泌療法— 7

効果予測因子

- 術後内分泌療法は、エストロゲン受容体 (estrogen receptor ; ER) 陽性早期乳癌の術後薬物療法の第1選択として行われる。
- 内分泌療法はERを標的とする治療であり、乳癌組織におけるERの発現が内分泌療法の効果予測因子であり大前提である。
- 一方、各内分泌療法剤 (タモキシフェンやアロマターゼ阻害薬など) の効果は、ERの発現のような癌細胞の生物学的特性だけではなく、宿主要因も関与する。
- 術後内分泌療法の効果予測因子としては、内分泌療法の効果予測因子と各内分泌療法剤特有の効果予測因子が存在する。
- 術後内分泌療法の効果の指標は「予後」となるため、これまで報告されている効果予測因子のほとんどはER陽性乳癌の予後予測因子となっている。
- 本項では、ER陽性乳癌の予後予測因子、内分泌療法の効果予測因子について因子ごとに概説し、各内分泌療法剤特有の効果予測因子についての現在の知見も述べる。
- 表1に、ER陽性HER2陰性乳癌の術後薬物療法に際して考慮する因子 (2009年 St.Gallen¹⁾) を示した。

表1 ER陽性HER2陰性乳癌の術後薬物療法に際して考慮する因子

	内分泌療法感受性		
	化学・内分泌療法の 相対的適応	決定に役立たない因子	内分泌療法単独の 相対的適応
ER・PgR陽性細胞率	低い	—	高い
増殖能 (Ki67 labeling index)	高い	中間	低い
Grade	3	2	1
多遺伝子発現解析	高リスク	中リスク	低リスク
腫瘍浸潤径 (pT)	>5cm	2.1 ~ 5cm	≤2cm
腋窩リンパ節転移	≥4個	1 ~ 3個	なし
脈管浸潤 (PVI)	広範なPVIがある	—	広範なPVIがない
患者の嗜好	すべての可能な治療	—	副作用は避けたい

スペクトラムは連続的。かつ、環境 (治療や宿主の要因など) によって変化する可能性がある。腫瘍浸潤径、腋窩リンパ節転移個数、脈管浸潤はER陽性HER2陰性乳癌の再発リスク因子。

(文献1)より改変)

■ 生物学的因子

1 ホルモン受容体：ER，プロゲステロン受容体（progesterone receptor；PgR）

- 乳癌組織におけるホルモン受容体（ER，PgR）の発現は，IHC法により評価する。
- 2010年のASCO/CAP（米国臨床腫瘍学会/米国病理医会）のガイドラインでは，癌細胞の核に少なくとも1%の染色陽性細胞がある場合ER/PgR陽性と判定することが推奨されている²⁾。また，ER陰性乳癌への内分泌療法の有効性は認めないことが明記されている。
- ER/PgRの発現量（陽性細胞率）は症例によりさまざまな分布を示し，0%から100%まで連続的に存在する。
- ER陽性乳癌術後のタモキシフェンの予後改善効果を示すEBCTCGのメタアナリシスによると，ER陽性乳癌においてタモキシフェン5年投与はER，PgRの発現量にかかわらず再発抑制効果を示した³⁾。
- さらに，タモキシフェンの5年投与により，コントロール（内服なし）に比べて再発率が4割，死亡率が3割低下した³⁾。
- エストロゲン受容体（ER）
 - ・ Allredらは術後内分泌療法を行った症例の予後を解析し，ERの発現量が高いほど予後良好であり，Allred Score 3以上（陽性細胞率1%以上）で術後内分泌療法の予後改善効果があることを報告した⁴⁾。
 - ・ 閉経後の術後内分泌療法の臨床試験（ATAC試験とBIG1-98試験）において，アロマターゼ阻害薬群，タモキシフェン群ともにERの陽性細胞率が高いほど予後良好であり⁵⁾，ERの陽性細胞率1%をカットオフとした場合，陽性例で有意に予後良好で，内分泌療法の効果が期待できる⁶⁾と報告された。
 - ・ 現在，乳癌組織のERの発現量は術後内分泌療法の奏効性や予後に関与すると考えられている。
- プロゲステロン受容体（PgR）
 - ・ 閉経後の術後内分泌療法の臨床試験（ATAC試験とBIG1-98試験）において，アロマターゼ阻害薬群，タモキシフェン群ともにPgRの陽性細胞率が高いほど予後良好であり⁵⁾，陽性細胞率1%をカットオフとした場合，陽性例で有意に予後良好であった⁶⁾。また，PgR発現量にかかわらずレトロゾール群がタモキシフェン群より予後良好であった⁶⁾。
 - ・ 現在，乳癌組織のPgRの発現量は，閉経後ER陽性乳癌の予後因子と考えられている。

