

厚生労働科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

新しいがん免疫療法の研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 建

平成15年 4月

目 次

I. 総括研究報告

新しいがん免疫療法の開発
山口 建

II. 分担研究報告

1. 「新しいがん免疫療法の開発」に関する研究
山口 建
2. 「抗原ペプチドを用いた転移性メラノーマに対する樹状細胞療法」に関する研究
秋山 靖人
3. がんの免疫治療のために有効なエフェクター細胞の開発に関する研究
若杉 尋
4. 免疫担当細胞移植技術を用いたがんの免疫療法に関する研究
峯石 真
5. 癌のワクチン療法に関する研究
伊東 恭悟
6. 難治性癌に対するワクチン療法の開発と臨床評価
珠玖 洋
7. 膵癌の免疫療法に関する研究
岡 正朗
8. CEA エピトープと新しい膜透過性ペプチド複合体の合成に関する研究
望月 徹
9. 抗腫瘍性プロスタグランジンによる免疫応答誘導に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書
「新しいがん免疫療法の開発」に関する研究
主任研究者 山口 建 静岡県立静岡がんセンター 総長

研究要旨

本研究では、難治がん症例における延命による治療成績の向上を目指した新しい免疫療法の開発を目的としている。これまでのがんに対する治療法のなかで外科・放射線・化学療法につぐ第4の治療法として免疫療法を位置付け、過去3年間でいくつかの施設において基礎研究の段階から積み重ねた免疫療法のプロトコルを臨床試験にまで発展させている。これまでに臨床試験の初期段階である第I相試験において安全性の評価がほぼ終了した。具体的には、細胞療法プロジェクトでは、メラノーマや切除腺がんを対象に樹状細胞やCTL細胞による治療を継続し、臨床的な効果につき評価した。CTL細胞とは異なる機序にて抗腫瘍効果を示すNK様T細胞の臨床応用についても、基礎的検討を終了し、臨床応用に向けた準備を開始した。固形がんに対する移植免疫反応（移植片対腫瘍）による抗腫瘍効果が期待しうる骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植（ミニ移植）では、腎がんでの有効例が認められた。がんのワクチン療法のプロジェクトでは、進行性上皮がんを対象にCTL前駆体同定に基づくペプチドワクチンの臨床第I相試験が施行され、一部の症例に腫瘍の縮小が認められ、今後第II相試験が予定されている。またc-erbB2陽性の乳がんや卵巣がんを対象にHER2タンパク由来のCTLエピトープペプチドを用いた臨床第I相試験を施行した。一方でCTLおよびヘルパーエピトープの両方を含むCHP-HER2（HER2タンパクと疎水化多糖類の複合体）を用いたがんワクチン療法の第I相試験を行う準備が整えられた。次に本研究においては、臨床応用可能な免疫療法の開発を目的として新規の腫瘍抗原の探索や免疫遺伝子治療などの基礎的検討も行っている。腫瘍抗原の探索としては、これまでのプロテインチップを用いた培養上清中の腫瘍ペプチドの検索で得られた解析技術に基づいて、さらに網羅的に腺がん以外のがん種においても腫瘍特異的ながん抗原ペプチドの同定に努めた。またヒトCD34⁺血液幹細胞よりサイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞の作製に成功しており、臨床応用に向けて引き続き基礎検討を継続した。

分担研究者名

1. 秋山 靖人 静岡県立静岡がんセンター研究所
2. 若杉 尋 国立がんセンター研究所
3. 峯石 真 国立がんセンター中央病院
4. 伊東 恭悟 久留米大学医学部
5. 珠玖 洋 三重大学医学部
6. 岡 正朗 山口大学医学部
7. 望月 徹 静岡県立大学薬学部
8. 福島 雅典 京都大学大学院医学研究科

A. 研究目的

本研究では、難治性がんの延命効果をめざした新しい免疫療法の開発・応用を目的とし、治療の安全性および臨床的な有効性につき評価を行った。まず、免疫細胞療法として転移性メラノーマと腺がんを対象に樹状細胞やCTL細胞を用いた治療を施行し、有効性につき検討した。

また、ヒトNK様T細胞の至適培養法を確立し、早期の臨床応用への準備を進めた。移植免疫反応である骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植（ミニ移植）は、造血器腫瘍に加えて腎がんなどの固形腫瘍についても症例数を増やし、治療効果を検討した。がんワクチン療法については、進行性上皮がんを対象にCTL前駆体同定に基づくペプチドワクチン（テラーメイド型）の臨床第I相試験が施行され、結果を総括した。またHER2陽性の上皮がんを対象にHLA-A24結合性HER2抗原由来ペプチドp63-71を用いたペプチドワクチン療法の第I相試験を施行し、効果につき検討した。がん免疫療法開発のための基礎的検討では、プロテインチップを用いた培養上清中の腫瘍ペプチドの検索で得られた解析技術に基づいて、網羅的に腺がん以外のがん種においても腫瘍特異的ながん抗原ペプチドを同定することに努めた。またヒトCD34⁺血液幹細胞よりサイトカイン遺伝子を導入した

樹状細胞の培養法を改良し、臨床応用に向けて引き続き基礎検討を継続した。

B. 研究方法

(1) 進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法：進行メラノーマを対象とした腫瘍特異的樹状細胞療法の臨床第 I 相試験を平成 13 年 10 月より開始している。対象は、臨床病期 IV 期の転移性メラノーマで HLA-A2 または A24 陽性の患者とした。In vitro にて CTL 誘導活性の確認された HLA-A2 または A24 拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドをそれぞれ 5 種類ずつ合わせたペプチドカクテルを作成した。成分採血より得られた患者由来の単球より樹状細胞を培養し、ペプチドと KLH にて刺激後患者へ皮下投与を行った。ペプチドの皮内テストに加えて ELISPOT アッセイやテトラマーを用いた染色により免疫学的な治療効果について検討を行った。

(2) 膵がん切除例に対する MUC1-CTL 療法：膵がん切除例において、術後補助療法として細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を用いた細胞療法を施行し、安全性と臨床効果を検討した。施行にあたっては、患者末梢血リンパ球を採取し、糖鎖抗原 MUC1 高発現ヒト膵がん細胞株 YPK-1 と混合培養して誘導した MUC1-CTL を用いた。

(3) ヒト NK 様 T 細胞の培養系の確立：G-CSF にて動員したヒト単核球及び血漿を使用することにより、NK 様 T 細胞の増殖や抗腫瘍活性に対する影響を検討した。

(4) 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植（ミニ移植）：ハイリスクの血液腫瘍や転移性固形腫瘍の患者を対象としてミニ移植療法を施行した。腎がんを中心に膵がんや大腸がんなど有効な可能性のある固形腫瘍の症例を蓄積することに努めた。

