

[別 紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 **Human vascular endothelial growth factor receptor 1**
由来エピトープペプチドを用いた抗腫瘍新生血管ワクチン療法
の基礎的検討

指導教員 田原 秀晃 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 石崎 秀信

1. 研究の背景と目的

近年、腫瘍関連抗原(TAA)遺伝子が同定されるに従い、TAA を標的とした特異的癌免疫療法が開発され臨床応用が進んでいる。とりわけ、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞を生体内で惹起させるがんワクチン療法が注目されている。これは、TAA 由来の 9 個や 10 個のアミノ酸残基からなるペプチドが HLA Class I 分子上に提示され、T 細胞受容体を介して T 細胞を活性化し、腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞(Cytotoxic T Lymphocyte; CTL)を誘導する機序が解明されたことによる。現在、種々の TAA や個々の HLA 分子に拘束性を示すエピトープペプチドの同定が精力的に進んでいる。これらのペプチドを用いたがんワクチン療法の臨床試験の結果から、担癌患者の生体内で CTL が誘導できることがわかり、一部の症例では臨床効果が得られたという報告もある。しかし、腫瘍細胞における HLA Class I 分子の発現低下や消失、さらに標的分子の欠落などの問題点も明らかになり、その臨床的な有効性も問題となってきた。一方で腫瘍組織に存在する腫瘍新生血管内皮細胞は腫瘍細胞と比較して個々の細胞が均一であり、

HLA Class I 分子が安定していることが明らかとなってきた。また TAA を標的としたペプチドワクチン療法においてはその癌腫のみを標的とする特異性が生じるが、腫瘍新生血管内皮細胞を標的とした場合には癌腫を問わず共通であるため全ての癌腫を網羅できることになる。

我々は、これらの問題点を解決するために標的細胞を腫瘍ではなく腫瘍新生血管における内皮細胞としたがんワクチン療法の開発に取り組んできた。腫瘍新生血管内皮細胞においては血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor; VEGF)のレセプターが強発現しており、内皮細胞の増殖に強く関与すると考えられている VEGF receptor 2(VEGFR2)を標的としたがんワクチン療法の有用性を既に報告している。一方で、腫瘍新生血管内皮細胞では VEGF receptor 1(VEGFR1)も強発現しており、近年腫瘍血管新生における VEGFR1 の重要性が注目されている。VEGFR1 を標的としたワクチン療法の報告は未だなく、本研究では VEGFR1 を標的としたがんワクチン療法の有用性について基礎的解析を施行した。

2. 研究方法

VEGFR1 の免疫原性をそのエピトープペプチドを決定することにより証明した。VEGFR1 由来で HLA-A*0201、HLA-A*2402 それぞれに結合する可能性のあるエピトープ候補ペプチドを各々20種類ずつ合成した。

臨床応用を前提とした animal model の検討のため、in vivo におけるワクチン効果の解析は、C57BL/6 (H-2^b) 由来で、その Class I の α 1、 α 2 ドメインを HLA-A*0201 に置換した A2/Kb トランスジェニックマウス (A2/Kb TGM) を用いて行った。この A2/Kb TGM にヒトと同じシーケンスを持つエピトープ候補ペプチドをワクチンすることにより HLA-A*0201 拘束性の CTL を誘導することができ、誘導された CTL は VEGFR1 を強発現する腫瘍新生血管内皮細胞を認識しこれを傷害することによって腫瘍血管新生抑制効果を発揮する。腫瘍モデルにおいては、移植された同系マウス腫瘍細胞は HLA を発現していないため認識されることはなく、腫瘍血管新生抑制効果によって抗腫瘍効果を発揮するものであり、HLA 分子の発現のない腫瘍細胞に対するペプチドワクチン療法の抗腫瘍効果を評価できるモデルとなっている。

