

201239007A

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 24 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 25 年 (2013 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)	
(資料) 治験の概要	

II. 分担研究報告書

鳥越 俊彦 (札幌医科大学)	11
平田 公一 (札幌医科大学)	15
今井 浩三 (東京大学)	17
釣田 義一郎 (東京大学)	19
瀬谷 司・松本 美佐子 (北海道大学)	21
杉田 修 (北海道大学)	24

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

	37
--	----

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(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24年度は、SVN-2Bペプチドの医師主導治験(第1相試験)を実施し、OR7C1ペプチドに関しては臨床試験に向けた安全性試験を実施した。

分担研究としては、(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ペプチドの前期第2相試験を開始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)
水口 徹 (札幌医科大学・准教授)
今井 浩三 (東京大学・教授)
釣田 義一郎 (東京大学・講師)
瀬谷 司 (北海道大学・教授)
松本 美佐子 (北海道大学・准教授)
杉田 修 (北海道大学・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)

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。さらにこれらをごがん治療ワクチンへ応用し、平成14年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。

H24年度に実施するSVN-2Bペプチドワクチン第1相試験の目的は、進行消化器がん患者を対象としてSVN-2B単独投与時の安全性を評価することであり、副次的に有効性として

免疫学的評価、腫瘍縮小効果を評価する。

B. 研究方法

本研究組織では次に挙げる(1)～(4)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・水口・杉田、今井・釣田)
H23年度に治験実施体制の整備と各種 SOP(student operating procedure)作成、治験開始準備を実施した。本年度は第1相試験を実施する。

H23年度実施項目

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(student operating procedure)の作成

H24年度実施項目

1. PMDA 治験前相談(6/26)
2. IRB 審査(7/18)
3. 治験届け提出(7/20)
4. 患者登録受付開始(8/30)
5. 製薬企業との連携会議(10/31, 12/4)
6. PMDA 薬事戦略事前面談(12/12)
7. 効果安全性評価委員会(3/25)

SVN-2B 第1相試験の治験概要

別添資料(治験の概要)を参照。

- (1)治験課題名:有効な治療法のない進行消化器がん患者に対する SVN-2B 単独投与の第 I 相臨床試験
- (2)主要評価項目:安全性
 - ①有害事象
 - ②臨床検査値、バイタルサイン、ほか
- (3)副次評価項目:
 - ①免疫学的効果:テトラマー, ELISPOT
 - ②腫瘍縮小効果:RECISTによる
- (4)治験薬投与方法
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。1回投与量は、登録後にランダム割付け。
 - ①0.3mg 群:SVN-2B 0.3mg/body/2週
 - ②1.0mg 群:SVN-2B 1.0mg/body/2週
 - ③3.0mg 群:SVN-2B 3.0mg/body/2週各群とも4回投与。
- (5)試験方法
単施設非盲検無作為化比較試験
- (6)対象患者と目標症例数
HLA-A*2402を有する進行消化器がん、胆肝膵臓がん患者
安全性かつ免疫学的評価可能例数として

計15例(1群5例、計3群)

(7)症例登録期間

第1版:H24.8.30よりH25.3.31

第2版:H25.9.30まで延長

- (2) OR7C1 ペプチドワクチンの臨床試験準備(鳥越・廣橋・今井・釣田)
H23年度に引き続き、臨床試験の準備を以下の手順で実施する。

1. 薬理薬効試験
2. 前臨床安全性試験
3. 抗原発現評価系の構築

- (3) ペプチドワクチンのサロゲートマーカーおよび効果予測マーカー探索解析(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、組織染色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とワクチン効果を予測できる免疫指標を探索する。

- (4) 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、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・水口・杉田、今井・釣田)

1. PMDA 治験前対面助言(6/26)
相談事項1:投与量設定の妥当性
相談事項2:症例数設定の妥当性
相談事項3:治験プロトコルについて
2. 札幌医大 IRB 審査(7/18)

3. 治験届け提出(7/20)
4. 第1相試験開始(8/30)
H24. 8. 30より患者登録を開始。H25. 4. 24現在、20例が登録され、原病悪化による中止例5例、終了11例、試験継続中4例。

