

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に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 山口 建

平成16年 4月

目 次

I. 総括研究報告

新しいがん免疫療法の研究
山口 建

II. 分担研究報告

1. がん免疫療法の新しい技術に関する研究
山口 建
2. 樹状細胞を用いたがんの免疫療法に関する研究
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. 骨髄非破壊的同種造血幹細胞の開発に関する研究
田野崎 隆二
5. 癌のワクチン療法に関する研究
山田 亮名
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. がんの免疫療法に関する研究
岡 正朗
8. 抗原原性がん抗原ペプチドの開発
望月 徹
9. 免疫誘導応答のための新技術開発の基礎的検討
福島 雅典

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。本年度は、最終年度として安全性の評価を主な目的とした臨床第 I 相試験に続いて抗腫瘍効果の評価を目的とした第 II 相試験がいくつかの施設で施行されている。具体的には、細胞療法プロジェクトでは、転移性メラノーマや切除除がんを対象として樹状細胞や CTL 細胞を用いた臨床試験を継続している。HLA 非拘束性に抗腫瘍効果を示す NK 様 T 細胞の前臨床試験として担がん患者の末梢血から培養した NK 様 T 細胞について生物活性を中心に詳細な機能解析を行っている。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、転移性腎がん症例を対象とした臨床第 I 相試験が終了しており、治療の安全性が確認された。がんのワクチン療法プロジェクトでは、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（テラーメイドワクチン）の臨床第 I 相試験が終了した。治療による有意な副作用は認められず、また前立腺がん症例において生存期間延長に対する効果が示された。さらに HER2 陽性の難治性固形がんを対象に CTL およびヘルパーエpitep 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 相試験が開始され、従来のペプチドワクチンと比較して効果の増強が期待される。次に本研究においては、以上の臨床試験と平行して新規の腫瘍抗原の探索などの基礎的検討も行っている。膵がん培養細胞表面の HLA クラス I タンパクに結合している免疫活性ペプチドの同定を目的として MALDI-TOF/TOF MS 法と HLA 結合モチーフ検索を組み合わせてペプチドの解析を行っている。また肺がんの腫瘍より樹立した CTL クローンと腫瘍由来 cDNA ライブラリーを用いて新たに 5 つのがん拒絶抗原遺伝子が同定されている。これらの方法で同定された腫瘍抗原ペプチドについて将来の臨床応用を目的とした免疫応答活性の検討が行われる。

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. 田野崎 隆二 国立がんセンター中央病院
4. 山田 亮 久留米大学先端癌治療研究センター
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 静岡県立静岡がんセンター研究所
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・応用を目的としており、これまでに施行された安全性の評価に重点をおいた臨床第 I 相試験の結果に基づいて抗腫瘍効果や延命効果について検討を行う第 II 相試験が施行されつつある。最初に免疫細胞療法として転移性メラノーマと膵がんを対象に樹状細胞や CTL 細胞を用いた治療を施行し、有効性および生存期間に対する効果が検討された。またヒト NK 様 T 細胞の前臨床試験として、担がん患者由来の NK 様 T 細胞の免疫活性

が重要と考えられ、増幅した NK 様 T 細胞につき機能解析を行った。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、転移性腎がんを対象として臨床第 I 相試験を終了している。がんワクチン療法については、進行性固形がんを対象に 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/II 相試験が施行され、免疫学的パラメーターと予後との関連につき検討された。また HER2 陽性の難治性固形がんを対象に CTL およびヘルパーエpitep の両方を含む CHP-HER2 を用いたがんワクチン療法の第 I 相試験が開始された。一方でがん免疫療法開発のための基礎的検討では、膵がん培養細胞表面の HLA クラス I タンパクに結合している免疫活性ペプチドの同定を目的として MALDI-TOF/TOF MS 法を用いた解析を行っている。また肺がんの腫瘍より樹立した CTL クローンと腫瘍由来 cDNA ライブラリーを用いて新たに 5 つのがん拒絶抗原遺伝子が同定されている。

B. 研究方法

(1) 転移性メラノーマを対象とした樹状細胞療法：9例の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前臨床試験を平成13年10月より15年3月まで施行している。副作用は、grade I-IIの一時的な肝機能低下のみであり、臨床効果はCR1例、PR1例、SD1例、PD3例が認められた。平成15年4月より新たに8例の転移性メラノーマが登録され（12例登録予

定)、臨床第II相試験が開始されている。症例の内訳は、8例すべてA24陽性 (A*2404, A*2420各1例含む) であり、投与細胞数は $1-5 \times 10^7$ の範囲内で設定された。HLA-A24拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドを5種類合わせたペプチドカクテルを作成した。最近の2症例は、GM-CSF, IL-4のサイトカインに加えて樹状細胞の成熟因子であるTNF- α を培養6日目に添加し、同様の方法で作成した樹状細胞を投与することとした。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、再発に対する臨床効果を検討した。また再発症例に対するテラーメイドペプチドワクチン療法の効果も第 I 相試験にて検討された。

(3) ヒト NK 様 T 細胞の機能解析 : G-CSF にて動員した担がん患者末梢血より NK 様 T 細胞を増幅し、その免疫活性や機能につき検討を行った。

(4) 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植 (ミニ移植) : 転移性腎がん9例を対象としてミニ移植療法の臨床第 I 相試験を施行し、治療の安全性や抗腫瘍効果について検討した。

(5) がんペプチドワクチン療法の臨床試験 : 進行固形がんに対して CTL 前駆細胞の誘導活性を指標に同定されたペプチド30種類を用いた第 I/II 相臨床試験 (テラーメイド型ペプチドワクチン) を実施した。免疫応答を示したペプチドの内上位4種類をワクチンとして使用した。また、HER2 陽性の難治性固形がん9症例を対象に CTL およびヘルパーエpiteopeの両方を含む CHP-HER2 を用いたがんワクチン療法の第 I 相試験が開始された。免疫学的なモニタリングについては、ELISPOT アッセイやテトラマーを用いた染色により検討を行った。

(6) がん免疫療法の開発を目的とした基礎的研究 : がん抗原の探索では、膵がん培養細胞表面の HLA クラス I タンパクに結合する免疫活性ペプチドの同定を目的として MALDI-TOF/TOF MS 法と HLA 結合モチーフ検索を組み合わせてペプチドの解析を行った。また肺がんの腫瘍組織より樹立した CTL クローンと腫瘍由来の cDNA ライブラリーを利用してがん拒絶抗原遺伝子の

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16年3月までの1年間で転移性メラノーマ症例8例 (すべてA24陽性) が第II相試験に登録され、平均9.5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、短期間に回復し、その他の重篤な副作用は見られなかった。臨床的效果は、8症例中PR 1例、SD 3例、PD 4例が認められた。PRの症例は、皮膚転移巣に著明な効果が認められている。抗腫瘍効果が見られた症例では、全例において治療後2種類以上のペプチドに対するELISPOT (CTL) 反応が確認されたが、逆に効果の見られなかった (PD) 症例では、早期のELISPOT反応で見られるCTLの誘導が認められなかった。皮内テストの検討では、8例中4例にて治療後ペプチドに対する反応の陽性化が認められた。今回の臨床第II相試験では、ペプチドカクテルにて処理した樹状細胞は、 $1-5 \times 10^7$ の範囲で有意な副作用を惹起することなく最大10回まで投与することが可能であり、樹状細胞投与の安全性が第I相試験に続いて確認された。

(2) 膵がん切除例に対する MUC1-CTL 療法 : 治療切除後膵がんの CTL 療法では、1年生存率は 80.0%, 5年生存率 20.0%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。テラーメイド型腫瘍抗原ペプチドワクチン療法については、後腹膜リンパ節再発例に対して延命効果を認めた。

(3) 担がん患者における NK 様 T 細胞の機能解析 : 固形がん症例では、G-CSF 投与後の末梢血単核球から誘導される NK 様 T 細胞の増殖効率はや低かった。一部大腸がん症例で抗がん剤との併用にて高い増殖を認めた。増幅した NK 様 T 細胞の α は oligoclonal な増殖を示した。

(4) ミニ移植による移植免疫療法 : 転移性腎細胞がん9例全例でドナーリンパ球を用いず完全キメラを達成した。Grade III 以上の前処理関連毒性は認めず GVHD

