

201110029A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ハイブリッドロングペプチドを用いた革新的次世代
がん治療用ワクチンの開発とその臨床効果

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西村 孝司

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

ハイブリッドロングペプチドを用いた革新的次世代がん治療用ワクチンの開発と その臨床効果	-----	3
西村 孝司		

II. 分担研究報告

1. ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療における癌抗原解析 および免疫モニタリングに関する研究	-----	12
北村 秀光・脇田 大功		
2. 進行・再発大腸癌に対するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン 治療に関する研究	-----	18
奥野 清隆・高橋 典彦		
3. 進行・再発乳癌に対するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療 に関する研究	-----	24
綿谷 正弘・高橋 弘昌		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	32
-----------------	-------	----

I . 総括研究報告

ハイブリッドロングペプチドを用いた革新的次世代がん治療用ワクチンの開発とその臨床効果

研究代表者 西村 孝司 北海道大学遺伝子病制御研究所 教授

研究要旨：

本研究において、がん抗原特異的ヘルパーT (Th) 細胞とキラーT細胞 (CTL) をそれぞれ活性化させるハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがん患者に対するがんペプチドワクチン臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを開発する。

本年度において、進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象とした、Survivin-H/K-HELPを用いたがんワクチン治療の探索的II相臨床試験の実施に向け、エントリー基準となるSurvivinがん抗原の解析法、評価項目となる免疫モニタリング法、抗腫瘍効果の判定プロトコルを記載した自主臨床試験実施計画書を整備した。また多施設共同による対象患者の適格基準、評価に関するがん抗原発現解析、がん抗原特異的抗体価、T細胞応答評価の標準化、データ解析のセントラル化を完了した。さらに全ての完遂症例を抗腫瘍効果の有無で二つにグループ分けし、グループ間で見られる免疫応答に関する制御因子の違いから、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうなバイオマーカーを探索・同定する付随研究プロトコルを作成した。

本臨床試験について、北海道大学病院自主臨床試験倫理審査委員会、遺伝子病制御研究所倫理審査委員会にて承認されるとともに、近畿大学医学部倫理委員会に審査申請し、さらに UMIN 臨床試験登録システムに登録（大腸癌：UMIN000007506、乳癌：UMIN000007507）した。このように、進行・再発大腸癌あるいは乳癌に対するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的II相自主臨床試験を実施する体制が整い、実際に大腸癌の患者がエントリーされた。次年度以降、本ペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果を検証するとともに、その臨床効果を予見し得るバイオマーカーの探索・同定も行うことで、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発を推進する。

今後、本研究を推進し、ワクチン投与による抗腫瘍効果および抗腫瘍免疫応答を精査することにより、患者のQOLを維持しつつ治療を行える日本発の革新的がん治療用ペプチドワクチンの医師あるいは企業主導治験への橋渡しが可能と考える。

研究分担者

北村 秀光 北海道大学遺伝子病制御研究所
免疫制御分野 准教授
脇田 大功 北海道大学遺伝子病制御研究所
免疫制御分野 助教
高橋 弘昌 北海道大学病院第一外科
准教授
高橋 典彦 北海道大学病院第一外科 助教
奥野 清隆 近畿大学医学部外科 教授
綿谷 正弘 近畿大学医学部外科 教授

日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンであるヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を高度医療評価制度あるいは医師主導治験へ橋渡しするためのエビデンスを得るため、本研究において世界に先駆けH/K-HELPの探索的II相自主臨床試験を実施し、医薬品の早期製造承認へ結びつける。

がんは依然として我が国の死亡原因、第1位であり、革新的次世代がん治療法の開発が望まれている。申請者らはマウスを用いた基盤的がん免疫研究成果により、担がん生体で免

A. 研究目的

疫応答を惹起するためには1型ヘルパーT細胞(Th1細胞)の活性化が必須であることを明らかにした。本免疫理論はヒトにおいても正しく、本研究に先行して行われたH/K-HELPを用いた探索的Ⅰ相自主臨床試験で、がん特異的なヘルパーT細胞、キラーT細胞、および抗体価の上昇がワクチン投与後の早い段階で確認され、一部の症例においてはCT画像上のがん消失などの臨床効果例も認められた。このことから、キラーT細胞のみを活性化させる従来型のショートペプチドではなく、Th細胞を活性化させるヘルパーエピトープも含んだ新たなロングペプチドが革新的次世代がんワクチン治療に重要であることが示唆された。また2010年に米国で開かれたiSBTc学会やASCO年会において、ショートペプチドからロングペプチドを用いたがんワクチン研究が主流になるという議論がなされ、今後、次世代がんワクチンとしてのロングペプチド開発は世界中での競争が展開されることが予想される。従って、がん抗原を用いたがんワクチン免疫治療は大きな分岐点にあるものと考えられ、世界の研究競争に乗り遅れるならば我が国の次世代がんワクチン治療開発研究やがんワクチンペプチド医薬の開発が世界から大きく取り残されることになる。

本プロジェクトは我々が世界に先駆け明らかにした「ヘルパーT細胞とキラーT細胞の両者を同時に活性化できるH/K-HELPの臨床研究結果」をもとに、世界の次世代がんワクチン開発研究に遅れをとらない日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを開発するものである。

B. 研究方法

1. がんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験におけるがん抗原解析および免疫モニタリングに関する研究

ハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的Ⅱ相臨床試験の実施に向け、研究分担者である北村、脇田を中心に腫瘍組織検体を用いてがん抗原解析方法の確立、がん抗原特異的免疫応答を評価する免疫モニタリング解析法の整備を行う。

腫瘍組織におけるSurvivinの発現について、先行して行われたSurvivin-H/K-HELPを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅰ相自主臨床試験の実施例をもとに、免疫染色による評価

と組織標本より抽出した遺伝子の発現を定量PCR法により解析を行う。

Survivin-H/K-HELPを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅰ相自主臨床試験で行った免疫モニタリングの先行例を参考に、ELISA法による抗Survivin抗体価測定法の標準化を行う。また、ELISA法およびELISPOTによるSurvivin抗原特異的T細胞応答の解析法について、より詳細に検証する。

また多施設共同による対象患者の適格基準、評価に関するがん抗原発現解析、がん抗原特異的抗体価、T細胞応答評価のバリデーション、データ解析のセントラル化を行う。

これらの実験・検証データをもとにペプチドワクチンⅡ相臨床試験におけるエントリー基準を設定するとともに、ワクチン投与前と各投与後に末梢血をそれぞれ回収し抗腫瘍免疫応答の有無を解析する研究実施計画書類を作成する。

2. 大腸癌および乳癌を対象とするH/K-HELPを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験に関する研究

大腸癌、乳癌を対象にSurvivinを標的抗原としたハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがん免疫治療の探索的Ⅱ相臨床試験を北海道大学遺伝子病制御研究所、北海道大学病院および近畿大学病院で実施するための整備を行う。研究分担者である奥野および高橋典彦は大腸癌、綿谷および高橋弘昌は乳癌を対象としたワクチン治療臨床試験を北海道大学病院と近畿大学医学部附属病院において実施するための臨床研究計画書を作成する。

先行実施したSurvivin-H/K-HELPを使用した探索的Ⅰ相自主臨床試験の成果をもとに、各研究者が連携して、主要エンドポイント、副次エンドポイントの決定、対象となる被験者の選択基準、選択除外基準、試験薬の再検証、治療スケジュール、試験デザインと症例数、評価項目を確定する。