患者登録状況と評価結果(H25. 4. 25時点)

番号	癌種	割付	状況	画像評価
101	膵がん	0.3mg	終了	PD
108	胃がん	1.0mg	終了	SD
109	大腸がん	0.3mg	終了	PD
117	膵がん	1.0mg	終了	SD
119	大腸がん	1.0mg	終了	PD
121	膵がん	0.3mg	終了	PR
123	膵がん	3.0mg	終了	SD
125	膵がん	3.0mg	終了	PD
127	膵がん	3.0mg	終了	SD
130	膵がん	3.0mg	終了	SD
132	大腸がん	1.0mg	終了	PD
133	膵がん	0.3mg	継続中	
135	膵がん	0.3mg	継続中	
136	膵がん	3.0mg	継続中	
138	大腸がん	1.0mg	継続中	

①安全性評価(H25. 4. 25時点)

登録20例中、本薬剤と因果関係を示すGrade 3以上の重篤な有害事象は1例も認めず、Grade 2以下の有害事象(発熱、投与局所硬結)を3例に認めるにとどまる。

②有効性評価(H25. 4. 25時点)

11例中、腫瘍マーカーは2例で半減し、RECISTによる画像評価ではPR 1例、SD 5例、PD 5例であった。テトラマー解析では8例にCTLの誘導が認められた。

H25.5.30に最終症例(15症例目,#138)の評価を終え、本治験を完遂できる見込みである。

5. 製薬企業との連携会議(10/31, 12/4)

後期第2相試験以後は製薬会社による企業治験に移行すべく、国内製薬メーカー(東レ)との連携会議を実施。第2相試験に向けてプロトコル案を策定した。第2相試験では、IFN-βを併用する計画とした。

6. PMDA 薬事戦略事前相談(12/12)

第2相試験に向けて事前相談を実施。

- ①相談事項1:SVN-2BとIFN-βとの併用の妥当性
- ②相談事項2:IFN-βを皮下投与することの妥当性
- ③相談事項3. 前期第II相試験の試験デザインについて
- ④相談事項4. 治験計画届書について

7. 効果安全性評価委員会(3/25)

- ①第I相試験の進捗状況
- ②有害事象報告
- ③有用性中間報告
- ④総括

(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)

1. 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を誘導した。

2. 安全性(毒性)試験

OR7C1-A24ペプチドをマウスに皮下投与し、反復毒性試験と局所刺激性試験を実施。毒性が認められないことを確認した。

3. 抗原発現評価系の確立

抗OR7C1抗体を用いて大腸がん組織を免疫染色し、抗原蛋白の発現を検出することに成功。抗原発現評価系を樹立した。引き続き、単クローン抗体の樹立を試みている。

(3) ペプチドワクチンのサロゲートマーカーおよび効果予測マーカー探索解析(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がん組織の免疫染色解析結果を分析し、ワクチン投与前のがん組織におけるHLA class I発現が陰性の症例は、ワクチンによる腫瘍縮小効果が期待できないことが示された。ホルマリン固定組織のHLA class I発現を染色する標準キットおよび染色プロトコルを作成。染色結果の評価方法の標準化を実施した。

(4) 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、安全かつ有効性の高いアジュバントを探索した。炎症を惹起することなく最も効果的にType Iインターフェロンを誘導できる分子構造を同定し、動物モデルを用いて安全性の評価を実施している。

D. 考察

本年度、SVN-2Bペプチドワクチンの医師主導治験(第1相試験)を開始し、年度末までに目標症例全15症例の登録を完了することができた。5月末までに全症例の評価を完了できる見込みである。

これまでの結果からは、安全性に関しては問題なく、全例でGrade 2以上の治験薬関連の有害事象は認められていない。有用

性評価に関しては、評価を完了した11症例中6例(55%)でPRまたはSD、5例でPDという結果となり、期待以上の腫瘍抑制効果が認められている。免疫学的効果に関しても、11例中8例でテトラマー陽性CTLの割合が上昇した。CTL上昇効果が最も高い群の投与量を指摘投与量として、第2相試験で採用する予定である。第2相試験では、IFN- β の皮下投与を併用した試験を実施する計画を立てている。

