

上に純化した V α 24⁺NKT 細胞は、IFN-gamma を高濃度に産生した。

D. 考察・結論

今年度に得られた成果は、1) 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た、2) G-CSF 投与後の単核球と血漿を用いることで、より効率よくヒト V α 24⁺NKT 細胞が増殖できることを確認した、3) われわれの条件で培養されるヒト V α 24⁺NKT 細胞は、主として IFN-gamma を産生することが明らかとなった、4) ヒト V α 24⁺NKT 細胞を多量に含む細胞群は、CD1d の発現量にとらわれず、広くヒトがん細胞を傷害することがあきらかとなった。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を示すことができたと確信する。

E. 健康危険情報 特記すべきことなし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ikarashi Y, Kato K, Yoshida M, Wakasugi H.

U1B3.3 monoclonal antibody recognizes a precursor of NK1.1⁺ cytotoxic T cells generated by interleukin-2. *Proc. Japan Acad.*, 78: 91-95, 2002.

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, 20: 448-459, 2002.

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
- 第 61 回日本癌学会総会 (東京) H14.10.1～H14.10.3 CD1d テトラマーによる α -galactosylceramide 反応性 NKT 細胞の解析: 五十嵐美德、飯塚明、吉田光二、若杉尋
2. 学会発表
- 第 6 回基盤的癌免疫研究会総会(久留米)H14.7.16～H14.7.17 α -galactosylceramide を用いて体外増殖したマウス NKT 細胞サブセットと抗腫瘍効果: 遅塚明貴、金井幸代、五十嵐美德、飯塚明、浅田留美子、加藤和則、平家勇司、吉田光二、高上洋一、若杉尋
- 第 61 回日本癌学会総会 (東京) H14.10.1～H14.10.3 α -galactosylceramide を用いて体外増殖したマウス NKT 細胞サブセットとその機能解析: 金井幸代、五十嵐美德、飯塚明貴、吉田光二、平家勇司、三上-浅田留美子、加藤和則、高上洋一、若杉尋
- 第 61 回日本癌学会総会 (東京) H14.10.1～H14.10.3 グニディマクリンの PKC β II 遺伝子を導入したヒト HLE 細胞への影響: 吉田光二、平家勇司、五十嵐美德、池川哲郎、若杉尋
- CD1&NK T Cell Workshop, 2nd International Workshop on CD1 Antigen Presentation and NK T Cells,(Woods Hole,Massachussetts) Nov.5-8, 2002. Expansion of Th0-type NK1.1-CD1d-restricted Natural Killer T(NKT) by α -galactosylceramide stimulation : Yoshinori Ikarashi, Sachiyo Kanai, Akira Iiduka, Hiro Wakasugi
- 第 61 回日本癌学会総会 (東京) H14.10.1～H14.10.3 Human B Dendritic Cell line : 松田和洋、市野瀬志津子、清水喜美子、佐藤結子、原田ゆきえ、若杉尋

第 32 回日本免疫学会総会 (東京) H14.12.4～

H14.12.6 SEREX 同定自己抗原認識

CD4⁺CD25⁺ T 細胞は腫瘍肺転移に関与する NKT

細胞を制御する : 西川博嘉、加藤琢磨、武光哲志、

俵功、五十嵐美德、若杉尋、栗林景容、珠玖洋

第 32 回日本免疫学会総会 (東京) H14.12.4～

H14.12.6 α -galactosylceramide 反応性

U5A2-13⁺T 細胞の解析 : 飯塚明、五十嵐美德、高

上洋一、若杉尋

H. 知的所有権の取得状況 なし

平成 14 年度厚生労働省厚生科学研究がん克服戦略研究事業

分担研究報告書

分担研究者 峯石 真 国立がんセンター中央病院特殊病棟部 造血幹細胞移植病棟医長

研究要旨 骨髄非破壊的同種移植を通常の移植法が適応とならない血液腫瘍やほかに治療法のない転移性固形腫瘍の患者に用いその安全性と有効性を確立する

研究目的 血液腫瘍や転移性固形腫瘍に対し同種移植による移植片対腫瘍 (Graft-versus-tumor, GVT) 効果による治療が有効である事を確認する。化学療法が効かない血液腫瘍や転移性固形腫瘍にはこれまで有効な治療法が無かった。このような腫瘍に対して GVT 効果による新しい治療法を開発する事を目的とする。この研究によって腎癌をはじめとする幾つかの固形腫瘍に対しては新しい標準的治療法となりうる方法が開発できる可能性がある。

B. 研究方法 通常の移植法の適応とならない血液腫瘍や他に治療法のない転移性固形腫瘍の患者をフルダラビン、ブスルファン (±ATG) の前処置の後に同種造血幹細胞移植を施行する。研究に参加するすべての患者に十分に説明し同意書を得た。移植後の生着の状態、血液細胞の混合キメラの状態、GVHD の程度、そして抗腫瘍効果を記載する。対象患者としては固形腫瘍においては GVT 効果の有効性が期待できる腎癌などの患者を対象とするほか、膵臓がんや大腸がんなど有効な可能性のある腫瘍に対する有効性を確認する。

C. 研究結果 血液腫瘍において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癌で 9 例中部分寛解 1 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、大腸がんなどでも部分寛解の例が見られた。

D. 考察 骨髄非破壊的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 GVT 効果を利用した免疫療法が有望であることを確認した。

E. 結論 GVT 効果を最大限に利用した骨髄非破壊的移植法は今後の血液・固形腫瘍の治療法に新しい発展をもたらす可能性のある治療法である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.
2. 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.
 3. 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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.
 7. 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.
- H. 知的財産権の出願
特になし