これらの研究計画に基づいた臨床試験計画書、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を作成し、各大学、各施設の倫理審査委員会に提出・審議するとともに、承認を得た上で本臨床試験を実施する。

3. がんワクチン治療効果を予見・診断するバ

バイオマーカー研究の整備

前述のがんペプチドワクチン臨床試験の付随研究として、完遂症例を抗腫瘍効果の有無でグループ分けを行い、抗腫瘍免疫に関連する制御因子を探索・同定するバイオマーカー研究を参画する全研究者が協力して整備する。

臨床試験の過程で得られる被験者のがん組織、血漿・血清、および末梢血リンパ球において、グループ間で相違の見られる核酸(遺伝子)・蛋白質・脂質・糖質を評価し、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となるような標的分子(バイオマーカー)を探索・同定する。抗腫瘍免疫応答と臨床効果とが相関する因子の解析方法および評価体制を整備する。

臨床ヒト検体を用いた各種バイオマーカーの解析法の設定は、北村、脇田を中心に行い、臨床データの相関を解析する項目、測定方法は奥野、綿谷、高橋弘昌、高橋典彦が連携して行う。

(倫理面への配慮)

がんワクチン治療臨床試験は、北海道大学遺伝子病制御研究所と連携し、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院で実施する。本臨床試験は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、臨床試験計画書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を準備し、各大学、各施設倫理委員会の承認を得た上で実施する。

本研究に用いるヒト検体については、本研究の趣旨を十分に説明し、文書による同意を得た上で、提供される。検体の提供者、その家族、血縁者および関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分に配慮し、研究を遂行する。本研究は、各施設の倫理審査委員会の承認を得て実施している。

また、北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野に事務センターを置き、北海道臨床開発機構や北海道大学病院高度先進医療支援センターと連携しながら、健康危険情報を含む全ての情報について各施設の研究者と共有できるようにシステムを組む。

C. 研究結果

平成 23 年度において、進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象にした、ヘルパー/キラー

ハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがんワクチン治療の探索的第II相臨床試験の実施に向けた整備を行った。

北海道大学遺伝子病制御研究所および参画する北海道大学病院、近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携し、エントリー基準となるSurvivinがん抗原の解析法、評価項目となる免疫モニタリング(抗Survivin抗体価、抗原特異的T細胞応答)、抗腫瘍効果の判定プロトコルを記載した自主臨床試験実施計画書を作成した。

今回の臨床試験では大腸癌、乳癌共に適格基準を満たした被験者に対し、まず初めに治療期間1として、2週間間隔で4回腫瘍近傍皮下に投与し、抗腫瘍効果と抗原特異的免疫応答を解析することとした。

本試験においては、合衆国連邦保険福祉省食品医薬品局(FDA)、がん治療用ワクチンのための臨床学的考察、ガイドラインにおける「結果に対する特別な定義をしたうえで(例:奏功患者と非奏功患者におけるプロトコル特異的基準)統計解析を計画することを推奨します」の特別な定義を、

(A)CT画像診断による抗腫瘍効果

(B)抗原特異的免疫応答

と設定し、

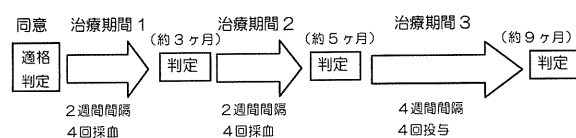
1:(A)がCR/PR/SDの場合次のワクチン治療に入る、

2:(A)がPDでも、(B)が陽性の場合、次の治療に入る、

3:(A)がPDで、(B)が陰性の場合、ワクチン治療終了、とした。

前述の画像診断および抗原特異的免疫応答の結果をもとに、次のワクチン治療(治療期間2)を実施するか否かを判定し、さらに2週間間隔で4回腫瘍近傍皮下に投与することとした。治療期間2の終了時点で再度、抗腫瘍効果と抗原特異的免疫応答を解析し、前述の定義に従い、適格と判定されれば、4週間間隔で4回腫瘍近傍皮下に投与することとした(下図)。

ワクチン治療スケジュール概略図



本研究では大腸癌 35 例に対し、臨床評価として、最良総合効果 (RECIST 規準) による病勢コントロール率 (CR+PR+SD)、乳癌においては 40 例を対象とし臨床的有用率 (CR+PR+6ヶ月以上の SD) の評価を主要エンドポイントとして設定した。

エントリー基準の一つとなる Survivin がん抗原の評価は、患者の標本組織を用いた免疫染色法と、組織から遺伝子を抽出し、定量 PCR による解析を行い、Survivin 抗原タンパクの発現、細胞局在および遺伝子発現レベルを確認することとした。本試験では、免疫染色法あるいは定量 PCR 法のいずれかの発現で陽性と判断された被験者を対象とし、Survivin 抗原の発現・局在とワクチン投与による抗腫瘍効果および抗原特異的免疫応答との相関解析を行うこととした。

ワクチン投与前後におけるがん抗原特異的免疫応答を評価する免疫モニタリングについて、血清検体を用いた ELISA 法による抗 Survivin 抗体価の解析法および陽性・陰性の評価基準を設定した。健康人由来血清検体を用いて測定した値の平均値および標準偏差より基準値 (ベースライン) を算出した。ワクチン治療の際に提供される血清検体を使用して、ワクチン投与前よりも値が上昇し、さらにその基準値よりも高値を示した時に上昇と判定する評価系を構築した。

がん抗原特異的 T 細胞応答の評価について末梢血由来リンパ球を用いたフローサイトメトリー、ELISA 法および ELISPOT による Survivin 抗原ペプチド刺激後の T 細胞からのサイトカイン産生能を評価する試験管内評価系を確立した。

さらに、がん患者の血液では、施設ごとで得られた血液検体サンプルの凍結保存後の T 細胞を用いた評価系を検討し、免疫学的モニタリングの評価項目である抗原特異的サイトカイン産生について、問題なく測定可能であることを確認した。

エントリー時、ワクチン投与時、および CRF 作成時に必要となる評価項目について、Survivin 癌抗原解析、免疫モニタリングおよび腫瘍の画像診断に加え、HLA 解析、患者基本情報、病歴等、併用薬、理学所見、患者自覚所見、一般血液検査、一般生化学検査、他覚所見、腫瘍マーカー、ワクチン予備投与および本投与時の所見、有害事象、および試験中

止時の検査・観察を決定した (次図)。

	Day -28 ~ -14	Day 1 ~ 1	Day 15 ~ 15	Day 29 ~ 29	Day 43 ~ 43	Day 57 ~ 57	Day 71 ~ 71	Day 85 ~ 85	Day 99 ~ 99	Day 113 ~ 113	Day 127 ~ 127	Day 141 ~ 141	Day 169 ~ 169	Day 197 ~ 197	Day 225 ~ 225	Day 253 ~ 253	Day 281 ~ 281	Day 309 ~ 309	
	治療前		治療期間1				判定 1	治療期間2				判定 2	治療期間3				判定 3	効果 判定	調査 期間
	±3日を許容										±7日を許容								
IC取得	○																		
仮登録	○																		
癌抗原解析	○																		
画像診断	○					○		○		○		○		○		○	△	△	△
HLA解析		○																	
患者基本情報		○																	
病歴等確認		○																	
併用薬確認		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△
理学所見		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△
患者自覚所見		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△
一般血液検査		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△
一般生化学検査		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△
他覚所見		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△
本登録		○																	
腫瘍マーカー	○					○		○		○		○		○		○	△	△	△
予備投与検査			○	○	○	○		○	○	○	○		○	○	○	○	△	△	△
ワクチン投与			○	○	○	○		○	○	○	○		○	○	○	○	△	△	△
免疫応答解析		○	○	○	○	○		○	○	○	○		○	○	○	○	○	△	△
有害事象の確認		○	○	○	○	○		○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○
中止時の検査・観察			○	○	○	○		○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○
CRF作成						○					○						○	○	
追跡調査																			○

