

遺伝子治療 腫瘍特異的発現 vector を用いた癌免疫遺伝子治療の基礎的検討. 東幸助, 裕彰一, 飯塚徳男, 丹黒章, 野間隆文, 岡正朗. 日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page397(2004.09)

癌に対する Cell therapy 切除可能膵癌に対する MUC1-CTL 療法:河岡徹, 山本光太郎, 吉野茂文, 裕彰一, 丹黒章, 岡正朗. 日本癌治療学会誌 39 巻 2 号 Page358(2004.09)

膵癌に対する MUC1-CTL を用いた術後補助免疫療法: 河岡徹(山口大学 第 2 外科), 山本光太郎, 吉野茂文, 裕彰一, 丹黒章, 岡正朗. 日本消化器外科学会雑誌 37 巻 7 号 Page1120(2004.07)

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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
裕 彰一	癌の補助療法 (免疫など)		消化器外科学 レビュー2004 —最新主要文 献と解説—	株式会社 総合 医学社	東京	2004	34-39

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oka M.	Immunological evaluation of personalized peptide vaccination for patients with pancreatic cancer.	Oncol Rep,	in press		
Oka M.	Tumor HLA-DR expression linked to early hepatic recurrence of hepatocellular carcinoma.	Int J Cancer.	115(2)	231-240	2005
Oka M	Overexpression of alpha enolase in poorly differentiated hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection.	Proteomics.	Epub ahead of print]		2005
Oka M.	High IL-15 secreting tumour induces specific immunity through CD8+ T cells to low immunogenic colon Adenocarcinoma.	Int J Mol Med.	14(1)	571-576	2004
有賀 淳	消化器癌における免疫療法	東京女子医科大学雑誌	74(6/7)	291-299	2004
有賀 淳	Immunohistological Evaluation of Single	Journal of Surgical	88	104-107	2004
有賀 淳	樹状細胞を用いた癌免疫療法の理論と実際	血液・免疫・腫瘍	9(1)	51-63	2004
有賀 淳	腫瘍細胞の多様性に対応した複合癌免疫細胞療法の新規開発	癌と化学療法	31(11)	1655-1658	2004
有賀 淳	最新のがん免疫療法	総合臨床	53(8)	2255-2260	2004
YOSHIYUKI YAMAGUCHI,	Host-oriented Peptide Evaluation using Whole Blood Assay for Generating Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes.	Anticancer Res	24	1193-1200	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshiyuki YAMAGUCHI	Locoregional immunotherapy of malignant ascites from gastric cancer using DTH-oriented doses of the streptococcal preparation OK-432-Treatment of Th1 dysfunction in the ascites microenvironment.	Int'l J Oncol:	24	959-966,	2004
Yoshiyuki YAMAGUCHI	Enhancing Effect of PS-K on IL-2-Induced Lymphocyte Activation-Possible Involvement of Antagonistic Action Against TGF-beta.	Anticancer Res.	24	639-648,	2004
Mitsuo Katano	Paclitaxel probably enhances cytotoxicity of natural killer cells against breast carcinoma cells by increasing perforin production.	Cancer Immunol Immunother	54	468-476	2005
Mitsuo Katano	Three-dimensional two-layer collagen matrix gel culture model for evaluating complex biological functions of monocyte-derived dendritic cells.	J Immunol Methods	287	79-90	2004
片野光男	免疫学を基盤とした腫瘍制御法の開発	Biotherapy	18(2)	107-114	2004
Mitsuo Katano	Monocyte-derived dendritic cells that capture dead tumor cells secrete IL-12 and TNF-a through IL-12/TNF-a/NF-kB autocrine loop.	Cancer Immunol Immunother	53	1093-1100,	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mitsuo Katano	Dendritic-cell therapy after non-myeloablative stem-cell transplantation for renal-cell carcinoma.	<i>Lancet Oncol</i>	5	750-752	2004
Ueda Y	Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 cases with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas.	<i>Int J Oncol</i>	Vol. 24	909-918	2004
Ueda Y	Mobilization of peripheral blood stem cells (PBSCs) after original etoposide, adriamycin, and cisplatin therapy and a multimodal cell therapy approach with PBSCs in advanced gastric cancer.	<i>Oncol Rep</i>	Vol. 12	323-332	2004
Ueda Y	Recognition of Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma cells by cytotoxic T lymphocytes induced in vitro with autologous lymphoblastoid cell line (LCL) and LMP2-derived, HLA-A24-restricted 9-mer peptide.	<i>Oncol Rep</i>	Vol. 12	725-732	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
上田祐二	新しい癌の体外循環治療技術の開発.	医学のあゆみ	Vol. 208	1012-1013	2004
Tani M,	Complication of jejunal pouch interposition after proximal gastrectomy: case report.	Hepatogastroenterology.	51(57)	916-8	2004
Tani M,	Virus-associated hemophagocytic syndrome and hemorrhagic jejunal ulcer caused by cytomegalovirus infection in a non-compromised host; a case report of unusual entity.	Hepatogastroenterology.	51(56)	491-3	2004
Tani M,	Timing of laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis with cholecystolithiasis.	Hepatogastroenterology.	51(56)	346-8	2004
Tani M,	Clinicopathological features of malignant intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas: the differential diagnosis from benign entities.	Arch Surg.	139(2)	188-92.	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koji Kono	Distribution of regulatory T cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer.	Journal of Surgical Research	124	151-157	2005
Koji Kono	Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with esophageal squamous cell carcinoma.	British Journal of Cancer	On line available		2005
Heike, Y	Freeze-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14 ⁺ monocytes.	Journal of Immunotherapy	27	27-35	2004
Heike, Y	Expansion of α -Galactosylceramide-Stimulated $V\alpha 24^+$ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials.	Journal of Immunotherapy	In press	Expansion of α -Galactosylceramide-Stimulated $V\alpha 24^+$ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials.	Journal of Immunotherapy

