

201208022A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西村 孝司

平成25(2013)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がん抗原解析 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・佐藤 崇之		
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・武富 紹信		
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	-----	23
菰池 佳史・山下 啓子		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27
---------------------	-------	----

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細胞とキラーT細胞を同時に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、北海道大学病院、北海道大学遺伝子病制御研究所および近畿大学医学部倫理委員会において承認された、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に従い、進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象に、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(大腸癌：UMIN000007506、乳癌：UMIN000007507)を実施した。

平成24年度末までに、大腸癌25例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、20例に対してH/K-HELPワクチン投与を実施した。乳癌では2例のエントリーがなされ、内1例にワクチンを投与した。ワクチン投与を行った被験者の免疫モニタリングを開始し、これまで実際に大腸癌16例について抗腫瘍免疫応答を評価したところ、ワクチン投与後15例においてがん抗原特異的な抗体価の上昇およびT細胞応答を認めた。乳癌については1例中1例において、抗腫瘍免疫応答が確認された。また本臨床試験に登録し、ワクチン投与を行った患者サンプルを使用して、臨床効果を予見し得るバイオマーカーの探索も同時に開始した。引き続きハイブリッドロングペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果について、最終年度に総合評価として判定することとした。

今後、本臨床研究を推進し、ハイブリッドロングペプチド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
佐藤 崇之	北海道大学遺伝子病制御研究所 ROYCE' 健康バイオ研究部門 特任助教
奥野 清隆	近畿大学医学部外科 教授
菰池 佳史	近畿大学医学部外科 教授
武富 紹信	北海道大学大学院医学研究科 消化器外科学分野I 教授
山下 啓子	北海道大学病院乳腺・内分泌外科 教授

A. 研究目的

本研究において、我々が世界に先駆け開発したヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化するヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)を用いた探索的II相自主臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ハイブリッドロングペプチドワクチン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ことで、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、既存の標準治療に加えて革新的次世代がん治療法の開発が望まれている。これまでに申請者らはマウスがん治療モデルを駆使

した基盤的がん免疫研究成果により、担がん生体で免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てきた。本免疫理論をヒトへと臨床応用するために、ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化するH/K-HELPを用いたがんワクチン治療を構築し、本研究に先行してH/K-HELPを用いた探索的Ⅰ相自主臨床試験を実施した。その結果、H/K-HELPワクチンの安全性に加え、実際に、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のみならず、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がんワクチン治療の開発に重要であることが示唆された。

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ハイブリッドロングペプチド、H/K-HELPの臨床研究結果」をもとに、H/K-HELPワクチンの抗腫瘍効果を検証する探索的Ⅱ相臨床試験研究を実施し、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相臨床試験において、研究分担者である北村、脇田、佐藤を中心に本臨床試験にIC取得後、エントリーした被験者検体を用いてがん抗原解析、がん抗原特異的免疫応答を評価する免疫モニタリングを実施する。

腫瘍組織における Survivin の発現について、前年度までに整備した標準化免疫染色法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。

H/K-HELP ワクチン投与前後における抗腫瘍免疫応答については、前年度までに整備した、標準化免疫モニタリング法に基づいて、被験者血液検体を用いて ELISA 法による抗

Survivin 抗体価測定を行う。また、ELISA 法およびELISPOT法による Survivin 抗原特異的 T 細胞応答の解析を実施する。

また多施設共同による対象患者の Survivin がん抗原発現解析、がん抗原特異的抗体価、および T 細胞応答評価についてセントラル化を行う。

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医学部附属病院とで連携して実施する。

研究分担者である奥野および武富は大腸癌、菰池および山下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。

昨年度までに各IRBにおいて承認された、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に基づき、H/K-HELPワクチンの抗腫瘍効果を検証する進行・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)を用いた癌ワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験(大腸癌:UMIN000007506、乳癌:UMIN000007507)を実施する。

3. がんワクチン治療効果を予見・診断するバイオマーカー研究

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または抗原特異的免疫応答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連携して実施する。

臨床試験の過程で得られる被験者のがん組織、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、佐藤を中心に行い、臨床データの相関を解析する項目、測定方法は奥野、菰池、武富、山下が連携して行う。

(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。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臨床試験研究事務局を置き、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んでいる。

C. 研究結果

平成 24 年度において、これまでに北海道大学病院、北海道大学遺伝子病制御研究所および近畿大学医学部倫理委員会において承認された、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に従い、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) を用いたがんワクチン治療の探索的 II 相臨床試験を実施した。

今年度末までに、大腸癌25例について同意取得によるエントリーがあり、引き続きSurvivin がん抗原の発現解析、HLAタイプの解析、各種検査などを実施し、所定の基準を満たした、20例に対してH/K-HELPワクチン投与を実施した。乳癌では2例のエントリーがなされ、内1例にワ

クチンを投与した。

エントリー基準の一つとなるSurvivinがんに抗原の評価において、Survivin抗原の発現を確認したところ、全27例(大腸癌25例、乳癌2例)中26例が陽性であった。また、HLA型の解析を実施したところ、27例中26例が適格であり、非常に高い確率でSurvivin-H/K-HELPを用いたがんワクチン治療試験にエントリー可能であることから、本ペプチドワクチンが数多くのがん患者に適応可能であることが分かった。

これまでに、大腸癌にエントリーした4症例について、治療の過程において、原病の増悪による入院の措置による本試験からの離脱が3例、一時中断し、軽快後に治療再開が1例あったが、Survivin-H/K-HELPワクチンの投与により、直ちに試験全体を中止する必要のある重篤な有害事象の発生は認められなかった。

Survivin-H/K-HELPワクチン治療を実施した、被験者の免疫モニタリングを行った結果、実際にSurvivin-H/K-HELPワクチン投与後、大腸癌16例について抗腫瘍免疫応答を評価したところ、15例においてSurvivin抗原特異的な抗体価(Total IgG, IgG1, IgG3など)の上昇、および投与ペプチド特異的にIFN- γ を産生するTh1あるいはTc1細胞応答を認めた。乳癌については1例中1例において、Survivin抗原ペプチド特異的なT細胞応答が確認された。