進行・再発大腸癌あるいは乳癌に対するがんワクチン治療の探索的 II 相臨床試験の実施計画書類を作成するとともに、倫理審査用の患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を準備した。本臨床試験の実施について、北海道大学病院自主臨床試験倫理審査委員会および北海道大学遺伝子病制御研究所倫理審査委員会において審議がなされ、承認された。平成 23 年度中に、患者のエントリーおよび治療を開始することが可能となり、実際に大腸癌患者のペプチドワクチン試験を開始した。引き続き、近畿大学医学部附属病院倫理審査委員会において審議を予定している。

本臨床試験の付随研究として、がん患者の腫瘍組織、治療の過程で得られる血液検体について抗腫瘍免疫応答に関係するバイオマーカー (各種がん幹細胞マーカー、幹細胞マーカー、がん抗原、免疫細胞表面マーカー、転写因子、受容体、サイトカイン、エフェクター機能等) の解析方法を整備するとともに、被験者の診療情報 (患者基本情報、血液学的検査結果、血液生化学検査結果、がん抗原解析結果、HLA 解析結果、出血傾向、活動性感染症、

免疫応答性、抗腫瘍効果)と比較検討する評価体制を整備した。

付随バイオマーカー研究の実験計画についても、北海道大学病院、自主臨床試験倫理審査委員会および北海道大学遺伝子病制御研究所倫理審査委員会による承認を得た。従って、本ワクチン治療の完遂症例を抗腫瘍効果の有無で二つにグループ分けし、グループ間で見られる抗腫瘍免疫応答に関連する制御因子・バイオマーカーを評価することが可能となった。

D. 考察

本研究において、がん抗原特異的ヘルパーT (Th) 細胞とキラーT細胞 (CTL) の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチド (H/K-HELP) を用いたがんペプチドワクチン臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを開発することを目指している。

これまでH/K-HELPを使用したがんワクチン治療の第I相自主臨床試験において高い免疫賦活能が認められたSurvivinがん抗原をターゲット分子として選定し、進行・再発大腸癌もしくは乳癌患者を対象にしたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的II相臨床試験を整備した。また北海道大学病院、近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携し、免疫染色によるSurvivinがん抗原の解析法、ELISA法による抗Survivin抗体価、ELISAおよびELISPOTによる抗原特異的T細胞応答、RECIST基準による画像解析および腫瘍マーカー測定に基づく抗腫瘍効果の判定プロトコルを確立した。施設ごとで得られた血液検体サンプルの凍結保存後のT細胞を用いた評価系を検討し、免疫学的モニタリング項目である抗原特異的サイトカイン産生について、問題なく測定可能であることが確認されたことから、多施設による本臨床研究が十分に実施可能であると考えた。

本年度において、進行・再発大腸癌あるいは乳癌に対するがんワクチン治療の臨床試験および付随バイオマーカー研究に関する実施計画について北海道大学病院および北海道大学遺伝子病制御研究所倫理審査委員会にて承認され、近畿大学医学部倫理委員会にて審議申請を行った。さらに本治療試験についてUMIN臨床試験登録システムに登録し、実際に患者のエントリーが開始されたことから、次年度以降、本

ペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果を検証するとともに、その臨床効果を予見し得るバイオマーカーの探索・同定も行うことで、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発が可能と考えられる。

本治療試験を推進することで、がん治療効果とその抗腫瘍免疫応答に関係する科学的エビデンスが証明できれば、将来的に患者のQOLを維持しつつ治療を行える日本発の革新的がん治療用ペプチドワクチンの医師あるいは企業主導治療への橋渡ししが極めて有望といえる。

E. 結論

本年度において、大腸癌もしくは乳癌患者を対象にしたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的II相臨床試験の実施に向けた整備を行った。参画する北海道大学病院、近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携し、Survivinがん抗原の解析法、抗腫瘍免疫モニタリング、および抗腫瘍効果の判定プロトコルを確立した。北海道大学病院および遺伝子病制御研究所に設置された倫理審査委員会による承認後、本治療試験のエントリーを開始し、大腸癌患者の登録がなされた。

今後、本研究を推進し、ワクチン投与による抗腫瘍効果および免疫応答性を検証・評価することにより、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発が期待される。

F. 健康危険情報

本年度、当該研究での臨床試験において、健康危険情報における事項はありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T. First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.*, 130: 150-153, 2012.
- 2) Noguchi K, Okumura F, Takahashi N, Kataoka A, Kamiyama T, Todo S, Hatakeyama S. TRIM40 promotes neddylation of IKKgamma and is downregulated in gastrointestinal cancers. *Carcinogenesis*, 32: 995-1004, 2011.
- 3) Mino K, Ozaki M, Nakanishi K, Haga S, Sato M, Kina M, Takahashi M, Takahashi N, Kataoka A, Yanagihara K, Ochiya T,