による死亡はなかった。効果は、PR 1 例、SD 5 例、PD 3 例（奏効率 11%）であった。観察期間中央値 452 日の時点で、1 年生存率は 89%であった。

(5)がんペプチドワクチン療法の臨床試験：HLA-A24 または A2 陽性高度進行上皮がん患者 113 症例を対象に CTL 前駆細胞誘導活性をもつ抗原ペプチドワクチン（テラーメイド型）を用いた第 I/II 相試験を施行した。副作用は、ほとんどなくワクチン投与早期において抗ペプチド抗体の誘導と生存期間の間に強い相関が認められた。特に前立腺がん症例に対して有意な延命効果が示された。また使用頻度の高いペプチドを選択して行った非テラーメイドワクチンの早期第 II 相試験では、予後の悪化が認められ、テラーメイド型の重要性が再認識された。また、HER2 陽性固形がんを対象に施行された 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、投与の安全性が確認された。これらの結果を踏まえて、CTL およびヘルパーエпитープを含む多価ワクチンである CHP-HER2 を用いた臨床第 I 相試験が開始されており、今後 9 例の HER2 陽性の進行固形がん患者の登録が予定されている。

(6) タンデムマススペクトロメトリー法を用いた固形がんにおける免疫活性ペプチドの同定：培養脾がん細胞 PSN-1（HLA-A24 陽性）表面の HLA クラス I タンパクに結合する HLA 拘束性ペプチドを MALDI-TOF/TOF MS を用いて解析を行った。MS にて得られた precursor peak を選択し、さらに MS/MS 解析を行い、データベースサーチにてペプチドの同定を行った。HLA-A24 タンパクへの結合指数（NIH Score）の検討で、Antigen NY-CO-16（Score 14.4）、Seven transmembrane helix receptor（Score 42）、U2 small nuclear protein（Score 200）などが候補ペプチドとして挙げられた。

(7) 新しいがん拒絶抗原遺伝子の同定：肺がんの腫瘍より樹立した CTL クローンと腫瘍由来 cDNA ライブラリーを用いて新たに 5 つのがん拒絶抗原遺伝子（Ribosomal proteins S2 および L10a, BTB domain containing2, hairpin-binding protein など）が同定されている。

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：臨床第 II 相試験では、評価可能であった 8 例中 4 例に SD 以上の治療効果が確認され、すべての症例において早期の ELISPOT 反応の陽性化が見られたことより、ELISPOT 検査における CTL 誘導の有無がその後の治療効果を予測しうる因子の 1 つであることが示

唆された。

(2)脾がん切除例に対する MUC1-CTL 療法：MUC1-CTL 療法は、安全に施行できる治療であると考えられた。また肝転移抑制効果の機序については、細胞性免疫が低下する周術期に、脾がんの特異的な 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、移入する細胞が脾がん特異的であることと移入する時期が肝要であると思われた。

(3)担がん患者における NK 様 T 細胞の機能解析：G-CSF を投与した場合でも担がん患者では、NK 様 T 細胞の増殖効率が低いことが示された。一方、抗がん剤投与後 G-CSF の投与を行った症例においては、NK 様 T 細胞の増殖促進効果があることが示された。健常者においても α GalCer に反応して NK 様 T 細胞が増加する例としない例が存在するが、V α 24 におけるポリモルフィズムなどが原因になっている可能性が否定できないと考えられた。

(4)ミニ移植による移植免疫療法：ミニ移植法は転移性腎がん症例に対して安全に移植を施行する方法であることが示されたが、今後第 II 相、III 相試験を行い、予後に対する効果が検討されるべきであると思われた。

(5)がんペプチドワクチン療法の臨床試験：進行固形がんに対する 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、抗ペプチド抗体の誘導がワクチン投与により増強し、予後とも強い相関を示したことから、ワクチンペプチド選択のための指標となることが示された。またホルモン不応性前立腺がんにおいてエストラムチンとペプチドワクチンの併用によりきわめて高い奏効率が得られており、有望な治療と考えられた。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）を用いた臨床第 I 相試験が開始されているが、ヘルパーエピトープの共存による相乗効果が予測される多価ワクチンであり、ペプチドワクチンに比べて治療効果の増強が期待される。

(6)タンデムマススペクトロメトリー法を用いた固形がんにおける免疫活性ペプチドの同定：これまでにかん細胞表面の HLA クラス I タンパクに結合する CTL エピトープペプチドについては、技術的に同定が困難であった。今回の MALDI-TOF/TOF MS を利用した微量ペプチドの検索システムと HLA 結合モチーフの解析法を組み合わせることで新しい HLA 拘束性免疫活性ペプチドの同定法を確立しうる可能性が示唆された。

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/II 相試験) では、治療の安全性および抗腫瘍効果が確認され、さらに第 III 相試験での検討が示唆された。NK 様 T 細胞の培養増幅には、個体差が認められた。ミニ移植療法 (第 I 相試験) では、腎がん症例において安全に治療が施行できることが示された。がんのペプチドワクチン療法では、進行固形がんに対するテラーメイド型ワクチン (第 I/II 相試験) において抗ペプチド抗体の誘導と生存期間の間に強い相関が認められた。多価ワクチンである CHP-HER2 を用いた臨床第 I 相試験が開始されており、今後の治療効果が期待される。この 4 年間で細胞療法やペプチドワクチンを含む免疫療法により明らかな抗腫瘍効果が得られることが明らかになった。今後は、有効例を免疫学的に詳細に検討し、個々の症例で免疫療法の治療効果を予測しうるような具体的な指標につき検討することが必要である。

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, Takigawa Y, Akiyama Y, Hojo T, Nara-Ashizawa N, Cheng J-Y, Watanabe M, Yamaguchi K. Structure and characterization of hamster IL-12 p35 and p40. *Mol. Immunol.* 2003, 40:319-326.

2. Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Mochizuki T, Yamamoto A, Yamazaki N, Kawashima I, Nukaya I, Takesako K, Yamaguchi K. Cytotoxic T cell induction against human malignant melanoma cells using HLA-A24-restricted melanoma peptide cocktail. *Anticancer Res.* 2004 (in press).

3. Nakai K, Mineishi S, Kami K, Saito T, Hori A, Kojima R, Imataki O, Hamaki T, Yoshihara S, Ohnishi M, Kim SW, Ando T, Arima F, Kanda Y, Makimoto A, Tanosaki R, Kanai S, Heike Y, Ohnishi T, Kawano Y, Wakasugi H, Takaue Y. 2003. Anti-Thymocyte Globulin Affects the Occurrence of Acute and Chronic Graft-Versus-Host Disease After a Reduced-Intensity Conditioning Regimen by Modulating Mixed Chimerism Induction and Immune Reconstitution. *Transplantation.* 2003, 75:2135-2143

4. Nakai K, Mineishi S, Kami M, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y. 2003. The feasibility of reduced-intensity

allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a related donor with HLA one-antigen with or without one-allele mismatch. *Haematologica / J Hematology.* 2003, 88: 115-117

5. Kami M, Hamaki T, Miyakoshi S, Murashige M, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y, Taniguchi S, Hirai H, Ozawa K, Kasai K. 2003. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Br J Haematol.* 2003, 120; 304-309

6. Mineishi S, Kanda Y, Saito T, Nakai K, Makimoto A, Kami M, Tanosaki R, Wakasugi H, Tobinai K, Takaue Y. 2003. Impact of graft-versus-host disease in reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) for patients with hematological malignancies. *Br J Haematol.* 2003, 121; 296-303

7. Yamamoto R, Kusumi E, Kami M, Yuji K, Hamaki T, Saito A, Murashige N, Hori A, Kim SW, Makimoto A, Ueyama J, Tanosaki R, Miyakoshi S, Mori S, Morinaga S, Heike Y, Taniguchi S, Masuo S, Takaue Y, and Muto Y. Late hemorrhagic cystitis after reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation (RIST). *Bone Marrow Transplant* 2003, 32; 1089-1095.

