

201136007A

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)

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 昇志 (札幌医科大学)

平成 24 年 (2012 年) 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発	1
佐藤 昇志 (札幌医科大学)	

II. 分担研究報告書

鳥越 俊彦 (札幌医科大学)	7
平田 公一 (札幌医科大学)	10
今井 浩三 (東京大学)	12
釣田 義一郎 (東京大学)	14
瀬谷 司 (北海道大学)	16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	25
-----------------------	----

I. 総括研究報告書

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

佐藤 昇志（札幌医科大学）

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報告書 (がん関係研究分野))

総括研究報告書

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

研究代表者 佐藤 昇志 札幌医科大学 教授

研究要旨

本研究は、がん患者体内にがん幹細胞障害性T細胞を誘導し、難治性固形がんの縮小および無増悪生存期間の延長が期待できる新規がん治療ペプチドワクチンの製剤化を目的とする。具体的には、がん幹細胞に発現するHLA-A24拘束性の2種類の抗原ペプチドSVN-2BとOR7C1-A24それぞれに関して、進行膵臓がん(SVN-2B)と進行大腸がん(OR7C1-A24)の患者を対象に臨床試験を実施し、安全性と有効性を検証することを目的とする。特に、これまで自主臨床研究を先行実施してきたSVN-2Bペプチドに関しては、医師主導型治験として第1相試験と前期第2相試験を実施する。

平成23年度は、治験実施に向けてPMDAと薬事戦略相談を行い、前臨床試験の完結、治験薬概要書の作成、治験実施計画書の作成、その他種々のSOPを作成し、治験実施体制の構築を行った。

また、分担研究として(1)ペプチドによって誘導されるCTLの抗腫瘍活性解析、(2)がん幹細胞抗原の発現解析、(3)新規免疫指標の探索、(4)ワクチンアジュバントの開発研究を実施した。

以上の研究成果をふまえ、次年度はSVN-2Bペプチドの治験(第1相試験)を完遂することがポイントとなる。

研究分担者

鳥越 俊彦 (札幌医科大学・准教授)
平田 公一 (札幌医科大学・教授)
今井 浩三 (東京大学・教授)
釣田 義一郎 (東京大学・助教)
瀬谷 司 (北海道大学・教授)
松本 美佐子 (北海道大学・准教授)
田村 保明 (札幌医科大学・講師)
廣橋 良彦 (札幌医科大学・助教)

度から進行消化器がん・肺がん・乳がん・口腔がん・膀胱がん・肉腫(約100症例)を対象としたペプチド単剤療法とインターフェロン併用療法の自主臨床研究を実施。安全性と臨床効果を確認してきた。一方、1980年代から我々は幹細胞様形質をもつ高悪性度がん細胞の抗原解析も行っており、世界に先駆けて約5種類のがん幹細胞特異抗原とそのT細胞エピトープの同定にも成功した。がん幹細胞は、長寿命・高い造腫瘍能力と抗がん剤耐性などの特性を持っていることから、がん再発と転移の根幹をなす細胞であると推察され、これを標的とした新規治療法の実用化は最重要課題となっている。

本研究は、がん幹細胞を障害する活性の高いT細胞を効果的に誘導する2種類のペプチドワクチンの創出を目指し、医師主導型治験として第1相および前期第2相試験を遂行することを目的とする。

A. 研究目的

本研究は、これまで積み上げてきた免疫学の基礎研究成果と臨床研究成果をもとにして、ヒトがんの根幹細胞と考えられるがん幹細胞を標的とするペプチドワクチンの創薬を目的とし、難治性がん、特に膵臓がんと進行大腸がんに対する副作用が少なく、かつ効果的ながん免疫治療法の確立を目指す。

我々は過去20年以上にわたってヒトがん抗原の同定とそれに対する免疫応答の分子機構を解明し、免疫原性の高いヒトがん抗原とそのT細胞エピトープを10種類以上同定してきた。さらにこれらをごん治療ワクチンへ応用し、平成14年

B. 研究方法

本研究組織では次に挙げる(1)～(5)の課題に対し分担研究組織で取り組む。

(1) SVN-2B ペプチドワクチンの医師主導治験準

備と実施（佐藤・鳥越・平田）
治験開始準備を以下の手順で実施する。

1. GMP 製剤（原薬）の委託製造
2. 治験実施体制の構築
3. PMDA 薬事戦略相談
4. GCP 準拠前臨床試験の完結
5. 治験薬概要書の作成
6. 治験実施計画書の作成
7. 各種 SOP の作成
8. PMDA 治験前相談
9. IRB 審査
10. 治験届け提出

(2) OR7C1 ペプチドワクチンの臨床研究準備と実施（鳥越・廣橋・今井・釣田）

臨床研究の準備を以下の手順で実施する。

1. GMP 製剤（原薬）の委託製造
2. 薬理薬効試験
3. 前臨床安全性試験
4. 実施計画書の作成
5. IRB 審査

(3) がん幹細胞抗原の発現と CTL 応答解析（廣橋）

OR7C1 の発現解析を RT-PCR 法で行う。また、蛋白の発現を検出するために単クローン抗体の樹立を試みる。

がん幹細胞抗原特異的 CTL クローンを樹立して、その細胞障害活性および in vivo 腫瘍抑制活性を解析する。

(4) ペプチドワクチンのサロゲートマーカー探索解析（鳥越・田村）

これまでの SVN-2B ペプチドワクチン自主臨床研究約 70 症例の臨床データと免疫モニタリングデータを統計的に解析し、ワクチン効果のサロゲートマーカーを探索する。また、ワクチンの効果を予測できる免疫指標を探索する。

(5) ペプチドワクチンのアジュバント開発（瀬谷・松本）

TLR リガンドを中心に、ペプチドワクチンによる CTL 誘導に安全で効果的なアジュバントを探索する。また、そのメカニズムを解析する。

(倫理面への配慮)

本研究には、医師主導型治験、患者由来の細胞組織の培養、遺伝子改変動物を用いた腫瘍移植実験が含まれているため、大学内部の治験審査委員会、自主臨床研究審査委員会、遺伝子組み換え実験審査委員会、動物実験倫理審査委員会に諮り、患者へのインフォームドコンセントと患者由来試料の扱い方に関して手順書を作成し、医学部長の許可を得て実施する。なお、インフォームド・コンセントは本研究内容をよく理解した、担当医師あるいは研究者が試料提