- Kamiyama T, Umezawa K, Todo S. Inhibition of nuclear factor-kappaB suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion. *Cancer Sci.*, 102: 1052-1058, 2011.
- 4) Okuno K, Horiuchi T, Ishibashi T, Shigeoka H, Hayashibe A, Tsubakihara H. Prognostic factors in gastrointestinal perforation. *Hepato-Gastroenterology* 58: 1598-1602, 2011.
 - 5) Okuno K, Sugiura F, Hida J, Tokoro T, Ishimaru E, Sukegawa Y, Ueda K. Phase I clinical trial of a novel peptide vaccine in combination with UFT/LV for metastatic colorectal cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2: 73-79, 2011
 - 6) Okuno K, Uno K: Efficacy of orally administered *Lentinula edodes* Mycelia extract for advanced gastrointestinal cancer patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12: 1-4, 2011
 - 7) Okuno K, Sugiura F, Itoh K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakamura Y. Recent advances in active specific cancer vaccine treatment for colorectal cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012 in press.
 - 8) Azuma K, Tsurutani J, Sakai K, Kaneda H, Fujisaka Y, Takeda M, Watatani M, Arai T, Satoh T, Okamoto I, Kurata T, Nishio K, Nakagawa K. Switching addictions between HER2 and FGFR2 in HER2-positive breast tumor cells: FGFR2 as a potential target for salvage after lapatinib failure. *407: 219-224*, 2011
 - 9) Hirao A, Oiso N, Tsurutani J, Kimura M, Watatani M, Nakagawa K, Kawada A. Transient effectiveness of an oral 5-Fluorouracil derivative, s-1, for epirubicin, cyclophosphamide and Paclitaxel refractory skin metastases from possible occult breast cancer in a male. *Case Rep Dermatol.* 3: 42-48, 2011
 - 10) 西村孝司: 「実地医療と臨床研究 1: がん特異的免疫治療の進歩と細胞治療の問題点」 *腫瘍内科* 8(5): 470-477 (2011)
 - 11) 西村孝司、脇田大功、富樫裕二、北村秀光: 「がん特異的な細胞治療の現状」 *カレントセラピー* 29(12): 61-66 (2011)
 - 12) 島田慎吾、山本 貢、細田充主、田口和典、高橋弘昌、藤堂 省: 「劣性栄養障害型表皮水疱症を併存した乳癌に対して全身麻酔下で乳房切除を施行した1例」 *日本臨床外科学会雑誌*、72(1): 27-31 (2011)
 - 13) 中駄邦博、櫻井正之、細田充主、田口和典、高橋弘昌: 「甲状腺腫瘍の検査・診断 甲状腺腫瘍の画像診断」 *日本臨床*、69(Suppl 2): 308-319 (2011)
 - 14) 相山 健、藤田裕美、細田充主、田口和典、高橋弘昌、藤堂 省: 「腫瘍自覚10年後に切除した乳癌 invasive cribriform carcinoma の1例」 *日本臨床外科学会雑誌*、72(7): 1715-1720 (2011)
 - 15) 島田慎吾、山本 貢、細田充主、田口和典、高橋弘昌、山田洋介、藤堂 省: 「転移リンパ節の迷走神経浸潤による嘔声で発見された甲状腺オカルト癌の1例」 *内分泌外科*、28(3): 186-190 (2011)
 - 15) 高橋弘昌、細田充主、山本 貢、田口和典、松野吉宏: 「乳頭癌を除く結節性甲状腺腫の手術適応に関する検討」 *内分泌外科*、28(4): 245-250 (2011)
 - 16) 奥野清隆: 「消化器外科レビュー2011」 -II 章免疫-監修: 渡邊昌彦、國土典宏、土岐祐一郎、総合医学社(東京)、p. 227-232 (2011)
 - 17) 奥野清隆: 「大腸の構造と機能」 -インフォームドコンセントのための図説シリーズ大腸がん改訂第4版-医薬ジャーナル社(大阪)、印刷中 (2011)
 - 18) 奥野清隆、所 忠男: 「S状結腸切除術 消化器外科」 -アトラスで学ぶ達人の手術-、34: 822-829 (2011)
 - 19) 奥野清隆: 「大腸癌の免疫療法」 *日本臨床(増刊号) -大腸癌-*、69: 574-578 (2011)
 - 20) 奥野清隆: 「わが国のがんワクチン療法の克服すべき課題—がん治療用ワクチン療法FDAガイダンスを軸に—」、*Biotherapy*、25(6): 845-850 (2011)
 - 21) 奥野清隆: 「ゲノム解析による腫瘍抗原の同定」 *腫瘍内科*、8(5): 405-408 (2011)
 - 22) 奥野清隆、杉浦史哲、肥田仁一、所 忠男、石丸英三郎、上田和毅: 「Stage III大腸癌におけるがんペプチドワクチンとUFT/LV併用による術後補助療法(HLA-Key Open法)」 *癌と化学療法*、38(12): 1906-1908 (2011)
 - 23) 助川 寧、奥野清隆: 「開発が進んでいるがんワクチン療法の現状と展望」 *近大医誌*、36(2): 71-79 (2011)
 - 24) 奥野清隆、杉浦史哲、肥田仁一、所 忠男、石丸英三郎、上田和毅、大東弘治、塩崎均: 「進行・再発大腸癌に対するペプチドワクチン+UFT/LV併用療法」 *日外科系連会誌*、37(1): 46-49, 2012

2. 学会発表

- 1) Nishimura T, Ohkuri T, Wakita D, Kitamura H: A novel cancer vaccine therapy using helper/killer hybrid epitope long peptide (H/K-HELP): Introduction of Th1 help to cure human cancer: 102th AACR Annual Meeting, Orlando, Florida, April 2011
- 2) Nishimura T: Helper/killer hybrid epitope long peptide (H/K-HELP) as a novel tool for cancer vaccine therapy: Cancer Immunology and Immunotherapy by National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, September 2011
- 3) Nishimura T: Helper/killer hybrid epitope long peptide(H/K-HELP) as a novel tool for cancer vaccine therapy: 第2回アジア細胞治療学会 フェニックス・シーガイア・リゾート 宮崎, October 2011
- 4) Okuno K: Vaccination with colorectal cancer-specific peptides in combination with oral chemotherapy for metastatic colorectal cancer patients. 3rd Annual World Vaccine Congress-2011, Beijing, China, March 2011.
- 5) Okuno K, Tokoro T, Hida J, Ishimaru E, Ueda K, Sugiura F: Prognostic Impact of Mesorectal Invasion in T3N0 Low Rectal Cancer. 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO), Tokyo, Nov. 2011.
- 6) Okuno K: Immunologic responses of colorectal cancer-specific peptide vaccination in combination with UFT/LV chemotherapy for metastatic colorectal cancer patients. 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO), Tokyo, Nov. 2011.
- 7) 西村孝司: ロングペプチドがんワクチン、H/K-HELPの第一相臨床研究: Th1免疫の誘導と抗腫瘍効果の検証: 国立成育医療研究センター特別セミナー独立行政法人国立成育医療研究センター 東京 2011年4月
- 8) 西村孝司、大栗敬幸、脇田大功、大竹淳矢、富樫裕二、高橋典彦、藤堂省、奥野清隆、北村秀光: 次世代癌ワクチン、H/K-HELPの第一相臨床研究: Th1免疫の誘導と抗腫瘍効果の検証: 第32回癌免疫外科研究会 和歌山マリーナシティ 和歌山 2011年4月
- 9) 西村孝司: がん抗原ロングペプチドを用いたH/K-HELPがんワクチン治療: 安全性とTh1依存的抗腫瘍効果の検証: 平成23年度北海道癌談話会 アキュ 札幌 2011年6月
- 10) 西村孝司: 次世代癌ワクチン、Helper/killer hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)の第一相臨床研究: Th1免疫の誘導と抗腫瘍効果の検証第15回日本がん免疫学会総会 千里ライフサイエンスセンター 大阪 2011年6月
- 11) 大竹淳也, 岩淵禎弘, 脇田大功, 増子和尚, 北村秀光, 西村孝司: 口頭発表 第15回日本がん免疫学会総会 「次世代がんワクチンの開発に向けたMAGE-A4特異的CD4およびCD8陽性T細胞の誘導に関する研究」 千里ライフサイエンスセンター 大阪 2011年6月
- 12) 西村孝司: シンポジウム発表 第39回日本臨床免疫学会総会 「ヘルパーT細胞を軸とした癌免疫応答の制御 -基盤研究から次世代癌ワクチン、H/K-HELPの発見まで-」 京王プラザホテル 東京 2011年9月
- 13) 西村孝司: 新しい人工がんペプチド、H/K-HELPの開発とそのがん撲滅への挑戦: ペプチド学会市民フォーラム 北海道大学 学術交流会館小講堂 札幌 2011年10月
- 14) 西村孝司、大栗敬幸、大竹淳矢、脇田大功、奥野清隆、藤堂省、高橋典彦、北村秀光: A novel cancer vaccine therapy using helper/killer hybrid epitope long peptide(H/K-HELP) to cure human cancer (ヒトがん制圧を目指した次世代H/K-HELPがんワクチン治療の開発): 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 愛知 2011年10月
- 15) 北村秀光、大栗敬幸、大竹淳矢、岩淵禎弘、脇田大功、西村孝司: Establish of a novel cancer immunotherapy with artificial helper/killer hybrid epitope long peptide(H/K-HELP) (人工がん抗原ロングペプチド(H/K-HELP)を用いた次世代がんワクチン治療法の開発): 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 愛知 2011年10月
- 16) 大竹淳矢, 岩淵禎弘, 脇田大功, 増子和尚, 北村秀光, 西村孝司: Induction of MAGE-A4-specific CD4+T and CD8+T cells and their development of novel tumor vaccine therapy (次世代がんワクチンの開発に向けたMAGE-A4特異的CD4およびCD8陽性T細胞の誘導に関する研究): 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 愛知 2011年10月
- 17) 西村孝司: がんワクチン治療の新しい幕開け: 次世代がんワクチン、H/K-HELPの開発とヒトがん治療への応用: 第8回東レ