第2相試験実施に向けた今後の予定は以下の通り。

7月末：PMDA薬事戦略本相談を実施

8月中：IRB審査と治験届け提出

9月中：第2相試験を開始予定

速やかに製薬企業主導の後期第2相試験に橋渡しできるように、治療群・対照群の設定と症例数を工夫する必要がある。

OR7C1-A24ペプチドに関しては、次年度に進行大腸がん患者を対象に、自主臨床研究を開始する予定。その準備として、腫瘍組織におけるOR7C1蛋白の発現評価系が確立できた。また、毒性試験において安全性が確認された。

ペプチドワクチンの効果予測に有用なマーカーとして、腫瘍組織のHLA class I免疫染色法が有用であることが示唆され、昨年度同定されたワクチン前のテトラマー陽性CTL頻度と合わせて、効果予測マーカーとしての有用性評価を第2相試験において実施する必要がある。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。

効果的にCTLを誘導す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

本年度、着実に医師主導治験(第1相試験)を遂行し、5月末には完了見込みとなった。H25年度には可及的速やかに第2相試験を開始する予定である。第1相試験の結果をふまえ、効果的な第2相試験のデザインを考える必要がある。また、企業主導治験に橋渡しをするためにも、製薬企業との連携が今後ますます重要となる。

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. Kutomi G, Tamura Y, Tanaka T, Kajiwara T, Kukita K, Ohmura T, Shima H, Takamaru T, Satomi F, Suzuki Y, Torigoe T, Sato N, Hirata

K. Human Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1- α (hERO1- α) is a Novel Predictor for Poor Prognosis of Breast Cancer. *Cancer Sci.* 2013 Apr 11. doi: 10.1111/cas.12177. [Epub ahead of print]

2. Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens.* 2013 Apr 11. doi: 10.1111/tan.12113. [Epub ahead of print]
3. Nishida, S., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Inoue, R. Kitamura, H., Tanaka, T., Takahashi, A., Asanima, H., Masumori, N., Tsukamoto, T. and Sato N. Prostate cancer stem-like cells/cancer-initiating cells have an autocrine system of hepatocyte growth factor. *Cancer Sci*, 104:431-436, 2013 Selected paper in "In this issue" of the Journal
4. Kiriyama, K., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Kubo, T., Tamura, Y., Kanaseki, T., Takahashi, A., Nakazawa, E., Saka, E., Ragnarsson, C., Natatsugawa, M., Inoda, S., Asanima, H., Takasu, H., Hasegawa, T., Yasoshima, T., Hirata, K., Sato, N. Expression and function of FERMT genes in colon carcinoma cells. *Anticancer Res.* 33:167-173, 2013
5. Kitamura, H., Torigoe, T., Hirohashi, Y., Asanima, H., Inoue, R., Nishida, S., Tanaka, T., Masumori, M., Sato, N and Tsukamoto, T. Nuclear, but not cytoplasmic, localization of survivin as a negative prognostic factor for survival in upper urinary tract urothelial carcinoma *Virchows Arch* 462:101-107, 2013
6. Kameshima H, Tsuruma T, Kutomi G, Shima H, Iwayama Y, Kimura Y, Imamura M, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sato N, Hirata K. Immunotherapeutic benefit of α -interferon (IFN α) in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients *Cancer Sci* 104:124-129, 2013.
7. Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kanaseki T, Asanima H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T, Sato N. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. *Exp. Mol. Pathol.* 94:322-327, 2013.
8. Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Asanima H, Inoue R, Nishida S, Tanaka T, Fukuta F, Masumori N, Sato N, Tsukamoto T. Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper

- urinary tract. *Mod Pathol.* 26:117-124, 2013
9. Ara S, Kikuchi T, Matsumiya H, Kojima T, Kubo T, Ye RC, Sato A, Kon S, Honma T, Asakura K, Hasegawa T, Himi T, Sato N, Ichimiya S. Sorting nexin 5 of a new diagnostic marker of papillary thyroid carcinoma regulates Caspase-2. *Cancer science* 103: 1356-1362, 2012.
 10. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine* 10: 205, 2012.
 11. Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Morita R, Kochin V, Sato N. Cytotoxic T lymphocytes: Sniping cancer stem cells. *Oncoimmunology* 1: 123-125, 2012.
 12. Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K. N-propionyl-4-S-cysteamylphenol induces apoptosis in B16F1 cells and mediates tumor-specific T-cell immune responses in a mouse melanoma model. *Journal of dermatological science* 67: 51-60, 2012.
 13. Kawaguchi S, Tsukahara T, Ida K, Kimura S, Murase M, Kano M, Emori M, Nagoya S, Kaya M, Torigoe T, Ueda E, Takahashi A, Ishii T, Tatezaki S, Toguchida J, Tsuchiya H, Osanai T, Sugita T, Sugiura H, Ieguchi M, Ihara K, Hamada K, Kakizaki H, Morii T, Yasuda T, Tanizawa T, Ogose A, Yabe H, Yamashita T, Sato N, Wada T. SYT-SSX breakpoint peptide vaccines in patients with synovial sarcoma: a study from the Japanese Musculoskeletal Oncology Group. *Cancer science* 103: 1625-1630, 2012.
 14. Kukita K, Tamura Y, Oku-ya K, Saito K, Kutomi G, Sato N, Hirata K. [Human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-like alpha regulates immune response of cancer cells via modulation of major histocompatibility complex class I expression and oxidation]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy* 39: 1800-1802, 2012.
 15. Matsuki K, Tanabe A, Hongo A, Sugawara F, Sakaguchi K, Takahashi N, Sato N, Sahara H. Anti-angiogenesis effect of 3'-sulfoquinovosyl-1'-monoacylglycerol via upregulation of thrombospondin 1. *Cancer science* 103: 1546-1552, 2012.
 16. Matsuzaki J, Torigoe T, Hirohashi Y, Kamiguchi K, Tamura Y, Tsukahara T, Kubo T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Yasuda K, Takahashi S, Sato N. ECRG4 is a negative regulator of caspase-8-mediated apoptosis in human T-leukemia cells. *Carcinogenesis* 33: 996-1003, 2012.
 17. Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, Fujino J, Asanuma H, Tamura Y, Nakamori K, Hasegawa T, Hiratsuka H, Sato N. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathology international* 62: 684-689, 2012.
 18. Mizuuchi M, Hirohashi Y, Torigoe T, Kuroda T, Yasuda K, Shimizu Y, Saito T, Sato N. Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses. *Experimental and molecular pathology* 92: 185-190, 2012.
 19. Mori T, Nishizawa S, Hirohashi Y, Torigoe T, Tamura Y, Takahashi A, Kochin V, Fujii R, Kondo T, Greene MI, Hara I, Sato N. Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population. *Experimental and molecular pathology* 92: 27-32, 2012.
 20. Morita R, Hirohashi Y, Sato N. Depletion of Tregs in vivo: a promising approach to enhance antitumor immunity without autoimmunity. *Immunotherapy* 4: 1103-1105, 2012.
 21. Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Kitamura H, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Gene expression profiles of prostate cancer stem cells isolated by aldehyde dehydrogenase activity assay. *The Journal of urology* 188: 294-299, 2012.
 22. Nishizawa S, Hirohashi Y, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Mori T, Kanaseki T, Kamiguchi K, Asanuma H, Morita R, Sokolovskaya A, Matsuzaki J, Yamada R, Fujii R, Kampinga HH, Kondo T, Hasegawa T, Hara I, Sato N. HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer research* 72: 2844-2854, 2012.