供機関の責任者の監督のもと行う。臨床試験は、GCP 基準に準じた臨床試験体制のもとで患者の人権及び安全性の確保に十分配慮し、臨床試験のデータの信頼性を確保しつつ研究を遂行する。

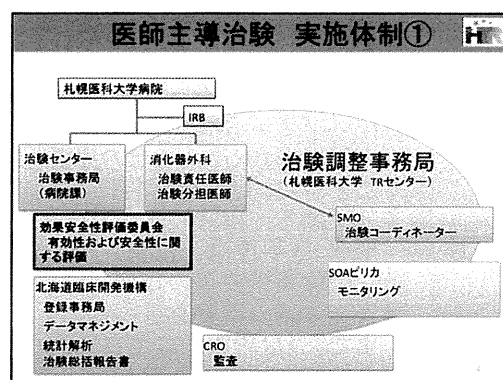
C. 研究結果

(1) SVN-2B ペプチドワクチンの医師主導治験準備と実施（佐藤・鳥越・平田）

1. GMP 製剤（原薬）の委託製造
米国 Polypeptide Group 社に委託して、GMP grade SVN-2B ペプチドを合成した。

2. 治験実施体制の構築

札幌医大治験センターおよび北海道臨床開発機構がコアとなって、以下の図に示すような治験実施体制を構築した。



3. PMDA 薬事戦略相談

事前相談を 12/27 に実施。対面助言を 2/27 に実施した。

相談事項 1：被験物質の規格及びその試験法について

相談事項 2：治験移行に必要な非臨床試験について

相談事項 3：治験プロトコルについて

追加相談事項：治験の早期開始について

4. GCP 準拠前臨床試験の完結

前臨床試験として以下の項目について解析と評価を行った。

i) SVN-2B の安定性評価

精製水または生理食塩水に溶解した場合、10mg/mL 以上の濃度では析出・重合が発生し、不安定になることが判明した。この結果をもとに、SVN-2B 製剤の最大濃度は 3mg/mL とすることとした。

ii) SVN-2B の無菌性評価

無菌であることが証明された。

iii) SVN-2B の溶解性評価

3mg/mL 以下の濃度で、生理食塩水に易溶性であることが確認された。

iv) SVN-2B の安全性評価

PMDA 対面助言に基づき、ビーグル犬を用いた 4 週間反復投与試験を実施した。1 例で投与部位の皮膚潰瘍形成と発熱が

認められたが、他に有害事象の発生は認められなかった。SVN-2B+モンタナイド試験製剤は安全であることが確認された。

v) SVN-2B 製剤の製造方法評価

SVN-2B ペプチド原薬を生理食塩水に溶解し、フィルター滅菌する製造手順書を作成した。

5. 治験薬概要書の作成

以上の前臨床試験結果に基づき、治験薬概要書を作成した。

6. 治験実施計画書の作成

自主臨床試験の結果を参考にして、第1相試験の治験実施計画書を作成した。

試験プロトコルの概略は以下の通りである。

SVN-2B 第1相臨床試験

有効な治療法のない進行消化器がん、胆膵臓がん患者で HLA-A*2402 を有する患者に対して、HLA-A*2402 拘束性で survivin 由来の腫瘍抗原エpiteope ペプチドである SVN-2B をアジュバント Montanide エマルジョンとして病巣近傍の皮下に投与し、その安全性と免疫効果、臨床効果を検証する。

コホート 1: 5 症例、1 回投与量ペプチド 0.3mg, 2 週間おきに 4 回皮下投与。

コホート 2: 5 症例、1 回投与量ペプチド 1.0mg, 2 週間おきに 4 回皮下投与。

コホート 3: 5 症例、1 回投与量ペプチド 3.0mg, 2 週間おきに 4 回皮下投与。

1st End point: 安全性の評価

2nd End point: 免疫効果、腫瘍抑制効果 (RECIST)

安全性と免疫効果 (テトラマー解析) の結果をもとに第2相試験で用いる SVN-2B ペプチド至適投与量を決定する。

7. 各種 SOP の作成

8. PMDA 治験前相談

9. IRB 審査

10. 治験届け提出

以上の項目 7-10 については平成 24 年度に実施する。

(2) OR7C1-A24 ペプチドワクチンの臨床研究準備と実施 (鳥越・廣橋・今井・釣田)

臨床研究の準備を以下の手順で実施した。

1. GMP 製剤 (原薬) の委託製造

和光純薬に委託して GMP grade OR7C1-A24 ペプチド原薬を製造した。

2. 薬理薬効試験

OR7C1-A24 ペプチドを用いて、大腸がん患者末梢血リンパ球からがん幹細胞傷害性ペプチド特異的 CTL を誘導することができた。

安全性試験は H24 年度に実施予定

(3) がん幹細胞抗原の発現と CTL 応答解析 (廣橋)

OR7C1 の発現解析を RT-PCR 法で行ない、大腸がん組織に OR7C1 遺伝子が発現していることを確認した。また、HLA-A24 陽性がん患者末梢血リンパ球を OR7C1-A24 ペプチドで刺激することによって、ペプチド特異的 CTL の誘導に成功し、CTL クローンを樹立した。この CTL クローンが大腸がん幹細胞を高率に障害することを確認した。

OR7C1 蛋白の発現を検出する単クローン抗体を樹立するために、合成ペプチドを免疫してスクリーニングを実施している。

(4) ペプチドワクチンのサロゲートマーカー探索解析 (鳥越・田村)

これまでの SVN-2B ペプチドワクチン自主臨床研究約 70 症例の臨床データと免疫モニタリングデータを統計学的に解析し、ワクチン効果のサロゲートマーカーおよびワクチンの効果を予測できる免疫指標を探索した。その結果、ワクチン前後でのテトラマー陽性 CTL 頻度 (%) の上昇率は、腫瘍抑制効果とよく相関し、サロゲートマーカーとして有用であることが示された。また、ワクチン前におけるテトラマー陽性 CTL 頻度の対数値が 1.6 以下の症例は、ワクチン後のテトラマー陽性 CTL 頻度が上昇する確率が高いことが判明し、ワクチン効果を予測する免疫指標となり得ると考えられた。以上の解析結果は SVN-2B 第1相試験プロトコル作成の根拠となった。

(5) ペプチドワクチンのアジュバント開発 (瀬谷・松本)