2 human epidermal growth factor receptor 2（HER2）

- 閉経後の術後内分泌療法の臨床試験（ATAC試験とBIG1-98試験）において，アロマターゼ阻害薬群，タモキシフェン群ともにHER2陰性例が予後良好であり，HER2発現にかかわらずアロマターゼ阻害薬群が予後良好であった^{5,7)}。

3 Ki67

- Ki67はG0期以外のすべての細胞周期において核内に発現しているタンパクで、増殖の指標である。
- 通常、IHC法にて陽性細胞率（labeling index）を評価する。
- Ki67 labeling indexは、グレード（組織学的グレードまたは核グレード）の、特に核分裂像（mitotic counts）と相関する。
- 閉経後の術後内分泌療法の臨床試験（BIG1-98試験）において、Ki67低発現群はKi67高発現群に比べて有意に予後良好であり、Ki67高発現群においてはレトロゾール群がタモキシフェン群に比べて有意に予後良好であった⁸⁾。
- 閉経後の術後内分泌療法の臨床試験（ATAC試験）において、IHC4 Score（ER, PgR, HER2, Ki67）はER陽性乳癌の予後予測因子であった⁹⁾。
- 2007年、2008年のメタアナリシスではKi67は乳癌の予後因子であることが示されている^{10,11)}。
- リンパ節転移陽性乳癌の術後化学療法の臨床試験（BCIRG 001試験とPACS 01試験）の後ろ向き研究において、ER陽性乳癌のうちKi67高発現群は、アンストラサイクリン系薬剤にタキサン系薬剤を追加することにより、アンストラサイクリン系薬剤のみの群より予後が改善した^{12,13)}。
- 現在、乳癌組織のKi67高発現は、ER陽性乳癌における早期（5年以内）再発の予後予測因子であり、ER陽性Ki67高発現乳癌においては化学療法（タキサン系薬）を追加することにより予後改善が期待できる指標と考えられている。
- Ki67の評価方法、カットオフなどについては現在、いまだ標準化されていない。

4 多遺伝子アッセイ

- IMPAKT Working Groupからの報告では、現在開発されている6つの多遺伝子アッセイ（Oncotype Dx[®], MammaPrint[®], Genomic Grade Index, PAM50, Breast Cancer Index, EndoPredict）を用いた場合に予後が改善するかは、現時点では不明確であると結論している¹⁴⁾。
- **Oncotype Dx[®] (RS)**
 ・乳癌組織（パラフィンブロック）を用いて21遺伝子のmRNA発現を評価し、再発スコア（21-gene recurrence score;RS）を算出する¹⁵⁾。ER陽性乳癌を対象としたレトロスペクティブ研究で高リスクと判定された場合は、タモキシフェンに化学療法（CMF療法）を追加することにより予後の改善が得られた：

- ・これまでのレトロスペクティブ研究により、現在、対象はER陽性・Stage I/IIかつリンパ節転移陰性症例と、閉経後ER陽性・Stage II/IIIかつリンパ節転移陽性 (N1) 症例となっている¹⁶⁾。
- ・術後内分泌療法の臨床試験 (ATAC試験) において、RSはER陽性乳癌の予後予測因子であった¹⁷⁾。
- ・ER陽性リンパ節転移陰性乳癌で内分泌療法単独の術後薬物療法施行症例 (NSABP B-14試験とATAC試験) において、RSに臨床病理学的因子 (年齢, 腫瘍径, Grade) を加えることにより、RS単独よりも中間リスク群に分類される症例を減らすことができた¹⁸⁾。
- ・ER陽性乳癌におけるOncotype DX[®]を用いた前向き試験として、リンパ節転移陰性症例を対象としたTAILORx試験, リンパ節転移陽性 (1 ~ 3個) 症例を対象としたRxPONDER (SWOG S1007) 試験が進行中である。