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hazama S,	Tumor secreting high levels of IL-15 induces specific immunity to low immunogenic colon adenocarcinoma via CD8+ T cells.	Int J Mol Med.	14(4)	571-6	2004
裕 彰一	免疫逃避機構	コンセンサス 癌治療	3(2)	110-110	2004

消化器外科学レビュー

最新主要文献と解説

2004

監修

跡見 裕 杏林大学医学部教授

炭山 嘉伸 東邦大学医学部教授

門田 守人 大阪大学医学部教授

総合医学社

6. 癌の補助療法 (免疫など)

はざま 裕 しょういち 影一, おか 正朗 まさあき

山口大学 消化器・腫瘍外科 (第二外科)

最近の動向

癌の免疫療法は、腫瘍抗原の同定が精力的に進められてきたこともあり、非特異免疫療法から特異的免疫療法へと進化した。従来から非特異的免疫療法剤として用いられていた BRMs や非特異的細胞療法においても、腫瘍特異免疫を誘導するひとつの方法として位置づけることができる。なかでも、樹状細胞を抗原提示細胞として用いる養子免疫療法は、本年も最も注目されている特異的免疫療法である。

生体内で免疫寛容を獲得している癌組織に対して、ふたたび宿主の腫瘍特異免疫を復活させるための道具はかなり調ってきており、集学的な戦略が重要となった。癌の補助療法としての位置づけも、癌種によっては化学療法や放射線療法を凌ぐものとなる日は近いであろう。

免疫療法

癌免疫療法が効果を上げるためには、腫瘍を選別認識する効果細胞 (免疫細胞) が生体内に存在し、効果細胞が腫瘍局所に移動し、腫瘍に結合してこれを破壊する必要がある。このうちのどのステップが欠けても抗腫瘍免疫は成立しない。末期癌に対する免疫療法に比べ、補助療法として手術後に行う免疫療法の利点は、残存腫瘍の細胞数が少ないことであり、腫瘍因子による免疫抑制の影響が少なく、腫瘍の牙城が形成されていないことから効果細胞の局所到達も容易であると予想され、免疫療法の格好の適応といえる。以下、各ステップにおけるこの一年間の報告で特に目を引くものを紹介する。

1. 腫瘍抗原

多くの腫瘍関連抗原が次々と同定され、癌ワクチン療法に臨床応用されている。新しく同定された抗原を用いた研究ならびに以前から知られていた抗原について発展させた研究が、精力的に行われている。

Ras oncogene は肺癌 (90%) や大腸癌 (40%) で遺伝子変異を起こしており、この変異タンパクが腫瘍抗原となると考えられ、これをターゲットとした免疫療法が行われてきた。13 mer の変異 ras ペプチド (SQ) を用いた第 I 相試験で最大耐用量・推奨投与量が $5\mu\text{g}$ と決定された。さらに、切除不能進行

再発大腸癌患者を主とした18例に対して、SQ を5 μ g皮下投与し GM-CSF, IL-2を併用したところ、3回以上のワクチン投与が可能であった11例では、ワクチン投与後の生存中央値は14ヵ月であり、大腸癌患者の肺転移が完全消失するなどの明らかな抗腫瘍効果を認めている¹⁾。

また、治癒切除がなされた、臍癌 (5例) ならびに Dukes C&D 大腸癌 (7例) に対しては SQ ならびにアジュバントとして DetoxTM を4週ごとに最大6週投与した。12例いずれにも重篤な副作用は認めなかった。このうち10例には標準的な補助化学・放射線療法が施行された。すべての患者で変異 ras に対する特異免疫が誘導され、無再発生存に関しても良好な結果が得られている^{2,3)} など、変異rasに対する特異免疫誘導の試みが精力的になされている。