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、それぞれワクチン投与 20 例の完遂の時点で、中間評価を実施することとした。今年度に引き続き、次年度も本臨床試験を行い、ハイブリッドロングペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果について、最終年度に総合評価として判定することとした。

ペプチドワクチン臨床試験の付随研究として、被験者の腫瘍組織、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)の解析に着手するとともに、担当医師と連携して被験者の診療情報(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)との比較検討を開始した。

D. 考察

本研究プロジェクトにおいて、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞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、がんペプチドワクチン臨床試験を実施し、日本発の革新的な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の第II相臨床試験実施計画書類を整備した。各IRBによる承認後、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、実際に患者のワクチン治療を開始した。

今年度末までに、大腸癌25例について同意取得によるエントリーがあり、引き続きSurvivinがん抗原の発現解析、HLAタイプの解析、各種検査などを行い、所定の基準を満たした、20例に対してSurvivin-H/K-HELPワクチン投与を実施した。乳癌では2例のエントリーがなされ、内1例にワクチンを投与した。これまでに、ワクチン投与を行った被験者の免疫モニタリングを行った結果、ワクチン投与後、Survivin抗原特異的なTh1細胞依存的な抗体価の上昇およびペプチド刺激特異的にIFN- γ を産生するTh1あるいはTc1細胞応答を認めた症例も認められたことから、本ハイブリッドロングペプチドにより、実際に腫瘍抗原特異的なType1免疫応答を惹起できたものと考えられる。

以上の結果から、本プロジェクトにおいて、Survivin-H/K-HELPワクチンの臨床効果を評価する上で、実際に大腸癌および乳癌患者に対するがんワクチン治療試験の実施体制が十分に整ったと考えられる。ここで、大腸癌に比べて乳癌においては、エントリー数が少ないが、これは参画していた医師の異動による影響が考えられるが、本年度より新たに参画した医師と協力・連携し、引き続き募集を継続するとともに、更に加速してエントリーの実施を検討している。ワクチン治療については、これまでに、原疾患の増悪による離脱が散見されるものの、試験全体を中止すべき重篤な有害事象の発生はなく、Survivin-H/K-HELPワクチンの安全性

の再確認がなされていることから、今後の試験の継続による症例数の集積とともに抗腫瘍効果の判定も望まれる。

さらにSurvivin-H/K-HELPワクチン治療を実施した症例において、先行実施した第I相試験の結果と同様に極めて早い段階でSurvivinペプチド特異的抗体価の上昇とT細胞応答が惹起されていることから、今後、長期経過観察を実施するとともに、抗腫瘍効果の有無との相関解析を詳細に行なうことで、より精度・効果の高いワクチン治療法の開発に繋がるものと考えている。

また今年度において、臨床試験に登録し、ワクチン投与を行った患者サンプルを使用して、臨床効果を予見し得るバイオマーカーの探索も同時に開始し、次年度、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、本ワクチン治療の完遂症例を抗腫瘍効果あるいは抗原特異的免疫応答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を詳細に解析し、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ている。

最近、国内外の学会や論文雑誌等において、ロングペプチドを用いたがんワクチン治療に関する報告が数多くなされ、今後、次世代型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考えられる。現在、がん抗原を用いたがんワクチン免疫治療はショートペプチドからロングペプチドへと大きな分岐点にあるものと予想され、今後、世界の研究競争に乗り遅れるならば我が国の革新的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。

本プロジェクトによる治療試験研究を引き続き強力で推進することで、ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化するハイブリッドロングペプチド、H/K-HELP ワクチンによる、がん治療効果とその抗腫瘍免疫応答に係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主導型あるいは企業主導型治療への橋渡しが極めて有望といえる。

E. 結論

今年度において、大腸癌もしくは乳癌患者を

対象に、前年度までに整備した臨床研究計画に従い、ハイブリッドロングペプチド、H/K-HELPワクチンを使用した、がんワクチン治療の探索的II相臨床試験研究を実施した。今年度末までに、大腸癌25例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、20例に対してSurvivin-H/K-HELPワクチン投与を実施した。乳癌では2例のエントリーがなされ、内1例にワクチンを投与した。従って、本プロジェクトにおいて、H/K-HELPワクチンの臨床効果を評価するための、がんワクチン治療試験の実施体制が十分に整ったといえる。今後、本研究を推進し、H/K-HELP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・評価するとともに、ワクチン投与を行った患者検体を使用して、臨床効果を予見し得るバイオマーカーを探索・同定することにより、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発に繋ぐことが可能と考える。