癌のワクチン療法に関する研究

分担研究者 伊東恭悟 久留米大学医学部免疫学講座教授

研究要旨 平成 14 年度は、前年に引き続き主に臨床研究として投与前の患者個々の免疫特性（ペプチド特異的 CTL 前駆体同定に基づく）に沿ったペプチドワクチン第 I 相臨床試験を 108 症例にて実施し、同年度内にほぼ終了した。その結果、有害事象はこれまでの評価可能な 108 症例（HLA-A24:78 症例、HLA-A2:30 症例）においてグレード I～II 以内であり、安全性が確認され、かつ特異的免疫誘導能は 6 回以上の投与症例においては 80%以上であった。臨床効果は、評価可能な 100 症例において、PR5、SD28 および PD67 例であった。PR 症例は子宮頸癌（2 例）、大腸癌、スキルス胃癌、再燃前立腺癌（各 1 例）に認められた。また著名な腫瘍縮小の他、高い QOL と生存率の延長が認められている。とりわけ高度進行肺癌では高い生存率が得られている。これらより、上記の癌種では早期第 II 相臨床試験への移行が可能と判断され、現在進行中である。

A. 研究目的

本研究の主目的は、癌に対する特異免疫療法の基礎及び臨床研究、とりわけペプチド特異的 CTL 前駆体同定に基づくペプチドワクチンの基礎及び臨床研究である。平成 14 年度は、前年に引き続き患者末梢血のワクチン候補ペプチドに対する CTL 前駆体を確認しての CTL precursor oriented-peptide vaccine（CTL 前駆体同定に基づくペプチドワクチン）の基礎及び臨床研究を実施した。

B. 研究方法

1) 癌ワクチン開発（臨床研究）：HLA 拘束性 CTL 誘導可能なペプチド分子については、GMP グレード（臨床応用可能）のペプチドを不完全フロインドアジュバンド（montanide ISA-51）と共に皮下投与する臨床第 I 相試験を開始した。個々のプロトコールについては、本学倫理委員会にて審査を受け承認されたものに限って開始した。エンドポイントは有害事象の有無及び CTL 誘導能の有無である。有害事象の判定は JCOG の毒性判断基準に従った。CTL 誘導能の有無は、CTL precursor frequency analysis を主として採用し、癌特異性及びペプチド特異性の両者を算出し、細胞性免疫の定量化を行った。

（倫理面への配慮）

本学内での倫理委員会での審査を経て、これまで 7 つの臨床試験を実施した。試験毎に専任の臨床研究コーディネーター（有医師資格の本学スタッフ）が、被験者から自由意志による十分な説明を受けた上での同意（インフォームド・コンセント）を得て

常時実施した。データマネージャー及び臨床試験看護婦の参加をえて、臨床研究の充実と患者や家族への十分な対応が可及的にできる体制をひいている。

C. 研究結果

本年度は、患者末梢血のペプチド特異的 CTL 前駆体を確認しての CTL precursor-oriented peptide vaccine を、HLA-A24 及び A2 の各種癌患者に対し第 I 相臨床試験を実施し、ほぼ終了した。これらは、症例毎に投与するペプチドが異なることからテラーメイド型ワクチンといえる。これまでに 108 症例が評価可能となったが、有害事象は局所炎症反応が 60%以上、全身倦怠感、発熱などが 30%近くの症例で認められたが、いずれもグレード I や II が主でありワクチンの安全性が確認された。HLA 拘束性癌特異的 CTL 活性は約 50%の症例において認められた。ペプチド特異的 CTL 誘導は 68%、ペプチドに対する血中 IgG 抗体の増強は 79%の症例において認められ、評価可能な 77 症例では全例において特異免疫誘導能が確認された。臨床効果においては、100 症例中腫瘍縮小やマーカー低下が一時的に認められた症例は 28 症例（28%）に及んだ。しかし、これらの抗腫瘍作用の多くは一時的であり、これまで臨床効果はワクチン単独症例では PR5、SD28、PD67 例であった。癌種別では子宮頸癌、大腸癌、スキルス胃癌及び再燃前立腺癌症例にて PR 症例が得られた。また肺癌では 1 年生存率が極めて良好であった。臨床効果とペプチドに対する特異免疫反応は良く相関した。とりわけ液性免疫誘導能と生存率が相関した。

D. 考察

平成 14 年にてテラーメイド型癌ペプチドワクチン第 I 相臨床試験がほぼ終了した。有害事象はグレード I ~ II 以内であり、ワクチンの安全性が確認された。臨床効果においては特異免疫が誘導されているにもかかわらず抗腫瘍作用が一過性である誘因には、高度進行癌細胞の HLA-クラス I 喪失が 30 ~ 50%におよび、その結果多くの癌細胞が免疫抵抗性であることが強く関与しているものと考えられる。しかしこのような高度進行癌のエスケープ現象にもかかわらず、ステージIV肺癌症例の 1 年生存率は 50%を超え、生存率延長においてはこれまでに報告のないほど優れた成果が認められている。生存率延長は再燃前立腺癌や大腸癌症例においても認められている。さらに、ワクチン単独群にて明らかな腫瘍縮小例や骨転移消失例などの症例も認められている。さらに、いずれの症例においても 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。これらは高度進行癌に対する抗癌剤や放射線治療での QOL 低下とは対称的であり、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が、平成 15 年度には終了し、報告予定である。

E. 結論

本年度はテラーメイド型の CTL precursor-oriented vaccine の第 I 相臨床試験が終了し、安全性と免疫反応性が確認された。また、臨床効果を目的とした早期第 II 相臨床試験を開始し、平成 15 年度内に数種類の癌種では終了する予定である。

F. 健康危険情報

ペプチドワクチン第 I 相臨床試験の有害事象としては、ワクチン投与部位の発赤、腫脹（グレード I）が 60%近くで認められ、硬結及び疼痛（グレード II）が 50%で認められた。全身倦怠感、発熱（グレード I ~ II）は 30%近くの症例で認められ、さらに前立腺癌症例の半数近くで血尿（グレード I ~ II）が認められた。また、肺癌の一症例において、限局性大腸炎（グレード III）が Lck₂₀₈ ペプチドなどのワクチン投与により誘発され、Lck₂₀₈ ペプチドワクチン中断により軽快した。以上、これまでの経験では（108 症例）いずれにおいても重篤な健康危険を疑わせる有害事象/薬物有害反応はワクチン投与により生じていないと判断される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. (英文査読誌掲載論文)