70%以上の大腸癌で発現しているヒト癌胎児抗原5T4をターゲットとした特異免疫療法も試みられている。弱毒化 vaccinia virus を担体として5T4抗原を投与した第I相試験では毒性は全く認められず、細胞性ならびに液性免疫が誘導された。さらに、腫瘍マーカーの低下や病勢進行の停止を認めている⁴⁾。

また、癌抑制蛋白であるp53発現腫瘍に対するワクチン療法も進行している^{5,6)}。p53は大腸癌の50%以上で過剰発現していることから、有用な腫瘍抗原となると考えられてきた。カナリア種痘ウイルスに野生型p53を組み込み静脈投与する phase I study がp53を過剰発現している大腸癌患者に対して行われた。毒性は発熱が主なものであり、細胞性・液性免疫が誘導された患者もいた。しかしながら、臨床効果的には目立った効果は認められなかった⁶⁾。

変異型P53蛋白は特異的なペプチド配列をもつため、これに対する特異免疫が誘導できる可能性が高い。変異p53を発現している大腸癌 (10例)、卵巣癌 (9例)、その他 (5例) に対してphase I/II 試験が行われた。変異p53ペプチドは末梢血から誘導した前未熟樹状細胞にパルスしたものを静脈投与された。また、ペプチド活性化リンパ球も併用し、IL-2も投与されていた。ワクチンによる毒性は全く認めず、IL-2に関連したものも重篤ではなく速やかに消失した。予想を上回る効果が得られており、すべての症例が3レジメン以上の化学療法を受けていたにもかかわらず、卵巣癌では progression-free survival (PFS) と post-vaccination survival (PVS) はそれぞれ13ヵ月、32ヵ月、大腸癌では4.6ヵ月、20ヵ月であり、5例は30~58ヵ月経過しているが、なお生存中であるという⁷⁾。

Carcinoembryonic antigen (CEA) は、消化器癌をはじめとする腺癌の腫瘍マーカーとして利用され、また、特異免疫の抗原蛋白としても臨床応用されている。頭頸部扁平上皮癌 (主に下咽頭癌、喉頭癌および食道癌) においても CEA は細胞質内に高頻度で発現しており、CTL の誘導や細胞障害活性も認められ、特異免疫療法のターゲットとなりうるということが報告されている⁸⁾。

また、第二世代のペプチド療法として、オーダーメイドの個別化治療、すな

- 1) Achtar M, Behrens RJ, Herrin Y et al : Mutant ras vaccine in advanced cancers. Proc ASCO 22 : (abstr No : 677), 2003
- 2) Hamilton J, Behrens RJ, Achtar M et al : An adjuvant phase II pilot trial of mutant ras peptide vaccine in stage II and III pancreatic and Dukes C and D colorectal cancer. Proc ASCO 22 : (abstr No : 745), 2003
- 3) Shono Y, Tanimura H, Iwahashi M et al : Specific T-cell immunity against Ki-ras peptides in patients with pancreatic and colorectal cancers. Br J Cancer 88 : 530-536, 2003
- 4) Valle JW, Connolly NB, Harrop R et al : Phase I study of escalating doses of TroVax in patients with advanced colorectal cancer (CRC). Proc ASCO 22 : (abstr No : 726), 2003
- 5) Liauw WS, Lomas M, Packham D et al : Phase I trial of an anti-p53, anti-idiotype vaccine : Immunogenicity in humans of peptides representing human complementarity determining regions (CDR). Proc ASCO 22 : (abstr No : 729), 2003
- 6) Menon AG, Kuppen PJ, van der Burg SH et al : Safety of intravenous administration of a canarypox virus encoding the human wild-type p53 gene in colorectal cancer patients. Cancer Gene Ther 10 : 509-517, 2003
- 7) Behrens RJ, Achtar M, Herrin Y et al : Phase I/II mutant p53 vaccination in advanced malignancies. Proc ASCO 22 : (abstr No : 744), 2003
- 8) Kass ES, Greiner JW, Kantor JA et al : Carcinoembryonic antigen as a target for specific antitumor immunotherapy of head and neck cancer. Cancer Res 62 : 5049-5057, 2002

わち個々の患者が末梢血中に CTL 前駆細胞を有するペプチドを最大4種類選択して投与し、さらにワクチン投与中に再度前駆細胞の存在を再検討し、投与ペプチドを変更する方法が考案され、肺癌、胃癌、大腸癌などでペプチド特異的免疫の誘導とともに、腫瘍の縮小や生存期間の延長など優れた臨床効果が報告されている^{9,10)}。