(5) がんペプチドワクチン療法の臨床試験：進行上皮がんに対して CTL 前駆細胞の誘導活性を指標

に同定されたペプチド (SART1, SART2, SART3, Cyclophilin B, lck, ART1, ART4, ppMAPkkk, WHSC2, UBE2V, HNRPL, EIF4EBP1) を用いた第 I 相臨床試験 (テーラーメイド型ペプチドワクチン) を実施した。また、HER2 陽性の固形腫瘍を対象に HLA-A24 結合性 HER2 抗原由来ペプチド p63-71 を用いたペプチドワクチン療法の第 I 相試験を施行した。特異的免疫反応の評価には、ELISPOT アッセイやテトラマー 解析を行った。

(6) がん免疫療法の基盤的技術の開発を目的とした研究：プロテインチップを用いたがん抗原の探索では、膵がん以外の多数のがん培養細胞について産生ペプチドを網羅的に解析し、がん特異的なペプチドにつきタンデム質量分析法を用いてアミノ酸配列を決定できるように努めた。免疫遺伝子治療の基盤的検討では、遺伝子導入技術を用いた CD34⁺血液幹細胞からの IL-12 を産生する樹状細胞の培養増幅法に関して、臨床応用に向けた方法論の改良を検討した。

(倫理面への配慮)

(1) 新しい免疫療法の臨床試験 (第 I 相試験) については、倫理審査委員会での承認と十分なインフォームド・コンセントを得た。

(2) ヒト由来の試料を用いる場合には、研究計画の倫理審査委員会による承認、被験者のインフォームド・コンセントの取得と個人情報の保護につとめた。

C. 研究結果

(1) 進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床試験：平成 13 年 10 月に第 I 相臨床試験を開始後 9 例の進行メラノーマ患者 (HLA-A2 5 例, A24 4 例) が登録され、平均 6.7 回の樹状細胞の投与を受けた。副作用は、grade I-II の一時的な肝機能低下を 4 例に認めたが、すべてにおいて短期間に回復した。それ以外の重篤な副作用は見られなかった。臨床的な抗腫瘍効果については、評価可能であった 6 症例中 1 例に SD, 2 例に PR が確認された。免疫学的反応に関する解析では、評価可

能な6症例すべてにおいてELISPOT反応の陽性化が見られ、それぞれ少なくとも2種類以上のペプチドおよび5種類を合わせたペプチドカクテルに対する特異的なCTLの誘導が確認された。また臨床効果を認めた2症例においてA24-tyrosinase (0.34%)およびA2-MART1 (0.64%)テトラマー陽性の少数のCTL群が認められた。

(2) 膵がん切除例に対するMUC1-CTL療法：治癒切除後膵がんのCTL療法では、1年生存率は86.2%と従来の成績に比べ、予後の改善を認め、また肝再発が15例中1例(6.7%)と有意に肝転移再発を抑制した。

(3) ヒトNK様T細胞の培養系の確立：G-CSF投与後の末梢血単核球と血漿をIL-2, α -GalCerとともに培養することによって効率よくヒトV α 24⁺NK様T細胞を誘導できることやこれらのNK様T細胞がin vitroにてヒト培養がん細胞に対して抗腫瘍活性を有することを確認した。

(4) ミニ移植による移植免疫療法：血液腫瘍では、高齢者や臓器障害のあるハイリスクの患者において、通常リスクの患者に通常の移植法を施行した場合と比べ少なくとも同等の全生存・無病生存率であった。固形腫瘍においては腎がんが9例中PR1例を含む6例で腫瘍の増大停止以上の効果が見られたほか、大腸がんなどでもPRの例が認められた。

(5) がんペプチドワクチン療法の臨床試験：進行上皮がんに対するCTL前駆細胞の誘導活性を指標に同定されたペプチド(テーラーメイド型)を用いた第I相臨床試験では、108症例が評価可能であったが、有害事象はいずれもgrade I-IIまでであり、安全性が確認された。HLA拘束性の腫瘍特異的なCTL活性は50%の症例において認められた。臨床効果は、PRが5例、SDが28例、PDが67例であり、PR症例は子宮頸がん(2例)、大腸がん、スキルス胃がん、再燃前立腺がん(各1例)に認められた。また投与症例においては、高いQOL

と生存率の延長が認められている。また、HLA-A24結合性HER2抗原由来ペプチドp63-71を用いたペプチドワクチン療法の第I相試験においては、10例(乳がん8例、肺がん1例、卵巣がん1例)が登録され、安全性評価では皮内投与部位の発赤、掻痒(grade I)が1例に見られるのみで他の有害事象はみられなかった。臨床効果では腫瘍縮小はみられなかったが、NC症例が3例であり他の例はすべてPDとなった。ELISPOT反応では、1例でワクチン投与後末梢血中にペプチド特異的CTLが検出された。

(6) サイトカイン遺伝子を導入したヒト血液幹細胞由来の樹状細胞の作製：ヒト臍帯血由来のCD34⁺血液幹細胞より14日間の培養後得られた樹状細胞は、約70%がDCマーカー陽性であり、レトロウイルスによるIL-12遺伝子の導入効率は、約40%であった。Fibronectin fragmentの併用によりIL-12の導入効率は、約3倍に増加を認めた。MLR反応では、IL-12遺伝子を導入した樹状細胞は、より強くT細胞の増殖を刺激した。

(7) プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原の探索：プロテインチップ質量分析法を用いて膵がん特異的に発現している分子量3335および2341のペプチドを同定した。前者は、がん抑制遺伝子産物と推定されているDeleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1)蛋白質のC端29アミノ酸、後者は、家族性英国痴呆症の責任遺伝子産物で2型膜蛋白質であるintegral membrane protein 2B/BRIのC端20アミノ酸であった。

D. 考察

(1) 進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床試験：すでに平成15年3月までに臨床第I相試験はほぼ終了しており、治療の安全性は確認された。客観的な抗腫瘍効果は第II相試験にて評価予定とされた。

(2) 膵がん切除例に対するMUC1-CTL療法：CTL療

法の肝転移抑制効果は、術前から存在する微小肝転移巣に対し、細胞性免疫が低下する周術期に、膵がん特異的 CTL を移入することで抗腫瘍効果が発揮されるためと考えられ、移入する時期が肝要と考えられた。

(3) ヒト NK 様 T 細胞の培養系の確立：ヒト V α 24⁺NKT 細胞を FBS を用いず、ヒト血漿を用いて増殖する系を確立し、G-CSF 投与後の単核球と血漿を用いることで、より効率よく NKT 細胞が増殖できることを確認した。以上の結果から、NKT 細胞を用いたがん免疫療法の臨床応用の可能性が示唆された。

(4) ミニ移植による移植免疫療法：ミニ移植法は血液疾患では高齢者や臓器障害のある患者など通常の移植法で合併症を起こす可能性の高い患者に対して安全に移植を施行する方法であることを確立した。また固形腫瘍においては移植片対腫瘍効果を利用した免疫療法が有望であることを確認した。