● MammaPrint[®] (70-gene signature)

- ・凍結乳癌組織を用いて70遺伝子のmRNA発現を評価する。ER, HER2状況は問わず、再発の有無をもとに25,000遺伝子のなかから抽出された70遺伝子による予後予測ツールである¹⁹⁾。
- ・これまでの後ろ向き研究により、現在、対象はStage I/II, リンパ節転移陰性あるいは陽性 (1 ~ 3個) となっている¹⁶⁾。
- ・最近の観察研究 (RASTER 研究) では427人のリンパ節転移陰性症例が登録され、Adjuvant! OnlineにMammaPrint[®]を加えることで5年遠隔無再発リスク評価が改善したことが報告された²⁰⁾。
- ・現在、MammaPrint[®]を用いたランダム化比較試験であるMicroarray In Node-negative Disease may Avoid Chemotherapy Trial (MINDACT) が、リンパ節転移陰性の早期乳癌症例 6,000例を対象に進行中である。

■ 宿主要因

■ タモキシフェンの効果とCYP2D6遺伝子多型

- CYP2D6 (チトクロムP450) はタモキシフェンを活性体のエンドキシフェンに変換する酵素である。
- CYP2D6阻害薬のパロキセチン (抗うつ薬) をタモキシフェンと併用すると、血漿中のエンドキシフェン濃度が低くなりタモキシフェンの効果が期待できない可能性がある。
- CYP2D6 *4のホモタイプ (*4/*4) は血漿中のエンドキシフェン濃度が低いことが報告され、このタイプの患者 (欧米人の5 ~ 10%) はタモキシフェンの効果が期待できない可能性がある。
- 術後タモキシフェン5年投与を行った欧米の臨床試験の患者において、CYP2D6 *4のホモタイプは予後不良であった²¹⁾。
- 閉経後の術後内分泌療法の臨床試験 (ATAC試験とBIG1-98試験) における最近の報告では、いずれの臨床試験においてもタモキシフェン群においてCYP2D6遺伝子多型と予後に相関はみられなかった^{22, 23)}。

- アジア人のCYP2D6*4ホモタイプは1%未満と報告されているが,*10のホモタイプ(CYP2D6の活性がやや低下する)は15~20%に存在する。
- 日本人におけるCYP2D6遺伝子多型の検討では、術後タモキシフェン投与例においてCYP2D6*10遺伝子多型による予後の差はないと報告されている^{24,25)}。

2 内分泌療法関連副作用と予後

- 閉経後の術後内分泌療法の臨床試験(ATAC試験とTEAM試験)において、内分泌療法関連副作用(関節症状、ホットフラッシュ、寝汗など)の出現と再発率をみたところ、いずれの臨床試験においても症状があった群はなかった群に比べて再発率が低かった^{26,27)}。
- アロマターゼ阻害薬に伴う筋骨格系の副作用(関節痛、筋肉痛など)に関連する遺伝子多型を同定する研究が行われ、一塩基多型(SNPs; rs11849538)が同定された²⁸⁾。
- 同定したSNPs(rs11849538)はTCL1A遺伝子のプロモーター領域に存在し、ERの結合部位を生じる。アロマターゼ阻害薬による筋骨格系の副作用が強い女性には、パリアントタイプをもつ人が多かった²⁸⁾。

3 body mass index (BMI) と予後

- 閉経後の欧米人女性において、血清エストロゲン濃度はBMIと正相関する。
- 閉経後の術後内分泌療法の臨床試験(ATAC試験)において、肥満(BMI>35)女性はBMI<23の女性に比べて再発率が高かった。また、BMI>30の女性ではタモキシフェン群とアナストロゾール群で再発率に差を認めなかった²⁹⁾。
- 閉経前の術後内分泌療法の臨床試験(ABCSCG-12試験;ゴセレリン/タモキシフェン±ゾレドロン酸 vs.ゴセレリン/アナストロゾール±ゾレドロン酸)において、BMI≥25以上の人はアナストロゾール群がタモキシフェン群より予後不良であった³⁰⁾。