2. 腫瘍抗原の提示

腫瘍抗原の提示は抗原提示細胞 (APC) から T 細胞へと行われる。なかでも樹状細胞はプロフェッショナル APC として近年注目されており、しばらく樹状細胞の時代が続くと思われる。この一年の報告でも、樹状細胞をいかに効率的に使うかについての報告が大半を占める。

ペプチドワクチン投与に先立って生体内の樹状細胞を増加させるために、造血系成長因子である Flt3-Ligand (FL) の投与が行われているが、FL により増加する樹状細胞は未熟型のフェノタイプが多いことが問題となる。これに対して DC の成熟化と抗原提示能の増強のために toll-like receptor (TLR)-7 ligand (imiquimod) を併用皮下投与したところペプチドに対する CTL 反応が著明に増強し、毒性の増加はなかった。本法によれば多大な労力と費用を要する *ex vivo* での DC 培養が不要となるため、今後の展開が期待される¹¹⁾。

*ex vivo*において誘導・活性化した樹状細胞を生体に投与したとき、生体内での樹状細胞の動態は CTL 誘導能を知るうえで極めて重要である。ヒトでの検討は倫理面的問題もあり、あまり行われていない。Riccobon らは、末梢血単球から IL-4 と GM-CSF で誘導した未熟 (immature) 樹状細胞 (iDC) ならびに、さらに TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2 にて成熟させた mature (m) DC を radioisotope でラベルした後、リンパ節近傍の皮内に投与し、その移動状況を詳細に検討している。mDC では iDC に比較してリンパ節への集積性が 2~35 倍高度であり、投与後 20~60 分後にはすでにリンパ節への集積が開始され、2~12 時間後にピークを迎え、48~72 時間後まで集積が認められたとしている。この研究により、mDC は iDC に比較して所属リンパ節への集積が高度に認められることが判明し、リンパ節における CTL 誘導が効率的であることが予想された¹²⁾。

mDC を誘導することは、生体内での走化性の向上において重要であるばかりでなく、CTL 誘導能においても iDC の数千倍の効率であることが知られており、より CTL 誘導能の高い DC を誘導する条件が検討され続けている。この際、誘導された DC が GMP grade であることが臨床治療で要求されるため様々な工夫がなされている。Gillet らは、植物細胞増殖因子である Lipochitooligosaccharides (LCOS) 1013 を iDC 培養液に添加し、成熟化促進機能を TNF- α と比較したところ、LCOS 群では CD80, CD40, CD83, CCR7, DC-LAMP の発現が高く、CD14, CD16, CD32, CD64 の発現が低い、

9) Suzuki N, Maeda Y, Tanaka S et al : Detection of peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors used for specific immunotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 98 : 45-50, 2002

10) Sato Y, Shomura H, Maeda Y et al : Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci* 94 : 802-808, 2003

11) Parente P, Davis ID, Jackson H et al : Impact of toll-like receptor (TLR)-7 ligand, imiquimod, on immune responses to cancer antigens in vaccine recipients receiving Flt3-Ligand (FL) and peptide antigens. *Proc ASCO* 22 : (abstr No : 676), 2003

12) Riccobon A, Ridolfi R, Fiorentini G et al : Dendritic cell vaccination in patients with melanoma and renal carcinoma : Evaluation of radio-labeled immature and mature DC *in vivo* migration. *Proc ASCO* 22 : (abstr No : 670), 2003

より成熟度の高い mDC が得られた。誘導された CTL の細胞障害性は両者で同等であったが、興味あることに、mDC と混合培養した自己リンパ球の増殖が LCOS 1013 で著明に高度であったとしている¹³⁾。

本邦で古くから非特異的免疫賦活剤として用いられている、いわゆる biological response modifiers (BRMs) を用い、質の良い樹状細胞を誘導しようとする試みもなされている。BRMs を用いる利点は、すでに臨床応用されている薬剤であるため、当然 GMP grade であり、*ex vivo* で誘導される DC の成熟化に用いることにより、治療薬剤・DC 製剤としてグレードの高いものが得られることになる。なかでも OK-432 は溶連菌菌体成分が主体の製剤であるため、抗原性が極めて高く、iDC に対する成熟を促す dangerous signal として極めて有用であり、強力に mDC (CD80, CD83, CD86, ICAM-1 陽性) を誘導し、CTL 誘導能も増強する¹⁴⁾。さらに、OK-432 の成熟誘導能は LPS や TNF- α と比較して、IL-12 と IFN- γ 誘導能において優れているとされる¹⁵⁾。他に、lentinan や PSK も mDC 誘導を促進することが知られている。