先端融合研究シンポジウム 東レ株式会社 2011年11月

- 18)大竹淳矢、脇田大功、増子和尚、角田健太郎、北村秀光、西村孝司：H/K-HELPを用いた腫瘍抗原特異的Th1、CTLの誘導とがんワクチン治療法開発への応用：第40回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ 2011年11月
- 19)西村孝司：Helper/killer hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)を用いた次世代がんワクチン細胞治療「テラ株式会社主催アイマックスがん治療研究会年次報告 国立国際医療研究センター 東京 2011年12月
- 20)西村孝司：Helper/killer hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)を用いた次世代癌ワクチン治療の開発：北海道小児先進医療研究会 平成23年度第5回勉強会 旭川医科大学実験実習機器センター 2012年2月
- 21)高橋典彦「大腸がんの外科治療」市民公開講座「大腸がんを知ろう！2011年8月
- 22)奥野清隆、中居卓也：バイオセラピーを併用した集学的治療、シンポジウム：転移性肝癌治療の最前線、第28回日本医学会総会（東京、Web発表）2011年4月
- 23)奥野清隆、杉浦史哲、肥田仁一、所 忠男、石丸英三郎、上田和毅：ステージIII大腸癌におけるがんペプチドワクチンとUFT/LV併用による術後補助療法（HLA-key open法）、第32回癌免疫外科研究会、シンポジウム、（和歌山）2011年5月
- 24)奥野清隆、杉浦史哲、肥田仁一、所 忠男、石丸英三郎、上田和毅、大東弘治、塩崎

均：標準療法抵抗性の進行・再発大腸癌に対するペプチドワクチン+UFT/LV療法 第36回日本外科系連合学会学術集会、シンポジウム（浦安）2011年6月

- 25)奥野清隆、杉浦史哲、所 忠男、肥田仁一、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔：Stage III大腸癌術後におけるがんペプチドワクチンとUFT/LV併用療法、第66回日本消化器外科学会総会、シンポジウム、（名古屋）2011年7月
- 26)奥野清隆：がんペプチドワクチンとUFT/LV併用によるStage III大腸癌の新しい術後補助療法、第49回日本癌治療学会学術集会（名古屋）2011年10月
- 27)奥野清隆、杉浦史哲、安積達也、助川 寧、大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：次世代がんワクチンhelper/killer hybrid epitope long peptide (H/K HELP)のTh1免疫誘導と臨床効果、第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会、ワークショップ（和歌山）2011年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療におけるがん抗原解析 および免疫モニタリングに関する研究

研究分担者 北村 秀光 北海道大学遺伝子病制御研究所 准教授
研究分担者 脇田 大功 北海道大学遺伝子病制御研究所 助教

研究要旨：

ハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験の実施に向け、エントリー基準となるSurvivinがん抗原の解析法、評価項目となる免疫モニタリング法を確定した。また多施設共同による対象患者の適格基準、評価に関するがん抗原発現解析、がん抗原特異的抗体価、T細胞応答評価の標準化、データ解析のセントラル化を完了した。さらにワクチン治療前後のがん患者検体を使用した、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうな因子(バイオマーカー)を探索・同定する付随研究プロトコルを作成した。

本研究計画について、北海道大学病院倫理審査委員会、遺伝子病制御研究所倫理審査委員会にて承認されるとともに、近畿大学医学部倫理委員会に審査申請した。次年度以降、本ペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果とがん抗原特異的免疫応答を詳細に検証するとともに、その臨床効果を予見し得るバイオマーカーの探索・同定も行うことで、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発が可能と考えられる。

A. 研究目的

進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象に、ヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)ワクチンの有効性を検証する探索的Ⅱ相臨床試験の実施に向け、エントリー基準となるSurvivinがん抗原の解析法、評価項目となる免疫モニタリングの標準化を行う。

本臨床試験は、北海道大学遺伝子病制御研究所と北海道大学病院、近畿大学医学部附属病院とが連携して実施する多施設共同臨床試験であることから、各施設に適応可能な標準化されたがん抗原発現解析、がん抗原特異的抗体価、T細胞応答評価法の整備、さらにデータ解析のセントラル化を行う必要がある。

また本研究においてワクチン治療による抗腫瘍効果と抗原特異的免疫応答との相関を明らかにするために、がん患者の腫瘍組織標本サンプルや治療の過程で得られる血液検体について抗腫瘍免疫応答に関係する制御因子・バイオマーカーの解析・評価方法を構築する。

これらの標準化Survivinがん抗原解析、免疫モニタリング、バイオマーカーの探索と同定を包括した探索的Ⅱ相臨床試験および付

随バイオマーカー研究を実施する。そこで各施設における倫理審査委員会申請に必要な実施計画書、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を作成する。本研究の承認を得た後、ワクチン治療試験を遂行することで、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発に寄与することを目指す。

B. 研究方法

1. Survivinがん抗原解析法の標準化

ハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的Ⅱ相臨床試験の実施に向け、エントリー基準となるがん抗原の解析方法の標準化を行う。

免疫染色によるSurvivin癌抗原の発現レベルを解析する。提供された病理組織標本について、加熱処理による賦活化、ブロッキング後、抗Survivin抗体を使用して抗原発現の解析を行う。またこれらの処理条件および使用する抗体、発色試薬の種類について比較検討を行う。さらにSurvivin抗原の発現レベル、細胞内あるいは核内での発現局在の違

いなどを精査することで、免疫染色法の最適化を図る。

大腸癌あるいは乳癌組織検体よりトータルRNAを抽出し、逆転写によるcDNAを作成し、定量PCRによるSurvivin遺伝子発現レベルの解析を行う。また市販の正常ヒト大腸由来cDNAを陰性コントロール、精巣由来cDNAを陽性コントロールとし、前述の各がん組織由来cDNAとともに定量PCRを実施し、ハウスキーピング遺伝子に対するSurvivin遺伝子の発現レベルを解析する。さらに免疫染色によるSurvivinタンパク発現と定量PCRによる遺伝子発現レベルとを比較検討する。

腫瘍組織のがん細胞におけるSurvivin抗原の発現、免疫担当細胞群の浸潤について、前述の最適化免疫染色法により解析し、大腸癌、乳癌の癌種や進行度・悪性度におけるがん抗原の発現とがんの悪性度等に関する評価法の整備を行なう。

2. ワクチン治療患者におけるSurvivin抗原特異的免疫応答解析法の整備

Survivin-H/K-HELPを用いたがんワクチンの投与前後における被験者末梢血検体について、ワクチン投与によるSurvivin抗原特異的抗体価およびT細胞応答性の上昇の有無について、免疫モニタリング法を整備する。