(5) がんペプチドワクチン療法の臨床試験：進行上皮がんに対する CTL 前駆細胞の誘導活性を指標に同定されたペプチド（テラーメイド型）を用いた第 I 相臨床試験では、治療症例は QOL は高いまま維持され外来通院による治療も可能であった。また合併症、有害事象が少なく、医療費も低いという点から特筆される特徴であるといえる。現在臨床効果を目的とした早期第 II 相臨床試験を実施中である。HER2p63-71 ペプチドによる臨床第 I 相試験は、治療の安全性は確認されたが、CTL エピトープ単独投与では、明らかな臨床効果は見られなかった。今後 CTL エピトープに加えてヘルパーエピトープをも含んでいる HER2 組み替え蛋白と疎水化多糖類の複合体（CHP-HER2）の臨床試験の実施が検討される。

(6) サイトカイン遺伝子を導入したヒト血液幹細胞由来の樹状細胞の作製：IL-12 を産生する樹状細胞は、通常の遺伝子導入をしていない細胞に比較して強い抗腫瘍効果を誘導できることが動物

実験で明らかになった。さらに腫瘍近傍やあるいは直接腫瘍内への投与でも明らかな腫瘍の縮小が認められ、免疫遺伝子治療としての臨床応用の可能性が検討される。

(7) プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原の探索；プロテインチップ質量分析法を用いて腫瘍ペプチドを同定する技術を応用して、質量分析計の高位機種（タンデムマスマスペクトロメトリー）を使用することにより、多くの固形腫瘍の産生するペプチドの網羅的かつ効率的解析が可能であることが示唆された。

E. 結論

がんの細胞免疫療法では、メラノーマの樹状細胞と膵がんの CTL 療法（第 I 相試験）は、治療の安全性および臨床効果が確認された。ミニ移植療法では、造血器腫瘍に加えて腎がん症例で有効例が見られ、症例の集積が必要であるが、一方で固形腫瘍での治療の適応についての見極めが必要である。がんのペプチドワクチン療法では、進行上皮がんに対するテラーメイド型ワクチン（第 I 相試験）において、安全性と有効性が確認されたが、有効であった固形腫瘍に絞った第 II 相試験が必要とされる。細胞療法、ペプチドワクチン療法ともにこれまでに得られた第 I 相試験の知見を基に今後第 II 相試験の施行により抗腫瘍効果が客観的に評価されるべきである。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Maruyama K, Akiyama Y, Cheng J-Y, Nara N, Hojo T, Sasaki K, Yamaguchi K. Hamster DEC205, its primary structure, tissue and cellular distribution. *Cancer Lett.* 2002, 181:223-232.

2. Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Hojo T, Cheng JY, Mori T, Wiltrot RH, Yamaguchi K. Antitumor

- effects induced by dendritic cell (DC)-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters. *Cancer Lett.* 2002, 184 :37-47.
3. Akiyama Y, Maruyama K, Mochizuki T, Sasaki K, Takaue Y, Yamaguchi K. Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope encoded by the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus. *Immunol. Lett.* 2002, 83: 21-30.
 4. Akiyama Y, Watanabe M, Maruyama K, Yamaguchi K. Retrovirus-mediated IL-12 gene transduction into human CD34⁺ cell-derived dendritic cells (DCs). *Int. J. Oncol.* 2002, 21: 509-514.
 5. Sasaki K, Sato K, Akiyama Y, Yanagihara K, Oka M, Yamaguchi K. Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 2002, 62: 4894-4898.
 6. Ikarashi Y, Kato K, Yoshida M, Wakasugi H. UIB3.3 monoclonal antibody recognizes a precursor of NK1.1⁺ cytotoxic T cells generated by interleukin-2. *Proc. Japan Acad.* 2002, 78: 91-95.
 7. Je-Jung Lee, Takei M, Hori S, Inoue Y, Harada Y, Tanosaki R, Kanda Y, Kami M, Makimoto A, Mineishi S, Kawai H, Shimosaka A, Heike Y, Ikarashi Y, Wakasugi H, Takaue Y, Tai-Ju Hwang, Hyeoung-Joon Kim, Kakizoe T. The Role of PGE₂ in the Differentiation of Dendritic Cells: How Do Dendritic Cells Influence T-Cell Polarization and Chemokine Receptor Expression? *Stem cells* 2002, 20: 448-459.
 8. Kato K, Ikarashi Y, Sugahara T, Yasumoto A, David Sancho, Yoshida M, Takaue Y, Kobayashi Y, Francisco Sanchez-Madrid, and Hiro Wakasugi. U5A2-13: An Antigen Originally Found on Mouse NK-like T Cells, Is An Early Inducible Cell Surface Antigen During Lymphoid Activation. *Cellular Immunology*, in press, 2003
 9. Kanda Y, Mineishi S, Saito T, Saito A, Ohnishi M, Niiya H, Chizuka A, Nakai K, Takeuchi T, Matsubara H, Makimoto A, Tanosaki R, Kunitoh H, Tobinai K, Takaue Y. Response-oriented preemptive therapy against cytomegalovirus disease with low-dose ganciclovir: a prospective evaluation. *Transplantation.* 2002, 73:568-572.
 10. Ohnishi M, Kanda Y, Takeuchi T, Won Kim S, Hori A, Niiya H, Chizuka A, Nakai K, Saito T, Makimoto A, Tanosaki R, Watanabe T, Kobayashi Y, Tobinai K, Takaue Y, Mineishi S. Limited efficacy of lamivudine against hepatitis B virus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transplantation.* 2002, 73:812-815.
 11. Saito T, Kanda Y, Kami M, Kato K, Shoji N, Kanai S, Ohnishi T, Kawano Y, Nakai K, Ogasawara T, Matsubara H, Makimoto A, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, Takaue Y, Mineishi S. Therapeutic potential of a reduced-intensity preparative regimen for allogeneic transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte globulin against advanced/refractory acute leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2002 , 8:1014-1020
 12. Kanda Y, Tanosaki R, Nakai K, Saito T, Ohnishi M, Niiya H, Chizuka A, Yakushijin K, Urahama N, Ueda K, Iijima K, Ando T, Matsubara