3. 腫瘍の免疫逃避機構とその対策

a) 腫瘍側因子

癌細胞の免疫逃避機構として、腫瘍抗原の発現低下が挙げられる。

腫瘍細胞表面に腫瘍抗原が提示されるためには、まず腫瘍抗原蛋白が細胞内に存在し、イムプロテアソームによりプロセッシングを受けて蛋白が提示ペプチドとなり、transporter associated with antigen processing (TAP) により細胞内輸送され、HLA-A, B, C ならびに β 2-microglobulin (β 2m) と結合して腫瘍細胞表面に提示されることが必要である。消化器癌細胞においても HLA class I 発現が低下しており、腫瘍免疫機構に有利に働いているとされる。大腸癌124例に関する検討では、うち14例 (11%) で class I 発現を認めなかった。HLA class I 発現低下の分子機構を詳細に検討すると、そのうち4例においては microsatellite instability (MSI) が陽性であり、両アレルの β 2m が不活化されており、細胞質内に HLA class I heavy chain の蓄積が認められたという。また、MSI 陰性の10例においては、うち9例で low molecular weight polypeptide proteasome subunit 7 (LMP7) の発現低下があり、4例で TAP2 の発現低下があったという。これら10例の heavy chain と β 2m の発現は正常であった¹⁶⁾。また、Miyagi ら¹⁷⁾ は、大腸癌細胞株を用いて検討したところ、HLA class I を発現していない腫瘍細胞においては、LMP2, multicatalytic endopeptidase complex-like-1 (MECL-1), PA28 α , PA28 β 等のプロテアソームサブユニットの発現を欠失しており、IFN- γ 処理により、LMP2, MECL-1 および PA28 β の発現は回復したが、HLA class I は回復しなかったとしている。限局癌が浸潤癌、転移癌へと進展する過程においても HLA の発現は低下し、悪性度・免疫逃避機構が助長される¹⁸⁾。このように、

13) Gillet SA, Duperrier K, Picandet S et al : Improvement of maturation of stable monocyte-derived dendritic cells in the presence of LCOS 1013 compared with tumor necrosis factor alpha. Proc ASCO 22 : (abstr No : 747), 2003

14) Itoh T, Ueda Y, Okugawa K et al : Streptococcal preparation OK432 promotes functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Cancer Immunol Immunother 52 : 207-214, 2003

15) Nakahara S, Tsunoda T, Baba T et al : Dendritic cells stimulated with a bacterial product, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. Cancer Res 63 : 4112-4118, 2003

16) Cabrera CM, Jimenez P, Cabrera T et al : Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways : beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. Tissue Antigens 61 : 211-219, 2003

17) Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T et al : Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. J Gastroenterol Hepatol 18 : 32-40, 2003

18) Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F : MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. J Cell Physiol 195 : 346-355, 2003

HLA class I 発現の認めない腫瘍に対しては MHC に依存しない免疫監視機構が重要となり、MHC 非拘束性様式で腫瘍を認識・攻撃する効果細胞の増強が重要となる。

CD3+CD56+ の NKT 細胞は MHC 非拘束性に NK 活性、LAK 活性のみならず自己腫瘍障害活性をもっており、抗腫瘍エフェクターとして期待されている。Gritzapis ら¹⁹⁾ は、末梢血単核球 (PBMC) を抗 CD3 抗体存在下に培養して得られたサイトカインリッチな上清を用いることにより、PBMC から大量に NKT を誘導することに成功した。担癌患者からも NKT の誘導は可能であり、大腸癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、膵臓癌などの様々な進行癌患者から誘導した NKT 細胞は、自己腫瘍に対して強い抗腫瘍活性をもっていたことから、臨床応用が期待できる。また、キメラ T 細胞受容体 (cTCR) を遺伝子導入することにより、MHC 非拘束性に腫瘍抗原を認識・攻撃する T 細胞が作成された²⁰⁾。Fc receptor γ chain (FcR γ) あるいは TCR ζ chain を用いて cTCR を作成し、これを導入した T 細胞では、いずれの導入細胞においても、MHC 非拘束性に抗原特異的な殺腫瘍活性をもっていた。さらに、補助刺激分子の導入を行っていないにもかかわらず、activation-induced T cell death (AICD) は認められなかったことから、特異免疫療法の新しい戦略として期待される。

b) 宿主側因子

腫瘍が生体内に存在すると、腫瘍産生因子あるいは腫瘍間質に存在する免疫細胞や間質細胞から産生される免疫抑制物質 (TGF- β , IL-6, IL-10, PGE2) 等の作用により腫瘍局所の免疫監視機構や全身の免疫能が低下する。これが腫瘍の逃避機構の一因となっている。DC の成熟には TNF- α が必要であるが、腫瘍局所における cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の蓄積は TNF- α の産生を低下させる。さらに TNF- α はヘルパーならびに細胞障害性リンパ球の増殖や抑制性リンパ球の抑制機能をもつため、この産生を回復させることは重要である。Tenofovir²¹⁾ は HIV 治療に用いられている経口剤であるが、cAMP の蓄積を抑制し、TNF の産生を増強するとされている。Prostaglandin E (PGE) も cAMP の増加から TNF 産生を抑制するとされるが、COX inhibitors (NSAIDs) により PGE の抑制が可能であることは知られている。したがって、Tenofovir や COX inhibitors を免疫療法に併用することにより腫瘍による免疫抑制が解除され、抗原提示能の増強やリンパ球の増殖が期待される。