抗Survivin抗体価の解析では、ELISA法による評価システムを確立する。まず初めに健常人由来血清検体を用いて測定した値の平均値および標準偏差より基準値(ベースライン)を算出する。そこで、ワクチン治療の際に提供される血清検体を使用して、ワクチン投与前よりも値が上昇し、さらにその基準値よりも高値を示した時に上昇と判定する評価系を構築する。さらに各症例における抗Survivin抗体の各サブクラス(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM)評価する系も整備する。

T細胞応答性については、まず初めにフローサイトメトリーによるPBMC中の免疫担当細胞の数的、機能的動態について解析する。またPBMCあるいは単離したCD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞をSurvivin-H/K-HELPを用いて試験管内にて刺激し、一定期間培養を行う。培養後、Survivin-H/K-HELPあるいはコントロールとなるペプチドを用いて再刺激を行う。その結果、抗原ペプチド特異的に産生されるIFN- γ を含む各種サイトカインについて、細胞内染色によるフローサイトメトリー、ELISA法あるいはELIS

POT法により解析を行う。これらの実験検討において、抗原特異的T細胞応答を判断し得る、最も有効な刺激条件、培養条件、評価法を決定する。

3. 抗腫瘍免疫応答に関与するバイオマーカーの探索・評価法の確立

本臨床試験の付随研究として、ワクチン治療の過程で得られる被験者のがん組織、血漿・血清、および末梢血リンパ球において、高い抗腫瘍効果あるいは抗腫瘍免疫応答を誘導するための鍵となるような核酸(遺伝子)・蛋白質・脂質・糖質をバイオマーカーとして解析する方法および評価系を整備する。

北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携して、被験者の診療情報および臨床効果と前述のバイオマーカーとの相関関係について比較可能な評価体制を整備する。

(倫理面への配慮)

本臨床研究は、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院と北海道大学遺伝子病制御研究所と連携して実施する。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、臨床試験計画書等を準備し、各大学、各施設倫理委員会の承認を得た上で実施している。

本研究に用いるヒト検体については、本研究の趣旨を十分に説明し、文書による同意を得た上で、提供される。検体の提供者、その家族、血縁者および関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分に配慮し、研究を遂行する。

C. 研究結果

本年度、進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象としたがんワクチン臨床試験のエントリー基準の一つとなるSurvivinがん抗原発現の評価法の整備を行った。

大腸癌あるいは乳癌患者腫瘍組織由来病理標本スライドについて抗Survivin抗体を用いた免疫染色によるSurvivin癌抗原の発現レベルを解析した。まず初めに本研究に先行して実施した探索的Ⅰ相自主臨床試験に使用した市販の抗体、発色試薬、加熱処理による賦活化、ブロッキング条件を基軸に、さら

に最適な抗原発現の解析条件を検討した。その結果、腫瘍組織のがん細胞において陰性コントロールとなる正常部位の組織あるいは、正常細胞には認められない、Survivin 抗原に由来する染色像を確認した。さらに提供された腫瘍組織におけるがん細胞の細胞質あるいは核内での Survivin 抗原の発現局在について、症例ごとに違いがあることを見出した。

大腸癌あるいは乳癌由来の病理組織検体よりトータル RNA を抽出し、逆転写による cDNA を作成し、定量 PCR による Survivin 遺伝子発現レベルの解析を行った。また市販の正常ヒト大腸組織由来 cDNA および精巣由来 cDNA をそれぞれ陰性コントロール、陽性コントロールとして使用し、各種検体サンプルにおける GAPDH 遺伝子に対する Survivin 遺伝子の相対発現レベルを解析した。その結果、陰性コントロールに比べ、大腸癌および乳癌組織検体由来サンプルについて、より高い Survivin 遺伝子の発現が確認された。さらに免疫染色による Survivin タンパク発現と定量 PCR による遺伝子発現レベルとを比較したところ、免疫染色において、Survivin 抗原発現が確認されたサンプルで、Survivin 遺伝子レベルでの発現も認められた。

ワクチン投与前後におけるがん抗原特異的免疫応答を評価する免疫モニタリングについて、血清検体を用いた ELISA 法による抗 Survivin 抗体価の解析法を整備した。本解析では Survivin ワクチンペプチドあるいは各種コントロールペプチドを固相とし、血清検体を様々な希釈倍率で希釈して使用した。検出は市販の HRP 結合抗ヒト IgG 抗体および発色試薬を使用した。

本研究でまず初めに健常人由来血清検体を用いて測定した値の平均値および標準偏差より基準値(ベースライン)を算出した。またワクチン治療の際に提供される血清検体を使用して、ワクチン投与前よりも値が上昇し、さらにその基準値よりも高値を示した時に上昇と判定する評価系を構築した。

また二次抗体を各種サブクラス、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 あるいは IgM に対するものを使用することにより、血清中の抗 Survivin 抗体のサブクラスも測定可能であることを確認した。さらに固相に用いるペプチドについて、Survivin タンパク質を網羅するオーバーラッピングペプチドを用いることで、血清中の抗 Survivin

抗体が、どの Survivin アミノ酸領域を認識するかを判定することが可能であることも確認した。

T細胞応答性について、被験者血液検体より PBMC を分離し、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を含む免疫担当細胞の数的、機能的動態についてフローサイトメトリーによる解析を行った。PBMC 由来の非付着性細胞、単離した CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞を Survivin-H/K-HELP を用いて試験管内にて刺激し、7-14 日間、培養を行った。培養後、Survivin-H/K-HELP あるいはコントロールとなるペプチドを用いて再刺激を行った。その結果、CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞について、抗原ペプチド刺激特異的に産生される IFN- γ が細胞内染色によるフローサイトメトリーにより検出された。一方、CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞を単離した培養系でも ELISA 法あるいは ELISPOT により IFN- γ の産生が確認された。

さらに、48-72 時間保管した血液検体より PBMC サンプルを調製した後、凍結保存した。これらのサンプルについて T 細胞応答性を検討した結果、ワクチンペプチド特異的な IFN- γ 産生が確認された。

進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象としたハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがんペプチドワクチン臨床試験の実施に伴う付随研究として、ワクチン治療の過程で得られる被験者のがん組織、血漿・血清、および末梢血リンパ球において、高い抗腫瘍効果あるいは抗腫瘍免疫応答を誘導するための鍵となるような核酸(遺伝子)・蛋白質・脂質・糖質をバイオマーカー(各種がん幹細胞マーカー、幹細胞マーカー、がん抗原、免疫細胞表面マーカー、転写因子、受容体、サイトカイン、エフェクター機能等)として解析する方法および評価系を整備した。

また被験者の診療情報(患者基本情報、血液学的検査結果、血液生化学検査結果、がん抗原解析結果、HLA 解析結果、出血傾向、活動性感染症、免疫応答性、抗腫瘍効果)および臨床効果と前述のバイオマーカーとの相関関係について比較可能な評価体制を構築した。

参画する北海道大学病院、近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携し、前述のエントリー基準となる Survivin がん抗原の解析

法、評価項目となる免疫モニタリング(抗Survivin抗体価、抗原特異的T細胞応答)を記載した、進行・再発大腸癌あるいは乳癌に対するSurvivinヘルパーペプチドを用いた癌ワクチン治療の第II相臨床試験を実施するための研究実施計画書を作成した。さらに本治療試験に付随する、大腸癌あるいは乳癌患者に対するSurvivinヘルパーペプチドを用いた癌ワクチン治療におけるバイオマーカー研究を実施するための研究実施計画書を作成した。さらに患者説明文書、試験参加同意書、倫理委員会申請書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を作成した。

