

201136006A

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(がん関係研究分野)

肺癌に対するWT 1 ペプチド免疫療法の開発

(H23-実用化 (がん) 一般-006)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 杉山 治夫

平成24 (2012) 年 5月

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(がん関係研究分野)

肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発

(H23-実用化(がん)一般-006)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 杉山 治夫

平成24(2012)年5月

目 次

I. 総括研究報告

肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発 杉山 治夫	-----	1
-------------------------------	-------	---

II. 分担研究報告

1. 肺腺癌の癌幹細胞性性質を決定する分子機構に関する研究 奥村明之進	-----	11
2. 早期肺癌の予後不良因子に関する研究 坪井 正博	-----	14
3. 肺癌術後補助療法における選別因子に関する研究 池田 徳彦	-----	18
4. 肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発に関する研究 鈴木 健司 (資料) 資料名	-----	22
5. 肺癌におけるoncogenic driver mutationに関する研究 伊藤 志門	-----	24
6. 肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発の研究 多田 弘人	-----	27
7. 抗がん剤感受性試験 (CD-DST) に基づいた非小細胞肺癌術後 補助化学療法に関する研究 東山 聖彦	-----	30
8. 間質性肺炎合併肺癌の標準的治療法の確立に関する研究 松村 晃秀	-----	33
9. 肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発に関する研究 太田 三徳	-----	35
10. 肺癌外科治療とその病態に関する研究 前田 元	-----	37
11. 肺癌に対する集学的治療に関する研究 吉村 雅裕	-----	41
12. 早期肺腺癌の悪性度・進行に関与する分子生物学的研究 岡田 守人	-----	42
13. WT1がんワクチンの肺がん治療に関する研究 山下 素弘	-----	44
14. 肺癌切除症例の予後を規定するバイオマーカーに関する研究 杉尾 賢二	-----	48
15. 肺癌術後補助療法としてのWT1ペプチド免疫療法に関する研究 吉田 純司	-----	51

1 6. 肺癌の治療効果評価における三次元的CT体積測定法の有用性に関する研究	—53
富山 憲幸	
1 7. 肺癌に対する治療に関する研究	----- 56
坂本 純一	
1 8. がんワクチン療法開発臨床研究における生物統計学的手法	----- 57
森田 智視	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 61
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 71

I. 総括研究報告

肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の開発

研究代表者 杉山 治夫 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

肺癌は年々増加している難治がんであり、この肺癌の治癒率を向上させるためには、作用機序が大きく異なる免疫療法の開発が必須である。本医師主導治験の目的は肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の有用性を確立することである。本治験では、病理学的に完全切除が確認され、病理的病期 T2a-bNOMO 期非小細胞肺癌で、HLA-A*24:02 を有し、肺癌細胞における WT1 タンパクの発現が確認されている患者に対して、WT1 ペプチドワクチンを、1 週間毎に 5 回、次に 2 週間毎に 4 回、さらに 4 週間毎に 10 回、1 年間にわたって計 19 回投与する WT1 ペプチドワクチン群とプラセボ群に 2:1 にランダム割付を行なう。主たる解析として、2 年間無再発生存割合を群ごとに推定すると共に、群間差の両側 90%信頼区間を計算する。

研究分担者

奥村明之進	大阪大学 教授
坪井正博	神奈川県立がんセンター 医 長
池田徳彦	東京医科大学 主任教授
鈴木健司	順天堂大学 教授
伊藤志門	愛知県がんセンター 医長
多田弘人	大阪市立総合医療センター 副院長
東山聖彦	大阪府立成人病センター 外 科系診療局長兼呼吸器外科部 長
松村晃秀	近畿中央胸部疾患センター 副院長
太田三徳	大阪府立呼吸器・アレルギー 医療センター 副院長
前田元	刀根山病院 部長
吉村雅裕	兵庫県立がんセンター 部長
岡田守人	広島大学原爆放射線医科学研 究所 教授
山下素弘	四国がんセンター 部長
杉尾賢二	九州がんセンター 部長
吉田純司	国立がん研究センター東病院 外来医長
富山憲幸	大阪大学 教授
坂本純一	名古屋大学 教授
森田智視	横浜市立大学 教授

から切望されている。手術に加え、化学療法や放射線療法を併用し、既存の治療法の改良のみでは治療成績の飛躍的な向上は望みにくい。このような状況において、既存の治療法とはその作用機序の異なる免疫療法への期待が高まっている。近年免疫療法は、基礎免疫学の発展によってもたらされた科学的根拠にもとづいて構築できるようになったため、十分な臨床効果を期待しうるまでのレベルに到達してきた。免疫療法は、既存の治療法とはその殺細胞機序が異なり、他の治療法では不可能と考えられる静止期癌幹細胞を死滅させることができるので、免疫療法は、本来的には癌を完治させる潜在的な力をもった治療法と考えられる。我々は、2001 年からトランスレーショナルリサーチとして、WT1 ペプチド免疫療法を 500 人以上の末期がん患者に実施し、本療法が、重篤な副作用を起こさず、末期癌に対して臨床効果を発揮しうる治療法であることを明らかにしてきた。これらの実績から、難治性の高い肺癌に対しても臨床効果が期待されるものと考え、本研究が立案、計画された。本研究は、難治がんの一つである肺癌の術後補助療法としての WT1 ペプチドワクチン療法の feasibility、有用性をランダム化第 I/II 相試験で評価するとともに、臨床第 III 相試験（治験）の実施可能性を検討することを目的とする。本研究は、厚生労働省の「健康長寿社会実現のためのライフ・イノベーションプロジェクト」の施策に合致するとともに、医師主導治験を経て、日本発の肺癌に対する WT1 ペプチドワクチンの製薬化につながると思われ、厚生労働行政に大きく貢献するものと考えられる。

A. 研究目的

肺癌は、年々増加の一途をたどっており、手術適用にならない患者も多くみられ、手術が施行された患者においても、手術後、多くの患者が再発し、死に至る代表的な難治癌であり、肺癌の治療成績の向上が国民

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

参加患者の安全性確保については、適格条件やプロトコル治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化される。また、「臨床研究に関する倫理指針」、「医薬品の臨床試験の実施の基準（省令GCP）」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則に従い以下を遵守する。