担癌患者では単球、ならびにヘルパー T リンパ球 (Th) の産生サイトカインが IL-10 や IL-6 などのいわゆる Th2 系のサイトカイン優位となっており、細胞性免疫が抑制されていることが知られている。このような進行癌患者に old BRMs である PSK、あるいは lentinan を投与したところ、単球ならびに Th において、IL-10 陽性細胞の比率が有意に低下したことから、担癌による

19) Gritzapis AD, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E et al: Large-scale expansion of CD3(+)/CD56(+) lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants. *Cancer Immunol Immunother* 51: 440-448, 2002

20) Ren-Heidenreich L, Mordini R, Hayman GT et al: Comparison of the TCR zeta-chain with the FcR gamma-chain in chimeric TCR constructs for T cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 51: 417-423, 2002

21) Kast RE: Tenofovir, COX inhibitors and zileuton during cancer immunotherapies: up-regulated TNF-alpha increases antigen driven lymphocyte proliferation. *Mol Immunol* 40: 297-303, 2003

免疫抑制状態が解除されたものと考えられ、他の特異免疫療法との併用意があると考えられた²²⁾。同様に、癌患者単球から誘導した樹状細胞フェノタイプを健康人のものと比較したところ、患者 DC では分化抗原の発現が低値であり、また、DC ワクチン療法の有効例と無効例の比較では、無効例では CD1a, CD80, CD11c, HLA-DR が低値であった²³⁾。このような免疫抑制状態にある患者単球・樹状細胞系に対しても、いわゆる old BRMs は有効であると考えられる。

腫瘍の逃避機構のひとつとして、腫瘍が宿主の免疫系から免疫寛容となっていることが挙げられる。免疫寛容に関する重要な分子として、Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4 ; CD152) が知られている。CTLA-4 は活性化 T 細胞や CD4+CD25+ T 細胞の一部に発現している免疫抑制性分子である。この分子をブロックすることにより、腫瘍細胞に対する免疫寛容を解除しようとする試みがなされているが、CTLA-4 は自己組織に対する免疫寛容を調節している分子でもあるため、この機能分子の抑制は腫瘍の退縮と同時に自己免疫疾患を誘導する可能性があり、諸刃の刃であるといえる。完全ヒト型抗 CTLA-4 抗体 (MDX-010) を腫瘍関連抗原である gp100 とともに癌患者に投与した臨床研究²⁴⁾ では、腫瘍退縮が得られた症例があり、すべての患者において gp100 に対する特異免疫が誘導されたものの、約半数の患者に Grade III-IV の自己免疫反応が出現している。ただし、この自己免疫反応は自然消失、あるいはステロイド反応性のものであり、すべての患者はもとの状態に回復している。

おわりに

癌免疫療法は理論的には癌をかなり追いつめてきた。臨床効果も免疫療法単独で目に見える効果が得られるようになった。癌補助療法としてのトライアルは新しい治療であるがゆえにあまり行われてきてはいないが、今後活発に行われるようになると思われる。しかしながら、切除不能癌においては、有効率・腫瘍縮小率ともに満足できるものとは言い難い。あとひとつのブレイクスルーを起こすことにより、真に有効な治療法になる日は近いと思われる。研究者の熱意とアイデアに期待したい。

22) Yoshino S, Hazama S, Shimizu R et al : Immunoregulatory Effects of PSK on the Balance between Th1 and Th2 in Patients with Colorectal Cancer. *Biotherapy* 17 : 26-31, 2003

23) Matthes C, Marx D, Cillien N et al : Marker expression of monocyte-derived dendritic cells in healthy individuals and cancer patients; correlation to clinical response. *Proc ASCO* 22 : (abstr No : 723), 2003

24) Phan GQ, Haworth LR, Duray PH et al : Blockade of CTLA-4 with MDX-010 in humans can induce both autoimmunity and cancer regression. *Proc ASCO* 22 : (abstr No : 3424), 2003

Immunological evaluation of personalized peptide vaccination for patients with pancreatic cancer

Yamamoto, Koutaro MD, PhD; Mine, Takashi MD, PhD; Katagiri, Kazuko; Suzuki, Nobuaki MD, PhD; Kawaoka, Toru MD, PhD; Ueno, Tomio MD, PhD; Matsueda, Satoko MS; Yamada, Akira PhD; Itoh, Kyogo MD, PhD; Yamana, Hideaki MD, PhD; Oka, Masaaki MD, PhD