F. 健康危険情報

本年度、当該研究での臨床試験において、本試験薬と因果関係の疑われる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) Watanabe K, Toji S, Ohtake J, Nakano K, Satoh T, Kitamura H, Nishimura T: Establishment of a stable T lymphoma cell line transduced with HLA-A*24:02-restricted WT1-specific TCR genes and its application to antigen-specific immunomonitoring. *Biomed Res.* 34(1): 41-50, 2013
- 2) Okuno K, Sugiura F, Itoh K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakamura Y: Recent advances in active specific cancer vaccine treatment for colorectal cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 13(9): 1439-1445, 2012
- 3) Uno K, Okuno K, Hamuro J: Intracellular glutathione in monocytes are useful biomarker of immune status of tumor bearing patients. *Eur J Clin Med Oncol.* 4(3): 21-26, 2012
- 4) Galon J, Franck P, Marincola FM, Okuno K, et al.: Cancer classification using the immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med.* 10(1): 205, 2012
- 5) Imano M, Itoh T, Satou T, Yasuda A, Nishiki K, Kato H, Shiraishi O, Peng YF, Shinkai M, Tsubaki M, Yasuda T, Imamoto H, Nishida S, Takeyama Y, Furukawa H, Okuno K, Shiozaki H: High expression of epithelial cellular adhesion molecule in peritoneal metastasis of gastric cancer. *Target Oncol.* 2012 in press
- 6) Imano M, Satou T, Itoh T, Yasuda A, Kato H, Shinkai M, Peng YF, Tsubaki M, Yasuda T, Imamoto H, Nishida S, Takeyama Y, Okuno K, Shiozaki H: Peritoneal metastatic lesions of gastric cancer exhibit low expression of human epidermal growth factor receptor 2. *Targ Oncol* 7(4): 213-216, 2012
- 7) Imano M, Yasuda A, Itoh T, Satou T, Peng YF, Kato H, Shinkai M, Tsubaki M, Chiba Y, Yasuda T, Imamoto H, Nishida S, Takeyama Y, Okuno K, Furukawa H, Shiozaki H: Phase II study of single intraperitoneal chemotherapy followed by systemic chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis. *J Gastrointest Surg.* 16(12):2190-2196, 2012
- 8) Imano M, Peng YF, Itoh T, Nishikawa M, Satou T, Yasuda A, Inoue K, Kato H, Shinkai M, Tsubaki M, Yasuda T, Imamoto H, Nishida S, Furukawa H, Takeyama Y, Okuno K, Shiozaki H: A preliminary study of single intraperitoneal administration of paclitaxel followed by sequential systemic chemotherapy with S-1 plus paclitaxel for advanced gastric cancer with peritoneal metastasis. *Anticancer Res.* 32(9): 4071-4075, 2012
- 9) Tokoro T, Okuno K, Hida J, Ueda K, Yoshifuji T, Daito K, Takemoto M, Sugiura F: Analysis of the clinical factors associated with anal function after intersphincteric resection for very low rectal cancer. *World J Surg Oncol.* 11:24, 2013
- 10) Hida J, Okuno K: High ligation of the inferior mesenteric artery in rectal cancer surgery. *Surg Today* 43(1):8-19, 2013
- 11) Ishitobi M, Suzuki O, Komoike Y, Ohsumi S, Nakahara S, Yagi T, Yoshinami T, Tomita Y, Inaji H: Phase II study of neoadjuvant anastrozole and concurrent radiotherapy for postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer.* 2012, in press
- 12) Ishitobi M, Okumura Y, Arima N, Yoshida A, Nakatsukasa K, Iwase T, Shien T, Masuda N, Tanaka S, Tanabe M, Tanaka T, Komoike Y, Taguchi T, Nishimura R, Inaji H: Breast Cancer Subtype and Distant Recurrence after Ipsilateral Breast Tumor Recurrence. *Ann Surg Oncol.* 20(6): 1886-1892, 2013
- 13) Ishitobi M, Okumura Y, Nishimura R, Nakatsukasa K, Tanabe M, Yoshida A, Masuda N, Shien T, Tanaka S, Komoike Y, Arima N, Taguchi T, Inaji H: Repeat lumpectomy for ipsilateral breast tumor recurrence (IBTR) after breast-conserving surgery: the impact of

- radiotherapy on second IBTR. Breast Cancer. 2013 in press
- 14) Einama T, Homma S, Kamachi H, Kawamata F, Takahashi K, Takahashi N, Taniguchi M, Kamiyama T, Furukawa H, Matsuno Y, Tanaka S, Nishihara H, Taketomi A, Todo S: Luminal membrane expression of mesothelin is a prominent poor prognostic factor for gastric cancer. Br J Cancer. 107(1):137-142, 2012
 - 15) Kawamata F, Kamachi H, Einama T, Homma S, Tahara M, Miyazaki M, Tanaka S, Kamiyama T, Nishihara H, Taketomi A, Todo S: Intracellular localization of mesothelin predicts patient prognosis of extrahepatic bile duct cancer. Int J Oncol. 41(6):2109-2118, 2012
 - 16) Taketomi A, Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y: A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. Surg Today. 43(3):289-292, 2013
 - 17) Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y: Tumor-Associated Macrophage Promotes Tumor Progression via STAT3 Signaling in Hepatocellular Carcinoma. Pathobiology. 80(3):146-154, 2013
 - 18) Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa JI, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura SI, Todo S: Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. Hepatology. 2013 in press
 - 19) Toyama T, Kondo N, Endo Y, Sugiura H, Yoshimoto N, Iwasa M, Takahashi S, Fujii Y, Yamashita H: High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients. Jap J Clin Oncol 42: 256-263, 2012
 - 20) Akechi T, Okuyama T, Uchida M, Nakaguchi T, Ito Y, Yamashita H, Toyama T, Komatsu H, Kizawa Y, Wada M: Perceived Needs, Psychological Distress and Quality of Life of Elderly Cancer Patients. Jap J Clin Oncol 42: 704-710, 2012
 - 21) Inaji H, Iwata H, Nakayama T, Yamamoto N, Sato Y, Tokuda Y, Aogi K, Saji S, Watanabe K, Saito T, Yoshida M, Sato N, Saeki T, Takatsuka Y, Kuranami M, Yamashita H, Kikuchi A, Tabei T, Ikeda T, Noguchi S: Randomized phase II study of three doses of oral TAS-108 in postmenopausal patients with metastatic breast cancer. Cancer Sci 103:1708-1713, 2012
 - 22) Endo Y, Toyama T, Takahashi S, Yoshimoto N, Iwasa M, Asano T, Fujii Y, Yamashita H: MiR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor a-positive breast cancer. Endocr Relat Cancer 20: 91-102, 2013
 - 23) Snyder CF, Blackford AL, Okuyama T, Akechi T, Yamashita H, Toyama T, Carducci MA, Wu AW: Using the EORTC QLQ-C30 in clinical practice for patient management: Identifying scores requiring a clinician's attention. Quality of Life Research, 2013 in press
 - 24) 大竹淳矢、増子和尚、角田健太郎、富樫裕二、北村秀光、西村孝司：「革新的がんワクチン、H/K-HELPの開発 ショートペプチドからヘルパー／キラーロングペプチドへの移行」医学のあゆみ 244(9): 767-778, 2013
 - 25) 西村孝司：「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」日本臨床免疫学会会誌 35(5): 412-423, 2012
 - 26) 西村孝司：「1枚の写真館 一滴のIL-2が導いてくれたセレンディピティー 免疫抑制癌逃避機構を克服するヘルパーT細胞を軸とした癌ワクチン・細胞治療」細胞工学 31(7): 739, 2012
 - 27) 西村孝司、脇田大功、富樫裕二、北村秀光：革新的次世代癌ワクチン, helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)の開発 基盤研究から臨床研究, そしてまた基盤研究へ臨床免疫・アレルギー科 57(5): 543-555, 2012
 - 28) 奥野清隆：図説 がんペプチドワクチン療法 Oncology Today September, p.14-19, Medical Tribune, 2012
 - 29) 奥野清隆、杉浦史哲: 大腸がんに対するペプチドワクチン療法、中村祐輔監修、がんペプチドワクチン療法、旬報社（東京）p.66-81, 2012
 - 30) 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 大腸癌（改訂第4版）、杉原健一 編、医薬ジャーナル社（大阪）、p.8-11, 2012
 - 31) 杉浦史哲、井上啓介、奥野清隆、助川寧：「進行再発大腸癌に対するUFT/LV併用ペプチドワクチンカクテル療法の臨床試験」癌と化学療法39(12): 1760-1762, 2012
 - 32) 奥野清隆：がんペプチドワクチン療法の開発状況」日本外科系連合学会誌37(5): 1068-1069, 2012
 - 33) 奥野清隆、杉浦史哲、助川寧、井上啓介：「【固形がんの免疫・抗体療法-基礎研究の進歩と臨床応用-】 基礎研究の進歩と展望