8. Saito T, Kanda Y, Nakai K, Kim SW, Arima F, Kami M, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, Heike Y, Mineishi S, Takaue Y. Immune reconstitution following reduced-intensity transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte globulin: serial comparison with conventional myeloablative transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003, 32:601-608

9. Harashima N, Kuribara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M, Ohashi T, Fukui F, Hasegawa A, Masuda T, Takaue Y, Okamura J, Kannagi M. 2004. Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients following hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res* 2004, 64; 391-399.

10. Hori A, Kami M, Kim SW, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y. 2004. Balance between acute graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-tumor (GVT) effect after reduced-intensity transplantation (RIST) for metastatic renal cell carcinoma. *Hematology Journal* 2004 (in press).

11. Matsuoka K, Ueno T, Morita K, Kawano H, Yamaguchi K, Maekawa T, Tangoku A, Oka M. Effects of Moderate

- Hypothermia on Proinflammatory Cytokines Production in Rat Model of Caerulein-Induced Pancreatitis. *Pancreas*. 2003, 26(1): E12-E17.
12. 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, Hamamoto Y. Use of oligonucleotide microarray as a novel approach for prediction of early intrahepatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 2003, 361: 923-929.
13. Iizuka N, Mori H, Tamesa T, Tangoku A, Oka M. Nm23-H2 protein expression and telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2003, 23: 43-47.
14. 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, Hamamoto Y. Differential Gene Expression in Distinct Virologic Types of Hepatocellular Carcinoma: Association with Liver Cirrhosis. *Oncogene* 2003, 22: 3007-3014.
15. Arai H, Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, Abe T, Kawauchi S, Oga A, Furuya T, Oka M, Sasaki K. Detection of amplified oncogenes by genome DNA microarrays in human primary esophageal squamous cell carcinoma: comparison with conventional comparative genomic hybridization analysis. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003, 146: 16-21.
16. Iizuka N, Oka M, Yamamoto K, Tangoku A, Miyamoto K, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Identification of common or distinct genes related to antitumor activities of a medicinal herb and its major component by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer*. 2003, 107: 666-672.
17. Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, Abe T, Toshimitsu H, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Oka M, Sasaki K. Prediction of Nodal Metastasis by Comparative Genomic Hybridization in Biopsy Specimens from Patients with Superficial Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003, 9: 5137-5141.
18. Okada T, Oka M, Iizuka N, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Takemoto N, Hashimoto K, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Gene expression profile linked to p53 status in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett*. 2003, 555: 583-90.
19. Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Identification of the heat shock protein 70 family as biomarkers against hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by proteomic profiling. *Proteomics* 2003, 3: 2487-2493.
20. Hinoda Y, Ikematsu Y, Horinouchi M, Sato S, Yamamoto K, Nakano T, Fukui M, Suehiro Y, Hamanaka Y, Nishikawa Y, Kida H, Waki S, Oka M, Imai Y, Yonezawa S. Increased expression of MUC1 in advanced pancreatic cancer. *J Gastroenterol* 2003, 38: 1162-1166.
21. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Hamada K, Nakayama H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Matoba K, Takashima M, Sakamoto K, Hashimoto K, Tangoku A, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Molecular signature in three types of hepatocellular carcinoma with different viral origin by oligonucleotide microarray. *Int J Oncol*. 2004, 24: 565-574.
22. Tangoku A, Yamamoto S, Suga K, Nagashima Y, Hida M, Sato T, Sakamoto K, Oka M. Sentinel biopsy using computed tomography lymphography to detect sentinel lymph node in breast cancer. *Surgery* 2004, 135: 258-265.
23. M. Koga, S. Shichijo, A. Yamada, J. Ashihara, H. Sawamizu, J. Kusukawa, and K. Itoh. Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor-rejection antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens*, 2003, 61: 136-145.
24. A. Yamada, K. Kawano, M. Koga, S. Takamori, M. Nakagawa, and K. Itoh. Gene and peptide analyses of newly defined lung cancer rejection antigens recognized by HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res*. 2003, 63: 2829-2835.
25. N. Kawamoto, S. Ohkouchi, T. Maeda, S. Tanaka, T. Hashimoto, S. Saijo, Y. Saijo, S. Shichijo, K. Itoh, and A. Yamada. IgG reactive to CTL-directed epitope peptides is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigens* 2003, 61: 352-361.

26. M. Noguchi, K. Kobayashi, N. Suetsugu, K. Tomiyasu, S. Suekane, A. Yamada, K. Itoh, and S. Noda. Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *Prostate*, 2003, 57:80-92.
27. S. Tanaka, M. Harada, T. Mine, M. Noguchi, R. Gohara, K. Azuma, M. Tamura, A. Yamada, A. Morinaga, M. Nishikori, K. Katagiri, K. Itoh, H. Yamana, and T. Hashimoto. Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancers based on pre-existing peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the periphery. *J. Immunother.* 2003, 26: 357-366.
28. T. Mine, R. Gouhara, N. Hida, N. Imai, K. Azuma, T. Rikimaru, K. Katagiri, M. Nishikori, A. Sukehiro, M. Nakagawa, A. Yamada, H. Aizawa, K. Shirouzu, K. Itoh, and H. Yamana. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2003, 94: 548-556.
29. S. Ohkouchi, N. Kawamoto, F. Sakanashi, S. Shichijo, Y. Saijo, T. Nukiwa, K. Itoh, and A. Yamada. Identification of cytotoxic T lymphocyte-directed epitope encoded by an intron of putative tumor suppresser gene Testin of the common fragile site 7G region at 7q31.2: Peptide vaccine candidate for HLA-B52⁺ and -62⁺ cancer patients. *Eur. J. Immunol.* 2003, 33: 2964-2973.
30. Y. Sato, H. Shomura, Y. Maeda, T. Mine, Y. Une, Y. Akasaka, M. Kondo, S. Takahashi, T. Shinohara, K. Katagiri, M. Sato, S. Okada, K. Matsui, A. Yamada, H. Yamana, K. Itoh, and S. Todo. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci.* 2003, 94:802-808.
31. N. Tsuda, K. Mochizuki, M. Harada, A. Sukehiro, K. Kawano, A. Yamada, K. Ushijima, T. Sugiyama, T. Nishida, H. Yamana, K. Itoh, and T. Kamura. Vaccination with pre-designated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers. *J. Immunother.* 2004, 27:60-67.
32. W. Kumamaru, S. Nakamura, T. Kadena, A. Yamada, E. Kawamura, M. Sasaki, Y. Ohyama, T. Toyoshima, J. Hayashida, K. Itoh, and K. Shirasuna. T cell receptor V β gene usage by T cells reactive with the tumor rejection antigen SART-1 in oral squamous cell carcinoma. *In. J. Cancer* 2004, 108:686-695.
33. M. Noguchi, K. Itoh, S. Suekane, A. Yao, N. Suetsugu, K. Katagiri, A. Yamada, H. Yamana, S. Noda. Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2 positive patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Cancer Sci.* 2004 (in press).
34. A. Yamada, H. Yamana, K. Itoh. Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy. In "Current Topics in Peptide & Protein Research". Research Trend, India, 2004 (in press).
35. Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Kuribayashi, K., Old, L.J. and Shiku, H.: CD4⁺ CD25⁺ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100:10902-10906.
36. Wang, L., Miyahara, Y., Kato, T., Wang, L., Aota, T., Kuribayashi, K. and Shiku, H.: Essential roles of tumor-derived helper T cell epitopes for an effective peptide-based tumor vaccine. *Cancer Immun.* 2003, 3:16.
37. Shiku, H.:Importance of CD4⁺ helper T-cells in antitumor immunity. *Int. J. Hematol.* 2003, 77:435-438.
38. Ishihara, M., Tawara, I., Wang, L., Takahashi, Y. and Shiku, H.:Elimination of CD4⁺ T cells may overcome suppression of anti-HER2 immune responses in tumor-bearing hosts. *Int. J. Oncol.* 2003, 22:1135-1139.
39. 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.
40. Suguro-Katayama, M., Suzuki, R., Kasugai, Y., Nakamura, T., Suzuki, H., Hosokawa, Y., Shiku, H., Nakamura, S. and Seto, M.:Heterogeneous copy numbers of API2-MALT1 chimeric transcripts in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leukemia* 2003, 17:2508-2512.