ペプチドワクチンによる CTL 誘導に最適な、安全で有効性の高いアジュバントを探索した。分子構造によって、炎症を惹起する TLR リガンドと、炎症を惹起することなく Type I インターフェロンを誘導できるリガンドとがあることが判明。現在、動物モデルを用いてペプチドワクチンに最適な分子構造の解明を行っている。次年度以後は、安全性の評価を実施する予定である。

D. 考察

本研究により、次年度より SVN-2B ペプチドワクチンの医師主導治験を開始できる見込みとなった。今後の予定は以下の通り。

6 月末に PMDA 治験前相談を実施

7 月中に IRB 審査と治験届け提出

8 月末に治験開始

自主臨床研究の結果をもとに、前期第2相試験では、インターフェロン併用試験を実施する計画である。インターフェロン併用の根拠を示す基礎データの集積が求められる。

OR7C1-A24 ペプチドに関しては、安全性試験を実施した後に、自主臨床研究を開始する予定。腫瘍組織における OR7C1 蛋白の発現を評価するための抗体試薬の樹立を急ぐ必要がある。大腸がん以外の癌腫における OR7C1 抗原の発現解析も重要である。

ペプチドワクチンの効果予測に有用な新規免疫指標が発見できた意義は大きい。ワクチン前にテトラマー陽性 CTL 頻度の高い患者は、なぜ臨床効果も期待できないのか、その免疫機序を解明することも今後の重要な課題である。また、さらに有用なバイオマーカーの探索も継続する必要がある。

アジュバントの探索も計画通り順調に進んでいる。

E. 結論

医師主導治験の実施にむけて着実に前進しており、次年度には治験開始予定である。抗がん剤とは全く作用機序の異なるワクチンとしての特性を評価し、これまでの自主臨床研究の成果を十二分に活用した治験計画を策定しており、エポックメイキングな医師主導治験となることが期待される。

F. 健康危険情報

現時点では特記すべき事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakatsugawa M., Takahashi A., Hirohashi Y., Torigoe T., Inoda S., Asanuma H., Tamura Y., Hasegawa T., Takahashi H., and Sato N. SOX2 is expressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumor-initiating potential. *Lab Invest.*, 91:1796-1804, 2011
2. Hirohashi Y. and Sato N. Tumor associated dendritic cells: molecular mechanisms to suppress anti-tumor immunity. *Immunotherapy*, 3:945-947, 2011.
3. Tanaka T., Kitamura H., Torigoe T., Hirohashi Y., Sato E., Masumori N., Sato N., Tsukamoto T. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:789-94, 2011.
4. Tamura Y., Hirohashi Y., Kutomi G., Nakanishi K., Kamiguchi K., Torigoe T., Sato N. Tumor-produced secreted form of binding of immunoglobulin protein elicits antigen-specific tumor immunity. *J Immunol* 186:4325-30, 2011. Selected paper in "In this issue" of the Journal
5. Oura J., Tamura Y., Kamiguchi K., Kutomi G., Sahara H., Torigoe T., Himi T., Sato N. Extracellular heat shock protein 90 plays a role in translocating chaperoned antigen from endosome to proteasome for generating antigenic

peptide to be cross-presented by dendritic cells. *Int Immunol* 23:223-37, 2011. Selected paper in "In this issue" of the Journal

6. Nakatsugawa M., Hirohashi Y., Torigoe T., Inoda S., Kiriyama K., Tamura Y., Sato E., Takahashi H., Sato N. Comparison of speedy PCR-ssp method and serological typing of HLA-A24 for Japanese cancer patients. *J Immunoassay Immunochem* 32:93-102, 2011.
 7. Miyazaki A., Kobayashi J., Torigoe T., Hirohashi Y., Yamamoto T., Yamaguchi A., Asanuma H., Takahashi A., Michifuri Y., Nakamori K., Nagai I., Sato N., Hiratsuka H. Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer. *Cancer Sci* 102:324-9, 2011.
 8. Kano M., Tsukahara T., Emori M., Murase M., Torigoe T., Kawaguchi S., Wada T., Yamashita T., Sato N. Autologous CTL response against cancer stem-like cells/cancer-initiating cells of bone malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Sci* 102:1443-7, 2011. Selected paper in "In this issue" of the Journal
 9. Kameshima H., Tsuruma T., Torigoe T., Takahashi A., Hirohashi Y., Tamura Y., Tsukahara T., Ichimiya S., Kanaseki T., Iwayama Y., Sato N., Hirata K. Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Sci* 102:1181-7, 2011.
 10. Inoda S., Morita R., Hirohashi Y., Torigoe T., Asanuma H., Nakazawa E., Nakatsugawa M., Tamura Y., Kamiguchi K., Tsuruma T., Terui T., Ishitani K., Hashino S., Wang Q., Greene M. I., Hasegawa T., Hirata K., Asaka M., Sato N. The feasibility of Cep55/c10orf3 derived peptide vaccine therapy for colorectal carcinoma. *Exp Mol Pathol* 90:55-60, 2011.
 11. Inoda S., Hirohashi Y., Torigoe T., Morita R., Takahashi A., Asanuma H., Nakatsugawa M., Nishizawa S., Tamura Y., Tsuruma T., Terui T., Kondo T., Ishitani K., Hasegawa T., Hirata K., Sato N. Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *Am J Pathol* 178:1805-13, 2011.
 12. Nagashima T., Ichimiya S., Kikuchi T., Saito Y., Matsumiya H., Ara S., Koshihara S., Zhang J., Hatate S., Tonooka A., Kubo T., Hirose B., Shirasaki H., Izumi T., Takami T., Himi T. and Sato N. Arachidonate 5-lipoxygenase establishes adaptive humoral immunity by controlong primary B cells and their cognate T cell help. *Am. J. Pathol.*, 171:222-232, 2011.
- ##### 2. 学会発表
1. 鳥越俊彦、廣橋良彦、佐藤昇志：がん幹細胞の免疫学的特性とワクチン開発、第13回癌治療増感研究シンポジウム、奈良、2月11日、2011年
 2. 佐藤昇志：ヒトがん免疫研究の現状と展望 - ヒト癌幹細胞/癌起始細胞への免疫応答