- 免疫療法(免疫細胞療法) 免疫療法薬の開発と動向」日本臨床70(12): 2075-2086, 2012
- 34) 奥野清隆、中居卓也、北口博士、山崎満夫、杉浦史哲、井上啓介：「【大腸癌肝転移の治療戦略】大腸癌肝転移に対する腫瘍免疫療法」消化器外科35(9): 1415-1422, 2012
- 35) 奥野清隆：「【消化器がんにおけるがんワクチン療法】大腸がんにおけるがんワクチン療法」G.I.Research 20(2): 128-133, 2012
- 36) 石飛真人、菰池佳史、稲治英生：「【乳癌(第2版)-基礎と臨床の最新研究動向-】乳癌の治療戦略 外科治療 乳癌局所再発に対する手術治療(手術適応)」増刊日本臨床 7: 519-23、日本臨床社, 2012
- 37) 山下啓子：ホルモン療法 新臨床腫瘍学 がん薬物療法専門医のために 改定第3版 日本臨床腫瘍学会編、南江堂 p264-270, 2012
- 38) 山下啓子、遠山竜也、岩瀬弘敬、小林俊三：「内分泌療法の変遷と展望. 乳癌 (第2版) -基礎と臨床の最新研究動向- 日本臨床 70 増刊号7: 29-34, 2012
- 39) 山下啓子、遠山竜也、吉本信保、遠藤友美：エストロゲンレセプター陽性乳癌におけるmicroRNAの役割に関する研究 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 29:289-292, 2012
2. 学会発表
- 1) 西村孝司：革新的がんワクチンとしての Helper/killer hybrid epitope long peptide (H/K-HELP) 第16回日本がん免疫学会 札幌 2012年7月
- 2) 大竹淳矢、大野陽介、合田彩佳、末竹幸広、富樫裕二、北村秀光、西村孝司：革新的ロングペプチド (H/K-HELP) は従来型ショートペプチドに比べ効率的にヒト癌特異的Tc1,Th1を誘導できる 第16回日本がん免疫学会 札幌 2012年7月
- 3) 北村秀光、大竹淳也、大野陽介、合田彩佳、末竹幸広、富樫裕二、西村孝司：革新的ロングペプチド (H/K-HELP) を用いた次世代型がんワクチン・細胞治療法の開発 第16回日本がん免疫学会 札幌 2012年7月
- 4) Hidemitsu Kitamura, Junya Ohtake, Norihiko Takahashi, Yosuke Ohno, Kiichiroh Nakano, Satoru Todo, Satoshi Fukuda, Kiyotaka Okuno, Yoshiki Tokura, Sadamu Homma, Shigeo Koido, Yuji Togashi, and Takashi Nishimura : A phase I clinical study of H/K-HELP cancer vaccine for patients with advanced cancer expressing MAGE-A4 or Survivin 「進行がん患者に対するMAGE-A4あるいはsurvivinを標的としたH/K-HELPがんワクチン第I相臨床試験」第71回日本癌学会学術総会 札幌 2012年9月
- 5) Junya Ohtake, Yosuke Ohno, Kiichiroh Nakano, Kazue Watanabe, Yuji Togashi, Hidemitsu Kitamura, and Takashi Nishimura : H/K-HELP is superior to classical short peptide for inducing human tumor antigen-specific Th1 and Tc1 cells 「ヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチド (H/K-HELP) はショートペプチドに比べて優れたがん抗原特異的Th1,Tc1細胞誘導能を示す」 第71回日本癌学会学術総会 札幌 2012年9月
- 6) Takashi Nishimura : 革新的次世代がんワクチン、Helper/killer-hybrid epitope long peptide(H/K-HELP)の開発 第71回日本癌学会学術総会 札幌 2012年9月
- 7) 西村孝司 : Helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP) as an innovative cancer vaccine Lloyd J Old Memorial Symposium 札幌 2012年9月
- 8) KITAMURA Hidemitsu, OHTAKE Junya, TAKAHASHI Norihiko, OHNO Yosuke, NAKANO Kiichiroh, TODO Satoru, FUKUDA Satoshi, OKUNO Kiyotaka, TOKURA Yoshiki, HOMMA Sadamu, KOIDO Shigeo, TOGASHI Yuji, and NISHIMURA Takashi : Helper/killer hybrid epitope long peptide (H/K-HELP) effectively induces tumor antigen-specific CD4⁺T and CD8⁺T cells in cancer patients 第41回日本免疫学会総会・学術集会 神戸 2012年12月
- 9) 奥野清隆：がんペプチドワクチン療法の現状と展望 第1回南大阪がん診療連絡会、大阪南医療センター 2012年4月
- 10) 奥野清隆：増えている大腸がん -がん検診で早期発見を- 大阪狭山市がん撲滅運動 大阪狭山 2012年9月
- 11) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川寧、大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：がんワクチンの新規工夫 ヘルパー/キラーハイブリッド型ロングペプチド(H/K HELP)によるTh1型免疫誘導と臨床効果、第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会 倉敷 2012年12月
- 12) 菰池佳史、中原早紀、石飛真人、元村和由、小山博記、稲治英生：センチネルリンパ節