41. Iwamura, K., Furukawa, K., Uchikawa, M., Sojka, BN., Kojima, Y., Wiels, J., Shiku, H., Urano, T. and Furukawa, K.:The blood group PI synthase gene is identical to the Gb3/CD77 synthase gene. A clue to the solution of the P1/P2/p puzzle. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:44429-44438.
42. Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B. and Bernstein, ID. :Notch signalling in hematopoiesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2003, 14:143-150.
43. Lorenzo, FV., Nishii, K., Usui, E., Katayama, N. and Shiku, H.: AML with t(8;21) and trisomy 4: possible involvement of c-kit?/Reply to SE Langabeer et al. *Leukemia* 2003, 17: 1915-1916.
44. Nishii, K., Usui, E., Katayama, N., Lorenzo, F V., Nakase, K., Kobayashi, T., Miwa, H., Mizutani, M., Tanaka, I., Nasu, K., Dohy, H., Kyo, T., Taniwaki, M., Ueda, T., Kita, K. and Shiku, H.: Characteristics of t(8;21) acute myeloid leukemia (AML) with additional chromosomal abnormality: concomitant trisomy 4 may constitute a distinctive subtype of t(8;21) AML. *Leukemia* 2003, 17: 731-737.
45. Morikawa, J., Li, H., Kim, S., Nishii, K., Ueno, S., Suh, E., Dougherty, E., Shmulevich, I., Shiku, H., Zhang, W. and Kobayashi, T.:Identification of signature genes by microarray for acute myeloid leukemia without maturation and acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12) (PML/RARa). *Int. J. Oncol.* 2003, 23: 617-625.
46. Kato K, Wakasugi H. et al. U5A2-13 :An antigen originally found on mouse NK-like T cells, is an early inducible cell surface antigen during lymphoid activation. *Cellular Immunol.* 2003 (in press).
47. Hideyuki I, Wakasugi H. et al. Determination the levels of matrix metalloproteinase-9 in portal and peripheral blood is useful for liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2003, 33:186-191.
48. Asada-Mikami R, Wakasugi H. et al. Increased expansion of V α 24⁺ T cells derived from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells as compared to peripheral blood mononuclear cells following α -galactosylceramide stimulation. *Cancer Science* 2003, 94:383-388.
49. Mitsuzi Y, Wakasugi H. et al. Involvement of PKC beta II in anti-proliferating action of a new antitumor compound Gnidimacrin. *Int. J. Cancer* 2003, 105:601-606.
50. Matuda K, Kawaura H, Onoue S, Kashimoto K, Uchiyama M, Mochizuki T, Kikuyama S. Regional concentration and chromatographic characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the brain of the bullfrog, *Rana Catesbeiana*. *Zoological Science.* 2003, 20: 1003-1009.
51. Mohri K, Fukushima M. Milli-Gauss magnetic field triggering reliable self organization of water with long range ordered proton transport through cyclotron resonance. *IEEE Trans Mag.* 36. 3328-3330. 2003.
52. Hosoe S, Komuta K, Shibata K, Harada H, Iwamoto Y, Ohsaki Y, Morioka Y, Origasa H, Fukushima M., Furuse K, Kawahara M. Gemcitabine and vinorelbine followed by docetaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer: a multi-international phase II trial of non-platinum sequential triplet combination chemotherapy (JMTO LC00-02). *Br J Cancer.* 88. 342-347. 2003.
52. Nishiyama H, Habuchi T, Watanabe J, Teramukai S, Tada H, Ono Y, Oshima S, Fujimoto K, Hirano Y, Fukushima M., Ogawa O. Clinical outcomes for locally advanced bladder cancer in Japan: A survey including 1131 patients treated during 1990-2000. *Eur Urol.* 45(2), 176-81. 2004.

H. 知的所有権の取得状況

特許取得

1. 名称：C型肝炎ウイルス由来ペプチド

出願日：平成15年9月22日

出願No.：特願2003-330258

発明者：伊東恭悟、山田 亮、佐田通夫

出願人：久留米大学

2. 平成15年1月15日「水分子および生命の活性化磁界発生方法及び装置」, 毛利佳年雄, 福島雅典, 科学技術振興事業団, 日本, 特願2003-011759.

3. 平成15年10月14日「水分子の自己組織化方法及び装置」, 毛利佳年雄, 福島雅典, 科学技術振興事業団, 日本, 特願2003-353610

研究要旨

本研究では、難治がんに対する新しい免疫療法の開発を目的として樹状細胞を用いた免疫細胞療法の臨床試験を施行した。臨床病期第 IV 期の転移性メラノーマ症例（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 月より施行し、投与の安全性が確認された。この結果を受けて平成 15 年 4 月より 8 例の進行メラノーマ患者に対して臨床第 II 相試験が開始されている。副作用は、軽度の肝機能低下のみであった。臨床的効果は、8 症例中 PR 1 例、SD 3 例、PD 4 例が認められた。抗腫瘍効果が見られた症例では、全例において治療後 2 種類以上のペプチドに対する ELISPOT (CTL) 反応が確認された。また基盤的技術の開発においては、免疫活性ペプチドの同定を目的として膀胱がん培養細胞株の HLA-クラス I タンパク上に発現する CTL エピトープを新しいプロテオミクスのアプローチ法 (MALDI-TOF/TOF マススペクトロメトリー) を用いて解析を行っている。

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。さらに新しいがん抗原の探索を目的として、膀胱がんをはじめとする固形がん培養細胞の表面に発現する微量な免疫活性ペプチドについてタンデムマススペクトロメトリー法を利用して解析を行う。

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 月より施行し、終了している。副作用は、grade II までの一時的な肝機能低下のみであり、CR 1 例、PR 1 例、SD 1 例を認めた。この結果を受けて、平成 15 年 4 月より 8 例の転移性メラノーマ患者を対象に樹状細胞療法の第 II 相試験を開始している。対象は、臨床病期 IV 期の転移性メラノーマですべて A24 陽性の患者であった。CTL 誘導活

性の確認された 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。最近の 2 症例は、成熟した樹状細胞を投与する群として登録され、培養 6 日目に TNF- α の添加を行った。投与樹状細胞数は、投与細胞数は $1-5 \times 10^7$ の範囲内で設定された。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) タンデムマススペクトロメトリー法を用いた固形がんにおける免疫活性ペプチドの同定：膀胱がんを中心とした固形がん培養細胞における新しい免疫活性ペプチド探索を目的で、細胞表面の HLA-クラス I タンパク上に存在する CTL エピトープを酸性 buffer を用いて、分離・回収し、タンデムマススペクトロメトリー法 (MALDI-TOF/TOF MS) にて解析した。また得られたペプチド配列を

データベース検索を行い、HLA-A24 などの特異的なクラス I 分子に対する結合モチーフの有無についても検討している。現時点で、膵管正常上皮細胞および膵がん培養細胞由来の免疫活性ペプチドについて検討中である。

(倫理面への配慮)

(1) 新しい免疫療法の臨床試験 (第 I/II 相試験) については、倫理審査委員会での承認と患者より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第II相試験：平成16年3月までの1年間で転移性メラノーマ症例8例 (A*2402 6例、A*2404 1例、A*2420 1例) が第II相試験に登録され、平均9.5回の樹状細胞の投与を受けた。8例中6例において10回投与が終了している。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、短期間に回復し、その他の重篤な副作用は見られなかった。8例中最近の2例では、TNF- α が添加された樹状細胞が投与された。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。臨床的効果は、8症例中PR 1例、SD 3例、PD 4例が認められた。PRの症例は、皮膚転移巣に著明な効果が認められている。抗腫瘍効果 (PRおよびSD症例) が見られた症例では、全例において治療後2種類以上のペプチドに対するELISPOT (CTL) 反応が確認されたが、逆に効果の見られなかった (PD) 症例では、早期のELISPOT反応で見られるCTLの誘導が認められなかった。皮内テストの検討では、8例中4例にて治療後ペプチドに対する反応の陽性化が認められた。今回の臨床第II相試験では、ペプチドカクテルにて処理した樹状細胞は、 $1-5 \times 10^7$ の範囲で有意な副作用を惹起することなく最大10回まで投与することが可能であり、樹状細胞投与の安全性が第I相試験に続いて確認された。