を中心に、第100回広島がん治療研究会
記念講演会、広島、3月26日、2011年。

3. 佐藤昇志：がんの免疫誘導と免疫療法、第28回医学会総会、特別講演、東京、4月、2011年。（震災のためDVD発表）
4. 鳥越俊彦、廣橋良彦、田村保明、佐藤昇志：がん幹細胞の免疫学的特性とワクチン開発、がん免疫学会シンポジウム、大阪、6月30日、2011年。
5. Toshihiko Torigoe, Hirohashi Yoshihiko, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato : Stress Response Genes Expressed in Cancer Stem Cells -potent molecular targets for cancer therapy-. The 5th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2011.8.21-25, Quebec City, Canada.
6. 廣橋良彦、鳥越俊彦、井野田智子、守田玲菜、高橋あかり、中津川宗秀、道振義貴、佐藤昇志：がん幹細胞を標的とする免疫療法、第70回日本癌学会学術総会、シンポジウム、名古屋、10月3日、2011年。
7. 鳥越俊彦、廣橋良彦、守田玲菜、田村保明、平田公一、佐藤昇志：次世代がんワクチン：がん幹細胞標的ペプチドワクチンの実用化研究、日本癌治療学会シンポジウム、名古屋、10月27日-28日、2011年。
8. 鳥越俊彦、廣橋良彦、佐藤昇志：がん幹細胞の免疫病理学的特性の解析：がん幹細胞標的治療へ向けて、バイオセラピー学会シンポジウム、和歌山、12月1日、2011年。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 米国仮出願 38834、池田佳奈枝、鳥越俊彦、松本佳隆、藤田龍哉、四ッ柳高敏、佐藤昇志、Resveratrol inhibits fibrogenesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts、2011年1月26日。
2. 特願 2011-102962、梶原敏充、沼崎麻希、清水佳隆、鳥越俊彦、佐藤昇志、田村保明、小島直也、改良された糖被覆リポソーム組成物、株式会社バイオメッドコア、北海道公立大学法人 札幌医科大学、学校法人東海大学、2011年5月2日。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

鳥越 俊彦 (札幌医科大学)
平田 公一 (札幌医科大学)
今井 浩三 (東京大学)
釣田 義一郎 (東京大学)
瀬谷 司 (北海道大学)

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

研究分担者 鳥越 俊彦 札幌医科大学 准教授

研究要旨

がん幹細胞特異抗原の発現と抗原特異的 T 細胞について分析し、がん幹細胞抗原を標的とした免疫療法の有効性と新規免疫指標について解析した。

- (1) 大腸がんのがん幹細胞に特異的に発現するがん抗原 OR7C1 が、がん細胞株のみならず患者由来のがん組織にも発現していることを確認した。
- (2) がん幹細胞特異抗原 OR7C1 とがん幹細胞・非幹細胞に共通して発現する shared antigens CEP55, サバイビンに関して、がん患者末梢血リンパ球からそれぞれの抗原ペプチドに特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローンを樹立し、標的細胞障害活性を分析した。
- (3) 免疫不全マウスにヒト腫瘍細胞と各種 CTL クローンを移植し、標的抗原の違いによる抗腫瘍活性の差について分析した。その結果、がん幹細胞特異抗原を標的とする CTL を移入した場合に、より高い抗腫瘍効果が認められた。
- (4) OR7C1 の発現を検出するための単クローン抗体樹立にむけて研究開発を実施した。
- (5) ワクチンの効果予測に有用な新規バイオマーカーの探索を行ない、ELISPOT 変法を開発した。

A. 研究目的

がん幹細胞に発現するがん抗原の種類と抗原性、T 細胞応答について解析し、がん幹細胞標的ペプチドワクチンの治験実施に向けた薬理薬効評価と免疫効果を反映するサロゲートマーカーの解明に寄与することを目的とする。

また、がん幹細胞抗原に特異的な抗体を樹立し、ワクチン対象患者の適応診断に用いることを目的とする。

B. 研究方法

大腸がん細胞株およびヒトがん組織から、ALDH1 アッセイを用いてがん幹細胞を分離し、がん幹細胞特異的遺伝子の発現について解析した。また、がん患者末梢血からがん幹細胞抗原に対する特異的 CTL クローンを樹立し、標的細胞障害活性および動物移植腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性について検討した。

SVN-2B ペプチドワクチン自主臨床試験における患者リンパ球を用いて、新規免疫指標の探索を行った。また、OR7C1 ペプチドを免疫して、単クローン抗体の樹立を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は大学内部の自主臨床研究審査委員会

に諮り、患者へのインフォームドコンセントのもとに実施された。

C. 研究結果

(1) 大腸がんのがん幹細胞に特異的に発現するがん抗原 OR7C1 が、がん細胞株のみならず患者由来のがん組織にも発現していることを確認した。

(2) がん幹細胞特異的 CTL を樹立することに成功し、がん幹細胞が高率に障害されることを確認した。

(3) 免疫不全マウスにヒト腫瘍細胞と各種 CTL クローンを移植し、標的抗原の違いによる抗腫瘍活性の差について分析した結果、がん幹細胞特異抗原を標的とする CTL を移入した場合に、より高い抗腫瘍効果が認められた。

(4) 1-10ng/mL のペプチド濃度での INF- γ ELISPOT アッセイは、CTL の細胞障害活性とよく相関し、新規免疫指標となりえることが示唆された。

D. 考察

がん幹細胞特異抗原 OR7C1 とがん幹細胞・非幹細胞に共通して発現する shared antigens

CEP55, サバイビンに関して、それぞれの抗原ペプチドに特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローンの抗腫瘍活性を *in vivo* モデルにおいて比較した結果、OR7C1 特異的 CTL により強い腫瘍抑制効果が認められた。このことは、がん幹細胞特異抗原の優位性を示唆しており、SVN-2B ペプチドワクチンよりも OR7C1-A24 ペプチドワクチンのほうがより効果的である可能性が示唆された。

ワクチンの免疫効果を反映する指標としてはテトラマー解析が有用であるが、CTL の質 (細胞障害活性) を反映する指標として 1-10ng/mL のペプチド濃度における ELISPOT 解析が有用であることが示唆された。医師主導治験において、テトラマー解析とともに、この新規免疫指標をモニタリングすることとした。