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 生検導入前後の乳癌腋窩再発の現状と予後
第 112 回日本外科学会定期学術総会 千葉
2012 年 4 月 | 1. 特許取得
特になし |
| 13) <u>菰池佳史</u> ：再発乳癌 115 例の化学療法治療
効果の後ろ向き解析 — 効率的な薬剤選択
を目指して— 第 20 回日本乳癌学会学術総
会 熊本 2012 年 6 月 | 2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし |

H. 知的財産権の出願・登録状況

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
研究分担者 佐藤 崇之 北海道大学遺伝子病制御研究所 特任助教

研究要旨：

Survivinがん抗原を標的とする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伴い、前年度までに各施設の倫理審査委員会で承認されたエントリー基準となるSurvivinがん抗原の解析について同意取得の得られた大腸癌25例、乳癌2例に対して行った。

その結果、これまで解析を行った全27例の腫瘍組織についてSurvivin抗原の発現を認めた。また所定の適格基準をすべて満たし、Survivin-H/K-HELPワクチンの投与を実際に行った大腸癌20例のうち、16例についてSurvivin抗原特異的な免疫応答を評価したところ、ワクチン投与後、15例において抗原特異的な抗体価の上昇およびT細胞応答を認めた。乳癌については1例中1例において、抗腫瘍免疫応答が確認された。

また、多施設における対象患者検体を使用し、Survivin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・セントラル化を行った。さらに担当医師と連携し、抗腫瘍効果と抗腫瘍免疫応答との検証を行うとともに、ハイブリッドロングペプチドワクチン治療前後の被験者検体を使用した、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)を探索する付随研究も開始した。

次年度、引き続き本ペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果の判定結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を同定することで、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発に繋ぐことが可能と考えられる。

A. 研究目的

昨年度までに整備し、参画する各施設の倫理審査委員会で承認されたヘルパー／キラーハイブリッドロングペプチド(H/K-HELP)ワクチンを用いたがんペプチドワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験の実施に伴い、実際に被験者検体を使用し、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Survivinがん抗原発現解析、がん抗原特異的抗体価およびT細胞応答評価法の標準化および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Survivin抗原特異的免疫応答との相関を明らかとするために、被験者の腫瘍組織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Survivin-H/K-HELPワクチン治療による抗腫瘍効果と抗原特異的免疫応答の相関について精査するとともに、治療効果を予見できるバイオマーカーを同定することで、最終的に、より精度・効果の高い革新的次世代型のがんワクチン治療の開発に繋ぐことを目指す。

B. 研究方法

1. ペプチドワクチン被験者腫瘍組織検体を用いた Survivin がん抗原の解析

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試験において、同意を得た被験者の Survivin がん抗原の発現を確認する。

昨年度までに整備し、参画施設の各倫理審査委員会にて承認された標準化 Survivin がん抗原解析法に従い、本試験にエントリーした大腸癌あるいは乳癌患者のがん組織標本スライドを用いて、加熱処理による賦活化、ブロッキングの後、抗 Survivin 抗体を使用して抗原発現の解析を行う。また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。

腫瘍組織における Survivin 抗原の発現レベル、細胞内での局在について、前述の標準化免疫染色法により解析し、がん抗原の発現・局在とワクチン治療による抗腫瘍免疫応答の誘導効果や抗腫瘍効果に関する検討を行う。

2. ワクチン治療患者検体を用いた Survivin 抗原特異的免疫応答の解析

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を使用して、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、昨年度までに整備した標準化免疫モニタリング法により解析・評価する。

抗 Survivin 抗体価の解析では、ワクチン治療の際に提供される血清検体を使用して、まずはじめに ELISA 法により、抗原ペプチド特異的トータル IgG 値を測定する。この際に、健常人検体を使用して得たベースラインとの比較検討も行う。ワクチン投与後、抗体価の上昇が認められた各症例における抗 Survivin-IgG 抗体の各サブクラス (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) も評価する。さらに産生誘導された抗体の力価について、サンプルを段階希釈して検討を行う。

Survivin 抗原特異的 T 細胞応答について、まず初めにフローサイトメトリーにより被験者血液検体より得られる PBMC 中の免疫担当細胞の数的、機能的動態について解析を行う。また PBMC あるいは非付着性細胞を 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 ELISPOT 法により解析を行う。これらの解析結果を検証し、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。

Survivin-H/K-HELP ワクチン投与による抗原特異的 T 細胞応答性について、前述の Survivin がん抗原の発現・局在と比較検討するとともに、担当医師と連携して抗腫瘍効果に関する検討も行う。

3. 抗腫瘍免疫応答に関与するバイオマーカーの探索・同定に向けた解析

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、血清、および末梢血リンパ球を用いて、高い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。

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性について検討を行う。

(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にエントリーした大腸癌 25 例、乳癌 2 例について適格基準の一つとなる Survivin がん抗原発現の解析を行った。その結果、解析を実施した全 27 例について、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。ここで、提供された腫瘍組織におけるがん細胞の細胞質および核内での 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。また、関連病院より紹介のあった症例については、各医院ごとに組織標本の作成法に違いが認められ、一部の解析では抗体染色によるバックグラウンドが高いものが散見された。