(2) タンデムマスマスペクトロメトリー法を用いた固形がんにおける免疫活性ペプチドの同定：培養膵がん細胞PSN-1 (HLA-A24 陽性) 表面のHLAクラス I タンパクに結合するHLA拘束性ペプチドをMALDI-TOF/TOF MSを用いて解析を行った。MSにて得られた precursor peak を選択し、さらにMS/MS解析を行い、データベースサーチにてペプチドの同定を行った。HLA-A24 タンパクへの結合指数 (NIH Score) の検討で、Antigen NY-CO-16 (Score 14.4), Seven transmembrane helix receptor (Score 42), U2 small nuclear protein (Score 200)などが候補ペプチドとして挙げられた。

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第 II 相試験：今回の第 II 相試験では、評価可能であった 8 例中 4 例に SD 以上の治療効果が確認され、すべての症例において早期の ELISPOT 反応の陽性化が見られたことより、ELISPOT 検査における CTL 誘導の有無がその後の治療効果を予測しうる因子の 1 つであることが示唆されている。また有害事象については、軽度の肝機能低下のみであり、第 I 相試験に引き続いて治療の安全性が確認されている。今後さらに臨床第 III 相試験にまで発展させ、最終的に患者の生存期間に対する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。

(2) タンデムマスマスペクトロメトリー法を用いた固形がんにおける免疫活性ペプチドの同定：これまでのがん細胞表面の HLA クラス I タンパクに結合する CTL エピトープペプチドについては、技術的に同定が困難であった。今回の MALDI-TOF/TOF MS を利用した微量ペプチドの検索システムと HLA タンパク結合モチーフの解析法を組み合わせることで新しい HLA 拘束性免疫活性ペプチドの同定法を確立しうる可能性が示唆された。

E. 結論

代表的な難治がんである転移性メラノーマ症例に対して樹状細胞療法の第 I/II 相試験が施行され、 $1-5 \times 10^7$ の細胞数の範囲で最大 10 回まで安全に投与が施行でき、また臨床的な抗腫瘍効果も期待しうることが示された。今後第 III 相試験において本治療法の生存期間に対する客観的な評価が必要とされる。また固形がんにおける新しい免疫活性ペプチドの同定については、MALDI-MS/MS 法の活用によりペプチド解析の精度の向上や効率化が可能となると考えられる。

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, Takigawa Y, Akiyama Y, Hojo T, Nara-Ashizawa N, Cheng J-Y, Watanabe M, Yamaguchi K. Structure and characterization of hamster IL-12 p35 and p40. *Mol. Immunol.* 2003,40: 319-326.

Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Mochizuki T, Yamamoto A, Yamazaki N, Kawashima I, Nukaya I, Takesako K, Yamaguchi K. Cytotoxic T cell induction against human malignant melanoma cells using HLA-A24-restricted melanoma peptide cocktail. *Anticancer Res.* 2004 (in press).

2. 学会発表

9th Annual Meeting of International Society for Cellular Therapy. Phoenix, Arizona, 2003. Analysis of HLA-A24-restricted CMV pp65 peptide-specific CTL with A24/pp65 tetramers. Akiyama Y, Kuzushima K, Tsurumi T, Yamaguchi K.

H. 知的所有権の取得状況 なし

「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 県立静岡がんセンター研究所 免疫治療部部長

研究要旨

転移性メラノーマは、現在有効な治療法がない難治がんであり、効果的な治療法の開発が求められている。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9例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相試験が施行され、細胞投与の安全性および一部の症例に臨床効果が認められた。平成15年4月より8例の転移性メラノーマ患者に対して臨床第II相試験が開始されており、抗腫瘍効果に加えて樹状細胞の投与の安全性が十分に確認されている。

A. 研究目的

転移性メラノーマは、現在効果的な治療法がなく新しい効率的な治療の開発が求められている。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15年度は、樹状細胞療法臨床第I相試験の終了後、第II相試験を開始しており、最終的な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

9例の進行メラノーマを対象とした腫瘍特異的樹状細胞療法臨床第I相試験を平成13年10月より平成15年3月まで施行している。副作用は、grade I-IIの一時的な肝機能低下のみであり、臨床的効果はCR1例、PR1例、SD1例が認められた。CRが得られた症例は、現在 か月間無再発の状態が維持されている。投与細胞数は、 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 の3つのレベルにて行われたが、指摘細胞数は決定できなかった。平成15年4月より新たに8例の転移性メラノーマが登録され（12例登録予定）、臨床第II相試験が開始されている。症例の内訳は、8例すべてA24陽性（A*2404、A*2420各1例含む）であり、投与細胞数は $1-5 \times 10^7$ の範囲内で設定された。HLA-A24拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドを5種類ずつ合わせたペプチドカクテルを作成した。最初の6症例については、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。後半の6症例は、GM-CSF、IL-4のサイトカインに加えて、樹状細胞の成熟因子であるTNF- α を培養6日目に添加し、同様の方法で作成した樹状細胞を投与することとした。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/II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16年3月までの1年間で転移性メラノーマ症例8例（A*2402 6例、A*2404 1例、A*2420 1例）が第II相試験に登録され、平均9.5回の樹状細胞の投与を受けた。8例中6例において10回投与が終了している。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、短期間に回復し、その他の重篤な副作用は見られなかった。8例中最最近の2例では、TNF- α が添加された樹状細胞が投与された。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。臨床的效果は、8症例中PR 1例、SD 3例、PD 4例が認められた。PRの症例は、皮膚転移巣に著明な効果が認められている。抗腫瘍効果(PRおよびSD症例)が見られた症例では、全例において治療後2種類以上のペプチドに対するELISPOT (CTL) 反応が確認されたが、逆に効果の見られなかった (PD) 症例では、早期のELISPOT反応で見られるCTLの誘導が認められなかった。皮内テストの検討では、8例中4例にて治療後ペプチドに対する反応の陽性化が認められた。今回の臨床第II相試験では、ペプチドカクテルにて処理した樹状細胞は、 $1-5 \times 10^7$ の範囲で有意な副作用を惹起することなく最大10回まで投与することが可能であり、樹状細胞投与の安全性が第I相試験に続いて確認された。

D. 考察

9例の転移性メラノーマに対する樹状細胞療法の臨床第I相試験により、治療の安全性と臨床的效果について有望な結果が得られていた。今回第I相試験の経験に基づいて、第II相試験を開始した。主要評価項目として抗腫瘍効果と安全性が検討された。臨床的效果については、評価可能であった8例中4例にSD以上の治療効果が確認され、すべての症例において早期のELISPOT反応の陽性化が見られたことより、ELISPOT検査におけるCTL誘導の有無がその後の治療効果を予測する因子の1つであることが示唆されている。また有害事象については、軽度の肝機能低下のみであり、第I相試験に引き続いて治療の安全性が確認されている。今後さらに臨床第III相試験にまで発展させ、最終的に患者の生存期間に対する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

代表的な難治がんである転移性メラノーマ症例に対して樹状細胞療法の第I/II相試験が施行され、 $1-5 \times 10^7$ の細胞数の範囲で最大10回まで安全に投与が施行でき、また臨床的な抗腫瘍効果も期待しうることが示された。今後第III相試験において本治療法の生存期間に対する客観的な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, Takigawa Y, Akiyama Y, Hojo T, Nara-Ashizawa N, Cheng J-Y, Watanabe M, Yamaguchi K. Structure and characterization of hamster IL-12 p35 and p40. *Mol. Immunol.* 2003,40: 319-326.

Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Mochizuki T, Yamamoto A, Yamazaki N, Kawashima I, Nukaya I, Takesako K, Yamaguchi K. Cytotoxic T cell induction against human malignant melanoma cells using HLA-A24-restricted melanoma peptide cocktail. *Anticancer Res.* 2004 (in press).

2. 学会発表

9th Annual Meeting of International Society for Cellular Therapy. Phoenix, Arizona, 2003. Analysis of HLA-A24-restricted CMV pp65 peptide-specific CTL with A24/pp65 tetramers. Akiyama Y, Kuzushima K, Tsurumi T, Yamaguchi K.