- H, Kami M, Makimoto A, Kobayashi Y, Tobinai K, Mineishi S, Takaue Y. Impact of stem cell source and conditioning regimen on erythrocyte recovery kinetics after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from an ABO-incompatible donor. *Br J Haematol.* 2002, 118:128-131
13. Nakai K, Mineishi S, Kami M, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y. Chimerism induction and delayed onset of cytomegalovirus (CMV) infection after allogeneic reduced-intensity stem cell transplantation (RIST). *Blood.* 2002, 100:2674-2675
14. Nakai K, Kanda Y, Mineishi S, Hori A, Chizuka A, Niiya H, Tanimoto T, Ohnishi M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Matsuno Y, Yamazaki N, Tobinai K, Takaue Y. Primary cutaneous aspergillosis caused by *Aspergillus ustus* following reduced-intensity stem cell transplantation. *Ann Hematol.* 2002, 81:593-596.
15. Mineishi S, Kanda Y, Saito T, Nakai K, Makimoto A, Kami M, Tanosaki R, Wakasugi H, Tobinai K, Takaue Y. Impact of GVHD in reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) for patients with hematological malignancies. *British J of Haematology* (in press.)
16. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N, Takao T, Tamesa T, Tangoku A, Tabuchi H, Hamada K, Nakayama H, Ishitsuka H, Miyamoto T, Hirabayashi A, Uchimura S and Hamamoto Y. Use of oligonucleotide microarray as a novel approach for prediction of early intrahepatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet.* (in press) .
17. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Hashimoto K, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S and Hamamoto Y. Differential Gene Expression in Distinct Virologic Types of Hepatocellular Carcinoma: Association with Liver Cirrhosis. *Oncogene* (in press) .
18. Matsuoka K, Ueno T, Morita K, Kawano H, Yamaguchi K, Maekawa T, Tangoku A and Oka M. Effects of Moderate Hypothermia on Proinflammatory Cytokines Production in Rat Model of Caerulein-Induced Pancreatitis. *Pancreas.* 2002, 26(1):E12-E17.
19. Yamamoto K, Yahara N, Gondo T, Ishihara T and Oka M. Establishment and Characterization of a new pancreatic cancer cell line, YPK-1. *The Bulletin of the Yamaguchi Medical School* 2002, 49(1-2):33-42, 2002.
20. Hinoda Y, Okayama N, Takano N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hazama S, Kitamura Y, Kamatani N and Oka M. Association of Functional Polymorphisms of Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 Genes with Colorectal Cancer. *Int J Cancer* 2002, 10:102(5):526-529
21. Yahara N, Abe T, Morita K, Tangoku A and Oka M. Comparison of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor production by the peritoneum in laparoscopic and open surgery. *Surgical Endoscopy* 2002, 16:1615-1619, 2002.
22. Nakamura M, Oka M, Iizuka N, Kawauchi S, Gondo T and Ueno T, Tangoku A. Osteopontin Expression in Chronic Pancreatitis. *Pancreas* 2002, 25(2):182-187, 2002.
23. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N,

- Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Tangoku T, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S and Hamamoto Y. Comparison of Gene Expression Profiles between Hepatitis B Virus- and Hepatitis C Virus-infected Hepatocellular Carcinoma by Oligonucleotide Microarray Data on the Basis of a Supervised Learning Method. *Cancer Res.* 2002, 62:3939-3944, 2002.
24. Iizuka N, Hazama S, Yoshimura K, Yoshino S, Tangoku A, Miyamoto K, Okita K and Oka M. Anticachectic effects of the natural herb *Coptidis rhizoma* and berberine on mice bearing colon 26/clone 20 adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2002, 10:99(2):286-291.
25. Suzuki N, Tanaka S, Maeda Y, Hida N, Mine T, Yamamoto K, Oka M and Itoh K. Detection of peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors used for specific immunotherapy for pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2002, 1:98(1):45-50, 2002.
26. Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, Abe T, Toshimitsu H, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Oka M and Sasaki K. Gain of 5p15 detected by comparative genomic hybridization as an independent marker of poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002, 8(2):526-533, 2002.
27. Okayama N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Fujiwara M, Matsubara T, Maekawa T, Hazama S, Oka M, Nohara H, Kayano K, Okita K and Hinoda Y. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Clinical Laboratory analysis* 2002, 16:56-58.
28. Shimada H, Liu TL, Ochiai T, Shimizu T, Haupt Y, Hamada H, Abe T, Oka M, Takiguchi M and Hiwasa T. Facilitation of adenoviral wild-type p53-induced apoptotic cell death by overexpression of p33(ING1) in T.Tn human esophageal carcinoma cells. *Oncogene* 2002, 4:21(8):1208-1216.
29. Takano N, Iizuka N, Hazama S, Yoshino S, Tangoku A and Oka M. Expression of estrogen receptor- α and β mRNAs in human gastric cancer. *Cancer Lett*, 2002, 176(2):129-135.
30. Yamada A, Kawano K, Koga M, Takamori S, Nakagawa M and Itoh K, Gene and peptide analyses of newly defined lung cancer rejection antigens recognized by HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 2003 (in press) .
31. Azuma K, Shichijo S, Maeda Y, Nonaka Y, Fujii T, Kenta K and Itoh K, Mutated p53 gene encodes a non-mutated epitope recognized by HLA- B4601- restricted and tumor-reactive CTLs at tumor site. *Cancer Res*, 2003, 63:854-858.
32. Noguchi M, Mine T, Suetsugu N, Katagiri K, Imai N, Tomiyasu K, Suekane S, Kobayashi K, Shichijo S, Yamada A, Yamana H, Itoh K and Noda S, Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptide in hla-a24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *The Prostate* 2003 (in press).
33. Kawamoto N, Yamada A, Ohkouchi S, Maeda T, Tanaka S, Hashimoto T, Saijo Y, Saijo S, Nukiwa T, Shichijo S, Aizawa H and Itoh K, IgG reactive to CTL-directed epitopes of self-antigens is enter lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigen.* 2003 (in

press).

34. Koga M, Shichijo S, Yamada A, Ashihara J, Sawamizu H, Kosukawa J and Itoh K, Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. Tissue Antigen 2003 (in press).

35. Nonaka Y, Tsuda N, Shichijo S, Ito M, Maeda Y, Harada M, Kamura T, Shigemori M and Itoh K, Recognition of ADP-ribosylation factor 4-like by HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes from patients with brain tumors. Tissue Antigen. 2003 (in press).

36. Tsuda N, Nonaka Y, Shichijo S, Yamada A, Ito M, Maeda Y, Harada M, Kamura T and Itoh K, UDP-Gal:beta GlcNAc beta1, 3-galactosyltransferase, polypeptide 3 (GALT3) is a tumor antigen recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from patients with brain tumor. Br J Cancer 2002, 87:1006-1012.

37. Maeda Y, Hida N, Niiya F, Katagiri K, Harada M, Yamana H, Kamura T, Takahashi M, Sato Y, Todo S and Itoh K, Detection of peptide-specific CTL-precursors in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. Br J Cancer 2002, 87:796-804.

38. Gohara R, Imai N, Rikimaru T, Yamada A, Hida N, Ichiki M, Kawamoto M, Matsunaga K, Ashihara J, Yano S, Tamura M, Ohkouchi S, Yamana H, Oizumi K and Itoh K, Phase I Clinical Study of CyclophilinB Peptide Vaccine for Lung Cancer Patients. J Immunother. 2002, 25:439-444.