本試験にエントリーした大腸癌患者の一部の症例について、病理組織検体よりトータル RNA を抽出し、逆転写により 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 および精巢由来 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、本試験にエントリーした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検体サンプルで、Survivin の遺伝子レベルでの発現も認められた。

Survivin-H/K-HELP 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おいて、被験者の血清検体を用いた ELISA 法による抗 Survivin 抗体価の解析を実施した。

前年度までの研究で得た基準値(ベースライン)を参照し、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した。その結果、Survivin-H/K-HELP ワクチンの投与を行った大腸癌20例のうち、これまで16例(北大13例、近畿大:3例)について評価したところ、ワクチン投与後、15例において抗原特異的な抗体価の上昇を認めた。

また抗体価の上昇の認められた15症例について、IgGの各種サブクラス、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4を解析したところ、15例中9例でIgG1あるいはIgG3が産生誘導されていることも確

認した。さらにSurvivin-H/K-HELPを構成する天然型のペプチド、Survivin-2B₉₉₋₁₁₇(Su18)およびSurvivin-2B₁₂₄₋₁₃₅(Su22)を固相に用いて、抗体の反応領域を同定したところ、Survivin-H/K-HELP ワクチン投与後、Su18領域に反応する抗体がより誘導されていたことが分かった。

T細胞応答性について被験者の血液検体より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動態、機能性について前年度までに標準化したフローサイトメトリー、ELISA法およびELISPOT法による解析を行った。PBMC由来の非付着性細胞および付着性細胞から誘導した樹状細胞を用い、Survivin-H/K-HELP存在下で、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、これまでCD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞について、抗原ペプチド特異的IFN- γ の産生が、大腸癌16例中12例について、また乳癌1例中1例にて確認された。さらに12例中4例でCD8陽性T細胞からの抗原特異的IFN- γ 産生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。

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、血清、および末梢血リンパ球を使用し、血清IL-6などのサイトカイン、免疫担当細胞の表面マーカーや腫瘍組織における他のがん抗原など諸因子(バイオマーカー)の解析を開始した。

また被験者の診療情報および臨床効果と前述の抗腫瘍免疫応答を効率よく誘導するための鍵となるようなバイオマーカーとの関係について担当医師と連携して検討を行った。

D. 考察

本研究において、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞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伴い、実際

に被験者の腫瘍組織のSurvivinがん抗原の評価、抗原特異的な抗体価およびT細胞応答の解析が進められたことから、本プロジェクトの実施体制が整備できたと考えられる。

ここで、外部関連病院からの紹介症例における免疫染色法によるSurvivin抗原解析時に生じたバックグラウンドの違いについては、今後、事前に標本スライド作成法等および留意点など予め周知する必要があると考えている。また、腫瘍組織から遺伝子を抽出し、定量PCR法によるSurvivin抗原の遺伝子発現レベルの評価については、標本の作成時の条件、保存状態や、組織中のがん細胞の割合やネクロシスといった腫瘍そのものの状態も詳細に検討し、遺伝子発現レベルを評価する必要があると思われる。

さらにSurvivinがん抗原の腫瘍組織におけるがん細胞内の局在を検証したところ、被験者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。これまで、複数の研究グループによりSurvivinがん抗原の細胞内局在とがん患者の生命予後に関する報告がなされている。従って、本研究で明らかになったSurvivin抗原のがん細胞内での局在の違いと、Survivin-H/K-HELPワクチン治療による抗原特異的な免疫応答の惹起や臨床効果との相関を詳細に検討することにより、抗腫瘍効果を予見する新たな知見を得る可能性が考えられた。

本Survivin抗原解析に関する研究成果から、今後、腫瘍組織のがん細胞におけるSurvivin抗原の発現および局在に加え、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、乳癌のがん種や進行度・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、Survivin-H/K-HELP ワクチン治療前後の血清サンプルを用いて、Survivin 抗原特異的な抗体価の解析を実施した。その結果、先行したH/K-HELP ワクチンを用いた第I相試験の研究成果と同様に、ワクチン投与後、極めて早期に、Survivin 抗体価の上昇が認められた。また、誘導されたIgGのサブクラスを解析したところ、Th1依存的な補体結合性の強いIgG1やIgG3が産生誘導されていることが明らかとなった。本臨床試験において、Th1細胞を基軸とした抗原特異的な免疫応答が、実際にがん患者生体内に誘導できたものと考えら

れる。

さらにSurvivin-H/K-HELP ワクチン投与後に産生誘導された抗体の反応領域を調べたところ、天然型のアミノ酸配列であるSurvivin-2B₉₉₋₁₁₇を認識していた。従って、ワクチンペプチドのみならず、実際にがん患者生体内におけるSurvivin抗原に対しても免疫応答が成立する可能性を示唆するものと考えている。今後、抗体のサブクラスのプロファイリングや抗体の力価を精査し、抗腫瘍効果との相関に関する検討を重ねる予定である。

Survivin抗原特異的なT細胞の応答性について被験者の血液検体より回収したPBMC由来の非付着性細胞および付着性細胞から誘導した樹状細胞を用いて検討した。その結果、これまでCD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞について、抗原ペプチド特異的なIFN- γ の産生が、大腸癌16例中12例について、また乳癌1例中1例にて確認された。さらに12例中4例でCD8陽性T細胞からの抗原特異的なIFN- γ 産生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。従って、本結果により実際にSurvivin-H/K-HELPワクチン投与により、がん患者生体内にがん抗原特異的なTh1細胞およびTc1細胞が誘導されることが証明された。この結果は、前述のTh1依存的な抗体であるIgG1およびIgG3の産生が誘導された結果とも一致する。