E. 結論

大腸がん患者末梢血から、がん幹細胞特異抗原 OR7C1 を標的とする CTL クローンを樹立することに成功し、本抗原を標的とした免疫療法の有効性を示した。また、新規免疫指標として、CTL の細胞障害活性を反映しうる ELISPOT 変法を開発した。医師主導治験の免疫モニタリングに有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakatsugawa M., Takahashi A., Hirohashi Y., Torigoe T., Inoda S., Asanuma H., Tamura Y., Hasegawa T., Takahashi H., and Sato N. SOX2 is expressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumor-initiating potential. *Lab Invest.*, 91:1796-1804, 2011
2. Tanaka T., Kitamura H., Torigoe T., Hirohashi Y., Sato E., Masumori N., Sato N., Tsukamoto T. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:789-94, 2011.
3. Tamura Y., Hirohashi Y., Kutomi G., Nakanishi K., Kamiguchi K., Torigoe T., Sato N. Tumor-produced secreted form of binding of immunoglobulin protein elicits antigen-specific tumor immunity. *J Immunol* 186:4325-30, 2011. Selected paper in "In this issue" of the *Journal*
4. Oura J., Tamura Y., Kamiguchi K., Kutomi G., Sahara H., Torigoe T., Himi T., Sato N. Extracellular heat shock protein 90 plays a role in translocating chaperoned antigen from endosome to proteasome for generating antigenic peptide to be cross-presented by dendritic cells. *Int Immunol* 23:223-37, 2011. Selected paper in "In this issue" of the *Journal*
5. Nakatsugawa M., Hirohashi Y., Torigoe T.,

Inoda S., Kiriyama K., Tamura Y., Sato E., Takahashi H., Sato N. Comparison of speedy PCR-ssp method and serological typing of HLA-A24 for Japanese cancer patients. *J Immunoassay Immunochem* 32:93-102, 2011.

6. Miyazaki A., Kobayashi J., Torigoe T., Hirohashi Y., Yamamoto T., Yamaguchi A., Asanuma H., Takahashi A., Michifuri Y., Nakamori K., Nagai I., Sato N., Hiratsuka H. Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer. *Cancer Sci* 102:324-9, 2011.
7. Kano M., Tsukahara T., Emori M., Murase M., Torigoe T., Kawaguchi S., Wada T., Yamashita T., Sato N. Autologous CTL response against cancer stem-like cells/cancer-initiating cells of bone malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Sci* 102:1443-7, 2011. Selected paper in "In this issue" of the *Journal*
8. Kameshima H., Tsuruma T., Torigoe T., Takahashi A., Hirohashi Y., Tamura Y., Tsukahara T., Ichimiya S., Kanaseki T., Iwayama Y., Sato N., Hirata K. Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Sci* 102:1181-7, 2011.
9. Inoda S., Morita R., Hirohashi Y., Torigoe T., Asanuma H., Nakazawa E., Nakatsugawa M., Tamura Y., Kamiguchi K., Tsuruma T., Terui T., Ishitani K., Hashino S., Wang Q., Greene M. I., Hasegawa T., Hirata K., Asaka M., Sato N. The feasibility of Cep55/c10orf3 derived peptide vaccine therapy for colorectal carcinoma. *Exp Mol Pathol* 90:55-60, 2011.
10. Inoda S., Hirohashi Y., Torigoe T., Morita R., Takahashi A., Asanuma H., Nakatsugawa M., Nishizawa S., Tamura Y., Tsuruma T., Terui T., Kondo T., Ishitani K., Hasegawa T., Hirata K., Sato N. Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *Am J Pathol* 178:1805-13, 2011.

2. 学会発表

1. 鳥越俊彦、廣橋良彦、佐藤昇志：がん幹細胞の免疫学的特性とワクチン開発、第 13 回癌治療増感研究シンポジウム、奈良、2 月 11 日、2011 年
2. 鳥越俊彦、廣橋良彦、田村保明、佐藤昇志：がん幹細胞の免疫学的特性とワクチン開発、がん免疫学会シンポジウム、大阪、6 月 30 日、2011 年。
3. Toshihiko Torigoe, Hirohashi Yoshihiko, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato : Stress Response Genes Expressed in Cancer Stem Cells -potent molecular targets for cancer therapy-. The 5th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2011.8.21-25, Quebec City, Canada.

4. 廣橋良彦、鳥越俊彦、井野田智子、守田玲菜、高橋あかり、中津川宗秀、道振義貴、佐藤昇志：がん幹細胞を標的とする免疫療法、第70回日本癌学会学術総会、シンポジウム、名古屋、10月3日、2011年。
5. 鳥越俊彦、廣橋良彦、守田玲菜、田村保明、平田公一、佐藤昇志：次世代がんワクチン：がん幹細胞標的ペプチドワクチンの実用化研究、日本癌治療学会シンポジウム、名古屋、10月27日-28日、2011年。
6. 鳥越俊彦、廣橋良彦、佐藤昇志：がん幹細胞の免疫病理学的特性の解析：がん幹細胞標的治療へ向けて、バイオセラピー学会シンポジウム、和歌山、12月1日、2011年。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 米国仮出願 38834、池田佳奈枝、鳥越俊彦、松本佳隆、藤田龍哉、四ッ柳高敏、佐藤昇志、Resveratrol inhibits fibrogenesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts、2011年1月26日。
2. 特願 2011-102962、梶原敏充、沼崎麻希、清水佳隆、鳥越俊彦、佐藤昇志、田村保明、小島直也、改良された糖被覆リポソーム組成物、株式会社バイオメッドコア、北海道公立大学法人 札幌医科大学、学校法人東海大学、2011年5月2日。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業報告書 (がん関係研究分野))

分担研究報告書

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

研究分担者 平田公一 札幌医科大学 教授

研究要旨

がん幹細胞に発現するがん抗原サイピンを標的とする SVN-2B ペプチドワクチン自主臨床研究の臨床データをもとに、(1) 臨床効果・免疫効果を高めるためのワクチン投与プロトコルの分析、(2) ワクチンの効果を予測する免疫指標、(3) 癌腫によるワクチン効果の違い、について分析した。その結果、

(1) SVN-2B ワクチンには Grade 3 以上の副作用はない。副作用の発現に用量依存性はない。2 週間間隔 4 回皮下投与によって免疫効果が現われる。インターフェロン併用によって免疫効果と腫瘍抑制効果が有意に向上する。