まとめ

- ER陽性乳癌の予後はこの30年間で明らかに改善した³¹⁾。これは再発予防目的として行う術後内分泌療法を中心とした薬物療法の進歩によると考えられている。
- しかしながら、特に腋窩リンパ節転移陽性症例は術後5年以降の再発リスクも高く、いかにこのような晩期再発症例の予後を改善するかが課題の1つである。
- そのために、より長期の内分泌療法や適切な内分泌療法薬の選択のほか、現在行っている内分泌療法や化学療法とは作用機序の異なる新たな薬物療法の開発が進められている。

(山下啓子)

■ 参考文献

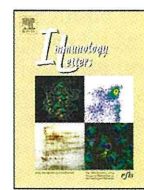
- 1) Goldhirsch A, et al : Thresholds for therapies : highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*, 20 (8): 1319-1329, 2009.
- 2) Hammond ME, et al : American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28 (16): 2784-2795, 2010.
- 3) Davies C, et al : Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 378 (9793): 771-784, 2011.
- 4) Harvey JM, et al : Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 17 (5): 1474-1481, 1999.
- 5) Dowsett M, et al : Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *J Clin Oncol*, 26 (9): 1059-1065, 2008.
- 6) Viale G, et al : Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol*, 25 (25): 3846-3852, 2007.
- 7) Rasmussen BB, et al : Adjuvant letrozole versus tamoxifen according to centrally-assessed ERBB2 status for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: supplementary results from the BIG 1-98 randomised trial. *Lancet Oncol*, 9 (1): 23-28, 2008.
- 8) Viale G, et al : Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*, 26 (34): 5569-5575, 2008.
- 9) Cuzick J, et al : Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol*, 29 (32): 4273-4278, 2011.
- 10) de Azambuja E, et al : Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*, 96 (10): 1504-1513, 2007.
- 11) Stuart-Harris R, et al : Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*, 17 (4): 323-334, 2008.
- 12) Hugh J, et al : Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol*, 27 (8): 1168-1176, 2009.
- 13) Penault-Llorca F, et al : Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 27 (17): 2809-2815, 2009.
- 14) Azim HA, Jr., et al : Utility of prognostic genomic tests in breast cancer practice: The IMPAKT 2012 Working Group Consensus Statement. *Ann Oncol*, 24 (3): 647-654, 2013.
- 15) Paik S, et al : A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 351 (27): 2817-2826, 2004.
- 16) 日本乳癌学会編 : 科学的根拠に基づく 乳癌診療ガイドライン ①治療編 2011年版. 金原出版, 東京, 2011.
- 17) Dowsett M, et al : Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol*, 28 (11): 1829-1834, 2010.
- 18) Tang G, et al : Risk of recurrence and chemotherapy benefit for patients with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: recurrence score alone and integrated with pathologic and clinical factors. *J Clin Oncol*, 29 (33): 4365-4372, 2011.
- 19) van de Vijver MJ, et al : A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 347 (25): 1999-2009, 2002.
- 20) Drukker CA, et al : A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study. *Int J Cancer*, 2013.
- 21) Goetz MP, et al : Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol*, 23 (36): 9312-9318, 2005.
- 22) Regan MM, et al : CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst*, 104 (6): 441-451, 2012.
- 23) Rae JM, et al : CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 104 (6): 452-460, 2012.
- 24) Okishiro M, et al : Genetic polymorphisms of CYP2D6 10 and CYP2C19 2, 3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer*, 115 (5): 952-961, 2009.
- 25) Toyama T, et al : No association between CYP2D6*10 genotype and survival of node-negative Japanese breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen treatment. *Jpn J Clin Oncol*, 39 (10): 651-656, 2009.
- 26) Cuzick J, et al : Treatment-emergent endocrine symptoms and the risk of breast cancer recurrence: a retrospective analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*, 9 (12): 1143-1148, 2008.
- 27) Fontein DB, et al : Specific Adverse Events Predict Survival Benefit in Patients Treated With Tamoxifen or Aromatase Inhibitors: An International Tamoxifen Exemestane Adjuvant Multinational Trial Analysis. *J Clin Oncol*, 2013.
- 28) Ingle JN, et al : Genome-wide associations and functional genomic studies of musculoskeletal adverse events in women receiving aromatase inhibitors. *J Clin Oncol*, 28 (31): 4674-4682, 2010.
- 29) Sestak I, et al : Aromatase inhibitor-induced carpal tunnel syndrome: results from the ATAC trial. *J Clin Oncol*, 27 (30): 4961-4965, 2009.
- 30) Pfeiler G, et al : Impact of body mass index on the efficacy of endocrine therapy in premenopausal patients with breast cancer: an analysis of the prospective ABCSG-12 trial. *J Clin Oncol*, 29 (19): 2653-2659, 2011.
- 31) Yamashita H, et al : Estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women: trends in incidence, characteristics, and prognosis. *Ann Oncol*, 22 (6): 1318-1325, 2011.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immlt

Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine

Junya Ohtake^{a,1}, Takayuki Ohkuri^{a,1}, Yuji Togashi^b, Hidemitsu Kitamura^a, Kiyotaka Okuno^c, Takashi Nishimura^{a,d,*}

^a Division of Immunoregulation, Section of Disease Control, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

^b Bioimmulance Co. Ltd., Sapporo, Japan

^c Department of Surgery, Kinki University, Faculty of Medicine, Osaka-Sayama, Japan

^d Division of ROYCE' Health Bioscience, Section of Disease Control, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2013

Received in revised form 31 March 2014

Accepted 16 April 2014

Available online 30 April 2014

Keywords:

Survivin

H/K-HELP

Cancer vaccine

Th1 and Tc1

ABSTRACT

We identified novel helper epitope peptides of Survivin cancer antigen, which are presented to both HLA-DRB1*01:01 and DQB1*06:01. The helper epitope also contained three distinct Survivin-killer epitopes presented to HLA-A*02:01 and A*24:02. This 19 amino-acids epitope peptide (SU18) induced weak responses of Survivin-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells though it contained both helper and killer epitopes. To enhance the vaccine efficacy, we synthesized a long peptide by conjugating SU18 peptide and another DR53-restricted helper epitope peptide (SU22; 12 amino-acids) using glycine-linker. We designated this artificial 40 amino-acids long peptide containing two helper and three killer epitopes as Survivin-helper/killer-hybrid epitope long peptide (Survivin-H/K-HELP). Survivin-H/K-HELP allowed superior activation of IFN- γ -producing CD4⁺ Th1 cells and CD8⁺ Tc1 cells compared with the mixture of its component peptides (SU18 and SU22) in the presence of OK-432-treated monocyte-derived DC (Mo-DC). Survivin-H/K-HELP-pulsed Mo-DC pretreated with OK-432 also exhibited sustained antigen-presentation capability of stimulating Survivin-specific Th1 cells compared with Mo-DC pulsed with a mixture of SU18 and SU22 short peptides. Moreover, we demonstrated that Survivin-H/K-HELP induced a complete response in a breast cancer patient with the induction of cellular and humoral immune responses. Thus, we believe that an artificially synthesized Survivin-H/K-HELP will become an innovative cancer vaccine.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Survivin is aberrantly expressed in almost all cancers but poorly in differentiated adult tissues except testis, thymus, and placenta [1]. Moreover, Survivin-derived peptide is able to induce cytotoxic

T lymphocytes (CTL) [2]. Therefore, Survivin has been considered as one of the attractive target molecules in cancer vaccine therapy.