今回、Survivin特異的なTc1、キラーT細胞が誘導された症例のHLAクラスIの型を精査したところ、これまでにSurvivin抗原のクラスIエピートープのHLAとして報告されていたHLA-A24以外の患者も存在したことから、Survivin-H/K-HELPには未知のクラスI拘束性エピートープが存在していたことを示唆する。このことからハイブリッドロングペプチドワクチンが数多くの患者に幅広く適応するのみならず、様々なエピートープを持つ抗腫瘍キラーT細胞を誘導し得ることが期待される。今後、被験者生体内に誘導された抗原特異的なヘルパーT細胞、キラーT細胞のエピートープ、およびそれらのHLA拘束性を同定することにより、更なる適応の拡大が望めるものと考えている。

本研究において、実際に多施設共同による被験者の適格基準、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な抗体価、T細胞応答評価、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

胞応答性について検証した。その結果、Survivin がん抗原の解析、抗原特異的抗体価の評価については、十分実施可能であることを確認した。T 細胞応答性に関する反応性についても反応性を確認しているが、引き続き、その反応条件を精査する予定である。

本ペプチドワクチン治療試験に付随して、実際に被験者の血清サイトカインレベル、PBMC 中の免疫担当細胞群の細胞表面マーカー、腫瘍組織の各種がん抗原の解析なども実施可能であることが分かった。また各施設の医師・研究者と連携し、本治療試験の全ての完遂症例について抗腫瘍免疫応答の有無あるいは惹起の程度でグループ分けするとともに、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうな因子(バイオマーカー)を探索・同定する付随研究を開始した。今後、大腸癌および乳癌 20 例の完遂により、抗腫瘍効果に関する中間評価を実施するが、その際に抗腫瘍効果と相関する新規バイオマーカーを同定することで、より効果の高い患者の選定が可能になると考えている。

今年度、ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン第 II 相臨床試験が実施され、実際に免疫モニタリングおよび付随バイオマーカー研究も開始したことから、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、次年度の研究計画に基づき、引き続きワクチン治療を遂行し、症例数の集積と抗腫瘍効果の判定を実施するとともに、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同定することで、より効果の高い革新的次世代がんワクチン開発に繋ぐことが期待できる。

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、Survivin-H/K-HELP ワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的の第 II 相臨床試験の実施に伴い、エントリー基準となる Survivin がん抗原解析法、評価項目となる免疫モニタリングを行った。実際にエントリーした患者について Survivin 抗原の評価がなされ、ワクチン治療前後において、Survivin 抗原特異的抗体価の上昇や T 細胞応答の解析・評価がなされたことから、ワクチン治療および免疫モニタリングの実施体制は整ったといえる。

ま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

疫を効率よく惹起するための鍵となるバイオマーカー研究を開始した。

今後、本研究を推進し、ハイブリッドロングペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果および抗腫瘍免疫応答性を検証するとともに、治療効果を予見し得るバイオマーカーを同定することにより、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) Watanabe K, Toji S, Ohtake J, Nakano K, Satoh T, Kitamura H, Nishimura T: Establishment of a stable T lymphoma cell line transduced with HLA-A*24:02-restricted WT1-specific TCR genes and its application to antigen-specific immunomonitoring. *Biomed Res.* 34(1): 41-50, 2013
- 2) 大竹淳矢、増子和尚、角田健太郎、富樫裕二、北村秀光、西村孝司:「革新的がんワクチン、H/K-HELP の開発 ショートペプチドからヘルパー/キラーロングペプチドへの移行」*医学のあゆみ* 244(9): 767-778, 2013
- 3) 西村孝司、脇田大功、富樫裕二、北村秀光: 革新的次世代癌ワクチン, helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP) の開発 基盤研究から臨床研究、そしてまた基盤研究へ臨床免疫・アレルギー科 57(5): 543-555, 2012

2. 学会発表

- 1) 北村秀光、大竹淳矢、大野陽介、合田彩佳、末竹幸広、富樫裕二、西村孝司: 革新的ロングペプチド (H/K-HELP) を用いた次世代型がんワクチン・細胞治療法の開発 第 16 回日本がん免疫学会 札幌 2012 年 7 月
- 2) 大竹淳矢、大野陽介、合田彩佳、末竹幸広、富樫裕二、北村秀光、西村孝司: 革新的ロングペプチド (H/K-HELP) は従来型ショートペプチドに比べ効率的にヒト癌特異的 Tc1, Th1 を誘導できる 第 16 回日本がん免疫学会 札幌 2012 年 7 月
- 3) Hidemitsu Kitamura, Junya Ohtake, Norihiko Takahashi, Yosuke Ohno, Kiichiroh Nakano, Satoru Todo, Satoshi Fukuda, Kiyotaka Okuno, Yoshiki Tokura, Sadamu Homma, Shigeo Koido, Yuji Togashi, and Takashi Nishimura: A phase I clinical study of H/K-HELP cancer vaccine for patients with advanced cancer expressing MAGE-A4 or S

urvivin「進行がん患者に対するMAGE-A4
あるいはsurvivinを標的としたH/K-HELPが
んワクチン第I相臨床試験」第71回日本癌
学会学術総会 札幌 2012年9月

- 4) Junya Ohtake, Yosuke Ohno, Kiichiroh Na
kano, Kazue Watanabe, Yuji Togashi, Hide
mitsu Kitamura, and Takashi Nishimura : H/
K-HELP is superior to classical short pepti
de for inducing human tumor antigen-specif
ic Th1 and Tc1 cells「ヘルパー/キラーハ
イブリッドロングペプチド (H/K-HELP)
はショートペプチドに比べて優れたがん
抗原特異的Th1,Tc1細胞誘導能を示す」第7
1回日本癌学会学術総会 札幌 2012年9
月
- 5) KITAMURA Hidemitsu, OHTAKE Junya,
TAKAHASHI Norihiko, OHNO Yosuke, N
AKANO Kiichiroh, TODO Satoru, FUKUD
A Satoshi, OKUNO Kiyotaka, TOKURA Y
oshiki, HOMMA Sadamu, KOIDO Shigeo,
TOGASHI Yuji, and NISHIMURA Takash

i : Helper/killer hybrid epitope long peptide
(H/K-HELP) effectively induces tumor antig
en-specific CD4⁺T and CD8⁺T cells in can
cer patients 第41回日本免疫学会総会・学術
集会 神戸 2012年12月