Koutaro Yamamoto, Nobuaki Suzuki, Toru Kawaoka, Tomio Ueno, Masaaki Oka
Department of Digestive Surgery and Surgical Oncology (Surgery II), Yamaguchi University School of Medicine, Ube, Japan

Takashi Mine, Kazuko Katagiri, Satoko Matsueda, Akira Yamada, Kyogo Itoh
Departments of Immunology and Research Center of Innovative Cancer Therapy of the 21st Century COE Program for Medical Science, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

Takashi Mine, Hideaki Yamana
Department of Surgery, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

Correspondence to: Takashi Mine MD, Department of Immunology, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi Kurume 830-0011, Japan. Tel: +81-942-317699, Fax: +81-942-317551, E-mail: mine@med.kurume-u.ac.jp

This study was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan (no. 12213134 to K.I. and Research Center of Innovative Cancer Therapy of 21st Century COE Program for Medical Science to K.I. and S.S.), from the Japan Society for the Promotion of Science (no. 14570526 to S.S.), and from the Ministry of Health and Welfare, Japan (no. H14-trans-002 and 11-16).

Abstract: The prognosis of pancreatic cancer is extremely poor, and development of new treatment modalities is needed. One such treatment could be specific immunotherapy. To evaluate safety and immunological responses, we conducted a phase I study of personalized peptide vaccination for pancreatic cancer patients (n=11). Namely, pre-vaccination peripheral blood mononuclear cells were screened for their reactivity *in vitro* to each of 14 or 16 peptides in HLA-A24⁺ or -A2⁺ patients, and then only the reactive peptides (maximum: 4) were vaccinated *in vivo*. This regimen was generally well tolerated, although inflammatory reactions at the injection site were observed in 7 patients. Delayed-type hypersensitivity to peptides used for vaccination was observed in 7 patients. Increased cellular and humoral immune responses to at least one of peptides used for vaccination were observed in the post-vaccination PBMCs and sera from 4 of 8 patients and 4 of 10 patients tested, respectively. The 6- and 12-month survival rates for patients who received more than 3 vaccinations (n=10) were 80% and 20%, respectively. Due to tolerability and capability of inducing specific immunity, further development of personalized peptide-based immunotherapy for pancreatic cancer patients is warranted.

Keywords: personalized peptide vaccination, pancreatic cancer, clinical trial, CTL precursors, peptide antibody

Introduction

Patients with pancreatic cancer (PC) have a poor prognosis, and for this reason, PC is considered to be one of the deadliest types of malignancy. The median survival time (MST) after diagnosis is less than 12 months, with a 5-year survival rate of approximately 3-5%.^{1,2} There is no standard therapy for advanced PC, although many chemotherapeutic agents have been used in clinical trials in the past two decades.³⁻⁶ Among these chemotherapeutic agents, gemcitabine (GEM) is somewhat clinically effective, but the MST is still less than 6-9 months. Therefore, development of new treatment modalities is needed, one such treatment could be a peptide-based specific immunotherapeutic approach, as recent advances in tumor immunology have resulted in the identification of many tumor-associated antigens and epitopes recognized by HLA-class-I-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTLs) from various cancers, including PC.⁷⁻¹⁰ However, clinical trials using those peptides have rarely demonstrated major clinical responses.¹¹⁻¹³ This failure could be due to an insufficient induction of anti-tumor responses by these vaccine regimens, under which the peptide-specific memory T cells were not measured in pre-vaccination peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). We have reported that personalized vaccinations based on pre-vaccination measurement of peptide-specific CTLs in the circulation induced potent anti-tumor immune responses in patients with cancers, such as lung, gastric, colorectal, prostate, and gynecologic cancers.¹⁴⁻¹⁹ Moreover, we previously reported that PC cells expressed tumor-associated antigens, that encoded the peptides used for those clinical studies.²⁰ Peptide-specific CTL precursors were also detectable in the majority of PC patients.²⁰ In this report, we describe the safety and the immune responses to personalized peptide vaccination of PC patients.

Materials and Methods

Patients and eligibility criteria

The Institutional Review Boards of Yamaguchi University and Kurume University approved this clinical protocol (#2031). Complete written informed consent was obtained from all of the patients at the time of enrollment. According to the protocol, the patients were required to be positive for HLA-A24 or A2. All patients were clinically confirmed to have PC. Eligibility criteria included the following: age of 85 years or less, serum creatinine of less than 1.4 mg/dl, bilirubin of less than 1.5 mg/dl, platelet count of 100,000/ μ l or more, hemoglobin of 8.0 g/dl or more, and total WBC of 3000/ μ l or more. Hepatitis B surface antigen and Hepatitis C antibody were negative in all patients. The

patients were untreated for at least 4 weeks before entry into the study, and had to have an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) of 0 to 2 at the time of entry. Patients with evidence of other serious illness, immunosuppression, or autoimmune disease were excluded. Treatment was carried out at Yamaguchi University and Kurume University Hospitals from March 2001 through March 2004.