1. 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.* (in press), 2003
2. 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*, 63:854-858, 2003.
3. 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.* (in press)
4. 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 either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigen.* (in press)
5. 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.* (in press)
6. 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.* (in press)

7. 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*, 87:1006-1012, 2002.
 8. 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*, 87:796-804, 2002.
 9. 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*, 25:439-444, 2002.
 10. 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*, 99:409-417, 2002.
 11. Komatsu N, Shichijo S, Maeda Y and Itoh K, Measurement of interferon- γ by high-throughput fluorometric microvolume assay technology (FMAT) system. *J Immunological method*, 263:169-176, 2002.
 12. 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*, 59:259-272, 2002.
 13. 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 Immunology*, 32:826-836, 2002.
 14. Sasatomi T, Suefuji Y, Miyagi Y, Ogata H, Akagi T, Shirouzu K and Itoh K, Expression of tumor-rejection antigens in colorectal cancers. *Cancer*, 94:1636-1641, 2002.
 15. 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*, 93:198-208, 2002.
 16. 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*, 93:453-458, 2002.
 17. 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*, 51:219-228, 2002.
 18. 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 of pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 98:45-50, 2002.
- 1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)
【 伊東恭悟 主任研究者 】
1. 末次典恵, 田村真由美, 久富瑞穂, 野口正典, 伊東恭悟:再燃前立腺癌患者に対する癌ペプチドワクチン療法の第 I 相臨床試験におけるリサーチナーズの役割. *日本がん看護学会誌*, 2002;16(2): 79-88.
 2. 助廣亜希, 津田尚武, 望月一生, 田村真由美, 雲井加代子, 伊東恭悟:癌ペプチドワクチン臨床試験を受ける再発婦人科癌患者の看護-第 I 相臨床試験へのクリニカルリサーチナーズとしての関与を通して-. *日本がん看護学会誌*, 2003;17(1) in press.

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

【伊東恭悟 主任研究者】

1. 峯 孝志, 伊東恭悟, 山名秀明, 白水和雄: テーラーメイドがん免疫治療: ゲノムからベッドへの先導役. 外科, 南江堂, 2002;64:269-274.

2. 野口正典, 平林康男, 野田進士, 山名秀明, 末次典恵, 伊東恭悟: 再燃前立腺癌における癌ペプチド療法の展望. 西日本泌尿器科, 2002;64:253-259.

3. 神田達夫, 高橋益廣, 海部 勉, 小杉伸一, 中川悟, 西巻 正, 伊東恭悟, 畠山勝義: 高度進行・再発食道癌に対する腫瘍拒絶抗原ペプチドでパルスした樹状細胞による癌ワクチン療法. 日本気管食道科学会会報, 2002;53(2):153-154.

4. 伊東恭悟, 山名秀明, 笹富輝男, 峯 孝志: テーラーメイド癌免疫治療: ゲノムからベッドへの先導役. 日本外科学会誌, 2002;103:42.

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

1-4. 論文発表 (著書)

【伊東恭悟 主任研究者】

1. 伊東恭悟, 片桐和子: 免疫療法: 初心者も活用できるがん医療・看護～集学的治療・全人的ケアをめざして～. 南山堂. 16-22, 2002.

2. Akira Yamada, Hideaki Yamana and Kyogo Itoh: Development of peptide-based vaccines for epithelial cancer. Res. Adv. in Cancer 2. 241-247, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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/JP02/06298 (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/JP02/12893 (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)

難治性癌に対するワクチン療法の開発と臨床評価

研究者 珠玖 洋 三重大学医学部 教授

研究要旨：本研究で我々は、野生型原癌遺伝子 HER2 を標的とした細胞性免疫による癌の免疫的治療を開発する。具体的には、HER2 蛋白内に含まれる CTL エピトープ及びヘルパーエピトープの両者を提示し得る組み替え蛋白と疎水化多糖類プルランとの複合体により、独自の癌ワクチン開発を行う。本年度は腫瘍由来のヘルパーエピトープの存在が HER2 由来エピトープに反応する CD8⁺CTL の活性を増強し、個体の癌拒絶能を増強することを明らかにした。又、HER2 に由来する CTL エピトープによる臨床第 I 相試験を行った。

A. 研究目的

本研究は乳癌、卵巣癌、非小細胞性肺癌等の 20～40%に発現されている野生型原癌遺伝子 HER2 を標的としてのワクチン療法を中心とした免疫療法の開発を目指すものである。日本人の約 60%が所有している HLA-A2402 結合性 HER2 由来ペプチドを既に同定していることより、多くの癌患者を対象とした治療法として展開する可能性が期待出来る。本研究では、既に同定した HER2p63-71 ペプチドを含んだ HER2 組み換え蛋白を用いた癌ワクチンの基礎的臨床的な開発研究と共に、免疫的モニタリング法の検討、及びサイトカインや樹状細胞の使用によるより有効な免疫治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

- (1) ペプチド特異的 CD8⁺T 細胞数の測定には、IFN γ 産生 CD8⁺T 細胞数測定のエリスポットアッセイを行った。
- (2) 腫瘍細胞の転移測定には BALB/c マウス由来の CMS5m 株を用い、 1×10^6 接種（静注）後 21～28 日後の肺転移結節を測定した。（倫理面への配慮）
「HER2 発現乳癌、卵巣癌、胃癌または肺癌患者に対する HLA-A2402 結合性 HER2 由来ペプチドによる免疫的治療-第 I 相試験-」は三重大学医学部研究等に関する倫理委員会の承認を受けた。（1998 年 9 月 28 日）

C. 研究結果

1.腫瘍拒絶の誘導における、腫瘍由来のヘルパーエピトープの重要性を明らかにするために、マウス MHC クラス II A^d 拘束性の 2 種のヘルパーエピトープ、HER2₁₆₋₃₀ 及び OVA₃₂₃₋₃₃₉ を用いて検討した。2 種のヘルパーエピトープは HER2p63 ペプチド特異的 CD8⁺T 細胞に対して、腫瘍非存在化ではほぼ同レベルのヘルパー効果を示した。肺転移を示す CMS5m 肉腫に、HER2cDNA のみ、HER2 及び OVAcDNA の両