- 6) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川寧、
大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：がんワク
チンの新規工夫 ヘルパー/キラーハイブリ
ッド型ロングペプチド(H/K HELP)によるT
h1型免疫誘導と臨床効果、第25回日本バイ
オセラピー学会学術集会総会 倉敷 2012年
12月

G. 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

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 武富 紹信 北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野I 教授

研究要旨

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)を用いた革新的がんワクチン治療法の開発を目指し、探索的第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)35例を対象にSurvivin-H/K-HELPを含むがんワクチン試験薬を腫瘍近傍皮下に反復投与し、最良総合効果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する。また副次目的として安全性の再確認、抗腫瘍免疫応答の評価を行うとともに、抗腫瘍効果と免疫応答性との相関を確認する。

前年度までに整備した試験計画について各施設での倫理審査委員会承認後、大腸癌患者のエントリーを開始した。平成24年度末までに、25例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、20例に対してH/K-HELPワクチン投与を行った。共同研究施設と連携し、実際に被験者の免疫モニタリングを開始し、ワクチン投与後、がん抗原特異的な抗体価の上昇およびT細胞応答を認めている。また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、血液検体を使用し、抗腫瘍免疫応答および治療効果と関連するバイオマーカーの探索を開始した。

最終的に、本治療試験において抗腫瘍効果を判定し、抗腫瘍免疫応答および臨床効果を予見し得るバイオマーカーを同定することで、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

本プロジェクトでは、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞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の開発を目指している。

本臨床試験において、Survivin抗原を発現する大腸癌患者に対して、Survivin-H/K-HELPワクチンを腫瘍組織の近傍皮下に反復投与した後、CT画像診断によりRECIST規準で最良総合効果を判定し、がんワクチン治療の有効性を評価する。またワクチンの投与による有害事象の確認、Survivin特異的免疫応答性の評価、および抗腫瘍効果と免疫応答性との相関を検証する。さらに本臨床試験に伴い、全ての完遂症例について、抗原特異的免疫応答あるいは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標的分子を探索するバイオマ

ーカー研究も実施する。

最終的に、本ペプチドワクチンの臨床効果を判定するとともに、抗腫瘍効果と関連する抗腫瘍免疫応答の精査と治療効果を予見し得るバイオマーカーを同定することで、より精度・効果の高いがんワクチン治療法の開発に繋ぐ。

B. 研究方法

前年度までに整備し、各施設の倫理審査委員会にて承認された研究計画に基づき、進行・再発大腸癌を対象に、Survivin-H/K-HELPを用いたがんワクチン治療の探索的第II相臨床試験を北海道大学遺伝子病制御研究所と連携して行なう。

本臨床試験において、同意の得られた被験者に対し、Survivinがん抗原、HLAタイプなど所定の適格基準を確認した後、Survivin-H/K-HELP(1mg)、ピシバニール(OK-432:0.02KE)、モンタナイド

(Montanide™ ISA51VG オイルアジュバント)の混和物を試験薬とし、腫瘍近傍皮下に2週間隔で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。

今回の臨床試験では、まず治療期間1におけるワクチン4回投与後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週間隔で4回腫瘍近傍皮下に投与する。治療期間2の終了時点で再度、腫瘍効果と抗原特異的免疫応答を解析し、適格と判定されれば、4週間隔で4回腫瘍近傍皮下に投与する。

本臨床試験の実施中に重篤な副作用(有害事象)を示した場合、効果・安全性評価委員会の審議により本試験の中止か継続の判断を行なう。

Survivin-H/K-HELPワクチン試験薬の投与による抗腫瘍効果について、RECIST基準で最良総合効果による病勢コントロール率(CR+PR+SD)を評価する。

さらに本臨床試験における付随研究として、被験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を使用し、抗腫瘍免疫応答に関係するバイオマーカーの解析を実施する。

(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。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臨床試験研究事務局を置き、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システムを組んでいる。

C. 研究結果

平成24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第II相臨床試験を北海道大学遺伝子病制御研究所と連携して行った。今年度末までに、大腸癌25例のエントリーがあり、内所定の適格基準を満たした、20例に対してSurvivin-H/K-HELPワクチン投与を行った。治療途中の症例を含め、1回ワクチン投与例4名、2回投与例3名、4回投与例11名、7回投与例1名、9回投与例1名を得た。

これまでに、ワクチン治療した4症例について、治療の過程において、原病の増悪による入院の措置による本試験からの離脱が3例、一時中断し、軽快後に治療再開が1例あったが、効果・安全性評価委員会および当該施設の倫理審査委員会による審議により、本試験全体の継続が承認された。

またSurvivin-H/K-HELPワクチンの投与により、直ちに試験全体を中止する必要があるCTCAEv4.0においてグレード3以上の非血液学的毒性もしくはグレード4の血液学的毒性などの重篤な有害事象の発生は認められなかった。

本試験において、Survivin-H/K-HELPワクチン投与と因果関係が「明確に」あるいは「ありそうな」有害事象として、ワクチン投与後、注射部位反応、皮膚硬結、そう痒症、倦怠感、あるいは疲労が散見された。

これまでワクチン投与部位に皮膚応答が認められていた被験者1例について、5回目のワクチン投与前に実施した皮内テストによる予備投与検査により、基準を超える発赤・硬結が認められた。本症例は所定の基準を満たさず、本試験より離脱した。その他、本試験のプロトコル逸脱により1名、被験者の意思により1名離脱した。

Survivin-H/K-HELPワクチン治療を実施した、各被験者の免疫モニタリングを行った。実際にワクチン投与後、大腸癌16例について抗腫瘍免疫応答を評価したところ、15例においてSurvivin抗原特異的な抗体価の上昇、および投与ペプチド特異的にIFN- γ を産生するTh1あるいはTc1細胞応答を認めた。

ペプチドワクチン臨床試験の付随研究とし