39. Maeda Y, Ito Masaaki, Harashima N, Nakatsura T, Hida N, Imai N, Sato Y, Shichijo

S, Todo S and Itoh K, Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)-derived peptides can induce HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in the majority of gastrointestinal cancer patients. Int J Cancer 2002, 99:409-417.

40. Komatsu N, Shichijo S, Maeda Y and Itoh K, Measurement of interferon- γ by high-throughput fluorometric microvolume assay technology (FMAT) system. J Immunol. Method 2002, 263:169-176.

41. Ohkouchi S, Yamada A, Imai N, Mine T, Harada T, Shichijo S, Maeda Y, Saijo Y, Nukiwa T, Itoh K, Non-mutated tumor-rejection antigen peptides elicit type-I allergy in the majority of healthy individuals. Tissue Antigens 2002, 59:259-27.

42. Nakatsura R, Senji S, Ito M, Nishimura Y and Itoh K, Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, CLP, originally defined by the SEREX method. Eur J Immunol. 2002, 32:826-836.

43. Sasatomi T, Suefuji Y, Miyagi Y, Ogata H, Akagi T, Shirouzu K and Itoh K, Expression of tumor-rejection antigens in colorectal cancers. Cancer 2002, 94:1636-1641.

44. Tanaka K, Harashima N, Niiya F, Miyagi Y, Hida N, Ochi M, Imai N, Harada M, Itoh K and Shichijo S, Serine proteinase inhibitor 9 can be recognized by cytotoxic T lymphocytes of epithelial cancer patients. Jpn J Cancer Res 2002, 93:198-208.

45. Yutani S, Tanaka M, Mastumoto H, Imai N, Sata M, Shichijo S, Harada M and Itoh K, Elevation of serum MAGE-4 protein levels and

prediction of hepatocellular carcinogenesis in patients with liver cirrhosis. *Jpn J Cancer Res* 2002, 93:453-458.

46. Hida N, Maeda Y, Katagiri K, Takasu H, Harada M and Itoh K, A simple culture protocol to detect peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the circulation. *Can Immunol. Immunother.* 2002, 51:219-228.

47. Tanaka K, Harashima N, Niiya F, Miyagi Y, Hida N, Ochi M, Imai N, Harada M, Itoh K and Shichijo S, Serine proteinase inhibitor 9 can be recognized by cytotoxic T lymphocytes of epithelial cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 2002, 93:198-208.

48. Kobayashi, T., Yamaguchi, M., Kim, S., Morikawa, J., Ogawa, S., Ueno, S., Suh, E., Dougherty, E., Shmulevich, I., Shiku, H., and Zhang, W. Microarray Reveals Differences in Both Tumors and Vascular Specific Gene Expression in de Novo CD5(+) and CD5(-) Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Cancer Res.* 2003, 63:60-66.

49. Ikuta, Y., Katayama, N., Wang, L., Okugawa, T., Takahashi, Y., Schmitt, M., Gu, X., Watanabe, M., Akiyoshi, K., Nakamura, H., Kuribayashi, K., Sunamoto, J. and Shiku, H. :Presentation of a major histocompatibility complex class I-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide-truncated HER2 protein complex: implications for a polyvalent immuno-cell therapy. *Blood.* 2002, 99:3717-3724.

50. Mukai, K., Yasutomi, Y., Watanabe, M., Kenjo, A., Aota, T., Wang, L., Nishikawa, H.,

Ishihara, M., Fujita, T., Kuribayashi, K. and Shiku, H. HER2 peptide-specific CD8(+) T cells are proportionally detectable long after multiple DNA vaccinations. *Gene Ther.* 2002, 9:879-888.

51. Nishii, K., Katayama, N., and Shiku, H. : Adult acute myeloid leukemia cells do not express non-functional Ikaros isoforms. *Blood* 2002, 100:3436-3437.

52. Yamaguchi, M., Seto, M., Okamoto, M., Ichinohasama, R., Nakamura, N., Yoshino, T., Suzumiya, J., Murase, T., Miura, I., Akasaka, T., Tamaru, J., Suzuki, R., Kagami, Y., Hirano, M., Morishima, Y., Ueda, R., Shiku, H. and Nakamura, S. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 2002, 99:815-21.

53. Schmitt, M., Taniguchi, M., Yoshida, T., Miyahara, Y., Gu, X., Mukai, K., Yagita, H., Dohner, H. and Shiku, H. Rapid lethality of hosts by interleukin-12 following H-2 compatible allogeneic bone marrow transplantation: Reminiscence of gut-associated acute graft-versus-host reaction. *Int J Oncol.* 2002, 21:795-801.

54. Masuya, M., Katayama, N., Hoshino, N., Nishikawa, H., Sakano, S., Araki, H., Mitani, H., Suzuki, H., Miyashita, H., Kobayashi, K., Nishii, K., Minami, N. and Shiku, H. :The soluble Notch ligand, Jagged-1, inhibits proliferation of CD34+ macrophage progenitors. *Int J Hematol.* 2002, 75:269-276.

55. Nishii, K., Katayama, N., Miwa, H., Shikami, M., Usui, E., Masuya, M., Araki, H., Lorenzo, F., Ogawa, T., Kyo, T., Nasu, K., Shiku, H. and Kita, K. : Non-DNA-binding Ikaros isoform gene

expressed in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2002, 16:1285-1292.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

① 細胞性免疫検出法およびその医薬への応用:

PCT/ J P 02/06298 (2002. 6. 24)

特開 2002-365286 (2002. 12. 18)

② 前立腺癌マーカー由来A24拘束性腫瘍抗原ペプチド:

PCT/ J P 02/12893 (2002. 12. 10)

③ 大腸癌 (SW620) 由来 A31 拘束性腫瘍抗原:

特願 2002-126764 (2002/4/26)

④ 肺腺癌由来 (11-18 細胞) 由来の B52&B62 拘束性腫瘍抗原:

特願 2002-286676 (2002/9/30)

分担研究報告書

「新しいがん免疫療法の開発」に関する研究

分担研究者 山口 建 静岡県立静岡がんセンター 総長

研究要旨

本研究では、難治がんに対する新しい免疫細胞療法の開発を目的として樹状細胞を用いた臨床試験を施行した。臨床病期第 IV 期の進行悪性黒色腫（HLA-A2 または A24）を対象にメラノーマ腫瘍抗原ペプチドを用いた樹状細胞療法の第 I 相臨床試験を平成 13 年 10 月より開始している。これまでに 9 例が登録され、平均 6.7 回の樹状細胞の投与が施行された。明らかな副作用は認めていない。抗腫瘍効果については、2 例に明らかな腫瘍の縮小（PR）を認め、全例に特異的な CTL の誘導が見られている。平成 15 年 4 月より第 II 相試験が予定されている。また免疫療法に関する基盤的技術の開発においては、ヒト血液幹細胞からサイトカインの遺伝子を導入した樹状細胞を作製する方法を確立した。さらに、膵がん培養細胞株の上清中に特異的に分泌される微量のがん抗原ペプチドをプロテインチップ法を用いて検出・同定しており、さらにこれまでの知見を活かして、他のがん種においても網羅的な解析を行うようつとめた。