H. 知的所有権の取得状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

NKT 細胞療法臨床応用へむけた前臨床試験

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

G-CSF 投与後の健常者血漿中には IL-3, IL-13 などが高い濃度で検出できるものの、それらのサイトカインの培養液への添加では NKT 細胞の増殖促進効果は得られなかった。増殖した NKT 細胞では各種サイト下院レセプターの発見増強が見られたが、CD3T 細胞との差は見られず NKT 細胞は特異的なものではなかった。増殖した NKT 細胞の TCR Repertoire 解析では V α 24 の Oligoclonal な増殖がみられた。担癌患者では、NKT の増殖効率が悪かった。抗がん剤投与後 C-CSF の投与を受けた担癌患者抹消血からは、高い NKT 誘導が見られる例があった。

A. 研究目的

NKT 細胞を多量に含む aGalCer 培養単核球の臨床応用をめざして前臨床試験を行うと共に、その過程で得られた情報を元に NKT 細胞の細胞生物学的解析を行う。

B. 研究方法

1) 同種抹消血造血幹細胞のドナーとして G-CSF 投与を受けることに同意した健常者で、本研究に関して同意が得られた症例より、G-CSF 投与前、投与後に末梢血を採取した。採血は 20ml おこない、得られた検体は直ちに中央病院 12F 研究支援室に持ちこみ血漿を保存すると共に単核球に分離した。分離した単核球は使用するまで -180 度に保存した。

2) G-CSF 投与によって増加したサイトカインの測を、ELISA 法を用いておこない、その結果を G-CSF 投与前後で比較した。

3) 2) の結果に基づき、G-CSF 投与前の血漿に、2) において増加が見られたサイトカインを加え、NKT 細胞増殖率に与える影響を検討した。

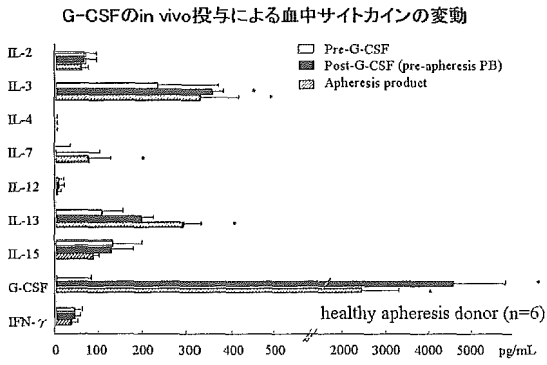
3) 2) の結果に基づき、G-CSF 投与前の血漿に、2) において増加が見られたサイトカインを加え、NKT 細胞増殖率に与える影響を検討した。

4) G-CSF 投与前後で、NKT 細胞、T 細胞の各種サイトカイン表面マーカーの発現をフローサイトメトリーで検討した。

5) 担癌患者で本研究に関して同意が得られた症例より末梢血 20ml を採取した。得られた検体は直ちに中央病院 12F 研究支援室に持ちこみ血漿並びに単核球を分離し直ちに解析を行った。

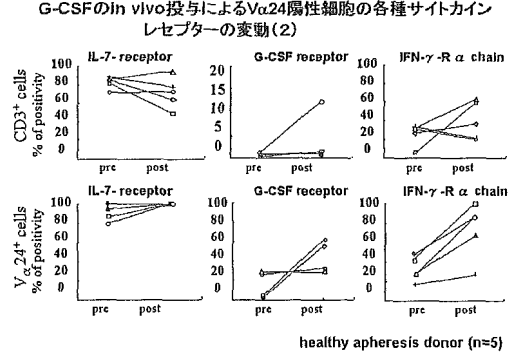
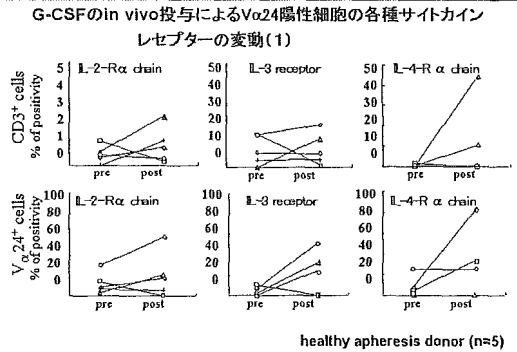
C. 研究結果

血漿中の NKT 増殖に関する液性因子の分析のため、既に NKT の増殖に関係することが報告されているサイトカインを ELISA にて測定した。



G-CSFの投与によって、IL-3やIL-13の血中濃度が増加していたが、これらのサイトカインを培養液に加えても、NKT細胞の優位な増殖は見られなかった。また、GM-CSFの添加によっても、あきらかなNKT細胞の増殖促進効果は認められなかった。

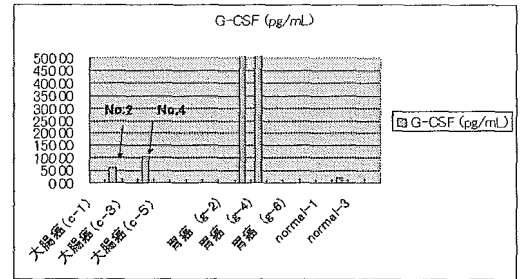
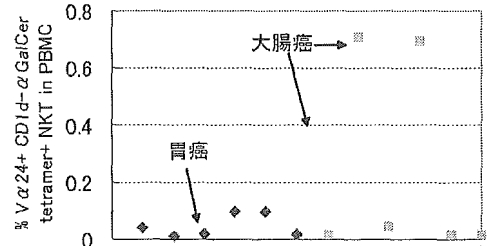
2) 1)の結果を含めて、NKT細胞表面のサイトカインレセプターをフローサイトメトリーにて解析した。



これから明らかなように、G-CSF投与によって、こIL-3、IL-4を始め多くのサイトカインレセプターが発現が増加しているが、これらのサイトカインの培養液中への添加によって、NKT細胞の特異的増殖は得られなかった。

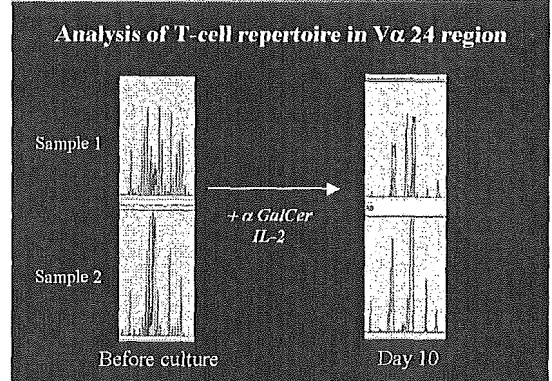
3) 担癌患者末梢血単核球及び血漿を用いて、NKT細胞の誘導を試みた。

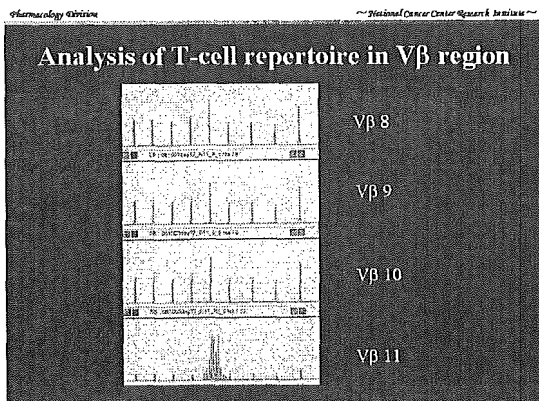
NKT cell expansion derived from PBMC of cancer patients



胃がん、大腸がん共に、担癌状態ではNKT細胞増殖効率が低かった。大腸がんのうち2例のみ高い増殖率が認められたが、この2例は化学療法後G-CSFを投与している例であった。