本臨床試験の実施については、北海道大学病院および北海道大学遺伝子病制御研究所倫理審査委員会において審議がなされ、承認された。平成23年度中に、患者のエントリー・治療、および付随バイオマーカー研究を開始することが可能となった。さらに近畿大学医学部倫理審査委員会にも審議申請を行った。

D. 考察

本研究において、がん抗原特異的ヘルパーT(Th)細胞とキラーT細胞(CTL)の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがんペプチドワクチン臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを開発することを目指している。

本年度、大腸癌もしくは乳癌患者を対象にしたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的II相臨床試験の実施に向け、これまでの探索的I相自主臨床試験において実施した、腫瘍組織のSurvivinがん抗原の解析法および抗原特異的T細胞応答の解析法をさらに精査し、第II相試験に向けて標準化した。

エントリー基準の一つとなるSurvivinがん抗原の発現の解析は、患者の標本組織を用いた免疫染色法と、組織から遺伝子を抽出し、定量PCRによるSurvivin遺伝子の発現を解析し、Survivin抗原タンパクの局在および遺伝子発現レベルを評価するとともに、抗腫瘍効果および抗原特異的免疫応答との相関解析を行うため、Survivinタンパク質あるいは遺伝子のいずれかの発現で陽性と判断された被験者を対象とすることとした。

今回、Survivinがん抗原の腫瘍組織における癌細胞の局在を検証したところ、症例によって細胞質あるいは核内での存在が異なるこ

とが明らかとなった。従って今後、ワクチン治療によるSurvivin抗原特異的な免疫応答や臨床効果との相関を検討することにより、新たな知見を得る可能性が考えられた。

腫瘍組織のがん細胞におけるSurvivin抗原の発現、免疫担当細胞群の浸潤について、免疫染色法により解析し、大腸癌、乳癌の癌種や進行度・悪性度におけるがん抗原の発現、がんの悪性度などと抗腫瘍免疫応答との相関に関する検証も興味深いと考えている。

今年度、がん抗原特異的T細胞応答の評価について最も有効な刺激条件、培養条件、評価法を探索した。ここで被験者の状態により、回収されるPBMC数が変動するため、先行したペプチドワクチン探索的I相自主臨床試験における被験者からの採血量およびリンパ球の回収割合を再検証した結果、がん患者の末梢血より得られるPBMC由来非付着性細胞を用いたフローサイトメトリーによるSurvivin抗原ペプチド刺激後のT細胞からのサイトカイン産生能を解析する評価系が最適と判断した。

多施設共同による対象患者の適格基準、評価に関するがん抗原発現解析ならびにがん抗原特異的抗体価、T細胞応答評価の標準化、データ解析のセントラル化を行った。特に、本試験では治療を実施する各施設が離れているため、それぞれ血液検体サンプルの保管・凍結保存後のPBMCを用いたT細胞応答性についての解析を精査した。その結果、ペプチド刺激による抗原特異的サイトカイン産生については、十分測定可能であることを確認した。従って、本研究が多施設共同で十分に実施可能であると考えられた。

各施設の医師・研究者と連携し、本治療試験の全ての完遂症例を抗腫瘍効果の有無で二つにグループ分けし、グループ間で見られる遺伝子、タンパク質等の発現の違いから、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうな因子(バイオマーカー)を探索・同定する研究プロトコルを作成した。

これらの臨床試験およびバイオマーカー研究の実実施計画について北海道大学病院および北海道大学遺伝子病制御研究所倫理審査委員会にて承認され、近畿大学医学部倫理委員会にて審議申請を行った。本治療試験についてUMIN臨床試験登録システムに登録し、患者のエントリーが開始されたことから、本研究事業における進捗状況として、十分に当初の計画を達成で

きたものと考えている。

今後、次年度以降の計画に基づき、本ワクチン治療を遂行するとともに、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうな候補因子を探索・同定することで、より効果の高いがんワクチン開発が期待できる。

E. 結論

本年度において、大腸癌あるいは乳癌患者を対象にしたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的II相臨床試験の実施に向け、エントリー基準となる癌抗原解析法、評価項目となる免疫モニタリングの標準化が完了した。

参画する北海道大学病院、近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携し、抗腫瘍免疫を惹起するための鍵となるバイオマーカー研究を実施する判定プロトコルを確立した。

本治療計画および付随バイオマーカー研究について、北海道大学病院および遺伝子病制御研究所に設置された倫理審査委員会による承認がなされるとともに、本治療試験のエントリーを開始した。

今後、本研究を推進し、ワクチン投与による抗腫瘍効果および免疫応答性を検証・評価することにより、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T. First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.*, 130: 150-153, 2012.
- 2) 西村孝司：「実地医療と臨床研究 1：がん特異的免疫治療の進歩と細胞治療の問題点」腫瘍内科 8(5)：470-477 (2011)
- 3) 西村孝司、脇田大功、富樫裕二、北村秀光：「がん特異的な細胞治療の現状」カレントセラピー 29(12)：61-66 (2011)

2. 学会発表

- 1) Nishimura T, Ohkuri T, Wakita D, Kitamura H: A novel cancer vaccine therapy using helper/killer hybrid epitope long peptide (H/K-HELP): Introduction of Th1 help to cure human cancer: 102th AACR Annual

Meeting, Orlando, Florida, April 2011

- 2) 西村孝司、大栗敬幸、脇田大功、大竹淳矢、富樫裕二、高橋典彦、藤堂省、奥野清隆、北村秀光：次世代癌ワクチン、H/K-HELPの第一相臨床研究：Th1免疫の誘導と抗腫瘍効果の検証：第32回癌免疫外科研究会 和歌山マリーナシティ 和歌山 2011年4月
- 3) 大竹淳也、岩淵禎弘、脇田大功、増子和尚、北村秀光、西村孝司：口頭発表 第15回日本がん免疫学会総会 「次世代がんワクチンの開発に向けたMAGE-A4特異的CD4およびCD8陽性T細胞の誘導に関する研究」千里ライフサイエンスセンター 大阪 2011年6月
- 4) 西村孝司、大栗敬幸、大竹淳矢、脇田大功、奥野清隆、藤堂省、高橋典彦、北村秀光：A novel cancer vaccine therapy using helper/killer hybrid epitope long peptide(H/K-HELP) to cure human cancer (ヒトがん制圧を目指した次世代H/K-HELPがんワクチン治療の開発)：第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 愛知 2011年10月
- 5) 北村秀光、大栗敬幸、大竹淳矢、岩淵禎弘、脇田大功、西村孝司：Establish of a novel cancer immunotherapy with artificial helper/killer hybrid epitope long peptide(H/K-HELP) (人工がん抗原ロングペプチド(H/K-HELP)を用いた次世代がんワクチン治療法の開発)：第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 愛知 2011年10月
- 6) 大竹淳矢、岩淵禎弘、脇田大功、増子和尚、北村秀光、西村孝司：Induction of MAGE-A4-specific CD4+T and CD8+T cells and their development of novel tumor vaccine therapy (次世代がんワクチンの開発に向けたMAGE-A4特異的CD4およびCD8陽性T細胞の誘導に関する研究)：第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 愛知 2011年10月
- 7) 大竹淳矢、脇田大功、増子和尚、角田健太郎、北村秀光、西村孝司：H/K-HELPを用いた腫瘍抗原特異的Th1、CTLの誘導とがんワクチン治療法開発への応用：第40回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ 2011年11月
- 8) 奥野清隆、杉浦史哲、安積達也、助川 寧、大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：次世代がんワクチンhelper/killer hybrid epitope

long peptide (H/K HELP)のTh1免疫誘導と
臨床効果. 第24回日本バイオセラピー学会
学術集会総会、ワークショップ (和歌山)
2011年12月