者を導入し発現する CMS5mHE 及び CMS5m HEOVA を作製し、CTL エピトープ及びヘルパーエピトープによる転移阻止実験を行った。CMS5mHE を用いた実験では、HER2p63CTL エピトープと HER2₁₆₋₃₀ ヘルパーエピトープの両者を投与した宿主においてのみ、転移予防が可能であった。HER2p63CTL エピトープ単独、HER2p63CTL エピトープと OVA₃₂₃₋₃₃₉ ヘルパーエピトープの両者、又はいずれかのヘルパーエピトープを投与されたマウスでは、いずれも多数の肺転移結節が確認されると共に、宿主は 30 日以内に全て死亡した。一方、HER2 及び OVA 発現の CMS5mHEOVA を用いた実験では、HER2₁₆₋₃₀ ヘルパーエピトープ及び OVA₃₂₃₋₃₃₉ ヘルパーエピトープを各々 CTL エピトープと共免疫することにより、ほぼ同様の肺転移の強い抑制が確認され、両実験システムにおいて、腫瘍に由来するヘルパーエピトープの重要性が強く示唆された。

2. “HER2 発現乳癌、卵巣癌、胃癌または肺癌患者に対する HLA-A2402 結合性 HER2 由来ペプチドによる免疫的治療-第 1 相試験-” を HER2 抗原由来ペプチド p63-71 の安全性評価を目的とした用量増加試験で行った。ペプチドは 2 週間隔で皮内投与し、試験内では計 5 回の免疫を行った。3 回まではペプチド単独、4、5 回は rhGM-CSF 75 μ g を併用投与した。継続希望者にはさらにペプチド+GM-CSF を反復投与した。10 例（乳癌 8 例、肺癌 1 例、卵巣癌 1 例）が登録され、安全性評価では皮内投与部位の発赤、搔痒（grade 1）が 1 例にみられるのみで他の有害事象はみられなかった。HER2 抗原は正常尿細管、胆管、腸管上皮に発現すると報告されているが、これらの障害を示す症状・所見はなかった。HER2p63 に対する特異的免疫応答を評価するため、テトラマー解析、ELISPOT アッセイを行い 1 例でワクチン後末梢血中ペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞が検出された。臨床観察では腫瘍縮小効果はみられなかったが、NC 症例が現在迄 10 例中 3 例であり他の例はすべて PD となった。

D. 考察

本年度の研究では、CD4⁺T細胞の重要性を明らかにした。肺転移抑制実験で、CTL エピトープと共に腫瘍由来のヘルパーエピトープを用いることの重要性が明らかとなった。現在メラノーマ等に対する癌ワクチンの臨床試験で、CTL エピトープに加えてKLH等の外来性ヘルパーエピトープが多く用いられている。これは、これ迄多くの患者さんに利用できるような腫瘍由来ヘルパーエピトープが同定されていないことにもよる。しかし、今後より効果的な癌ワクチンを作製するためには、腫瘍発現ヘルパー抗原を合わせて利用することが *in vivo* 腫瘍抑制効果に極めて重要であることが示された。HER2p63 ペプチドによる臨床第 I 相試験は当初予定の 12 名中 10 名を登録し、これまでペプチド 300 μg までは安全であることを確認した。現時点での解析は、ペプチド 3 回及び 5 回投与の検体が主体となっており、免疫応答が限られていることが予想される。今後継続投与する患者さんにおける免疫応答を詳細にモニターしていく予定である。一方 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ことの期待される HER2 組み替え蛋白と疎水化多糖類の複合体 (CHP-HER2) の臨床試験については、GMP 基準のクリニカルグレードの複合体作製を終了した。又、前臨床試験における動物を用いた毒性試験での安全性確認を終了し、平成 14 年 9 月 20 日に三重大学医学部研究倫理委員会の承認を受けた。

E. 今後のより有効な癌ワクチンにとって、適切なヘルパーエピトープは極めて重要である。

F. 健康危険情報

現時点では該当するものはなし。

G. 研究発表

1. 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.* 63:60-66, 2003.
2. 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 1-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide-truncated HER2 protein complex: implications for a polyvalent immuno-cell therapy. *Blood.* 99:3717-3724, 2002.
3. 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.* 9:879-888, 2002.
4. Nishii, K., Katayama, N., and Shiku, H.: Adult acute myeloid leukemia cells do not express non-functional Ikaros isoforms. *Blood.* 100:3436-3437, 2002.
5. 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.* 99:815-21, 2002.
6. 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.* 21:795-801, 2002.
7. 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.* 75:269-276, 2002.
8. 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.**
16:1285-1292,2002.

9. **Kobayashi, T., Sawa, H., Morikawa, J., Ueno, S., Katayama, N., Zhang, W. and Shiku H.**: Bax-induction alone is sufficient to activate apoptosis cascade in wild-type Bax-bearing K562 cells, and the initiation of apoptosis requires simultaneous caspase activation. **Int J Oncol. 20:723-728,2002.**

H.知的財産権の出願、登録状況（予定含）

現時点では該当するものはなし。

膵癌の免疫療法に関する研究

分担研究者 岡 正朗 山口大学医学部教授

研究要旨：本研究は難治性癌の一つである膵癌に対する新しい癌免疫療法を確立することを目的とし、細胞療法と癌ワクチン療法について検討した。細胞療法としては、膵癌切除例に対するMUC1-CTL療法と膵癌非切除・再発例に対するMUC1-CTL+DC療法を検討した。癌ワクチン療法としては、高度進行膵癌患者を対象に腫瘍抗原ペプチドワクチン療法とMUC1ペプチドワクチン療法を検討した。臨床効果として、細胞療法に関しては、肝転移抑制と予後の改善を認め、特に膵癌切除例におけるMUC1-CTL療法では、一年生存率は86.2%と従来の成績に比べ、良好であった。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。腫瘍抗原ペプチドワクチン療法に関しては後腹膜リンパ節転移症例に対して延命効果を認めた。