4) 誘導されたNKT細胞のクローナリティーを確認するため、Vα24およびVβのレパトア解析を行った。





検討した例では、V α 24 は Oligoclonality を示し、V β は V β 11 のみが発現し正常ガウス分布を示していた

D. 考察

昨年までの班会議において、G-CSF の投与を受けた健常者において NKT 細胞の増殖効率が高いことを示してきた。本年度の検討にて、限られた症例ではあるが担癌患者は NKT 細胞の増殖効率が低いことが示された。一方、抗がん剤投与後の好中球減少症に対し G-CSF の投与を行った症例においては、NKT 細胞の増殖促進効果があることが示された。左記の症例では抗がん剤投与後の好中球減少に対する内在性の G-CSF の影響も考えられ、担癌患者からえられた血液検体からの NKT 細胞増殖の条件検討は、臨床応用に先立って重要な要件である。また、NKT細胞の V α が Oligoclonal に増加していることも非常に興味深い。健常者においても α GalCer に反応して NKT 細胞が増加する例と増加しない例が存在するが、V α 24 におけるポリフォルニズムなどが原因となっている可能性が否定できない。仮にポリフォルニズムにより α GalCer に対する反応性が前もって判定できれば、NKT 療法が可能な患者と不可能な患者を前もって判別することが可能となり、臨床応用を行う上で重要な要件となる。今後の重要な検討課題である。

E. 結論 :

- 1) G-CSF 投与前後での液性因子の解析を ELISA で行った。G-CSF に加え IL-3 や IL-13 などの増加が見られた。
- 2) G-CSF 投与前後での NKT 細胞のサイトカインレセプターの発現解析を行った。いくつかのサイトカインレセプターの発現が増加していたが、CD3 リンパ球との違いは見られなかった。
- 3) 1) の結果に基づき、G-CSF 投与前の血漿にサイトカインを加えた増殖系を検討したが、各種サイトカイン添加による NKT 増殖促進効果は見られなかった。
- 4) 増殖した NKT 細胞の TCR の V α は Oligoclonal な増殖を呈していた。V β に関しては V β 11 のみが発現していたが、そのパターンはガウス分布を呈していた。

健康危険情報 :

「特記すべきことなし」

研究発表 :

International Society for Cellular Therapy (ISCT) 9th International Meeting (Phoenix, Arizona USA) May29-June1, 2003.
Induction of CMV specific CD4 T cells by culture with cytomegarovirus (CMV) lysate: Yukioko Kishi, Mutsuko Onishi, Yuji Heike, Masahiro Kami, Yohichi Takaue, Hiro Wakasugi, and Tadao Kakizoe.

共立薬科大学講義 「病気とくすり」
H15. 5. 22

第11回日本乳癌学会総会 (新潟) H15. 6. 12
~H15. 6. 13

炎症性乳癌に対する sFlt-1 及び sTie-2 遺伝子導入 adenovirus を用いた治療の試み : 白川一男、橋本大定、若杉尋、吉本賢隆

第7回基盤的癌免疫研究会総会 (岡山) H
15. 7. 17~H15. 7. 18

同種造血幹細胞移植後患者におけるサイト
メガロウイルス (CMV) 特異的T細胞応答の
モニタリング: 大西睦子、桜井敏晴、山崎
理絵、藤田知信、平家勇司、高上洋一、若
杉尋、河上裕

第7回基盤的癌免疫研究会総会 (岡山) H
15. 7. 17~H15. 7. 18

S E R E X 自己抗原による活性化される
CD4⁺CD25⁺T細胞は 3-メチルコラントレン
による発癌を促進する: 俵功、西川博嘉、
加藤琢磨、武光哲志、五十嵐美德、若杉尋、
中山俊憲、谷口克、栗林景容、珠玖洋

第 6 2 回日本癌学会総会 (名古屋) H
15. 9. 25~H15. 9. 27

P K C β II 遺伝子を導入したH L E細胞に
おけるグニディマクリンのP K C活性化に
よるG2 期停止: 吉田光二、谷ヶ崎和美、
森川隆之、五十嵐美德、池川哲郎、若杉尋

第 6 2 回日本癌学会総会 (名古屋) H
15. 9. 25~H15. 9. 27

臨床応用を目指したV α 24 陽性T細胞 (N
K T細胞) 誘導方の開発: 原田ゆきえ、平
家勇司、五十嵐美德、若杉尋、高上洋一、
白川一男、石田秀行、橋本大定

第 6 2 回日本癌学会総会 (名古屋) H
15. 9. 25~H15. 9. 27

ヒト炎症性乳癌マウス移植モデルに対する
血管新生・脈管形成阻害としての遺伝子治
療の試み: 白川一男、平家勇司、若杉尋、
橋本大定

第 6 2 回日本癌学会総会 (名古屋) H
15. 9. 25~H15. 9. 27

マイコプラズマ由来コリン含有糖リン脂質
による human B dendric cell からの IL-10
産生制御: 松田和洋、佐藤結子、若杉尋

第 6 2 回日本癌学会総会 (名古屋) H
15. 9. 25~H15. 9. 27

α -galactosylceramide 刺激後に増殖してく
る NKT 細胞の機能: 五十嵐美德、飯塚明、
平家勇司、吉田光二、若杉尋

第 6 2 回日本癌学会総会 (名古屋) H
15. 9. 25~H15. 9. 27

がん免疫の基礎と臨床 自然免疫 (1) 座
長: 若杉尋

第34回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウ
ム (東京 パレスホテル)

The 34th International Symposium of the
Princess Takamatsu Cancer Research Fund
"Cancer Immunotherapy" Nov. 11-13, 2003.
Palace Hotel, Tokyo, Japan

ROLE OF NATURAL KILLER T (NKT) CELLS IN
ANTI-TUMOR IMMUNE RESPONSE :Yoshinori
Ikarashi, Yuji Heike, Mitsuzi Yoshida,
Akira Iiduka, Takayuki Morikawa, Atsushi
Shimizu, Osamu Imataki, Yoichi Takaue¹ and
Hiro Wakasugi.

第 3 3 回日本免疫学会総会 (福岡) H
15. 12. 8~H15. 12. 10

活性化NKT細胞によるマウスGVHD発症抑制
の可能性: 桑谷将城、五十嵐美德、飯塚明、
金田知詞、若杉尋

第 3 3 回日本免疫学会総会 (福岡) H
15. 12. 8~H15. 12. 10

invariant V α 14 NKT 細胞のサイトカイン産
生能とサブセット: 飯塚明、五十嵐美德、
平家勇司、北川昌伸、広川勝いく、若杉尋、
高上洋一

第 3 3 回日本免疫学会総会 (福岡) H
15. 12. 8~H15. 12. 10

α -galactosylceramide に対して異なる反応
性をしめす二種類の invariant V α 14 NKT
細胞: 五十嵐美德、飯塚明、若杉尋

第 1 回日本癌学会カンファレンス (長野)
H16. 2. 26~H16. 2. 28

体外で増殖・活性化した V α 14i NKT 細胞の
抗腫瘍活性: 五十嵐美德、飯塚明、金田知
詞、平家勇司、若杉尋

知的財産権の出願・登録状況 (予定含):
なし

癌のワクチン療法に関する研究

分担研究者 山田 亮 久留米大学先端癌治療研究センター
がんワクチン分子部門 教授

研究要旨

癌ペプチドワクチン療法の開発に向けて、新規癌抗原の同定を行うとともに、従来より同定されている抗原ペプチドを用いて、個々の患者に最適なテラーメイド型がんワクチンの第 I 相及び早期第 II 相臨床試験（トランスレーショナルリサーチ）を実施した。その結果、安全性が確認されるとともに、ホルモン不応性再燃前立腺癌症例において高い臨床効果が得られた。これらの結果より、医薬品承認申請に向けた治験（第 I 相）を平成 16 年より実施することとなった。

A. 研究目的

がん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を実施し、個々の患者の免疫学的特性（HLA の型及びペプチド特異的 CTL 前駆体の有無）に即応したテラーメイドがんワクチンの開発を行う。

B. 研究方法

本研究ではヒト HLA 拘束性癌特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）株を作製し、それらの CTL により認識される癌抗原をコードする遺伝子および抗原ペプチドを同定した。また、ペプチドワクチン臨床試験では、患者の末梢血単核球（T 細胞）を抗原ペプチドで 2 週間刺激し、その反応性を IFN- γ を測定することにより判定し、陽性ペプチド最大 4 種類をフロイント不完全アジュバント ISA-51 とともにエマルジョン化した製剤 3 mg を患者の皮下に 2 週間毎に投与した。T 細胞反応性に加え、血中抗ペプチド抗体価測定によってもワクチンペプチドの選択を行った。ペプチド及びアジュバント（ISA-51）は全て GMP 下で製造された