It is now accepted that CD4⁺ Th cells, especially Th1 cells play a pivotal role in antitumor immunity to induce a complete cure of tumor-bearing hosts [3–7]. However, cancer vaccine therapy using class I-binding killer epitope peptide of tumor antigen has only focused on the activation of CTL but largely ignored Th1 cells, which are essential for fully activation of CTL and memory CTL generation [3–11]. Thus, the immunological and clinical responses have been rather meager in cancer vaccine therapy using class I-binding short peptide though the therapy could induce slight increase of cancer-specific CTL and long stable diseases [8–10]. To overcome these issues, we considered that it might be a rational strategy to apply class II-binding helper peptide to cancer vaccine therapy.

Several investigators have tried to identify helper epitope peptides and applied to clinical trials. However, there have been

Abbreviations: CTL, cytotoxic T lymphocytes; EBV-B, Epstein-Barr virus-transformed B; H/K-HELP, helper/killer-hybrid epitope long peptide; HPV, human papilloma virus; MMC, mitomycin C; Mo-DC, monocyte-derived dendritic cells; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; SLP, synthetic long peptide; Tc, cytotoxic T; Th, helper T; Treg, regulatory T.

* Corresponding author at: Division of Immunoregulation, Section of Disease Control, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-0815, Japan. Tel.: +81 11 706 7546; fax: +81 11 706 7546.

E-mail address: tak24@igm.hokudai.ac.jp (T. Nishimura).

¹ These two authors are equally contributed to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.iml.2014.04.010>

0165-2478/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

no positive data that short helper peptide or short helper/killer hybrid epitope induced a significant antitumor immunity in cancer patients [12,13]. Recently, however, it was demonstrated that synthetic long peptides (SLP) containing helper and killer epitopes derived from naturally occurring sequence of human papilloma virus (HPV)-16 oncoproteins were superior to short peptides to induce HPV-specific Th1 and CTL responses in both animal and human systems [11]. The mixtures of SLP in cancer antigen have been also demonstrated to be beneficial for inducing anticancer immune responses in cancer patients [14]. In previous paper [15], we also developed an artificial 40 amino-acids long peptide vaccine of MAGE-A4 cancer antigen, which was designated as MAGE-A4-helper/killer-hybrid epitope long peptide (MAGE-A4-H/K-HELP). In that paper [15], we first demonstrated that cancer vaccine therapy of a colon cancer patient with artificially synthesized MAGE-A4-H/K-HELP containing both helper and killer epitopes caused the induction of superior Th1-dependent cellular and humoral immune responses in the cancer patient and inhibited the growth of colon cancer. Surprisingly, a single injection of MAGE-A4-H/K-HELP rapidly induced efficient antitumor immune responses in cancer patient likely as the case when patients were vaccinated with the mixtures (over 10 peptides) of SLP cancer vaccine.

In this paper, we identified novel helper epitope of Survivin cancer antigen and again planned to synthesize 40 amino-acids Survivin-H/K-HELP widely applicable to the therapy of cancer patients. The superior effect of Survivin-H/K-HELP on dendritic cells (DC)-dependent T cell activation *in vitro* was documented with the results of a case study in clinical trial of Survivin-H/K-HELP cancer vaccine therapy. These results indicated that artificially synthesized long peptide, Survivin-H/K-HELP would become a promising cancer vaccine peptide.

2. Material and methods

2.1. Peptides and cytokines

The synthesis of overlapping peptides covering whole amino acid sequence of Survivin-2B (SU1-SU27) and Survivin-H/K-HELP (purity > 95%) was ordered to Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan). For screening, the peptides except two supplementary SU17 and SU19 peptides were subdivided into MIX1–MIX5 5 peptide pools (MIX1; SU1–SU5, MIX2; SU6–SU10, MIX3; SU11–SU15, MIX4; SU16–SU22, and MIX5; SU23–SU27) as illustrated in Supplementary Table S1. Recombinant IL-2 was kindly donated by Shionogi Pharmaceutical Institute Co. Ltd., Osaka, Japan. Recombinant IFN- γ , IL-4, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) were purchased from PeproTech Inc. (New Jersey, USA).

2.2. Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared from healthy volunteers after obtaining written informed consent approved by the medical ethics committees of Hokkaido University Graduate School of Medicine and Institute for Genetic Medicine. Epstein–Barr virus-transformed B cells (EBV-B), generated from PBMC by culturing with culture supernatants from EBV-producing cells, were maintained in RPMI 1640 medium (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) containing 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and antibiotics. Mo-DC from PBMC of healthy volunteers were cultured in AIM-V medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) without serum. T cells were cultured in AIM-V containing 5% heat-inactivated pooled human AB serum (kindly donated from Hokkaido Red Cross blood center).