今後、細胞療法における肝転移抑制効果と腫瘍抗原ペプチドワクチン療法における後腹膜再発抑制効果を期待し、新たな複合的免疫療法の研究を要する。

A. 研究目的

悪性腫瘍は世界で800万人以上が罹患しており、また、我が国の国民死亡原因の第1位を占め国民の最も関心の高い疾患である。なかでも膵癌は消化器癌の中で最も予後不良であり、本研究は膵癌に対する新しい免疫療法を検証し、臨床応用されることを目的とする。

B. 研究方法

1. 膵癌に対する細胞療法

A) 膵癌切除例に対するMUC1-CTL療法

膵癌切除例において、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3回施行し、安全性と臨床効果を検討した。施行した細胞療法は患者末梢血リンパ球を採取し、糖鎖抗原MUC1高発現ヒト膵癌細胞株YPK-1と混合培養して誘導したMUC1-CTLを用いた。

B) 膵癌非切除・再発例に対するMUC1-CTL+DC療法

膵癌非切除・再発例に対して、細胞療法を繰り返し施行し、安全性と臨床効果を検討した。施行した細胞療法としては上述のMUC1-CTLに加え、患者末梢血より樹状細胞(DC)を採取し、105merMUC1ペプチド(GMP grade)にて刺激・誘導したMUC1-DCを用いた。

2. 膵癌に対する癌ワクチン療法

A) 腫瘍抗原ペプチドワクチン療法

多数の腫瘍抗原ペプチドの中から、個々の患者に有効なペプチドを決定する新細胞性免疫定性法を用いた第I相臨床試験を施行し、安全性と臨床効果を

検討した。対象はHLA-A24もしくはHLA-A2陽性で本研究への参加を同意した高度進行膵癌患者で、新細胞性免疫定性法にて反応性を認めたペプチドワクチンの中から良好なものを最大4種類選択し、各ペプチド3mgと不完全フロイントアジュバント(IFA)を混合したペプチドワクチンを2週間隔で3回投与した。

B) MUC1ペプチドワクチン療法

105merMUC1ペプチド(GMP grade)を用いて第I相臨床試験を施行し、安全性と臨床効果を検討した。ペプチド1回投与量は300、1,000、3,000 μ gの3段階のdose escalationとし、MUC1ペプチド3mgとIFAを混合したペプチドワクチンを2週間隔で3回投与した。

(倫理面への配慮)本研究における各種治療法は山口大学審査委員会での審査承認を得たのち、当該研究分担者(医師)が被験者から文書での十分な説明を受けた上での自由意志による同意(インフォームド・コンセント)を得て実施している。

C. 研究結果

1. 膵癌に対する細胞療法

A) 膵癌切除例に対するMUC1-CTL療法

15例に施行し、安全性に関しては、副作用を認めず、安全性が確かめられた。15例中2例が術後48ヶ月、23ヶ月と無再発生存中である。一年生存率は86.2%と従来の成績に比べ、予後の改善を認めた。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。

B) 膵癌非切除・再発例に対するMUC1-CTL+DC療法

9例に施行し、安全性に関しては、副作用を認めず、安全性が確かめられた。9例施行した中で切除後多発肺転移1例が35ヶ月生存し、H2（肝両葉にわたり少数散在性の転移が認められる）の1症例が12ヶ月後死亡と治療効果を認めた。

2. 膵癌に対する癌ワクチン療法

A) 腫瘍抗原ペプチドワクチン療法

10例に施行し、安全性に関しては、局所発赤・腫脹が7例で全てgrade Iであり、発熱が7例と全てgrade II以下、grade Iの食欲不振を2例に認めた以外は副作用を認めず、安全性が確かめられた。臨床効果については、3回投与終了後NC3例、PD7例であった。NC症例の内訳は腹腔内リンパ節再発2例、腹腔内リンパ節再発および骨転移1例であった。予後に関しては、最低3ヶ月で死亡したが、NCの1症例は14ヶ月生存中であり、継続投与を行っている。

B) MUC1ペプチドワクチン療法

9例に施行し、安全性に関しては、副作用を認めず、安全性が確かめられた。臨床効果については、3回投与終了後NC1例、PD8例であった。NC症例の内訳は腫瘍マーカー上昇例で、本療法により腫瘍マーカーの低下を認めた。予後に関しては、最低3ヶ月で死亡したが、NCの1症例は20ヶ月生存中で、腫瘍マーカーの再上昇は認めていない。

D. 考察

本研究で施行した細胞療法および癌ワクチン療法は安全に施行できると考えられる。

臨床効果に関しては、細胞療法においては肝転移の抑制と予後の改善を認めた。特に膵癌切除例に対するMUC1-CTL療法においては、肝再発が15例中1例（6.7%）と有意に肝転移再発を抑制しており、その機序としては術前・中から存在する微小肝転移細胞に対し、細胞性免疫が低下する周術期に、膵癌特異的CTLを移入することで抗腫瘍効果を発揮するものと考えられ、移入する細胞が膵癌特異的であることと移入する時期が肝要と考えられた。また、腫瘍抗原ペプチドワクチン療法においては、CR症例は得られなかったものの、後腹膜リンパ節転移3症例においてはNCが得られており、うち1例において14ヶ月生存中の症例が得られている。本症例は、long NCの状態であり、膵癌の予後を考えると、ペプチド療法には延命効果があると考えられる。これらNC症例における臨床効果の機序として、癌ペプチドワクチン投与が大腿部皮下に行われ、リンパの流れから投与されたペプチドは後腹膜沿いのリンパ管から、後腹膜リンパ節に到達し、同部の抗原提示細胞に取り込まれ、CTLを誘導して抗腫瘍活性が増強されたとも考えられる。

E. 結論

本研究で施行した細胞療法および癌ワクチン療法の安全性と有効性が確認された。有効性に関しては、特に細胞療法における肝転移抑制効果と腫瘍抗原ペプチドワクチン療法における後腹膜再発抑制効果を認めた。今後、細胞療法と腫瘍抗原ペプチドワクチン療法を併用した新たな複合的免疫療法の検討する予定である。

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

1-1. 論文発表（英文査読誌掲載論文）

1. 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)
2. 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)
3. 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*. 26(1):E12-E17, 2002.
4. 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*, 49(1-2):33-42, 2002.
5. 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*, 10:102(5):526-529, 2002.
6. Sasaki K, Sato K, Akiyama Y, Yanagihara K, Oka M and 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*, 62:4894-4898, 2002.
7. 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*, 16:1615-1619, 2002.