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

進行・再発大腸癌に対するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療 に関する研究

研究分担者 奥野 清隆 近畿大学医学部外科 教授
研究分担者 高橋 典彦 北海道大学病院第一外科 助教

研究要旨

革新的ながんワクチン治療の開発を目指し、ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化することのできるハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いた非対照・非盲検・探索的の第II相臨床試験を実施する。

本試験では、Survivinがん抗原を発現している進行・再発大腸癌(腺癌)を有するなど各基準を満たした被験者にSurvivinヘルパーペプチド(1mg)を含むがんワクチン試験薬を腫瘍近傍皮下に反復投与することによる抗腫瘍効果の評価を行い、最良総合効果(RECIST規準)による病勢コントロール率(CR+PR+SD)の評価を主要エンドポイントとした。副次目的として安全性評価の再確認、免疫応答性の評価、および抗腫瘍効果と免疫応答性との相関を確認する。また試験全体で対象被験者は合計35症例とした。

本臨床試験研究において、Survivin-H/K-HELP(1mg)、ピシバニール(OK-432:0.02KE)、モンタナイド(Montanide™ ISA51VG オイルアジュバン)の混和物を試験薬とし、腫瘍近傍皮下に2週間隔で4~8回(治療期間1および2)、4週間隔で4回(治療期間3)投与することとした。各治療期間終了後に抗腫瘍効果・免疫応答性の結果から次のワクチン治療を実施するか判定することとした。また本臨床試験の付随研究として完遂症例を抗腫瘍効果の有無でグループ分けを行い、本臨床試験の過程で得られる被験者のがん組織、血液検体において、グループ間で相違の見られるバイオマーカーを評価し、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となるような標的分子を探索・同定する。

本治療試験の実施について、北海道大学病院、北海道大学遺伝子病制御研究所の倫理審査委員会にて承認されるとともに、近畿大学医学部倫理審査委員会に審議申請した。さらにUMIN臨床試験登録システムに登録(UMIN000007506)するとともに、大腸癌被験者のエントリーを開始した。最終的に、本治療試験および付随バイオマーカー研究を推進することで、より精度・効果の高いがんワクチン治療の開発に繋げる。

A. 研究目的

本研究において、がん抗原特異的ヘルパーT(Th)細胞とキラーT細胞(CTL)の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いたがんペプチドワクチン臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを開発することを目指している。

本臨床試験において、Survivin抗原を発現する大腸癌をもつがん患者に対して、Survivin-H/K-HELPワクチン(1mg)を腫瘍組織の近傍皮下に反復投与して、抗腫瘍効果を確認する。抗腫瘍効果はCT画像診断によりRECIST

規準で最良総合効果を判定し、Survivin-H/K-HELPを用いたがんワクチン治療の有効性を評価する項目、体制を構築する。

また副次エンドポイントとして、ワクチンの投与による有害事象の程度・頻度・種類の確認、Survivin特異的免疫応答性の評価、最良総合効果による主要エンドポイント以外の抗腫瘍効果、およびそれらの割合・率の算出を行う。さらに抗腫瘍効果と免疫応答性の相関評価を検証する評価項目を決定する。

また本臨床試験の付随研究として、全ての完遂症例を抗腫瘍効果の有無で二つにグループ分けし、グループ間で差異の見られる高い抗腫

瘍効果を誘導するための鍵となりそうな標的分子を探索・同定するバイオマーカー研究の実施体制を整備する。

最終的に、本ペプチドワクチン臨床試験および付随バイオマーカー研究を、北海道大学遺伝子病制御研究所、北海道大学病院および近畿大学医学部と連携し、迅速に遂行することで、より精度・効果の高いがんワクチン治療の開発を目指す。

B. 研究方法

進行・再発大腸癌を対象にした、Survivin-H/K-HELP を用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験の実施に向けた整備を行う。

北海道大学遺伝子病制御研究所、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携し、エントリー基準となるSurvivin がん抗原の解析法、評価項目となる免疫モニタリング、抗腫瘍効果の判定プロトコルを記載した自主臨床試験実施計画書を作成する。

多施設共同による本研究の遂行が可能な対象患者の症例数、適格基準の決定、評価に関するがん抗原発現解析ならびにがん抗原特異的抗体価、T 細胞応答評価の標準化、データ解析のセントラル化を行う。

さらに本臨床試験実施における付随研究として、がん患者の腫瘍組織を用いたがん抗原発現解析、治療の過程で得られる血液検体について抗腫瘍免疫応答に関係するバイオマーカーの解析・評価体制を整備する。

本臨床試験の実施について、各施設における倫理審査委員会申請に必要な実施計画書、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を作成し、申請・承認後、ワクチン治療試験を開始する。

(倫理面への配慮)

がんワクチン治療臨床試験は、北海道大学遺伝子病制御研究所と連携し、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院で実施する。本臨床試験は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、臨床試験計画書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を準備し、各大学、各施設倫理委員

会の承認を得た上で実施する。

本研究に用いるヒト検体については、本研究の趣旨を十分に説明し、文書による同意を得た上で、提供される。検体の提供者、その家族、血縁者および関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分に配慮し、研究を遂行する。本研究は、各施設の倫理審査委員会の承認を得て実施している。

また、北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野に事務センターを置き、北海道臨床開発機構や北海道大学病院高度先進医療支援センターと連携しながら、健康危険情報を含む全ての情報について各施設の研究者と共有できるようにシステムを組む。

C. 研究結果

平成 23 年度において、進行・再発大腸癌を対象にした、ヘルパー／キラーハイブリッドロングペプチド (H/K-HELP) を用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験の実施に向けた整備を行った。

北海道大学遺伝子病制御研究所、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と協議し、今回の試験について、対象となる被験者を次のように決定した。

進行あるいは再発大腸癌(腺癌)で標準治療不応の患者において、Survivin抗原を発現し、かつHLAが当該ペプチドに結合し得る型を発現し、手術不能例あるいは術後再発例で、標準的な治療(化学療法1レジメン以上、放射線療法1コース以上など)を受け、それらの効果が認められない、あるいは標準的な治療法を1レジメンあるいは1コース以上受けた症例で、その後の標準治療を拒否したものの、CT画像診断による測定可能病変を有するもの、Performance Statusが2以下、4ヶ月以上の生存が見込め、骨髄機能、腎機能、肝機能が基準値以上で保たれているもの、本臨床研究を理解し、文書による同意が得られている患者を本試験の対象とした。

今回の臨床試験では適格基準を満たした被験者に対し、まず初めに治療期間1として、2週間間隔で4回腫瘍近傍皮下に投与し、抗腫瘍効果と抗原特異的免疫応答を解析することとした。

本試験においては、合衆国連邦保険福祉省食品医薬品局(FDA)、がん治療用ワクチンのた