- 1) 研究実施計画書の IRB 承認が得られた施設のみから患者登録を行う。
- 2) すべての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得る。
- 3) データの取り扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報（プライバシー）保護を厳守する。

【研究形式】盲検的ランダム化第 I・II 相臨床試験。

主評価項目は、第 I 相は有害事象発生割合（安全性）、第 II 相で 2 年無再発生存割合

副次的評価項目は、1 年無再発生存割合、無再発生存期間、全生存期間、有害事象発生割合、

【対象症例】患者選択規準のうち主なものは、次の通り。1) 脈管侵襲を伴う病理病期 IA 期および IB/II 期非小細胞肺癌、2) 病理学的に完全切除が確認されている、3) 年齢：20 歳以上、4) Performance status (ECOG) 0~1、5) 術後補助療法が未施行、6) HLA-A*2402 を有する、7) 肺癌細胞における WT1 の発現、8) 主要臓器機能の保持、9) 患者本人からの文書による参加同意

【症例登録とランダム割付】

症例登録はデータセンターでの中央登録方式とする。治療群はデータセンターで、「A 群: WT1 ペプチドワクチン群」と「B 群: プラセボ群」に 1 : 1 でランダムに割付けられる。ランダム割付に際し、1) 性別（男/女）、2) 年齢（70 歳未満/70 歳以上）、3) 病理病期（IA・IB 期/IIA 期）、4) EGFR 遺伝子変異（有/無または不明）、5) 施設で大きな偏りが生じないように、これらを割付調整因子とする最小化法を用いる。

【治療内容】

登録後速やかに割付けられた治療を開

始する。治療法は、「A 群: WT1 ペプチドワクチン群」と「B 群: プラセボ対象群」の 2 群でいずれも治療期間は 1 年間とする。プロトコル治療完了後、再発を認めるまで無治療で観察する。

WT1 ペプチドワクチンは、HLA-A*2402 用 WT1 ペプチドワクチン（WT4869）である。1 回につき 1.6mg / body を、両上腕伸側～腋窩、計 2ヶ所に皮下注射する。プラセボ群で用いる製剤は、WT 1 ペプチドを含まないペプチド溶解液とアジュバントとのエマルジョン製剤である。

治療開始日を Day1 とし、A 群、B 群共に Day365 まで合計 19 回の投与を行う。

Day29 まで週 1 回投与。その後、Day 85 まで 2 週毎に投与を行い、以後、Day 365 まで 4 週毎に投与する。

プロトコル治療中止後の治療、および再発後の後治療は規定しないが、試験薬である WT1 ペプチドワクチンの再投与は認めない。

【集積目標症例数】

対象とする症例において、術後補助療法なしで経過観察した場合の 2 年無再発生存割合は 65% と見込まれ、これを A 群の閾値 2 年無再発生存割合と設定する。これに対し臨床的に有用な再発予防効果をハザード比で 0.75 と仮定したとき、期待 2 年無再発生存割合は 72% となる。 α エラー = (片側) 0.05、検出力 = 80% のもと、登録期間 2 年、追跡期間 2 年で必要登録数を計算すると、試験治療群での最小必要症例数は 140 例と計算される。A 群と B 群との割付比を 2:1 にしたとき、試験全体での必要症例数は 210 例となる（B 群は 70 例）。不適格例などを考慮して試験全体の目標登録数を 225 例 [A 群: WT1 ペプチドワクチン群 150 例、B 群: プラセボ対象群 75 例] と設定した。

なお、症例集積期間 2 年、最小追跡観察期間 2 年を予定する。

【実施施設・症例集積見込み】

本臨床研究参加 12 施設における脈管侵襲を伴う術後（病理）病期 IA 期および IB / II 期の年間切除症例数は、約 880 例程度あり、このうち、重複癌などの不適格例を除くと 60%（約 530 例）が登録可能と考えられる。同意取得率は 60% 程度と考えられる。控えめに見積もって適格例 55%、うち同意取得率 55% とすると年間 270 例弱の集積可能となり、2

年集積で約225 例の患者登録は可能と判断する。

【研究実施体制】

臨床試験実施計画書は、研究代表者、研究事務局、統計解析責任者、臨床研究アドバイザー等の合議で作成し、実施に当たって各施設の倫理委員会またはIRBの承認を得る。症例集積は試験分担医師がそれぞれの施設から行う。研究登録、モニタリング等は、外部CRO（EPS社）に依頼し、研究事務局がその状況を把握し、安全な研究の遂行に努める。予期せぬまたは重篤な有害事

象については、第三者機関である効果安全評価委員会で審査される。再発確認の画像は画像中央判定委員会で中央判定する。統計解析に関しては統計解析責任者のもとで実施する。研究代表者が総括を行う。

A 群、B 群共に治療開始日を Day1 とする。
 Day365 まで 1 年間投与。
 合計 19 回、投与する。
 ・ Day29 まで週 1 回の投与
 ・ Day 85 まで 2 週毎に投与
 ・ Day 365 まで 4 週毎に投与
 ・ Day 365 まで 4 週毎に投与

<目的>
 難治がんの一つである肺癌の術後補助療法としての WT1 ペプチドワクチン療法の feasibility、有用性を評価するとともに、臨床第Ⅲ相試験（治験）の実施可能性を検討する

<期待される効果>
 1. WT1 ペプチド免疫療法により術後肺癌の再発予防効果が得られる。
 2. 第Ⅲ相臨床治験への基盤の確立

<方法>
 脈管侵襲のある病理病期 IA 期および病理病期 IB/IIA (T2bN0) 期非小細胞肺癌完全切除例に対する WT1 ペプチド免疫療法のランダム化第Ⅱ相臨床試験（治験）