8. Nakamura M, Oka M, Iizuka N, Kawauchi S, Gondo T and Ueno T, Tangoku A. Osteopontin Expression in Chronic Pancreatitis. *Pancreas*, 25(2):182-187, 2002.

9. 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*, 62:3939-3944, 2002.

10. 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*, 10:99(2):286-291, 2002.

11. 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*, 1:98(1):45-50, 2002.

12. 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*, 8(2):526-533, 2002.

13. 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*, 16:56-58, 2002.

14. 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*, 4:21(8):1208-1216, 2002.

15. 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*, 176(2):129-135, 2002.

1-2. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

1. 鈴木伸明, 岡 正朗: 消化器癌のワクチン療法. *消化器外科*, 2002;25:1841-1846.

1-3. 論文発表 (著書)

なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)

1. Nobuaki Suzuki, Yoshiaki Maeda, Shoko Tanaka, Naoya Hida, Takashi Mine, Koutaro Yamamoto, Kyo go Itoh and Masaaki Oka. Evaluation of Immuno-reactivities using MUC1 Peptide-pulsed Dendritic Cells for Patients with Unresectable Pancreatic Cancer. The 5th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Tokyo, Japan. (2002. 4. 25~29)

2. Koutaro Yamamoto, Tomio Ueno, Yahara Noboru, Tooru Kawaoka, Masaaki Oka. Radical Operation for Invasive Pancreatic Cancer with Hemi-circle Plexus Preservation. The 5th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Tokyo, Japan. (2002. 4. 25~29)

3. Noboru Yahara, Shoichi Hazama, Toru Kawaoka, Kohtarou Yamamoto, Tomio Ueno, Akira Tangoku, Masaaki Oka. Evaluation of Immuno-reactive using MUC1 Peptide-pulsed Dendritic Cells for Patients with Unresectable Pancreatic Cancer. The 5th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Tokyo, Japan. (2002. 4. 25~29)

2-2. 国内学会発表

1. 鈴木伸明、田中 聖子、檜田 直也、前田 好章、峯 孝志、山本光太郎、裕 彰一、丹黒 章、伊東 恭悟、岡 正朗: 膵癌に対するペプチドワクチン療法の可能性. 第102回日本外科学会総会, 2002年4月11-13, 京都.

2. 山本光太郎、上野富雄、中邑光夫、矢原 昇、河岡 徹、丹黒 章、岡 正朗: 遠隔成績およびQOLからみた膵頭部浸潤性膵管癌に対する治療方針. 第102回日本外科学会総会, 2002年4月11-13, 京都.

3. 矢原 昇、裕 彰一、上野富雄、山本光太郎、中邑光夫、鈴木伸明、荒木厚博、丹黒 章、岡 正朗: 膵癌に対するMUC1-CTL療法におけるCTL誘導能の検討—移行細胞数と表面マーカーの解析より—. 第102回日本外科学会総会, 2002年4月11-13, 京都.

4. 鈴木伸明、前田好章、檜田直也、田中聖子、峯 孝志、山本光太郎、裕 彰一、丹黒 章、伊東恭悟、岡 正朗: 高度進行膵癌に対するペプチドワクチン療法. 第57回日本消化器外科学会総会, 2002年7月28-30, 京都.

5. 山本光太郎、矢原 昇、河岡 徹、上野富雄、岡 正朗:膵癌に対する多角的免疫治療. 第33回日本膵臓学会大会, 2002年9月4-5, 仙台.

6. 山本光太郎、裕 彰一、吉野茂文、吉村 清、荒木厚博、河岡 徹、末廣 寛、濱中裕一郎、日野田裕治、岡 正朗:膵・胆管癌に対するMUC 1 ペプチドワクチン療法第 I 相試験. 第61回日本癌学会, 2002年10月1-3, 東京.

7. 山本光太郎、上野富雄、矢原 昇、河岡 徹、裕 彰一、丹黒 章、岡 正朗:膵癌に対する多角的免疫治療戦略. 第40回日本癌治療学会, 2002年10月16-18, 東京.

8. 岡 正朗:膵癌に対する免疫療法. 第40回日本癌治療学会, 2002年10月16-18, 東京.

9. 河岡 徹、裕 彰一、矢原 昇、山本光太郎、吉野茂文、岡 正朗:切除不能・再発膵癌に対する細胞・ワクチン療法併用の試み. 第15回バイオセラピー学会, 2002年11月7-8日, 札幌.

10. 山本光太郎、鈴木伸明、裕 彰一、吉野茂文、矢原 昇、荒木厚博、河岡 徹、末廣 寛、濱中裕一郎、日野田裕治、岡 正朗:膵癌に対する癌ペプチドワクチン療法第1相試験の成績. 第15回バイオセラピー学会, 2002年11月7-8日, 札幌.

11. 伊東恭悟、峯 孝志、山名秀明、佐藤裕二、藤堂省、岡 正朗:上皮性癌ペプチドワクチンの臨床試験; 第一相から第二相へ. 第15回バイオセラピー学会, 2002年11月7-8日, 札幌.