2.3. Preparation of Mo-DC from PBMC as antigen presenting cells

PBMC isolated from healthy volunteers by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) gradient centrifugation were cultured in AIM-V without serum. After removing non-adherent cells, the remaining adherent monocytes were cultured in the presence of GM-CSF (50 ng/ml) and IL-4 (50 ng/ml) for 7 days. The induced CD11c-positive Mo-DC were used as antigen-presenting cells (APC) in this study.

2.4. Identification of helper epitopes using mixture of peptides derived from Survivin-2B

Non-adherent cells prepared from PBMC were suspended in the staining buffer according to the manufacture's protocol. Then, anti-CD4 microbeads (130-049-201; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were added to the cell suspension and incubated for 15 min on ice. The cells were diluted in 10 ml PBS and washed by centrifugation at 1500 rpm for 5 min. The pelleted cells resuspended in 500 μ l buffer were magnetically separated into CD4-positive or negative cells with MACS LS column (130-091-596; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) by fitting on the magnet. The purity of isolated CD4⁺ T cells was over 90% determined by flow cytometry. Survivin 2B antigen-derived synthetic peptides (SU1-SU27; Supplementary Table S1), were dissolved in DMSO. The sequential peptides (SU1–SU5, SU6–SU10, SU11–SU15, SU16–SU22, and SU23–SU27) were mixed and used as peptide mixture (MIX1, MIX2, MIX3, MIX4, and MIX5) at 10 μ g/ml, respectively. The purified CD4⁺ T cells (2×10^6 cells) were cultured with mitomycin C (MMC)-treated PBMC (2×10^6 cells) in the presence of MIX1, MIX2, MIX3, MIX4 or MIX5 (10 μ g/ml) for 7 days. The cultured CD4⁺ T cells were restimulated with autologous Mo-DC in the presence of the cognate peptide MIX and IL-2 (10 IU/ml). After 7 days-culture, CD4⁺ T cells were restimulated with the cognate peptide mixture to evaluate their cytokine production by ELISA. Survivin-specific Th cells were then used for further experiments to identify Survivin-2B epitope and HLA-restriction.

2.5. Induction of Survivin-specific Th1 cells and Tc1 cells from PBMC

PBMC (2×10^6 cells) were primarily stimulated with Survivin-H/K-HELP or the mixture of Survivin short peptides (SU18 plus SU22) (5 μ M) in 24-well polystyrene microplate (Corning Inc., NY, USA). After 7 days-culture, the cultured T cells were restimulated with MMC-treated autologous Mo-DC (1×10^5 cells) pretreated with Th1 adjuvants, OK-432 (0.1 KE/ml) or IFN- γ (20 ng/ml) in the presence of the induction peptide and IL-2 (10 IU/ml) for 7 days. The frequency of Th1 and Th2 cell induction was determined by measuring IFN- γ and IL-5 (or IL-4) production of the expanded T cells by intracellular staining after stimulation with Mo-DC (1×10^5 cells) pulsed with the cognate peptide.

2.6. Antigen presentation capability of Mo-DC pulsed with Survivin-H/K-HELP or mixture of SU18 and SU22 short peptides

Mo-DC, which were harvested from PBMC and activated with OK-432 (0.1 KE/ml), were pulsed with Survivin-H/K-HELP or the mixture of SU18 and SU22 short peptides (5 μ M) for 2 h at 37 °C. After washing with PBS twice, peptide-pulsed Mo-DC (1×10^4 cells) were cultured alone for various times (0, 24, 48, 72, 96 h) at 37 °C. The peptide-pulsed Mo-DC (1×10^4 cells) were harvested from the culture various time (0, 24, 48, 72, 96 h) after incubation and determined their antigen-presenting ability. Peptide-pulsed Mo-DC were cocultured for 24 h with Survivin-specific Th cells