

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告  
（免疫学的解析法の確立と適応拡大の検討）

免疫学的解析法の確立と適応拡大の検討に関する研究

業務担当責任者 中面哲也  
国立がん研究センター  
早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野長

### 研究要旨

HSP105 由来ペプチドワクチン療法の医師主導治験を実施するにあたり、IFN ELISPOT アッセイ、がん組織の免疫組織化学的解析及び、MHC ペプチド複合体マルチマーを用いた FACS 解析について、治験開始までに確立する必要がある。IFN ELISPOT アッセイについては既に確立しているが、MHC ペプチド複合体マルチマーを用いた FACS 解析については、ワクチンを投与した患者の末梢血単核球がないと解析できないため、治験開始までに確立を目指す方針とした。

がん組織の免疫組織化学的解析を用いて、最も簡便にがん細胞における HSP105 蛋白発現を評価できる方法を確立すること、並びに、今後の適応症例の拡大を目指して、種々の難治性腫瘍における HSP105 蛋白発現について評価することを目的とした。

大腸がん症例に対し、2種類の抗体、HSP105 mono (Rabbit monoclonal antibody, clone EPR4576, EPITMICS) と HSP105 poly (Rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology) を用いて、免疫組織化学染色の条件設定を施行した結果、2種類の抗体共にがん細胞に特異的に染色されることを確認し、以後は monoclonal 抗体 (HSP105 mono) を用いることとした。また、適応症例の拡大を目指し、神経膠芽腫7例、髄芽腫27例、肺原発腺がん38例、神経芽腫5例、横紋筋肉腫10例、Ewing肉腫5例、滑膜肉腫5例、悪性ラブドイド腫瘍3例、類上皮肉腫6例、粘液型脂肪肉腫5例、線維肉腫4例、脊索腫5例、弧発性線維性腫瘍4例に対して、HSP105の免疫組織化学染色を施行した結果、神経膠芽腫7例中7例（100%）、髄芽腫27例中8例（30%）、肺原発腺がん38例中37例（97%）、神経芽腫5例中3例（60%）、横紋筋肉腫10例中1例（10%）、Ewing肉腫5例中2例（40%）、滑膜肉腫5例中2例（40%）、悪性ラブドイド腫瘍3例中2例（67%）、類上皮肉腫6例中5例（83%）、粘液型脂肪肉腫5例中2例（40%）、線維肉腫4例中0例（0%）、脊索腫5例5例（100%）、弧発性線維性腫瘍4例4例（100%）で腫瘍細胞にHSP105蛋白発現を認めた。幅広いがん腫がHSP105由来ペプチドワクチン療法の対象となる可能性が示唆された。

### 担当責任者

中面 哲也 国立がん研究センター  
早期・探索臨床研究センター  
免疫療法開発分野  
孝橋 賢一 九州大学大学院医学研究院  
形態機能病理学  
北野 滋久 国立がん研究センター  
早期・探索臨床研究センター  
和田 聡 神奈川県立がんセンター臨床研究所  
がん免疫療法研究開発部

### A. 研究目的

HSP105 由来ペプチドワクチン療法の医師主導治験を実施するにあたり、IFN ELISPOT アッセイ、がん組織の免疫組織化学的解析及び、MHC ペプチド複合体マルチマーを用いた FACS 解析について、

治験開始までに確立することを目指している。がん組織の免疫組織化学的解析において、最も簡便にがん細胞における HSP105 蛋白発現を評価できる方法を確立する。また、今後の適応症例の拡大を目指し、種々の難治性腫瘍における HSP105 蛋白発現について評価する。

### B. 研究方法（倫理面への配慮）

#### 1. 免疫学的解析法の確立

IFN ELISPOT アッセイ、がん組織の免疫組織化学的解析及び、MHC ペプチド複合体マルチマーを用いた FACS 解析について、治験開始までに確立を目指す。

免疫組織化学的解析について、まず大腸がん症例に対し、2種類の抗体、HSP105 mono (Rabbit monoclonal antibody, clone EPR4576, EPITMICS) と HSP105 poly (Rabbit

polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology)を用いて、免疫組織化学染色の条件設定を施行した。

## 2. 適応拡大の検討

適応症例の拡大を目指し、神経膠芽腫 7 例、髄芽腫 27 例、肺原発腺がん 38 例、神経芽腫 5 例、横紋筋肉腫 10 例、Ewing 肉腫 5 例、滑膜肉腫 5 例、悪性ラブドイド腫瘍 3 例、類上皮肉腫 6 例、粘液型脂肪肉腫 5 例、線維肉腫 4 例、脊索腫 5 例、弧発性線維性腫瘍 4 例に対して、HSP105 の免疫組織化学染色を施行した。

## C . 研究結果

IFN ELISPOT アッセイについては既に確立しているが、MHC ペプチド複合体マルチマーを用いた FACS 解析については、ワクチンを投与した患者の末梢血単核球がないと解析できないため、治験開始までに確立を目指す方針とした。

がん組織の免疫組織化学的解析について、2 種類の抗体共に大腸がん症例ではがん細胞に特異的に染色されることを確認した。monoclonal 抗体、polyclonal 抗体共に優劣付け難い結果となったが、以後は monoclonal 抗体 (HSP105 mono) を用いることとした。