Screening of peptide-specific CTL-precursors

Thirty ml of peripheral blood was obtained before and after every 3 vaccinations. PBMCs were isolated by means of Ficoll-Conray density gradient centrifugation, and were then used for a CTL precursor assay, as reported previously.²⁰ In brief, PBMCs (1×10^5 cells/well) were incubated with 10 μ M of a peptide in wells of u-bottom-type 96-well microculture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in 200 μ l of culture medium containing 100 U/ml of interleukin-2 (IL-2). Half of the medium was removed and replaced with new medium containing a corresponding peptide (20 μ M) every 3 days. After incubation for 12 days, these cells were harvested and tested for their ability to produce interferon- γ (IFN- γ) in response to CIR-A2402 cells for HLA-A24⁺ or to T2 cells for HLA-A2⁺ patients, were pre-loaded with either a corresponding peptide or a HIV peptide (RYLRQQLLGI for HLA-A24⁺ and SLYNTVATL for HLA-A2⁺ patients) as a negative control. The level of IFN- γ was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (limit of sensitivity: 10 pg/ml). Two-tailed Student's *t* test was employed for the statistical analyses.

Peptides and vaccination

The peptides used in the present study were prepared according to good manufacturing practice conditions using Multiple Peptide System (San Diego, CA). The sequences of the peptides are shown in Table 1. All of these peptides have the ability to induce HLA-A24- or HLA-A2-restricted and tumor-specific CTL activity in the PBMCs of cancer patients.⁷⁻²⁰ Montanide ISA-51 adjuvant (known as incomplete Freund's adjuvant (IFA)) was purchased from Seppic, Inc. (Franklin Lakes, NJ). The peptides were supplied in vials containing 2 mg/ml sterile solution for injection. One ml of solution was added in a 1:1 volume to IFA, and then the solution was mixed in a vortex mixer (Fisher, Inc., Alameda, CA). The resulting emulsion was injected subcutaneously into the thigh using a glass syringe. The interval between vaccinations was 2 weeks, and a total of 3 injections were performed. For patients with a favorable clinical course, vaccination was repeated in order to further evaluate adverse events, immunological responses, and clinical responses.

Immunological assays

Skin tests were performed by intradermal injection of 50 µg of each peptide using a tuberculin syringe and a 27-gauge needle. Saline was used as a negative control. Immediate and delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions were determined at 20 minutes and 24 hours after the skin test, respectively. At least 5 mm of induration or 10 mm of erythema was needed to score the skin test as positive. Cytotoxic activity was measured by a standard 6-hr ⁵¹Cr-release assay, as reported previously.²⁰ In brief, cryopreserved pre- and post (3rd to 9th)-vaccination PBMCs were thawed at the same time, and then were cultured in the medium with 100 U/ml of IL-2 in the absence of peptides. On the 21st to 25th days of culture, the cells were harvested and used for the assay. MIA PaCa2 (HLA-A24+A2⁻ pancreatic carcinoma, which was obtained from Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer Tohoku University), PK-8 (HLA-A24+A2⁻ pancreatic carcinoma), YPK-1 (HLA-A24+A2⁻ pancreatic carcinoma),¹⁹ Panc-1 (HLA-A24+A2⁺ pancreatic adenocarcinoma), and phytohemagglutinin (PHA)-blastoid T cells (HLA-A24⁺ or HLA-A2⁺) were used as target cells.

The serum levels of peptide-specific IgG were measured by ELISA, as previously reported.^{14,19} In brief, 100 µl/well of serum sample diluted with 0.05% Tween 20-Block Ace were added to the peptide (20 µg/well)-immobilized plate. After 2-hr incubation at 37°C, the plate was washed and further incubated for another 2 hours with a 1:1000-diluted rabbit anti-human IgG (γ-chain-specific, DAKO, Glostrup, Denmark). The plate was washed, then 100 µl of 1:100-diluted goat anti-rabbit Ig-conjugated horseradish peroxidase-dextran polymer (En Vision, DAKO) was added to each well, and the plate was incubated for 40 minutes. After washing, 100 µl/well of tetramethyl-benzidine substrate solution (KPL, Guildford, UK) was added, and the reaction was stopped by the addition of 1 M phosphoric acid. To estimate the peptide-specific IgG levels, the optical density (OD) values of each sample were compared with those of serially diluted standard samples, and the values are shown as OD units/ml.

Evaluation of adverse events and clinical response

All adverse events were evaluated by the National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 2.0 at every vaccination. All known sites of disease were evaluated by computed tomography (CT)-scan before and after every 3 vaccinations. Patients were assigned to a response category according to the response evaluation