A. 研究目的

本研究では、難治性がんの延命効果をめざした新しい免疫療法の開発・応用を目的とし、臨床的な有効性につき評価を行った。免疫細胞療法として転移性メラノーマを対象にメラノーマ関連抗原ペプチドを用いた樹状細胞療法の臨床第 I/II 相試験を施行し、安全性と有効性につき検討した。また免疫療法開発の基礎的研究としてサイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞を利用した免疫遺伝子治療について臨床応用をめざした基礎検討を進めた。さらに新しいがん抗原の探索を目的として、膵がんをはじめとする固形がん培養上清中に産生・放出される腫瘍特異的な微量ペプチドをプロテインチップ法を用いて同定し、がんワクチンや腫瘍マーカーとしての応用の可能性につき検討した。

B. 研究方法

(1) 進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床試験：進行メラノーマを対象とした腫瘍特異的樹状細胞療法の臨床第 I 相試験を平成 13 年 10 月より開始している。対象は、臨床病期 IV 期の転移性メラノーマで HLA-A2 または A24 陽性の患

者とした。CTL 誘導活性の確認された HLA-A2 または A24 拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドをそれぞれ 5 種類ずつ合わせたペプチドカクテルを作成した。成分採血より得られた患者由来の単球をサイトカイン（GM-CSF, IL-4）を用いて培養し、得られた樹状細胞をペプチドカクテルと KLH にて刺激後患者へ皮下投与を行った。投与樹状細胞数は、 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 の 3 つのレベルにて行い、それぞれ 3 症例ずつ割り当てた。個々の症例は、最大 10 回まで樹状細胞の投与を行い、治療の安全性および有効性の評価を行った。免疫学的なモニタリングについては、ペプチドの皮内テストに加えて ELISPOT アッセイやテトラマーを用いた染色により免疫学的な治療効果について検討を行った。

(2) サイトカイン遺伝子を導入したヒト血液幹細胞由来の樹状細胞の作製：ヒト臍帯血由来の CD34⁺ 血液幹細胞を用いてレトロウイルスベクターを利用することにより Interleukin (IL)-12 遺伝子を導入した樹状細胞の培養法を確立した。MACS 法にて分離した CD34⁺ 血液幹細胞を IL-3, IL-6, Flt3 ligand, bFGF, IGF-I の存在下に IL-12

遺伝子を含むレトロウイルスと 48 時間共培養を行った。その後 GM-CSF, SCF, Flt3 ligand, IL-4, TNF- α とともに 12 日間培養し、成熟型の樹状細胞を得た。表面マーカーや IL-12 産生能の解析に加え MLR 反応での機能的評価も施行した。

(3) プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原の探索：膵がんの特異的な分泌ペプチド性腫瘍マーカーを探索する目的で、培養細胞の無血清培養上清中に存在するペプチドをプロテインチップ質量分析法を用いてプロファイリングする新しい手法を確立した。無血清化した培養上清 2 μ l をチップに装填し、分子量 2,000 ~10,000 の領域でマスマスペクトルの解析を行う。膵がん培養株 3 6 株、膵 duct cell 由来細胞株 2 株、膵 duct cell 初代培養細胞、および非膵がん培養株 3 6 株を分析し、膵がんの特異的に発現するペプチドの同定を行った。

(倫理面への配慮)

(1) 新しい免疫療法の臨床試験 (第 I 相試験) については、倫理審査委員会での承認とインフォームド・コンセントを得た。

(2) ヒト由来の試料を用いる場合には、研究計画の倫理審査委員会による承認、被験者のインフォームド・コンセントの取得と個人情報の保護につとめた。

C. 研究結果

(1) 進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床試験：平成 13 年 10 月に第 I 相臨床試験を開始後 9 例の進行メラノーマ患者 (HLA-A2 5 例, A24 4 例) が登録され、平均 6.7 回の樹状細胞の投与を受けた。副作用は、grade I-II の一時的な肝機能低下を 4 例に認めたが、すべてにおいて短期間に回復した。それ以外の重篤な副作用は見られなかった。臨床的な抗腫瘍効果については、評価可能であった 6 症例中 1 例に SD, 2 例に PR が確認された。免疫学的反応に関する解析では、評価可能な 6 症例すべてにおいて ELISPOT 反応の陽性化が見られ、それぞれ少なくとも 2 種類以上のペプ

チドおよび 5 種類を合わせたペプチドカクテルに対する特異的な CTL の誘導活性が確認された。また臨床効果を認めた 2 症例において A24-tyrosinase (0.34%) および A2-MART1 (0.64%) テトラマー 陽性の少数の CTL 群が認められた。

(2) サイトカイン遺伝子を導入したヒト血液幹細胞由来の樹状細胞の作製：ヒト臍帯血由来の CD34⁺ 血液幹細胞より 14 日間の培養後得られた樹状細胞は、約 70% が CD1a 及び DEC205 陽性であった。レトロウイルスによる IL-12 遺伝子の導入効率は、約 40% であり IL-12 産生量は 5 x 10⁵ 細胞あたり 53 ng であった。Fibronectin fragment の併用により IL-12 の導入効率は、約 3 倍に増加を認めた。MLR 反応では、IL-12 遺伝子を導入した樹状細胞は、GFP 遺伝子を導入した細胞に比較してより強く T 細胞の増殖を刺激した。

(3) プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原の探索：プロテインチップ質量分析法を用いて膵がん培養株 3 6 株、膵 duct cell 由来細胞株 2 株、膵 duct cell 初代培養細胞、および非膵がん培養株 3 6 株由来の無血清化した培養上清を分析し、膵がん 5 株に分子量 3335 および 2341 のペプチドが選択的に発現することを明らかにした。タンデム質量分析により、前者は、がん抑制遺伝子産物と推定されている Deleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1) 蛋白質の C 端 29 アミノ酸、後者は、家族性英国痴呆症の責任遺伝子産物で 2 型膜蛋白質である integral membrane protein 2B/BRI の C 端 20 アミノ酸であることを明らかにした。

D. 考察

(1) 進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床試験：すでに平成 15 年 3 月までに臨床第 I 相試験はほぼ終了している。ここまで軽度の肝機能低下以外有意な副作用は見られていない。第 I 相試験の結果より至適投与細胞数が決定され、最終的に第 II 相試験において有効性に関して客観的な評価が可能となった。