12. 山本光太郎、上野富雄、矢原 昇、河岡 徹、裕 彰一、丹黒 章、岡 正朗:膵癌に対する外科治療成績と今後の治療戦略. 第64回日本臨床外科学会, 2002年11月13-15, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし(予定を含む)
2. 実用新案登録
なし(予定を含む)
3. その他
なし(予定を含む)

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

分担研究者

望月 徹

静岡県立大学薬学部・助教授

研究要旨

細胞膜透過性ペプチドである PTHrP の核移行シグナル配列 (87-107)内には、他の細胞膜透過性ペプチドとは異なり酸性アミノ酸が2個存在する。このペプチド配列のN末端2アミノ酸残基を順次欠いた PTHrP(89-107), (91-107), (93-107), (95-107) および (97-107) を合成し、ヒト肺小細胞がん培養細胞株 SBC-3A における細胞膜透過活性を指標とする構造—活性相関を検討した。その結果、PTHrP(89-107), (91-107), (93-107), および(95-107) は PTHrP(87-107) と同様細胞質のみならず細胞核に多く集積するが、一方 PTHrP(97-107) は細胞質のみに分布し核には取り込まれないことを明らかにした。さらに、ここに見出した PTHrP(97-107)のがん免疫療法における有用性を検討する目的で CEA がん抗原エピトープ関連ペプチドとの複合体の合成を行った。

A. 研究目的

がん抗原ペプチドを長時間抗原提示細胞表面に提示させることにより効率よく CTL が誘導できるとの仮説を基に、先ず細胞質滞留型細胞膜透過性ペプチドを見出し、次いで見出した新規細胞質滞留型細胞膜透過性ペプチドと大分子型がん抗原ペプチドの複合体の化学合成を行い、その CTL 誘導活性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

分子内に2個の酸性アミノ酸が存在するという細胞膜透過性ペプチドとしては特異な構造を有する PTHrP の核移行シグナルである PTHrP(87-107) 配列に着目し、その N 末端より順次2アミノ酸残基を欠く Cys-PTHrP(89-107), (91-107), (93-107), (95-107) および (97-107) を合成後各ペプチドのN末端Cysの側鎖に Fluorescein を導入し蛍光標識化した。

合成標識化 PTHrP(87-107) 関連ペプチドをヒト肺小細胞がん培養株 SBC-3A の培地に添加し、各ペプチドの細胞膜透過活性および細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

その結果、細胞膜透過活性を有しながら細胞核にまで移行せず細胞質に滞留することが明らかになった Cys-PTHrP(97-107)と大分子型がん抗原ペプチド複合体の合成を検討した。すなわち、大分子型がん抗原ペプチドとしては CEA の HLA-24 peptide motif を2および3種類含む CEA(409-436) および CEA(231-244+409-436) を選択し、それぞれのN末端に Cys 残基を導入した H-Cys-CEA(409-436) および H-Cys-CEA(231-244 + 409-436) を合成した後シスチン結合で架橋した H-Cys-PTHrP(97-107) および H-Cys-CEA(409-436)

H-Cys-PTHrP(97-107)

H-Cys-CEA(231-244+409-436)

を調製した。

いずれのペプチドもその化学合成は固相法で行った。すなわち固相担体としては PAM-樹脂を用い、TBTU/HOBt を縮合剤として C 末端より順次 Boc-アミノ酸を導入してペプチド鎖を延長した。得られた保護ペプチド樹脂を液体 HF で処理することによりペプチドを樹脂より脱離し同時に側鎖保護基を除去して粗製ペプチドを得た。粗製ペプチドは、0.01N HCL/CH₃CN を溶出溶媒とする逆相 HPLC で高純度に精製した。

蛍光標識化 PTHrP(87-107) 関連ペプチドの細胞膜透過活性は以下の方法で検討した。

ヒト肺小細胞がん培養細胞 SBC-3A を、10%(v/v) ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地中で 5% CO₂ 下 37°C で前培養した後、1mM EDTA/リン酸緩衝液{PBS(-)}中 0.05% trypsin でフラスコから剥離した。続いて、PBS(-) で洗浄後 8 ウェル LAB-TEK II Camber Slide に 5x10⁴ cell/ well 撒き 37°C で 24 時間プレインキュベーションした後、培地を 5 μM, 10 μM あるいは 20 μM のペプチドを含む培地に置換しさらに 6 時間インキュベーションした。培地を除去した後 3.7% formaldehyde で細胞を固定後 PBS で 3 回洗浄し Vectashield で封入したものを試料とし、488nm で励起、515nm の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

合成した全てのペプチドは、いずれも酸加水分解物のアミノ酸分析、FAB 質量分析および逆相 HPLC により高純度単一物質であることを証明した。また合成収率は

PTHrP 関連ペプチドでは 51-63%, 大分子型の CEA(409-436) および CEA(231-244+409-436) では 33% と 25% であり満足すべき者であった。Fluorescein で蛍光標識した PTHrP(87-107) 関連ペプチドは、SBC-3A 細胞に 5 μM, 10 μM および 20 μM 濃度で培養液に添加し 5 時間培養した結果、いずれの濃度においても細胞内に移行した像が観察され PTHrP(89-107), (91-107) は細胞膜透過性ペプチドとして報告されている Tat(48-60) と同様殆どが細胞核に集積されていた。また、PTHrP(93-107), (95-107) は細胞核および細胞質の両者に分布し、一方 PTHrP(97-107) は細胞質のみに分布することが初めて観察された。さらに、PTHrP(97-107) と CEA(409-436) あるいは CEA(231-244+409-436) のシスチン架橋反応はほぼ定量的に進行し、予想される副産物であるそれぞれのホモダイマーの生成は認められなかった。

D. 考察

本研究では、大分子型がん抗原ペプチドをリンパ細胞に強制的に取り込ませ、細胞内でプロセスされて生成するがん抗原エпитープを抗原提示細胞表面に長時間提示させることにより、効率的に CTL 活性を誘導することを可能にするがん抗原ペプチド関連物質を見出すことを目的とした。すなわち、大分子型がん抗原ペプチドとしては CEA 内の HLA-A24peptide motif を 2 あるいは 3 種類含むペプチドを、また細胞膜透過性ペプチドとしては本研究で新たに見出した主に細胞質にのみ取り込まれる PTHrP(97-107) を用い、両者の複合体の合成を検討した。大分子型がん抗原ペプチド