非小細胞肺癌完全切除後
 脈管侵襲を伴う p-T1N0M0 および p-T2a-bN0M0T2a
 20 歳以上、ECOG-PS : 0 - 1, 術後無治療

HLA スクリーニング
 HLA-A*24:02 陽性
 腫瘍組織での WT 1 発現 陽性

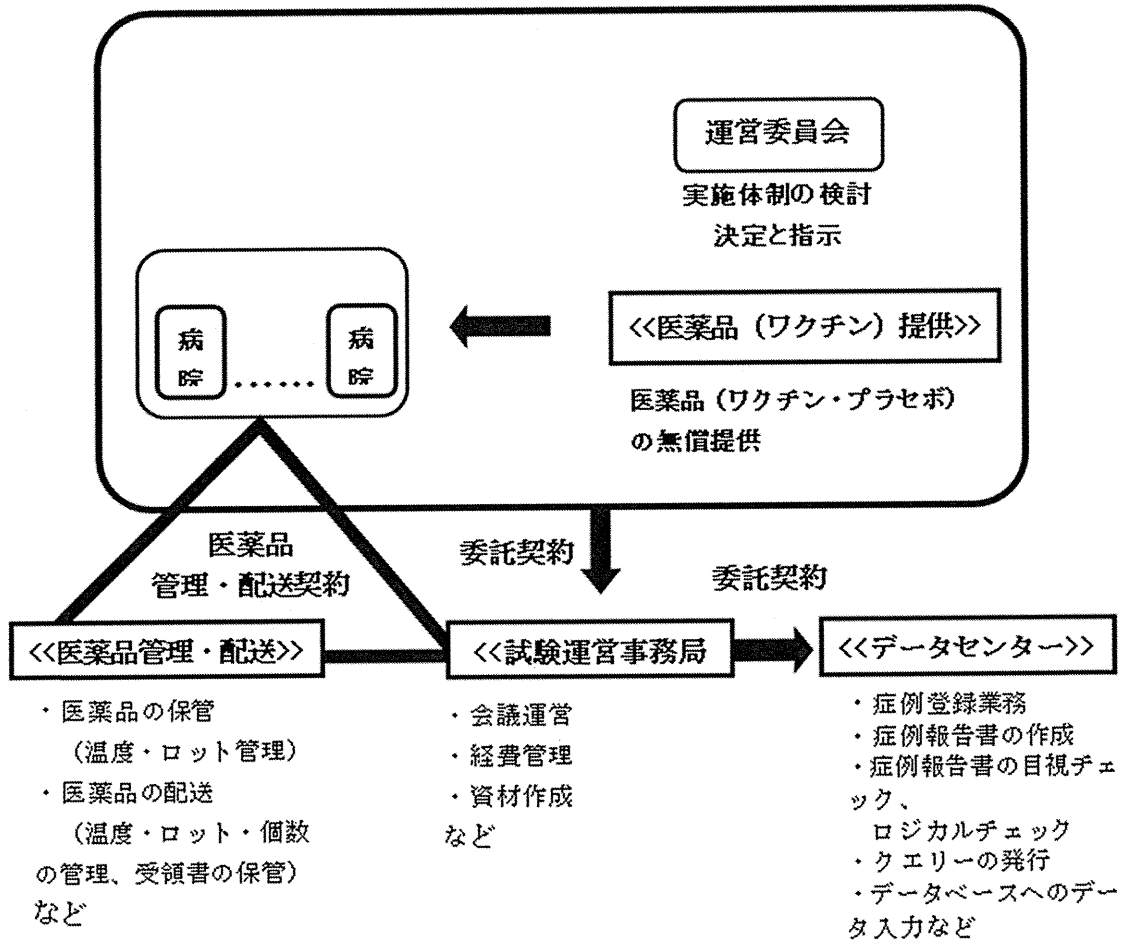
本登録 (225 例)
 割付調整因子：性別（男性／女性）、年齢（70 歳未満／70 歳以上）、
 病理病期（T 因子 T1 & T2a/T2b）、EGFR 遺伝子変異（有／無）、施設



A 群：WT1 ペプチドワクチン群 (150 例)

B 群：プラセボ群 (75 例)

試験実施体制



C. 研究結果

I. 治験のための標準作業手順書（SOP）の作製

I. 免疫組織化学法による WT1 タンパクの発現判定のための標準作業手順の作製

大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座免疫造血制御研究室にて WT1 免疫染色を行う。同施設ではこれまでに WT1 ペプチドワクチンによる固形癌に対する免疫療法の臨床試験において 1700 例以上の WT1 タンパク発現判定を行ってきた実績を有する。検査のバリデーションは内部精度管理による。さらに、現在、同施設で施行される染色・判定法をもとにして WT1 タンパク免疫染色の国際標準化プロジェクトが進行中である。H23 年度は治験に対応するため標準作業手順書（SOP）を作成した。WT1 発現判定にあたっては判定の客観性を担保するために施設外部の病理医による判定を行う。

（1）検体の受け入れ

WT1 治験事務局（大阪大学大学院医学系研究科癌ワクチン療法学寄附講座内）にて行う。染色依頼者は WT1 治験へのエントリーを希望する患者の組織検体（免疫染色用コート付ガラススライドを用いて作成した薄切未染標本 5 枚またはパラフィンブロック）を WT1 治験事務局に検体情報（患者氏名または ID、年齢、性別、病名、病理診断名、標本臓器、担当医氏名、担当医連絡先、検体受け入れ日、等）を添付して提出する。

WT1 治験事務局で受け入れた標本については匿名化を目的に WT1 発現判定用の番号の割付を行い（例 P12-001）、標本スライドのすべてにその割付番号を記載し、標本箱に入れ暗所（室温）で染色施設への搬送（原則として週に 1 回）まで保管する。検体情報は割付番号ごとに電子ファイル（以下「WT1 発現判定ファイル」と呼ぶ）に記入する。なお、WT1 発現判定ファイルは個人情報保護のため、パスワードを設定し、限定されたアクセス権者のみが閲覧可能とする。また、この WT1 発現判定ファイルは大阪大学医学系研究科内でのみ閲覧可能とする。また、検体情報をもとに判定依頼票を作成する。

（2）搬送方法

WT1 治験事務局から染色・判定施設（大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座免疫造血制御研究室）まで、標本スライ

ドに判定依頼票を添えて担当者が搬送する。搬送は常温で行う。

（3）WT1 タンパク免疫染色

WT1 タンパク免疫染色は、大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座免疫造血制御研究室で行う。