23. Takahashi A, Torigoe T, Tamura Y, Kanaseki T, Tsukahara T, Sasaki Y, Kameshima H, Tsuruma T, Hirata K, Tokino T, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock enhances the expression of cytotoxic granule proteins and augments the activities of tumor-associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell stress & chaperones* 17: 757-763, 2012.
24. Tamura Y, Saito K, Sato N. [Heat shock protein inhibitor for molecular targeting therapy]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 70 Suppl 8: 135-139, 2012.
25. Tamura Y, Torigoe T, Kukita K, Saito K, Okuya K, Kutomi G, Hirata K, Sato N. Heat-shock proteins as endogenous ligands building a bridge between innate and adaptive immunity. *Immunotherapy* 4: 841-852, 2012.
26. Tamura Y, Torigoe T, Kutomi G, Hirata K, Sato N. New paradigm for intrinsic function of heat shock proteins as endogenous ligands in inflammation and innate immunity. *Current molecular medicine* 12: 1198-1206, 2012.
27. Torigoe T, Asanuma H, Nakazawa E, Tamura Y, Hirohashi Y, Yamamoto E, Kanaseki T, Hasegawa T, Sato N. Establishment of a monoclonal anti-pan HLA class I antibody suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue: unusually high frequency of down-regulation in breast cancer tissues. *Pathology international* 62: 303-308, 2012.
28. Tsukahara T, Takasawa A, Murata M, Okumura K, Nakayama M, Sato N, Hasegawa T. NK/T-cell lymphoma of bilateral adrenal glands in a patient with pyothorax. *Diagnostic pathology* 7: 114, 2012.

2.学会発表

1. 佐藤昇志:期待されるがん免疫治療の現在と未来、第20回日本癌学会市民公開講座、札幌、9月22日、2012年。
2. 佐藤昇志:がん免疫系のパラダイムシフトと口腔外科臨床、第50回NPO法人日本口腔科学会、第38回(社)日本口腔外科学会北日本地方会特別講演、札幌、6月23日、2012年。
3. 佐藤昇志:『期待される「免疫によるがん治療」の現状と展望』、日本医師会生涯教育講座、函館消化器病懇談会特別講演、函館、5月18日、2012年。
4. 佐藤昇志:がん治療・予防のパラダイムシフトに向かって—免疫を中心に、第26回札幌冬季がんセミナー、札幌、2月11日、2012年。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 特願 2012/189224、田村保明、久木田和晴、

廣橋良彦、鳥越俊彦、佐藤昇志、癌の検出方法、診断薬および診断キット並びに癌治療用医薬組成物、北海道公立大学法人札幌医科大学、2012年8月28日。

2. PCT/JP2012/002958、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、2012年5月1日。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