まず HLA-A*0201 拘束性のエピトープ候補ペプチドをワクチンすることによりペプチド特異的 CTL の誘導能の検討を行った。

同定された HLA-A*0201 拘束性のエピトープ候補ペプチドはヒトでも同様に CTL が誘導しうるかどうかを HLA-A*0201 陽性の健常人末梢血単核球を用いて検討した。末梢血単核球由来樹状細胞にペプチドをパルスし、CD8 陽性 T 細胞と共培養して 20 日後に細胞傷害活性を解析した。活性を認めたものは、限界希

積法にて CTL クローンを樹立した。

同定された HLA-A*0201 拘束性のエピトープ候補ペプチドは更に A2/Kb TGM を用いて *in vivo* での新生血管抑制効果の検討、皮下腫瘍モデル及び肺転移モデルにおける抗腫瘍効果の検討、またワクチン効果における有害事象の検討を行った。更により強い抗腫瘍効果を得るため、既に同定している VEGFR2 由来のエピトープペプチドを併用したワクチン効果の検討を行った。

HLA-A*2402 拘束性のエピトープ候補ペプチドに関しては HLA-A*2402 陽性の健常人末梢血単核球を用いて免疫原性の検討を行った。HLA-A*0201 と同様の手法でペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、更に内因性に VEGFR1 を発現する標的細胞に対する細胞傷害活性を検討し、エピトープペプチドを同定した。更に、臨床応用を目的として癌患者におけるエピトープペプチドに対する免疫活性を HLA-A*2402 陽性の悪性黒色腫の患者の末梢血を使用して解析した。

3. 結果と考察

A2/Kb TGM に HLA-A*0201 拘束性のエピトープ候補ペプチドをワクチンすることにより 3 種類のペプチドにおいてペプチド特異的に IFN- γ の産生と細胞傷害活性を示す CTL を誘導することが明らかとなった。

このうち 2 種類のペプチドにおいて、HLA-A*0201 陽性の健常人末梢血単核球からペプチドをパルスした標的細胞に対して強い細胞傷害活性を示す CTL クローンを樹立した。

この 2 種類のペプチドを A2/Kb TGM にワクチンすることにより、背部皮下法(Dorsal air sac assay)にて有意な腫瘍新生血管の抑制効果が証明できた。

抗腫瘍効果の解析では、皮下腫瘍の治療モデルにおいて異なる 3 種類の癌腫の腫瘍細胞株に対して有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。また、肺転移の治療モデルにおいても同様に有意な抑制効果を認めた。更に VEGFR2 由来のエピトープペプチドワクチンを併用することにより、VEGFR1 および VEGFR2 単独よりも有意な抗腫瘍効果の増強を認めた。

有害事象の検討では、VEGFR2 を標的とした血管新生に対するワクチン療法で報告されているものに準じて創傷治癒および妊娠反応に関して検討を行ったが、明らかな有害事象は認めなかった。また、VEGFR1 は造血幹細胞にも発現していることが報告されているが、ワクチンを施行されたマウスにおいて骨髄細胞数および末梢血の白血球数に減少を認めず、造血系には影響ないものと考えられた。

HLA-A*2402 拘束性のエピトープ候補ペプチドの中から 1 種類において、ペプチド特異的に強い細胞傷害活性を示す CTL クローンを樹立した。この CTL クローンは、ペプチドをパルスした標的細胞に対して強い細胞傷害活性を示す

だけでなく、**VEGFR1** を内因性に発現する標的細胞に対しても強い細胞傷害活性を示すことが明らかとなりエピトープペプチドであることが同定された。

更に **HLA-A*2402** 陽性の癌患者末梢血単核球を用いた解析では、同定したエピトープペプチドに反応する **CTL** が癌患者にも存在することが証明された。

4. 結語

VEGFR1 には細胞性免疫反応の標的となるエピトープペプチドが存在し、これを用いることにより今日のがんペプチドワクチン療法の問題点を克服し、さらに複数の癌種を標的としうる腫瘍新生血管ワクチン療法の新しいターゲットとなりうる可能性が示唆された。