①染色手順

染色は原則として週に 1 回行う。

染色の精度を保つため、原則として 1 度の染色では 10 検体（HE、C-19 染色、6F-H2 染色のセットで 1 検体）を超えては行わないこととする。

染色担当者は判定依頼票と標本スライドが一致していることを確認する。

②薄切

滑走式マイクロトーム（大和光機）により 3 μ m の厚さで薄切し、薄切切片を水面に浮かべる。その後、50 $^{\circ}$ C の温水に浮かべ、MAS コート付きスライドガラス（マツマミ、S9442）に貼り付け、50 $^{\circ}$ C に設定したパラフィン伸展器（ミナトメディカル、P0-2）により一晩乾燥させる。

③染色方法

HE 染色後、WT1 モノクローナル抗体 C19（Santa Cruz）と 6F-H（Daka）で染色する。

（4）WT1 免疫染色の記録と保管

WT1 タンパク免疫染色については、染色者、染色日時、判定番号、使用抗体について記録、保管する。染色済み標本（もしくは nanozoomer（Hamamatsu）を用いて取得した標本のスキャンファイル）は 1 年間以上保管する。

（5）WT1 タンパク免疫染色の判定方法

まず陽性コントロール標本であるマウス腎臓の podocyte が染色されていることを確認する。次に、染色標本を観察し、組織内で WT1 タンパクの発現が陰性であると考えられる間質の fibroblast やリンパ球における WT1 タンパクの染色の強度によって染色標本のバックグラウンドの評価を行う。バックグラウンドが強い場合にはその標本による WT1 タンパク発現判定は行わない。上記の評価の終了後、腫瘍細胞における WT1 タンパク発現の評価を行う。6F-H2 抗体あるいは C-19 抗体で染色した標本のそれぞれについて、腫瘍細胞と間質との間の染色のコントラストに基づいて腫瘍細胞における WT1 タンパク発現を、陰性、弱陽性、陽性、あるいは、強陽性と、判定する。また、

腫瘍血管内皮細胞における WT1 タンパク発現の評価も行う。6F-H2 抗体あるいは C-19 抗体で染色した標本のそれぞれについて、腫瘍細胞と間質との間の染色のコントラストに基づいて血管内皮細胞における WT1 タンパク発現を陰性、弱陽性、陽性、あるいは、強陽性と判定する。多くの場合、陽性である。

上記の判定に当たっては客観性を保つため、大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座免疫造血制御研究室以外の外部の病理医の判定を受ける。

(6) 精度管理

染色ごと、抗体ごとにコントロール標本を検体標本と共に染色し、WT1 発現判のための免疫組織化学染色方法の内部精度管理を行う。コントロール標本には C57BL6 (SLC) マウス腎臓を用いる。マウス腎臓の podocyte を陽性コントロールに、fibroblast を陰性コントロールとする。

(7) 判定結果の報告

染色・判定施設の担当者は、判定結果を WT1 治験事務局へ e-mail にて送付する。WT1 治験事務局は、この判定結果を書面または e-mail にて染色依頼者に対して報告するとともに、判定結果、報告日を「WT1 発現判定ファイル」に記載し、保管する。

2. 治験薬供給についての標準作業手順の作成

(1) 機械法による薬剤調剤法の確立

治験薬である、WT1 ペプチドワクチンについては WT1 ペプチドおよびアジュバントのエマルジョンとして実用に供される。このエマルジョン化の品質が臨床効果に影響しうることがこれまでに明らかになっている。そこで本治験においては、大阪大学医学部附属病院薬剤部において一括調剤し、これを治験実施施設に供給する。その際、エマルジョンの品質を安定に管理することおよび 1 日当たり数十におよぶ治験薬の調剤数に対応するため機械法による調整法を確立した。さらに、大阪大学医学部附属病院薬剤部調剤にスペースを設け、クリーンベンチを新たに設置するとともに、薬剤調剤のための専属要員を置く。この要員の研修は終了している。

大阪大学医学部附属病院薬剤部において（攪拌脱泡混練/粉碎機 NP-100 シンキヤ社）を用いたワクチン調剤法（以下機械法）の開発を行った。

① 機械法で調整した WT1 ペプチドワクチンの薬効

これまで大阪大学医学部附属病院薬剤部において行ってきた用手法で調剤した WT1 ペプチドワクチンに対して、機械法で調剤した WT1 ペプチドワクチンの非劣性を、マウスを用いた動物実験により検討した。その結果、機械法で調剤した WT1 ペプチドワクチンは、用手法で調剤した WT1 ペプチドワクチンに比較して同等以上の抗腫瘍効果を示し、用手法で調剤した WT1 ペプチドワクチンに対して、機械法で調剤した WT1 ペプチドワクチンの非劣性が明らかになった。

② 機械法で調整した WT1 ペプチドワクチンの安定性

調剤後の安定性について用手法で調剤した WT1 ペプチドワクチンと機械法で調剤した WT1 ワクチンを比較したところ、4℃保存で、用手法で調剤した WT1 ワクチンでは、エマルジョン調製 3 日後にエマルジョンの分離を認めたが、機械法で調剤した WT1 ワクチンではエマルジョン調製後 7 日後までエマルジョンの分離を認めなかった。このように、安定性は、機械法で調剤した WT1 ワクチンは、用手法で調剤した WT1 ワクチンに比較して優れていることが明らかになった。

(2) 調剤の管理と調剤後安定性の管理

高い精度による WT1 ペプチドワクチン調剤の品質管理を行うため、位相差顕微鏡観察および粒子径・ゼータ電位・分子量測定装置（ゼータサイザー Nano ZS）を用いた粒度測定による品質管理体制を整えた。

(3) 配送体制の確立

調剤された WT1 ワクチンの配送にあたっては、下記の条件を必須とした。

- ① 治験薬を配送するにあたって規制に合致していること。
- ② 配送時の調剤の品質を担保するため温度管理が適切になされること。
- ③ 配送時の安全を担保するため調剤された WT1 ペプチドワクチンの密封性が保たれること。

宅急便配送業者および治験薬配送業者に面談を行なった。その結果、宅急便での配送は、規制に合致し、配送時の温度管理も十分であることが判明した。業者としては、信頼度の高い日本通運に依頼する予定である。