(2) テトラマー解析によるワクチン前後の上昇率が最もよく臨床効果を反映する免疫指標となる。

(3) 癌腫による免疫効果の差異は少ないが、腫瘍抑制効果には差があり、特に乳癌では抗腫瘍効果が低い。

以上の分析結果に基づいて、医師主導治験に向けた治験実施計画書の作成を行った。

A. 研究目的

がん幹細胞を標的とする SVN-2B ペプチドワクチンの医師主導治験実施にむけて、ワクチン投与プロトコル、ワクチンの免疫効果指標、対象とする癌腫の決定を行い、治験実施計画書を作成することを目的とする。

B. 研究方法

これまでに実施した SVN-2B ペプチドワクチン自主臨床研究約 60 症例の臨床データについて統計学的に分析し、至適投与量、安全性、有効性、至適プロトコル、免疫指標 (バイオマーカー)、癌腫による効果の差について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大学内部の自主臨床研究審査委員会に諮り、患者へのインフォームドコンセントのもとに実施された。

C. 研究結果

(1) SVN-2B ペプチドの安全性は 0.1mg/mL から 10mg/mL の範囲で Grade 3 以上の副作用は認められなかった。また、副作用には用量依存性が認められなかった。2 週間間隔 4 回投与によって、有意な免疫効果を得られた。免疫効果に関しては癌腫による違いは少ないが、腫瘍抑制効果には癌腫による違いがあることがわかり、

治験の対象から乳癌は外すこととした。

(2) テトラマー解析法におけるテトラマー上昇率は、臨床効果と相関することがわかり、バイオマーカーとして採用できることが判明した。

(3) モンタナイドとペプチドとの組み合わせでは免疫効果が不十分であるが、インターフェロンを併用することによって、有意に免疫効果が上昇することが明らかとなった。

(4) 以上の成果に基づいて、第 1 相臨床試験にむけた治験実施計画書を作成した。

D. 考察

ワクチンの安全性に関しては、必ずしも抗がん剤のような用量依存性はないことが判明し、第 1 相試験における用量漸増試験には合理性がないと判断された。また、テトラマー上昇率を免疫指標として、至適投与量を決定するのが合理的であると考えられた。第 2 相試験では、より高い免疫効果を得るために、インターフェロンを併用するのが合理的であると考えられた。

E. 結論

約 60 症例の SVN-2B ペプチドワクチン自主臨床研究臨床データを統計学的に分析し、第 1 相

臨床試験に向けた治験実施計画書を作成した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Morita R, Takahashi A, Asanuma H, Nakatsugawa M, Nishizawa S, Tamura Y, Tsuruma T, Terui T, Kondo T, Ishitani K, Hasegawa T, Hirata K, Sato N. Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. Am J Pathol 178:1805-1813. 2011
2. Umemori Y, Ohe Y, Kuribayashi K, Tsuji N, Nishidate T, Kameshima H, Hirata K, Watanabe N. : Evaluating the utility of N1,N12-diacetylspermine and N1,N8-diacetylspermidine in urine as tumor markers for breast and colorectal cancers. Clin Chim Acta 411:1894-1899. 2010
3. Ohno K, Nishimori H, Yasoshima T, Kamiguchi K, Hata F, Fukui R, Okuya K, Kimura Y, Denno R, Kon S, Uede T, Sato N, Hirata K. Inhibition of osteopontin reduces liver metastasis of human pancreatic cancer xenografts injected into the spleen in a mouse model. Surg Today 2010; 40:347-56
4. 平田公一、九富五郎、奥谷浩一、亀島秀和、鶴間哲弘、齋藤慶太、久木田和晴、鳥越俊彦、佐藤昇志：4. 癌ワクチン・免疫療法の実際と展望. 北海道医報 道医シリーズ臨時創刊号；13-23, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

(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))

分担研究報告書

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

研究分担者 今井浩三 東京大学医科学研究所附属病院・病院長

研究要旨

本研究では切除不能進行大腸癌及び膵癌に対する新規ペプチドワクチン療法の開発を目的とし、その第 I 相試験及び前期第 II 相試験を行なう。平成 23 年度はその開始に向け、準備を釣田分担研究者とともにいった。具体的には、ペプチドワクチン療法に精通した、看護師、薬剤師、臨床心理士の配置、緩和医療チームの強化といった病院内の体制整備、症例のリクルートの準備、ペプチドワクチン療法の啓発活動などを行った。その結果、臨床試験開始直前の準備段階は、ほぼ完了した。倫理面での各種審査を経て、実施される見通しとなった。

共同研究者：谷口博昭

所属：東京大学医科学研究所・抗体・ワクチン
治療寄付研究部門特任助教

予想されるため、緩和医療チームの強化を実行するため、他病院から、緩和医療専門家をリクルートするのに成功した。

A. 研究目的

切除不能進行大腸癌及び膵癌に対する、新規ペプチドワクチン療法の実施を目的とした。

2. 症例のリクルートの準備

臨床試験開始に備え、症例のリクルートを円滑に行うべく、癌研有明病院や東大病院において切除不能進行大腸癌や膵癌の症例を実際に治療している医師に対して、本研究についての説明会を行った。また、看護師、薬剤師等への説明会も実施した。

B. 研究方法

切除不能進行大腸癌及び膵癌に対して、札幌医科大学第一病理学講座で開発された新規ペプチドワクチンである、survivin 2B ペプチド及び OR7C1-A24 ペプチドの第 I 相試験及び前期第 II 相試験を行なう。

3. ペプチドワクチン療法の啓発活動

上記説明会以外にも、ペプチドワクチン療法をテーマに、市民公開医療懇談会を開催した。

(倫理面への配慮) 当院の倫理委員会の規定に従い、実施計画書や患者説明文書等を作成中である。

D. 考察

ペプチドワクチンが調整中であるため、現在臨床試験は開始されていないが、その準備段階はほぼ完了したと考えている。

C. 研究結果

ペプチドワクチンが調整中であったため、分担研究としての臨床試験は行われなかった。しかし、臨床試験開始に向け、その準備を積極的に行った。

E. 結論

臨床試験開始直前の準備はほぼ完了した。

1. 病院内の体制整備

本臨床試験は担当医師のみならず、ペプチドワクチン療法に精通した、看護師、薬剤師、臨床心理士などが不可欠であり、有害事象の発生に備えた診療体制も必要である。また、これらを統括する臨床試験マネージャーも必要である。これらの体制の整備を行った。また、臨床試験開始後は、癌性疼痛や精神不安に対する十分な治療も必要となること

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 釣田義一郎, 水野靖大, 畑啓介, 篠崎大, **今井浩三**, 分子腫瘍マーカー治療経過と経過指標として ワクチンを標的としての癌抗原ペプチド. *Current Therapy*.