(2) サイトカイン遺伝子を導入したヒト血液幹細胞由来の樹状細胞の作製：IL-12 を産生する樹状細胞は、通常の遺伝子導入をしていない細胞に比較して強い抗腫瘍効果を誘導できることが動物実験で明らかになっている。さらに腫瘍近傍やあるいは直接腫瘍内への投与でも明らかな腫瘍の縮小が認められる。今後ヒト樹状細胞の培養系を効率よく改善することにより免疫遺伝子治療としての臨床応用の可能性が検討される。

(3) プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原の探索；プロテインチップ質量分析法を用いて膵がん培養細胞より特異的に分泌されるペプチドが2種類同定された。プロテインチップ解析法の有用性が示されたのみならず、膵がん特異的な腫瘍マーカーやがんワクチンペプチドの開発において今後の展望が期待される。また膵がん以外の多数のがん種においても、より高位の機種（タンデムマススペクトロメトリー）を使用することにより、網羅的かつ効率的にペプチドの解析が可能である。

E. 結論

メラノーマの樹状細胞療法については、これまでに第 I 相試験がほぼ終了し、有意な有害事象は全くみられておらず治療の安全性が確認された。2例に明らかな抗腫瘍効果も認められ、今後第 II 相試験における客観的な臨床効果が評価可能となった。免疫療法開発のための基礎的検討では、新しいがん抗原ペプチドの同定に関してプロテインチップ解析法の有用性が示された。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Maruyama K, Akiyama Y, Cheng J-Y, Nara N, Hojo T, Sasaki K, Yamaguchi K. Hamster DEC205, its primary structure, tissue and cellular distribution.

Cancer Lett. 2002, 181:223-232.

Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Hojo T, Cheng JY, Mori T, Wilttrout RH, Yamaguchi K. Antitumor effects induced by dendritic cell (DC)-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters. Cancer Lett. 2002, 184 :37-47.

Akiyama Y, Maruyama K, Mochizuki T, Sasaki K, Takaue Y, Yamaguchi K. Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope encoded by the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus. Immunol. Lett. 2002, 83: 21-30.

Akiyama Y, Watanabe M, Maruyama K, Yamaguchi K. Retrovirus-mediated IL-12 gene transduction into human CD34⁺ cell-derived dendritic cells (DCs). Int. J. Oncol. 2002, 21: 509-514.

Sasaki K, Sato K, Akiyama Y, Yanagihara K, Oka M, Yamaguchi K. Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. Cancer Res. 2002, 62: 4894-4898.

2. 学会発表

第 61 回日本癌学会総会（東京）H14. 10. 1～H14. 10. 3 HLA-A24 拘束性メラノーマ抗原ペプチドにて処理した樹状細胞を用いた CTL の誘導
秋山靖人、丸山宏二、山本明史、山崎直也、川嶋一郎、糠谷育衛、竹迫一任、山口 建

7th International Symposium on Dendritic cells. Bamberg, Germany, 2002. Antitumor effect induced by dendritic cells

(DC)-based immunotherapy against peritoneal dissemination of the hamster pancreatic cancer. Akiyama Y, Takigawa Y, Maruyama K, Sugiyama K, Yamaguchi K.

H. 知的所有権の取得状況 なし

分担研究報告書

「抗原ペプチドを用いた転移性メラノーマに対する樹状細胞療法」に関する研究

分担研究者 秋山靖人 静岡県立静岡がんセンター研究所 免疫治療部部长

研究要旨

転移性メラノーマは、現在有効な治療法がなく非常に予後の悪い難治がんである。平成13年10月より HLA-A2 または A24 陽性の転移性メラノーマを対象にメラノーマ抗原ペプチドカクテルにて処理をした樹状細胞を用いた細胞免疫療法の臨床第 I 相試験を開始した。これまでに9例が登録され、細胞投与の安全性および明らかな臨床効果の確認がなされている。平成15年4月より転移性メラノーマ患者が新たに12例登録され、臨床第 II 相試験の実施が予定されている。

A. 研究目的

転移性メラノーマは、現在効果的な治療法が見つかっていない。このため樹状細胞を用いた細胞免疫療法の確立により、治療延命効果や予後の改善が期待される。平成14年度は、樹状細胞療法の臨床第 I 相試験の施行により治療の安全性および臨床的な抗腫瘍効果につき検討を行った。

B. 研究方法

進行メラノーマを対象とした腫瘍特異的樹状細胞療法の臨床第 I 相試験を平成13年10月より開始している。対象は、臨床病期IV期の転移性メラノーマでHLA-A2またはA24陽性の患者とした。In vitroにてCTL誘導活性の確認されたHLA-A2またはA24拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドをそれぞれ5種類ずつ合わせたペプチドカクテルを作成した。成分採血より得られた患者由来の単球からGM-CSF, IL-4との培養で得られた樹状細胞をペプチドとKLHにて刺激後患者へ皮下投与を行った。投与樹状細胞数は、 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 の3つのレベルにて行い、それぞれ3症例ずつ割り当てた。個々の症例は、最大10回まで樹状細胞の投与を行い、治療の安全性および有効性の評価を行った。免疫学的なモニタリングについては、ペプチドの皮内テストに加えてELISPOTアッセイやテトラマーを用いた染色により免疫学的な治療効果について検討を行っ

た。

（倫理面への配慮）

新しい免疫療法の臨床試験（第I相試験）については、倫理審査委員会での承認と患者側より十分なインフォームド・コンセントを得た。

C. 研究結果

平成14年3月までに9例（HLA-A2 5例, A24 4例）が第I相試験に登録され、平均6.7回の樹状細胞の投与を受けた。原疾患の増悪のため3例で投与3回で中止されたが、3例において10回投与が施行できた。副作用は、grade I-IIの一時的な肝機能低下を4例に認めたが、すべてにおいて短期間に回復した。それ以外の重篤な副作用は見られなかった。臨床的な抗腫瘍効果については、治療経過中に認められた最大効果を最終的な治療効果と判断した。評価可能であった6症例中1例にSD, 2例にPRが確認された。PRのうち1例は、治療開始後1年を経過し、引き続き腫瘍の縮小を認め、再発は見られていない。皮内テストの検討では、6例中ペプチド反応の陽性化が2例、KLH反応の陽性化が3例、ツベルクリン反応の陽性化が4例に認められた。免疫学的反応に関する解析では、評価可能な6症例すべてにおいてELISPOT反応の陽性化が見られ、それぞれ少なくとも2種類以上のペプチドおよび5種類を合わせたペプチドカクテルに対する特異的なCTLの誘導が末梢血中に確認され

た。特に臨床的な抗腫瘍効果 (PR) を認めた2症例では、RT-PCRにて発現が確認されたすべての抗原ペプチドに対して特異的なCTLが誘導されており、またTh1/Th2バランスも治療後大きくTh1に傾いていた。さらに誘導されたCTLを客観的に定量化することを目的としてテトラマー染色を合わせて行った。臨床効果を認めた2症例においてA24-tyrosinase (0.34%)およびA2-MART1 (0.64%)テトラマー陽性の少数のCTL群が認められた。