宅急便配送時の温度管理については業者にて保証されるが、さらに配送時の温度管理を徹底するために温度ロガーをボックスごとに備え、温度記録を行うこととした。

配送時の密封性を保証するために大阪大学医学部附属病院薬剤部にて WT1 ワクチンを調剤後、ボックスに収納する際密封シールを用いて封印することとした。

II. 肺癌術後補助療法として WT1 ペプチドワクチンを使用する際の臨床効果判定と予後因子についての研究

1. 3 cm以下の I 期非小細胞肺癌(NSCLC) 切除例において腫瘍内の脈管侵襲が独立した予後因子かどうかは依然 controversial である。そこで、より精度の高い評価方法として、通常の Hematoxylin-Eosin 染色 (HE) に Elastica-Van-Gieson 染色 (EvG)、D2-40 免疫染色 (D2-40) を加えて脈管浸潤を判定したところ、脈管侵襲陽性 IA 期 NSCLC の予後は IB 期のそれと同等であり、この結果から、IA 期 NSCLC 脈管侵襲陽性例は術後補助療法の対象候補となり得ると考えられた。特に、当該病期の予後を考慮すれば、毒性の面から通常の抗がん剤よりもむしろ WT1 ペプチドワクチンなどによる免疫療法の介入、確立が期待される。
2. Klotho 発現 (+) 症例は、補助療法としてシスプラチンやドセタキセルを用いる。一方、Klotho 発現 (-) 症状は、免疫療法を用いるのがよいと考えられる。
3. ゲムシタビンの単独投与と UFT の単独投与で、再発及び予後において両群間に統計的有意差を認めなかった
4. K-ras 変異は、再発の予測因子であり、WT1 ペプチドワクチンの術後補助療法のデザインの中の割り付け因子にするのが有用と考えられる。
5. TNM 分解に加え、組織分化度、血管浸潤、臓側胸膜浸潤、線維化間質、喫煙歴が予後不良因子であることが判明し、この成果は、WT1 ペプチドワクチンの術後補助療法のデザインの構築に有用である。
6. コンピューター支援画像診断プログラムを用いた肺癌の三次元体積測定法を確立。本がん免疫療法への応用が期待される。
7. がんワクチン療法の開発において、臨床試験を計画・実施するに当たって重要なことは、データベース集積と集積したデータの有効活用であるが、そのための最適な統計的方法の 1 つがベイズ流統計手法である。本 WT1 ペプチドワクチン療法においてもこの手法が利用可能か否かが検討中である。

D. 考察

WT1 ペプチド免疫療法の医師主導治験を行なう上で重要な事項の 1 つである、適格患者を選択するための腫瘍細胞での WT1 タンパクの発現解析のための WT1 免疫染色法の手順が完成した。また、試験薬の調整やその各施設への搬送のための手順も完了した。また、各種の術後予後因子の解析研究から、術後に WT1 ペプチドワクチンの投与が妥当と考えられる患者の選択を科学的に行なえるようになった。通常、臨床効果の判定は CT などを用いた二次元的画像診断で行なわれているが、実際は腫瘍は 3 次元的広がりをもっているものなので、完璧とは言えない。本研究では、腫瘍の 3 次元的画像を作り、臨床効果を的確に評価しうる道も開くものと考えられる。さらに、ベイズ流統計手法を活用できれば、本免疫療法での重要なデータベースの集積と集積したデータの有効活用が可能になる可能性が高い。

E. 結論

WT1 ペプチドワクチンの医師主導治験を進める上で必須の事項である、患者選択、試験薬調整・配送、臨床効果判定、有用なデータベースなどが確立されつつある。

F. 健康危険情報（研究代表者のみ） 特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wada N, Ikeda J, Hori Y, Fujita S, Ogawa H, Soma T, Sugiyama H, Fukuhara S, Kanamaru A, Hino M, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K. Epstein-barr virus in diffuse large B-Cell lymphoma in immunocompetent patients in Japan is as low as in Western Countries. *Med Virol.* 83: 317-21, 2011. Feb
2. Takahara A, Koido S, Ito M, Nagasaki E, Sagawa Y, Iwamoto T, Komita H, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Mineno J, Shiku H, Nishida S, Sugiyama H, Tajiri H, Homma S. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother.* 60: 1289-97、

- 2011.
3. Ohno S, Takano F, Ohta Y, Kyo S, Myojo S, Dohi S, Sugiyama H, Ohta T, Inoue M. Frequency of myeloid dendritic cells can predict the efficacy of wilms' tumor 1 Peptide vaccination. *Anticancer Res.* 31: 2447-52, 2011.
 4. Hashii Y, Sato-Miyashita E, Matsumura R, Kusuki S, Yoshida H, Ohta H, Hosen N, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K. WT1 peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric leukemic patients with high risk for relapse: successful maintenance of durable remission. *Leukemia*, 26: 530-532, 2011.
 5. Dohi S, Ohno S, Ohno Y, Takakura M, Kyo S, Soma G, Sugiyama H, Inoue M. WT1 peptide vaccine stabilized intractable ovarian cancer patient for one year: a case report. *Anticancer Res.* 31: 2441-5, 2011.
 6. Nishioka M, Tanemura A, Nishida S, Nakano A, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Azuma I, Sugiyama H, Katayama I. Vaccination with WT-1 (Wilms' Tumor gene-1) peptide and BCG-CWS in melanoma. *Eur J Dermatol.* 22: 258-9, 2012.
 7. Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Nakano A, Fujimoto Y, Kinoshita M, Sugiyama H, Yoshimine T. CD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) is expressed on glioblastoma progenitor cells and involved in the regulation of tumor cell invasion. *Neuro Oncol.*, in press.
 8. Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, Katayama Y, Elisseeva OA, Kawakami M, Nishida S, Morimoto S, Murao A, Nakajima H, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H. Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Leukemia*, in press.
 9. Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Tanaka Y, Fujiki F, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Maruno M, Myoui A, Enomoto T, Izumoto S, Sekimoto M, Kagawa N, Hashimoto N, Yoshimine T, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Biased usage of T cell receptor β -chain variable region genes of Wilms' tumor gene (WT1)-specific CD8(+) T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Sci.* 103: 408-414, 2012.
 10. Nakajima H, Oka Y, Tsuboi A, Tatsumi N, Yamamoto Y, Fujiki F, Lie Z, Murao A, Morimoto S, Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Kawase I, Isaka Y, Oji Y, Sugiyama H. Enhanced tumor immunity of WT1 peptide vaccination by interferon $\cdot \cdot$ administration. *Vaccine*, 30: 722-9. 2012.
 11. Chiba Y, Kinoshita M, Okita Y, Tsuboi A, Isohashi K, Kagawa N, Fujimoto Y, Oji Y, Oka Y, Shimosegawa E, Morita S, Hatazawa J, Sugiyama H, Hashimoto N, Yoshimine T. Use of (11)C-methionine PET parametric response map for monitoring WT1 immunotherapy response in recurrent malignant glioma. *J Neurosurg*, 116: 835-42. 2012.
 12. Shirakata T, Oka Y, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oji Y, Murao A, Tanaka H, Nakatsuka S, Inohara H, Sugiyama H. WT1 Peptide Therapy for a Patient with Chemotherapy-resistant Salivary Gland Cancer. *Anticancer Res.* 32: 1081-6, 2012.
 13. Hosen N, Matsuoka Y, Kishida S, Nakata J, Mizutani Y, Hasegawa K, Mugitani A, Ichihara H, Aoyama Y, Nishida S, Tsuboi A, Fujiki F, Tatsumi N, Nakajima H, Hino M, Kimura T, Yata K, Abe M, Oka Y, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. CD138-negative clonogenic cells are plasma cells but not B cells in some multiple myeloma patients. *10.1038/leu.2012.80. Leukemia*, 2012