- 29 (12):1104-8, 2011
2. Niinuma T, **Imai K** et al. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res**, 2012, Epub ahead of print.
 3. Nishioka M, **Imai K** et al. Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. **Mol Carcinog**, 2011, in press.
 4. Ohashi H, **Imai K**, et al. Insulin-like growth factor receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. **Cancer Sci**, 2011, in press.
 5. Yamamoto M, **Imai K**, et al. Risk of malignancies in IgG4-related disease. **Mod Rheumatol**, 2011, in press.
 6. Liu Y, **Imai K** et al. Heat stress activates ER stress signals which suppress the heat shock response, an effect occurring preferentially in the cortex in rats. **Mol Biol Rep**, 2011, in press.
 7. Fox BA, **Imai K** et al. Defining the critical hurdles in cancer immunotherapy. **J Transl Med**, 9: 214, 2011.
 8. Suzuki H, **Imai K** et al. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. **Cancer Res**, 71(17): 5646-5658, 2011.
 9. Ii M, **Imai K** et al. Co-expression of laminin β3 and γ2 chains and epigenetic inactivation of laminin α3 chain in gastric cancer. **Int J Oncol**, 39(3): 593-599, 2011.
 10. Taniguchi H, **Imai K**, et al. Silencing of the Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer. **Oncogene**, 2011, in press.
 11. Ii M, **Imai K** et al. The efficacy of IGF-I receptor monoclonal antibody against human gastrointestinal carcinomas is independent of k-ras mutation status. **Clin Cancer Res**, 17(15): 5048-5059, 2011.
 12. Tanaka H, **Imai K** et al. Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. **J Gastroenterol**, 46: 143-152, 2011.
 13. Kamimae S, **Imai K**, et al. Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. **Cancer Prev Res**, 4(5): 674-683, 2011.
 14. Sasaki S, **Imai K** et al. Interferon-alpha/beta and anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, 6(5): e19618, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金

(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))

分担研究報告書

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

研究分担者 釣田 義一郎 東京大学医科研病院外科 病院講師

研究要旨

本研究では切除不能進行大腸癌及び膵癌に対する、新規ペプチドワクチン療法の開発を目的とし、その第 I 相試験及び前期第 II 相試験を行なう。平成 23 年度はその開始に向け、その準備を積極的に行った。具体的には、ペプチドワクチン療法に精通した、看護師、薬剤師、臨床心理士の配置、緩和医療チームの強化といった病院内の体制整備、症例のリクルートの準備、ペプチドワクチン療法の啓蒙活動などを行った。その結果、臨床試験開始直前の準備段階は、ほぼ完了した。

共同研究者：篠崎大¹、畑啓介¹、水沼信之²、渡邊聡明³

所属：東京大学医科研病院外科¹、癌研有明病院化学療法科²、東京大学腫瘍外科³

A. 研究目的

切除不能進行大腸癌及び膵癌に対する、新規ペプチドワクチン療法の開発を目的とした。

B. 研究方法

切除不能進行大腸癌及び膵癌に対して、札幌医科大学第一病理学教室で開発された新規ペプチドワクチンである、survivin 2B ペプチド 及び OR7C1-A24 ペプチドの第 I 相試験及び前期第 II 相試験を行なう。

(倫理面への配慮) 当院の倫理委員会の規定に従い、実施計画書や患者説明文書等を作成中である。

C. 研究結果

ペプチドワクチンが調整中であったため、分担研究としての臨床試験は行われなかった。しかし、臨床試験開始に向け、その準備を積極的に行った。

1. 病院内の体制整備

本臨床試験は担当医師のみならず、ペプチドワクチン療法に精通した、看護師、薬剤師、臨床心理士などが不可欠であり、有害事象の発生に備えた診療体制も必要である。また、これらを統括する臨床試験マネージャーも必要である。これらの体制の整備を行った。また、臨床試験開始後は、癌性疼痛や精神不

安に対する十分な治療も必要となることが予想されるため、緩和医療チームの強化も行った。

2. 症例のリクルートの準備

臨床試験開始に備え、症例のリクルートを円滑に行うべく、癌研有明病院や東大病院において切除不能進行大腸癌や膵癌の症例を実際に治療している医師に対して、本研究についての説明会を行った。

3. ペプチドワクチン療法の啓蒙活動

上記説明会以外にも、ペプチドワクチン療法をテーマに、市民公開講座を開催した。

D. 考察

ペプチドワクチンが調整中であるため、現在臨床試験は開始されていないが、その準備段階はほぼ完了したと考えている。

E. 結論

臨床試験開始直前の準備はほぼ完了した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

釣田義一郎, 水野靖大, 畑啓介, 篠崎大, 今井浩三. 分子腫瘍マーカー治療経過と経過指標として、ワクチンを標的としての癌抗原ペプチド. *Current Therapy*. 29 (12) : 1104-8. 2011 年

2.学会発表

釣田義一郎, 篠崎大, 水野靖大, 畑啓介. Stage IV 大腸癌の治療成績. 第 75 回大腸癌研究会. 東京. 2011 年 7 月 18 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

(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))

分担研究報告書

難治性がんに対するがん幹細胞標的ペプチドワクチン療法の開発

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

抗がんペプチドワクチン療法は高 QOL・低侵襲のすぐれた免疫療法だが、免疫増強剤 (アジュバント) によってがん抗原免疫応答を高めることが必須となる。本分担研究はサバイビン 2B、OR7C1-A24 ペプチドの有効性を支持するアジュバント開発を担当し、臨床試験を支える。本年度はマウスで抗がん NK, CTL を起動し低副作用のアジュバントの確立を目指す。

A. 研究目的

札幌医大・病理学講座で長年ヒトがん抗原の同定とそれらの免疫応答が解析され、がん幹細胞に発現する HLA-A24 拘束性の 2 種類の抗原ペプチド **survivin2B** と **OR7C1-A24** に関して、GCP 基準に準じた安全性試験 (初年度) を実施している。本研究は TLR3 を活性化する RNA アジュバントを創製し、この臨床試験をサポートする。H23 年度は樹状細胞 (mDC) の NK 細胞、CD8+ T 細胞 (CTL) 誘導能を強力に惹起する dsRNA 誘導体のデザインを決定し、担がん (EG7) マウスの系で最善のアジュバントを抽出する。