ものを使用した。

（倫理面への配慮）

臨床試験（トランスレーショナルリサーチ）は久留米大学の倫理委員会により実施計画書が審査承認されたのちに GCP に準拠して実施された。患者には、研究協力医師が試験の目的及び研究内容、プライバシーの保護、試験に参加しない場合にも不利益を被らない等について文書による説明と同意（インフォームドコンセント）を得たのちに実施された。

C. 研究結果

基礎研究：新たに癌拒絶抗原の遺伝子クローニングと細胞傷害性 T リンパ球（CTL）により HLA 拘束性に認識される抗原ペプチドの同定を実施した。その結果、以下に示す 5 遺伝子によってコードされる癌抗原を同定することができた。これらのうちの 2 分子は全く新規にクローニングされたものであった。さらにこれらの分子に由来し、CTL により HLA 拘束性に認識される抗原ペプチド 9 分子を同定した。

1) Ribosomal proteins S2 および L10a。この

分子は HLA-A26 拘束性に CTL により認識される癌拒絶抗原である。さらに、これらの遺伝子のコードする HLA-A26 拘束性ペプチド 3 種も同定した。これらの分子は ubiquitous に発現しているものであった。

2) 肺癌の cDNA ライブラリーより新規癌拒絶抗原として 3 分子同定した (BTB domain containing 2, hairpin-binding protein, clone 83)。これらのうち、clone 83 は新規遺伝子であった。これらの遺伝子のコードする HLA-A24 拘束性ペプチドも 4 種同定した。これらの遺伝子発現に着いても詳細に検討した。その結果、広汎な腫瘍での発現が認められた。

3) 癌抑制遺伝子 testin のイントロンによりコードされる testin 関連遺伝子が細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) により HLA 拘束性に認識される事を明らかにし、その抗原ペプチドを同定するとともに種々の癌に広汎に発現している事を示した。

4) がんワクチン用に開発されたペプチドに反応性を有する抗体の存在を癌患者、健常人およびアトピー患者で検討し、その特異性と Th1/Th2 バランスとの関連について解析した。

5) 扁平上皮癌局所より分離した SART1 特異的 CTL の T 細胞抗原レセプターのレパトアを明らかにした。

臨床試験

第 I 相臨床試験の解析

HLA クラス I 拘束性細胞傷害性 T 細胞によって認識される癌抗原ペプチドを用いたテラーメイド癌ワクチンの第 1 相臨床試験を高度進行癌症例に対し実施し、各種免疫学的パラメーターと臨床予後との相関を解析した。HLA-A24 もしくは-A2 拘束性に CTL に認識される癌抗原ペプチド 30 種をワクチンペプチドとして用いた。事前に患者末梢血 T 細胞のこれらワクチンペプチドに対する *in vitro* での反応性を解析し、反応性の認められたペプチド上位 4 種をワクチンとして接種した。各ペプチド 3 mg はフロイント不完全アジュバントとともに隔週で患者に皮下投与した。遅延型過敏

反応 (DTH) は 2 4 時間後に判定した。5 mm 以上の硬結もしくは 10 mm 以上の発赤が認められたものを陽性とした。HLA-A24 患者 78 例、-A2 患者 35 例、計 113 症例に対し臨床試験を実施し、ワクチン開始前および 6 回投与後の血中抗ペプチド抗体量、末梢血 CTL のワクチンペプチドに対する *in vitro* での反応性、細胞傷害活性、および DTH を測定した。その結果、ワクチン開始 6 回後という比較的早期の時点での細胞傷害活性、CTL 反応性、および DTH と予後との間に相関は認められなかったが、抗ペプチド抗体の誘導と生存期間延長とのあいだには強い相関が認められた。これらのことより、ペプチド特異的抗体の誘導はワクチン投与患者の予後を規定する良好なマーカーであることが示唆された。また、抗腫瘍免疫作用発現における抗体の関与も示唆された。

早期第 II 相臨床試験の成績

子宮頸癌、再燃前立腺癌、およびスキルス胃癌患者に対し早期第 II 相臨床試験を実施中である。第 I 相試験で使用された 30 種類のペプチドにはその使用頻度、および免疫誘導能において大きな偏りがあった。すなわち、HLA-A24 患者用には SART3-109, SART3-315, lck-208, lck-408 の 4 種、HLA-A2 患者用には CypB-172, lck-246, MAP-432, UBE-43 の計 8 種類のペプチドが高頻度に投与され、かつ CTL, DTH, 抗体のいずれをも高頻度に誘導可能であった。このことより、これらのペプチドを用いればテラーメイド型ワクチンに匹敵する臨床成績が得られることが期待された。そこで、上記 8 種類のペプチドを用いた“非テラーメイド”ワクチンの早期第 II 相臨床試験を子宮頸癌およびスキルス胃癌患者 15 例に対し実施した。テラーメイド型の TTP は 4 ヶ月であったのに対し、非テラーメイド型では 1.5 ヶ月ときわめて悪い結果となった。これらのことより、テラーメイド型の必要性が再確認された。ホルモン不応性再燃前立腺癌に対する臨床試験は現在継続実施中であるが、2003 年 12 月現在の解析では、低用量の抗癌剤リン酸エストラムスチンと

の併用により15例中7例においてPR、5例でSDとなっており、PD症例は3例のみであった。また、生存期間中央値は25ヶ月を超えている。

D. 考察

本年度は新たに5分子の癌抗原をコードする遺伝子、およびCTLによりHLA-A2、-A24および-A26拘束性に認識される9種の抗原ペプチドを同定した。日本人におけるこれらのHLAタイプはそれぞれ、約40%、60%、及び20%である。そこで、これらのHLAタイプに対応するワクチンペプチドを今後も同定することにより、日本人の約9割の患者に対応できる癌ワクチンが開発されることになる。また、第1相試験の解析結果より、癌抗原ペプチドに対する抗体がすでに患者の体内に存在すること、これらの抗体はワクチン投与により増加し臨床予後とも相関することが明らかになり、ワクチンペプチド選択のための指標となることが示唆された。早期第II相臨床試験の成績よりテーラーメイド型でワクチン療法を実施する必要性が明確に示された。また、ホルモン不応性再燃前立腺癌に対する臨床試験では、低用量の抗癌剤リン酸エストラムスチンとの併用により15例中7例においてPR、5例でSDとなっており、CRは得られていないものの、きわめて高い奏率が得られている。また生存期間中央値25ヶ月は、既存の治療法、たとえばリン酸エストラムスチンと他の化学療法剤との併用が20ヶ月前後であることからしてきわめて有望な治療法であることが示唆された。そこで、医薬品承認申請にむけた治験（第I相試験）を平成16年秋より開始するために医薬品機構との調整を行っている。

E. 結論

本研究により、癌に対する特異免疫療法の基礎および臨床研究、とりわけ個々の患者の免疫学的個性に基づいたテーラーメイドペプチドワクチン開発の基盤的研究が飛躍的に推進された。

F. 健康危険情報

今回実施した臨床試験においてはワクチン投与局所における発赤腫脹などの炎症反応が約半数の症例において認められた。また、軽度の発熱や感冒様症状をはじめとする種々の有害事象がみとめられたが、これらは全症例においてトレラブルであり、安全であると判断された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Koga, S. Shichijo, A. Yamada, J. Ashihara, H. Sawamizu, J. Kusukawa, and K. Itoh. Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor-rejection antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens*, 61: 136-145, 2003.
2. A. Yamada, K. Kawano, M. Koga, S. Takamori, M. Nakagawa, and K. Itoh. Gene and peptide analyses of newly defined lung cancer rejection antigens recognized by HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, 63: 2829-2835, 2003.
3. N. Kawamoto, S. Ohkouchi, T. Maeda, S. Tanaka, T. Hashimoto, S. Saijo, Y. Saijo, S. Shichijo, K. Itoh, and A. Yamada. IgG reactive to CTL-directed epitope peptides is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigens*, 61: 352-361, 2003.
4. M. Noguchi, K. Kobayashi, N. Suetsugu, K. Tomiyasu, S. Suekane, A. Yamada, K. Itoh, and S. Noda. Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *Prostate*, 57:80-92, 2003.