14. Hayashi S, Oji Y, Kanai Y, Teramoto T, Kitaichi M, Kawaguchi T, Okada M, Sugiyama H, Matsumura A. Low Wilms' tumor gene expression in tumor tissues predicts poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Invest.* 30: 165-71, 2011.
- 学会発表
(発表誌名巻号・頁・発行年)
1. Oji Y, Berneman Z N, Keilholz U, O'reilly R, Saglio G, Wagner N, Heike Y, Lundin E, Aozasa K, Pauwels P, Anguille S, Cilloni D, Ohashi H, Waelput W, Fukuda M, Tatsumi N, Oka Y, Sugiyama H: STANDARDIZATION OF WT1 IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING AND EVALUATION OF WT1 POSITIVITY IN SOLID CANCERS. Fifth International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Torino, April 15, 2011.
 2. Wakeda T, Heike Y, Nishida S, Tsuboi A, Hosen N, Oji Y, Nakajima H, Umeda T, Tanemura A, Katayama I, Oka Y, Sugiyama H: Effect of Cancer Vaccine Therapy on Patients' QOL Camouflage makeup for unsightly skin reactions. Fifth International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Torino, April 16, 2011.
 3. Nishida S, Takeda Y, Eguchi H, Ito T, Kitagawa T, Nagano H, Doki Y, Mori M, Koido S, Homma S, Komita H, Takahara A, Ohkusa T, Tajiri H, Morita S, Sakamoto J, Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, Hosen N, Morimoto S, Sugiyama H: WT1 peptide-based Cancer Vaccine in combination with Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer - PHASE 1 CLINICAL TRIAL-. Fifth International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Torino, April 16, 2011.
 4. Hosen N, Maeda T, Yamane T, Hino M, Morimoto S, Hara K, Nakata J, Nishida S, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Kanakura Y, Morita S, Sakamoto J, Sugiyama H: WT1 peptide vaccination post allo HSCT against hematological malignancies Fifth International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Torino, April 16, 2011.
 5. Tsuboi A, Hosen N, Nishida S, Kawakami M, Nakata J, Morita S, Sakamoto J, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H: Reduced dose of WT1 vaccine for myelodysplastic syndrome - Phase I clinical study -. Fifth International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Torino, April 16, 2011.
 6. Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, Katayama Y, Elisseeva O A, Kawakami M, Nishida S, Morimoto S, Murao A, Nakajima H, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H: Long-term WT1 peptide vaccination for the patients with acute myeloid leukemia. Fifth International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Torino, April 16, 2011.
 7. 杉山治夫: WT1 ペプチドを用いたがんの免疫療法, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 2011 年 6 月 8 日
 8. 杉山治夫: WT1 ペプチドがん免疫療法, 第 15 回日本がん免疫学会総会、豊中、2011 年 6 月 30 日
 9. Nakata J, Hosen N, Okumura A, Shimizu Y, Guo M, Fujioka Y, Kinoshita Y, Oka Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: Immuno-editing of leukemic stem cells in MLL/ENL mouse leukemia model, The 15th annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology, Toyonaka, June 30, 2011.
 10. Hara K, Nishida S, Morimoto S, Tsuboi A, Koido S, Homma S, Komita H, Fujiki F, Takeda Y, Nagano H, Oka Y, Ohkusa T, Sugiyama H: CD45RA⁺CCR7⁺ memory WT1-CTLs predicts the favorable clinical outcome; the WT1 cancer vaccine combined with gemcitabine in the pancreatic cancer patients, The 15th annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology, Toyonaka, June 30, 2011.
 11. 橋井佳子、松村梨紗、吉田寿雄、宮下恵実子、坪井昭博、尾路祐介、保仙直毅、岡芳弘、杉山治夫、大藪恵一：同種造血幹細胞移植後の難知性小児血液腫瘍患者に対する WT1 ペプチドワクチンを用いた免疫療法、第 15 回日本がん免疫学会総会、豊中、2011 年 6 月 30 日
 12. 西岡めぐみ、種村篤、西田純幸、坪井昭博、井上匡美、岡芳弘、杉山治夫、片山一郎：BCG-CWS 併用 WT1 ペプチドワクチン療法によって肺転移巣の増殖