と細胞膜透過性ペプチドはそれぞれN末端に Cys 残基を導入し、両者をシスチン結合で架橋する方法を採用し高収率で複合体を得ることに成功した。本研究で細胞膜透過性ペプチドとして用いた PTHrP(97-107) は、Tat ペプチドのような既知の細胞膜透過性ペプチドとは異なり細胞核には移行しないことより細胞毒性の少ないペプチドであることが予想されることから、本研究で合成したがん抗原ペプチド関連物質は副作用の少ない CTL 誘導物質として期待されるものである。

E. 結論

がん抗原ペプチドを強制的にリンパ細胞に取り込ませプロセスングにより生成するエピトープを抗原提示細胞表面に提示させることにより、効率的に CTL 活性を誘導可能にするが抗原ペプチド関連物質の開発を目的として先ず、PTHrP(87-107) の N 末端から順次2アミノ酸残基を欠く5種類の関連ペプチドを合成しその細胞膜透過活性を検討した。その結果 PTHrP(97-107) が細胞質滞留性細胞膜透過ペプチドであることを初めて見出した。この PTHrP(97-107) に 大分子型のがん抗原ペプチドである合成 CEA(409-436) および CEA(231-244+409-436) をシスチン架橋した膜透過性ペプチドーがん抗原ペプチド複合体を合成した。

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

1. Sugatani, N., Komiyama, N.,

Mochizuki, T., Hoshino, M., Miyamoto, D., Igarashi, T., Hoshi, S., Miwa, M. : Urinary concentrating defect in rat given Shiga toxin; elevation in urinary AQP2 level associated with polyuria. Life Sciences, 71. 171-189(2002)

2. Matsuda, K., Onoue, S., Kashimoto, K., Hamakawa, A., Uchiyama, M., Mochizuki, T., Arimura, A. : A newly developed enzyme-immunoassay for measuring the tissue contents of PACAP in fish. Peptide, 23, 1741-1750(2002)

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. Immunology Letters, 83, 21-30(2002)

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
平成14年度 分担研究報告書

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

分担研究者 福島 雅典 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

ユニークな作用機構を持つ新規抗がん薬候補化合物、抗腫瘍性プロスタグランジン(PG)製剤 Δ^7 -PGA₁-リピッドミクロスフェアは、既に臨床試験使用可能なGMPグレードの製剤が準備でき、概要書、プロトコルもできて第一相試験を実行できる段階にある。

本剤の至適投与方法は持続点滴、皮下注射、または腫瘍内投与である。動物実験では、本剤の投与を止めると一定期間後に腫瘍が増大する。そこで臨床での効果を安全に、より確実なものにするため、新しい抗腫瘍免疫応答誘導技術の開発を進めた。

その一つとして、腫瘍に高電圧で極めて短時間通電する電気化学療法的アプローチを検討したが、腫瘍サイズ、形状により著しく制限されるため、デバイス開発が難しく、臨床の実用性には問題があることが判明し、臨床には入っていない。

そこで、癌治療に応用できる全く新しい、安価で安全な免疫応答誘導・免疫強化のための新技術開発に着手し、ミリガウス低周波交流磁界発生装置の強い生物学的活性を見出した。すなわち、10mGauss 6Hzパルス交流磁界を印加したリン酸緩衝液(PBS)はヒト好中球の貪食能を著しく亢進するほか、NK活性も促進する。ミリガウス低周波交流磁界を発生する装置は極めて簡便で、このような非侵襲性的な方法で免疫系を賦活できる可能性があることが明らかになった。

A. 研究目的

本研究の目的は、抗腫瘍性PGの効果を安全により確実なものにするため、新しい安全な免疫応答誘導技術を開発することである。そこで、これまでに非常に多くの研究がなされ、臨床にも一部応用されているながらデータがまちまちで結論が出ていない、磁界の生体免疫への影響に着目し、系統的に研究を行うこととした。

B. 研究方法

磁界の免疫応答誘導の可能性を探るため、10mGauss 6Hzパルス交流磁界を発生する直径10cmコイルを作成した。

次に、PBS(250mlボトル)を磁界発生コイル内に置き、10mGauss 6Hzパルス磁界を1時間印加した後、12時間常温に放置し、磁化PBSのヒト白血球貪食能に対する効果を測定した。好中球は、健康なヒト末梢血より調製した。好中球を磁化PBSまたはコントロールPBS好中球で1時間常温でインキュベーション後にルミスフェア粒子を加えて貪食活性を計測した。細胞内カルシウム濃度は好中球をRPM I 1640にFura2/AMカルシウムインディケータを添加して45分インキュベートし、磁化PBSまたはコントロールPBS好中球を加えて測定した。

C. 研究結果

磁化PBSはヒト好中球の貪食能を著しく亢進したが、コントロールPBSにはそのような効果はなかった。また磁化PBSは好中球の細胞内カルシウム

濃度を上昇させたが、コントロールPBSには効果はなかった。

D. 考察

これまでに、50-60Hz、0.1-22mTの磁界が好中球貪食に伴う酸化的バーストを促進すること、低周波磁界がHL-60細胞内カルシウム濃度を上昇させることが報告されていたが、磁界を印加した溶液自体が生化学的活性を持つことは新しい発見である。低周波ミリガウス磁界により、リン酸緩衝液にどのような変化が起きているのか解明を進めている。

E. 結論

ミリガウス低周波交流磁界を安定的に発生し、かつその強度、周波数等制御できる簡便なデバイスを開発し、同上磁界に曝露したPBSにはヒト白血球貪食能、NK細胞活性を刺激し、促進する効果があることが明らかになった。

低周波ミリガウス磁界にはまだ知られていない物理化学的作用があり、今後研究を進める価値があると考えられるので、広く生物学的活性を含めて検討したい。

F. 健康危険情報

現代生活に氾濫している電磁波は、50Hz-60Hzで強い磁界を伴う。(例えば、携帯電話は1cmで100Gaussある。)上記の事実から、電磁波が生体に何らかの影響があることは確実と考えられる。