また、種々のがん腫で発現を検討したところ、神経膠芽腫 7 例中 7 例 (100%)、髄芽腫 27 例中 8 例 (30%)、肺原発腺がん 38 例中 37 例 (97%)、神経芽腫 5 例中 3 例 (60%)、横紋筋肉腫 10 例中 1 例 (10%)、Ewing 肉腫 5 例中 2 例 (40%)、滑膜肉腫 5 例中 2 例 (40%)、悪性ラブドイド腫瘍 3 例中 2 例 (67%)、類上皮肉腫 6 例中 5 例 (83%)、粘液型脂肪肉腫 5 例中 2 例 (40%)、線維肉腫 4 例中 0 例 (0%)、脊索腫 5 例 5 例 (100%)、弧発性線維性腫瘍 4 例 4 例 (100%) で腫瘍細胞に HSP105 蛋白発現を認めた。

## D . 考察

がん組織の免疫組織化学的解析による検討の結果、HSP105 蛋白発現は多様ながん腫で認められる可能性が示唆され、更なる適応症例の拡大を目指して、蛋白発現の確認が必要と考えられた。また、肺腺がんや、既存の治療に難治である神経膠芽腫や神経芽腫、悪性ラブドイド腫瘍、類上皮肉腫で、高頻度に HSP105 蛋白発現を認めており、ワクチン療法の対象になりうる可能性が考えられた。特に、脊索腫では、重粒子線治療が有用ではあるが、治療適応外症例や社会的事情により重粒子線治療が受けられなかった場合にワクチン療法という選択肢が提示できる可能性がある。さらには、中間悪性である弧発性線維性腫瘍にも高頻度の蛋白発現を認めており、HSP105 が悪性のみならず、中間悪性や良性腫瘍にも発現している可

能性が考えられる。

## E . 結論

IFN ELISPOT アッセイについては既に確立しているが、MHC ペプチド複合体マルチマーを用いた FACS 解析については、ワクチンを投与した患者の末梢血単核球がないと解析できないため、治験開始までに確立を目指す方針とした。

免疫組織化学染色による簡便かつ正確な HSP105 蛋白発現の評価法を確立した。また、種々のがん腫でも HSP105 蛋白発現を認め、幅広いがん腫が HSP105 由来ペプチドワクチン療法の対象となる可能性が示唆された。

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

1. Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y, Nakatsura T. A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 46:497-504,2015
2. Sawada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Iwama T, Endo I, Nakatsura T. Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Oncol.* 46:28-36,2015
3. Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, Nakatsura T. Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 31(3):1051-1058, 2014
4. Ito A, Kondo S, Tada K, Kitano S. Clinical development of immune checkpoint inhibitors. *BioMed Research International*. In press. (Corresponding author) (peer reviewed)
5. Kitano S, Postow MA, Ziegler CG, Kuk D, Panageas K, Cortez C, Rasalan TS, Adamow M, Yuan J, Wong P, Altan-Bonnet G, Wolchok JD, Lesokhin AM. Computational Algorithm Driven Evaluation of Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cell Frequency For Prediction of

Clinical Outcomes. Cancer Immunol Res. 2(8): 812-821, 2014. (peer reviewed)

6. 北野滋久、藤原豊、抗 PD-1 抗体の特異的CTL誘導能の特異的CTLの解析の現状 がん分子標的治療 12(1): 32-36, 2014.
7. 北野滋久、悪性黒色腫に対する抗PD-1抗体療法：抗PD-1抗体と抗CTLA-4抗体併用療法 細胞工学 33(10):1042-1048, 2014.
8. 北野滋久、塚崎邦弘、Tregによる免疫反応の制御とimmune checkpointによる免疫修飾の違い 腫瘍内科 14(5):469-474, 2014.

## 2. 学会発表

- 1) Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的CTLの解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、吉原宏樹、上野浩生、真部淳、細野亜古、植村靖史、中面哲也、第18回日本がん免疫学会総会（松山）2014年7月30日～8月1日
- 2) Glypican-3由来エピトープペプチド結合リボソームのCTL誘導能の評価、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、第18回日本がん免疫学会総会（松山）2014年7月30日～8月1日
- 3) Analysis of glypican-3 specific CTLs in the tumor tissue and vaccination site after administration of GPC3 peptide.  
( Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的CTLの解析 )、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、植村靖史、中面哲也、第73回日本癌学会学術総会（横浜）2014年9月25日～27日
- 4) Evaluation of peptide-specific CTL-inducibility of glypican-3-derived peptide-coupled liposome vaccine. ( Glypican-3由来ペプチドを結合したリボソームワクチンのペプチド特異的CTL誘導能評価 )、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、第73回日本癌学会学術総会（横浜）2014年9月25日～27日
- 5) The enhancement of the CTL induction by peptide vaccine therapy in combination with

anti-CD4 antibody ( 抗CD4抗体の併用投与は抗腫瘍ペプチドワクチン療法のCTLプライミング効率を高める )、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、植村靖史、中面哲也、第73回日本癌学会学術総会（横浜）2014年9月25日～27日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