- 抑制を認めた悪性黒色腫の一例、第 15 回日本がん免疫学会総会、豊中、2011 年 6 月 30 日
13. 保仙直毅、前田哲生、山根孝久、日野雅之、森本創世子、原一真、中田潤、西田純幸、坪井昭博、尾路祐介、岡芳弘、金倉譲、森田智視、坂本純一、杉山治夫：造血幹細胞移植後患者に対する WT1 ワクチン免疫療法、第 15 回日本がん免疫学会総会、豊中、2011 年 6 月 30 日
 14. 坪井昭博、保仙直毅、川上学、岡芳弘、尾路祐介、西田純幸、中田潤、森本創世子、杉山治夫：骨髓異型成症候群に対する低容量 WT1 ペプチドワクチン療法、第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、別府、2011 年 8 月 20 日
 15. 岡芳弘、坪井昭博、許泰一、片山雄太、川上学、Elisseeva Olga、村尾綾子、森本創世子、中島博子、保仙直毅、西田純幸、中田潤、中江吉希、尾路祐介、熊ノ郷淳、杉山治夫：再発ハイリスク寛解期 AML に対する WT1 ペプチドワクチン治療による長期生存・治癒の可能性、第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、別府、2011 年 8 月 20 日
 16. 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、辰巳直也、藤木文博、保仙直毅、西田純幸、尾路祐介、杉山治夫：IFN- β 併用投与による WT1 ペプチドワクチンの造血器腫瘍に対する拒絶効果の増強、第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、別府、2011 年 8 月 20 日
 17. 橋本直哉、坪井昭博、千葉泰良、木嶋教行、岡芳弘、木下学、香川尚己、吉峰俊樹、杉山治夫：悪性グリオーマに対する WT1 免疫療法：Recursive partitioning analysis と予後予測因子、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 4 日
 18. 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、辰巳直也、藤木文博、森本創世子、保仙直毅、白方俊章、西田純幸、尾路祐介、杉山治夫：IFN- β 併用投与による WT1 ペプチドワクチンの腫瘍拒絶効果の増強、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 4 日
 19. 土肥聡、大野智、高倉正博、京哲、石崎純子、宮本謙一、杣源一郎、杉山治夫、井上正樹：WT1 ペプチドワクチン療法により長期間症状安定が得られた抗癌剤治療抵抗性卵巣癌の 1 症例、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 4 日
 20. 橋井佳子、坪井昭博、尾路祐介、保仙直毅、岡芳弘、杉山治夫：WT1 ペプチドワクチンを用いた小児血液腫瘍に対する同種造血幹細胞移植後免疫療法、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 5 日
 21. 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、辰巳直也、藤木文博、森本創世子、保仙直毅、白方俊章、西田純幸、尾路祐介、杉山治夫：WT1 ペプチドワクチンと IFN- β の併用投与による WT1 発現白血病細胞に対する拒絶効果の増強、第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、2011 年 10 月 14 日
 22. Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, Katayama Y, Kawakami M, Hosen N, Nishida S, Morimoto S, Oji Y, Sugiyama H : Long-term WT1 peptide vaccination for the patients with acute myeloid leukemia with MRD, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nagoya, Oct. 14, 2011.
 23. 前田哲生、保仙直毅、佐多弘、中田潤、西田純幸、坪井昭博、尾路祐介、福島健太郎、岡芳弘、水木満佐央、織谷健司、杉山治夫、金倉譲：血液悪性疾患に対する同種造血幹細胞移植後の adjuvant therapy としての WT1 peptide vaccination の検討、第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、2011 年 10 月 14 日
 24. 杉山治夫：がんワクチン-WT1 ペプチドと樹状細胞ワクチン-、第 48 回日本癌治療学会学術集会、京都、2010 年 10 月 28 日
 25. 杉山治夫：WT1 ペプチドワクチン、第 49 回日本癌治療学会学術集会、名古屋、2011 年 10 月 28 日
 26. 西田純幸、杉山治夫：WT1 ペプチドを用いたがんの免疫療法 多施設共同研究、第 24 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、和歌山、2011 年 12 月 1 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- 特記すべきことなし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

肺腺癌の癌幹細胞性性質を決定する分子機構に関する研究

研究分担者 大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器外科学 教授 奥村明之進

研究要旨

近年、血液系悪性腫瘍や乳癌・消化器癌において癌幹細胞の研究が進んでおり、癌幹細胞の分子生物学的特徴の解明が進んでいる。しかしながら非小細胞肺癌では癌幹細胞のマーカーもいまだ明らかではなく、その存在の確認も定かでなく、その性質の解明が遅れている。我々はこれまでの研究により、NR0B1 (DAX1) 分子を発現する肺癌細胞が癌幹細胞の性質を有することを報告してきた。今回、NR0B1 に結合することが知られている PPAR γ 分子に着目し、癌細胞内でのこれらの分子の働きを解析した。その結果、NR0B1 発現亢進または PPAR γ 発現抑制により、腺癌細胞の発生に関与していると考えられている ALDH3A1 遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。さらに両者を組み合わせることで相乗的に ALDH3A1 mRNA レベルが上昇することも確認した。臨床検体を以て検討したところ、PPAR γ の発現は手術後の予後とも関連していた。したがって、NR0B1 と PPAR γ の発現を制御することは、予後不良の肺癌の新たな治療戦略への展開につながると期待される。

A. 研究目的

外科治療、放射線治療・外科治療の進歩により、癌治療の成績が向上しつつある現在においても、治療抵抗性の癌が存在する。特に非小細胞肺癌は完全切除術後でさえ再発の可能性が高い難治性の腫瘍としてよく知られている。さらに近年、肺腺癌の発症頻度が増加しており、治療成績の向上は国民の健康福祉の向上の意味で急務である。治療抵抗性の癌細胞が存在することは、近年、癌幹細胞の概念によって説明されつつある。癌幹細胞は、自己複製能力があり、薬剤排出能

力が高く、各種の治療に抵抗する細胞と考えられている。我々はこれまでの研究により、NR0B1 分子 (DAX1 分子) を発現する肺癌細胞が、肺癌の癌幹細胞の性質を有することを報告してきた。NR0B1 を強く発現する肺癌は予後不良であり、NR0B1 の発現機序・作用機序を解明することは、予後不良の肺癌の新たな治療戦略への展開につながると期待される。今回、我々は、NR0B1 分子と結合し機能調節に関与すると推測されている PPAR γ 分子に着目し、癌幹細胞内でのこれらの分子の働きを解析した。