D. 考察

転移性メラノーマに対する樹状細胞療法の臨床第I相試験の総括より、治療の安全性についてはgrade I-IIの軽度の肝機能低下のみであり有意な有害事象は見られなかった。また副次的評価項目とされた抗腫瘍効果については、評価可能6例中2例にPRが認められ、すでに第I相試験において免疫反応のみならず臨床効果においても、治療の有効性が部分的に示唆された。平成15年4月より第I相試験にて設定された至適細胞数を用いて第II相試験が予定されており、さらに客観的に治療の有効性が評価される。最終的に治療の有効性が確認されれば、いまだに有用な治療法のない転移性メラノーマにおける標準的治療法となる可能性があると考えられた。

E. 結論

メラノーマの樹状細胞療法については、これまでに第I相試験がほぼ終了したが、有意な有害事象は全くみられておらず治療の安全性が確認された。また2例に明らかな抗腫瘍効果も認められ、今後第II相試験において客観的な臨床効果の評価が必要とされる。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Maruyama K, Akiyama Y, Cheng J-Y, Nara N, Hojo T, Sasaki K, Yamaguchi K. Hamster DEC205, its primary structure,

tissue and cellular distribution. *Cancer Lett.* 2002, 181:223-232.

Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Hojo T, Cheng JY, Mori T, Wilttrout RH, Yamaguchi K. Antitumor effects induced by dendritic cell (DC)-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters. *Cancer Lett.* 2002, 184:37-47.

Akiyama Y, Maruyama K, Mochizuki T, Sasaki K, Takaue Y, Yamaguchi K. Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope encoded by the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus. *Immunol. Lett.* 2002, 83:21-30.

Akiyama Y, Watanabe M, Maruyama K, Yamaguchi K. Retrovirus-mediated IL-12 gene transduction into human CD34⁺ cell-derived dendritic cells (DCs). *Int. J. Oncol.* 2002, 21:509-514.

Sasaki K, Sato K, Akiyama Y, Yanagihara K, Oka M, Yamaguchi K. Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 2002, 62:4894-4898.

2. 学会発表

第61回日本癌学会総会(東京) H14.10.1~H14.10.3 HLA-A24拘束性メラノーマ抗原ペプチドにて処理した樹状細胞を用いたCTLの誘導
秋山靖人、丸山宏二、山本明史、山崎直也、川嶋一郎、糠谷育衛、竹迫一任、山口建

7th International Symposium on Dendritic cells. Bamberg, Germany, 2002. Antitumor

effect induced by dendritic cells (DC)-based immunotherapy against peritoneal dissemination of the hamster pancreatic cancer. Akiyama Y, Takigawa Y, Maruyama K, Sugiyama K, Yamaguchi K.

H. 知的所有権の取得状況 なし

分担研究報告書

「がんの免疫治療のために有効なエフェクター細胞の開発に関する研究」

分担研究者 若杉 尋 国立がんセンター研究所 薬効試験部長

研究要旨

1) ヒト血漿を用いた、NKT細胞の増殖法を確立した、2) G-CSFを投与した後の健常者末梢血は、G-CSF投与前の末梢血と比較して、効率よくNKTが得られることが分かった、3) 2)の原因として、細胞並びに血漿共に、G-CSFの投与によりNKT細胞の増殖により適した環境となることが示唆された、4) G-CSF投与後の血漿にはIL-3、IL-13が多量に含まれることが確認された、5) しかし、通常血漿へのIL-3とIL-13の添加だけではNKTの増殖には影響を与えなかった、6) 上記の方法で誘導されたNKT細胞は、IFN-gammaを産生すると共に、CD1d非拘束的にがん細胞を傷害した

- | | |
|---|---|
| A. 研究目的 | 血漿を含むAIM培地を用いて、NKT細胞の増殖比 |
| CTL, NK, NKT細胞やDC等の免疫担当細胞の役割を総合的に解析し、がんの治療法の確立に貢献 | 率を比較検討した。 |
| することを本研究の目的とする。本年度は、NKT | 2) G-CSF投与前後の末梢血から得られた細胞並 |
| 療法の臨床応用を目指し、臨床での使用が可能な | びに血漿を用いて、Vα 24 ⁺ NKT細胞の増殖率を比 |
| ヒト NKT 培養法の確立ならびにその評価法の確 | 較検討した。 |
| 立を行った。 | 3) G-CSF投与後の血漿中に存在する、NKT細胞 |
| | の増殖促進因子に関し検討した。 |
| | 4) 上記条件にて培養された NKT 細胞の、抗腫 |
| B. 研究方法 | 瘍活性並びにサイトカイン産生能を検討した。 |
| 1) ウシ胎児血清、ヒトアルブミン、ヒト血清 | |

C. 研究結果

昨年までにG-CSF投与後の末梢血或いはアフエレーシス血から得られた単核球を用いることによって、通常の単核球より効率よくVα 24+NKT細胞が誘導可能であることを示してきた。これらの培養においては研究用のRPMI培地を用いるとともに、研究用のFBSを用いていた。臨床応用を考える場合、FBSは好ましくない。今回この問題を解決するために、ヒト血清・血漿並びにヒトアルブミンを用いた、臨床用細胞培地 (AIM培地) を用いた培養を試みた。その結果、AIM培地でもRPMI培地と比較して遜色なく培養が可能であることとともに、ヒト血清・血漿を用いれば、FBSを用いる以上に効率よくVα 24+NKT細胞の誘導が可能であることが明らかとなった。また、ヒトアルブミンではT細胞の増殖は見られるものの、NKT細胞の増殖はまったく得られないことが明らかとなった。

ヒト血清と血漿の間で、Vα 24+NKT細胞の増殖に与える影響に差は認められなかった。5%血漿

と10%血漿間でのVα 24+NKT細胞の増殖の差は見られなかった。

2) G-CSF 投与後の細胞を用いることで、Vα 24+NKT細胞の増殖は有為に増強された。

3) G-CSF 投与後の血漿を用いることで、Vα 24+NKT細胞の増殖は有為に増強された。

4) G-CSF 投与後の細胞と血漿の組み合わせは、Vα 24+NKT細胞を最も効率よく増殖させた。

5) G-CSF の投与前の血漿と比較して、G-CSF 投与後の血漿中には、G-CSF と共に IL-3 と IL-13 が高濃度に含まれていた。

6) 培養ヒト Vα 24+NKT 細胞を含む細胞群は、各種ヒト培養がん細胞に対して高い抗腫瘍活性を示した。この効果は、標的細胞のCD1dの発現量に左右されなかった。

7) 6) の細胞群から、MACS を用いて 95%以上純化した Vα 24+NKT 細胞も、各種がん細胞株に対して高い抗腫瘍活性を示した。この効果も、標的細胞のCD1dの発現量に左右されなかった。

8) 7) の細胞群から、MACS を用いて 95%以