B. 研究方法

EG7 担がんの WT と各種 KO マウスに polyI:C または合成の DNA/RNA キメラ分子 (特許申請) を s. c. して腫瘍退縮が著明な合成分子を抽出する。同マウスの血中サイトカインを測定し、脾臓から mDC, リンパ球を採取する。抗原刺激後に OT1 増殖と NK 活性を調べる。一方、ex vivo 系 (骨髄性樹状細胞 (BMDC) と T 細胞の混合系) に被検アジュバントを加えて、mDC の dsRNA 認識経路の機能を解析する。用いたマウスは MyD88^{-/-}, TICAM-1^{-/-}, IPS-1^{-/-}, IRF-3^{-/-}, IRF-7^{-/-}, IFNAR^{-/-} である。MyD88^{-/-} は審良研から、IRF-3^{-/-}, IRF-7^{-/-} は谷口研から恵与を受けた。BMDC, 脾臓細胞の調整、NK 活性の測定、cross-priming 能の査定は既報に準じた。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. polyI:C 投与マウスは急性期に NK 活性化を起動した。同様の NK 活性化はいくつかの DNA/RNA キメラ分子 (dsRNAX と呼ぶ) で再現した。polyI:C の場合、IFN, cytokines が血中に高く誘導されたが、dsRNAX は全身性の cytokinemia を誘導しなかった。同様の cytokinemia の副作用が無い状況で mDC は OVA に対して cross-priming を誘導した。NK 活性化と cross-priming 誘導能は mDC の TICAM-1 に依存し、IPS-1 は殆ど関与しなかった。

1. NK 活性化について TICAM-1 経路は INAM と名付けた分子を mDC 表面に誘導し、これが NK 細胞の INAM と相互反応を誘導して NK 活性化を起こすことを証明した。この系に MyD88 は関与しなかった。NK 活性化には IRF-3 が強く関与したが IRF-7 の関与は軽微であった。

2. polyI:C と OVA の投与マウスは経時 6 日後以降に CD8+ CTL 増殖を起動した。同様の CTL 誘導は OT1 を使った ex vivo 系でも再現した。polyI:C で mDC が cross-priming を誘導すると判明した。CTL 誘導にも mDC の TICAM-1 > IPS-1 の関与が証明された。CTL 誘導には IRF-3 と IRF-7 が関与し、両方の KO で cross-priming は殆ど抑えられた。TICAM-1 経路の cross-priming 誘導因子は現在同定中である。

D. 考察

PolyI:C など RNA アジュバントは type I IFN と独立に CTL, NK 活性化を起動することが判明した。これらのエフェクター誘導の根幹に TLR, RLR シグナルを始めとする樹状細胞・自然免疫の活性化が必須なことが本研究で判明した。

一般に polyI:C は毒性の問題が臨床への導入を阻んで来た。濁世の本体は cytokine storm である。本研究は dsRNAX を抽出することにより、毒性の問題を解決しようとする企画である。dsRNAX はどの様に mDC に NK 活性化と cross-priming を誘導するかは分子レベルで未定であるが、検討中の課題である。

dsRNAX アジュバントによる腫瘍退縮は NK 依存性, CTL 依存性のいずれの腫瘍でも起き、IFN 誘導はさらに抗腫瘍活性を上げる。NK 感受性腫瘍では単独の治療効果も査定できる。マウス mDC 成熟化の分子基盤の解明と抗腫瘍活性起動の分子機構を解明してから、dsRNAX がヒトで十分にエフェクター誘導を起こすか今後の検討課題である。

E. 結論

TICAM-1 経路によって NK, CTL の起動を行うが cytokinemia を起こさない新規合成 DNA/RNA キメラ分子を発明した。マウス移植がんを副作用無く退縮する。ヒトへの適用は今後の検討課題である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

a) 論文発表

1. Watanabe, A., M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J. Biol. Chem.* 86: 10702-10711.

2. Sawahata, R., H. Shime, S. Yamazaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Akazawa, N. Inoue, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. Failure of mycoplasmal lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13: 350-358.

3. Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. The SKI2-related helicase DDX60 is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Molec. Cell. Biol.* 31: 3802-3819.

4. Wakasa, K., H. Shime, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, M. Imamura, and T. Seya. 2011. Development of monoclonal antibodies that specifically interact with necrotic lymphoma cells. *Microbiol. Immunol.* 55: 373-377.

5. Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S.

Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. 2011. Natural killer cells recognize Friend retrovirus infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions *in vivo*. *J. Virol.* 85: 5423-5435.

6. Yamazaki, S., K. Okada, A. Maruyama, M. Matsumoto, and T. Seya. 2011. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides *in vivo*. *PLoS ONE.* 6 (4). e18833.

7. Aly, H. H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, K. Shimotohno, T. Wakita, and T. Seya. 2011. Establishing mouse hepatoma cell lines permissive to human hepatitis C virus. *PLoS ONE.* 6 (6): e21284.

8. Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. 2011. The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J. Immunol.* 187: 5320-5327.

9. Sancho-Shimizu, V., R. Pérez de Diego, L. Lorenzo, R. Halwani, A. Alangari, S. Fabrega, A. Cardon, J. Maluenda, M. Tatematsu, F. Mahvelati, M. Herman, M. Ciancanelli, Y. Guo, A. Ghadiri, S. Boucheriti, S. Plancoulaine, C. Picard, F. Rosenberg, M. Tardieu, P. Lebon, E. Jouanguy, T. Seya, M. Matsumoto, N. Rezeai, D. Chaussabel, A. Puel, L. Abel, S-Y. Zhang, S. Al-Muhsen, and J-L. Casanova. 2011. Human TRIF deficiency in otherwise healthy patients with herpes simplex encephalitis. *J. Clin. Invest.* 121: 4889-4902.

10. Itoh, H., A. Watanabe, K. Iwano, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. *PLoS ONE.* 6(12): e28500.

11. Hazeki, K., Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, K. Nigorokawa, S. Takasuga, T. Sasaki, M. Matsumoto, T. Seya, and O. Hazeki. 2011. Phosphoinositide 3-kinase<gamma> controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *PLoS ONE.* 6(10): e26836.

12. Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and