B. 研究方法

1. NR0B1、PPAR γ 発現ベクターを作製し、A549およびPC9肺腺癌細胞株にtransient transfectionを行い、NR0B1分子によるPPAR γ の活性に対する作用を、luciferase assayを用いて評価した。
2. NR0B1のN末側を欠失させたdeletion mutant (mNR0B1)を発現するベクターを作製し、PPAR γ と、wild type NR0B1またはmNR0B1発現ベクターをHEK293T細胞株に導入し、coimmunoprecipitation assayを用いて両者がheterodimerを形成するかどうかを評価した。さらに、PPAR γ 活性の変化についてもluciferase assayで評価した。
3. A549細胞株にベクターを導入して、Tet-Express(tetracycline)誘導性NR0B1発現細胞株を作製した。この細胞株を用い、NR0B1、PPAR γ 発現の変化により腺癌細胞の腫瘍発生に関与すると考えられているALDH3A1遺伝子の発現を評価した。ALDH3A1のmRNA level、ALDH発現細胞数の変化を、それぞれQuantitative RT-PCRならびにAldefluor assayを用いて評価した。
4. 最後に、当科にて1995年～2003年に手術を行ったp-IA期の肺腺癌症例の切除検体を用いて、腫瘍細胞のNR0B1とPPAR γ の発現を免疫染色にて評価した。さらにこれらの分子の発現と予後との関連性の有無を検討した。
今回の研究で解析対象となった患者検体を用いての研究においては、厳重に個人情報の保護した上で行

っている。また、個人情報にはゲノム解析は含まれておらず、一般的な臨床情報のみを使用した。

C. 研究結果

1. NR0B1発現により、PPAR γ の活性はdose-dependentに有意に抑制された。
2. wild type NR0B1はPPAR γ とheterodimerを形成してPPAR γ 活性を抑制しれたのに対し、mDAX-1はPPAR γ とheterodimerを形成せず、PPAR γ 活性の抑制もみられなかった。
3. NR0B1発現亢進またはPPAR γ 発現抑制により、ALDH3A1のmRNAレベルは上昇し、両者を組み合わせることで相乗的にALDH3A1 mRNAレベルが上昇した。Aldefluor assayにおいて、NR0B1発現の亢進またはPPAR γ 発現の抑制により、ALDH発現細胞数は増加し、両者を組み合わせると相乗的にALDH発現細胞数が増加した。
4. NR0B1の発現の高い予後不良群において、PPAR γ 発現の高い症例では比較的予後良好であったが、PPAR γ 発現の低い症例では予後不良であり、生体内でも二つの分子に機能的関連が存在することが示唆された。

D. 考察

肺腺癌細胞内において、PPAR γ がNR0B1の機能を抑制的に制御することが明らかにされた。

E. 結論

肺腺癌の癌幹細胞ではPPAR γ の発現が低下している可能性が示唆

された。

治療抵抗性の肺腺癌において PPAR γ の発現を高めることにより、肺腺癌の癌幹細胞の機能を抑制し、治療効果を向上させうる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Susaki Y, Inoue M, Minami M, Sawabata N, Shintani Y, Nakagiri T, Funaki S, Aozasa K, Okumura M, and Morii E. Inhibitory effect of PPAR γ on NR0B1 in tumorigenesis of lung adenocarcinoma. International Journal of Oncology 2012, in press.

2. 学会発表

須崎剛行 他。Stage IA 肺腺癌における DAX-1、PPAR γ 発現と予後の関係。日本呼吸器外科学会総会 2012 年 5 月、秋田市。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

早期肺癌の予後不良因子に関する研究

研究分担者 坪井 正博

研究要旨 3 cm以下の I 期非小細胞肺癌(NSCLC)切除例において腫瘍内の脈管侵襲が独立した予後因子かどうかは依然 controversial で世界的コンセンサス得るに至っていない。その一因として脈管浸潤の病理学的評価方法が様々であることが考えられ、より精度の高い評価方法が求められている。本研究では、通常の Hematoxylin-Eosin 染色 (HE)に Elastica-Van-Gieson 染色(EvG)、D2-40 免疫染色(D2-40)を加えて脈管浸潤を判定したところ、10%程度診断鮮度があがることが示された。また、脈管侵襲陽性 IA 期 NSCLC の予後は IB 期のそれと同等であった。この結果から、IA 期 NSCLC 脈管侵襲陽性例は術後補助療法の対象候補となり得ると考えられた。特に、当該病期の予後を考慮すれば、毒性の面から通常の抗がん剤よりもむしろペプチドワクチンなどによる免疫療法の介入、確立が期待される。

A. 研究目的

3 cm以下の I 期 NSCLC において Hematoxylin-Eosin 染色 (HE)に加えて Elastica-Van-Gieson 染色 (EvG)、D2-40 免疫染色(D2-40)を行って脈管浸潤を判定し、特殊染色による診断精度の向上を検討する。また、当該病期における予後因子として脈管浸潤が有用であるか否か検討する。

B. 研究方法

対象:2000年1月から2005年12月に当院で根治的肺葉切除術を施行したI期NSCLC患者は467例。

(IA期とPL1/PL2によるIB期; 335例、腫瘍径3cmから5cm以下のIB期; 132例)。

方法: 1) 脈管侵襲の客観的判定

の検討

新TNM分類で3cm以下の肺癌においてT因子をT1からT2aへと上げる因子となった胸膜浸潤(pl)と静脈浸潤(v)、リンパ管浸潤(ly)を比較検討した。年齢、性別、pl、v、lyに対し無再発生存期間の単変量解析および多変量解析を行った。

脈管浸潤の検討には、腫瘍最大断面の全パラフィンブロックから新たに Hematoxylin Eosin (HE) 染色、elastica von Gieson (EvG) 染色、抗 podoplanin 抗体 (クローン D2-40) による免疫染色を作成した。各染色はその順に連続標本とし、それぞれの染色標本の所見が対比可能とした。初めに HE 染色のみで最大断面における v、ly の有無を判定した。浸潤ありとし