治験の概要

項目	内容
治験薬名	SVN-2B
治験課題名	有効な治療法のない進行消化器がん患者に対する SVN-2B 単独投与の第 I 相臨床試験
治験概要・目的	本治験は、進行消化器がん患者を対象として SVN-2B 単独投与時の安全性を検討する。副次的に有効性として免疫学的評価、腫瘍縮小効果を検討する。
主要評価項目	安全性 ① 有害事象 ② 臨床検査値、バイタルサイン、体重、12誘導心電図
副次評価項目	1) 免疫学的効果 ① SVN-2Bペプチド特異的CTL数（テトラマー解析） ② SVN-2Bペプチド特異的CTL活性（ELISPOT解析） 2) 腫瘍縮小効果 治療開始前と4回目終了後の身体診察と画像診断による病巣の評価
選択基準	(1) 組織学的に消化器がんと確定診断された患者。 (2) がん細胞にサバイビン蛋白質の発現が確認された患者。 (3) 以下1)かつ2)、または1)かつ3)のいずれかに該当する患者。 1) 根治手術が不可能である（遠隔転移例、再発例等）患者。 2) 標準化学療法が確立されていない場合の初回投与例の患者。 3) 標準化学療法不応例、不耐容例の患者。 (4) 前観察期のCTまたはMRIで測定可能評価病変がある患者。 (5) HLA遺伝子型がHLA-A*2402である患者。 (6) $\text{Log}_{10}(1 + \text{CTL}_{\text{pre}})$ が1.6以下の患者 CTL _{pre} : 前観察期におけるSVN-2Bペプチド特異的CTL数（テトラマー解析における10,000個のCD8陽性T細胞に対するSVN-2Bテトラマー陽性CTL数） (7) Eastern Cooperative Oncology Group（ECOG）Performance Statusが0または1の患者。 (8) 登録前30日以内に重篤な臓器不全がないことが確認された患者（好中球 $\geq 1,500/\mu\text{L}$ 、ヘモグロビン値 $\geq 8.0 \text{ g/dL}$ 、血小板数 $\geq 75 \times 10^3/\mu\text{L}$ 、血清クレアチニン値 \leq 正常上限値の1.5倍、血清総ビリルビン値 \leq 正常上限値、AST、ALT \leq 正常上限値の2倍）。 (9) 同意取得時の年齢が20～85歳の患者。 (10) 本治験内容について十分な説明を受け、本人の文書による同意が得られている患者。
除外基準	(1) 抗生物質または抗ウイルス剤等の全身投与を要する感染症を合併している患者。 (2) 登録前90日以内のHIV抗体検査、HBs抗原検査またはHCV抗体検査のいずれかで陽性の患者。 (3) NYHA分類ⅢまたはⅣの心疾患、登録180日以内の心筋梗塞の既往、治療を要する不整脈、活動性の狭心症、または重度の閉塞性肺疾患を有するなど、本治験治療に支障を来す疾患を有する患者 (4) コントロール不能な糖尿病または高血圧の患者。 (5) ドレナージが必要な胸水、心嚢水または腹水を有する患者（登録時点においてドレーン抜去後14日間以上経過しており、増悪がないと判断された患者は許容する）。

	<p>(6) 症状を伴う脳転移を有する患者。</p> <p>(7) 生命予後に影響を及ぼすような他の疾患に罹患している患者。</p> <p>(8) 経過の評価ができない患者。</p> <p>(9) 過去にSVN-2Bの投与を受けた患者。</p> <p>(10) 登録時に以下のいずれかの前治療または処置を行い、治療または処置の終了時から以下の期間が経過していない患者。</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 80%;">1) 手術療法、放射線療法</td> <td style="text-align: right;">28日間</td> </tr> <tr> <td>2) 化学療法(分子標的薬を含む)</td> <td style="text-align: right;">21日間</td> </tr> <tr> <td>3) ニトロソウレア、MMC</td> <td style="text-align: right;">42日間</td> </tr> <tr> <td>4) 内分泌療法、免疫療法 (BRM療法を含む)</td> <td style="text-align: right;">14日間</td> </tr> <tr> <td>5) 輸血、造血因子製剤</td> <td style="text-align: right;">14日間</td> </tr> <tr> <td>6) 免疫抑制剤</td> <td style="text-align: right;">28日間</td> </tr> <tr> <td>7) 他の治験薬、未承認薬</td> <td style="text-align: right;">28日間</td> </tr> </table> <p>(11) ステロイド剤の投与（経口、静注）を必要としている患者。ただし、治療に伴う急性アレルギー症状の処置用に投与した場合を除く。</p> <p>(12) 前治療で発現した副作用が、CTCAE ver.4.03に規定する重症度Grade2以上で持続している患者。</p> <p>(13) 過去に重大な薬物アレルギーの既往がある患者。</p> <p>(14) 妊娠している、もしくは授乳中である患者。治験期間中に被験者本人およびパートナーの妊娠を希望する患者。効果の高い避妊法を行えない患者。</p> <p>(15) その他、治験責任医師または治験分担医師が不適切と判定した患者。</p>	1) 手術療法、放射線療法	28日間	2) 化学療法(分子標的薬を含む)	21日間	3) ニトロソウレア、MMC	42日間	4) 内分泌療法、免疫療法 (BRM療法を含む)	14日間	5) 輸血、造血因子製剤	14日間	6) 免疫抑制剤	28日間	7) 他の治験薬、未承認薬	28日間
1) 手術療法、放射線療法	28日間														
2) 化学療法(分子標的薬を含む)	21日間														
3) ニトロソウレア、MMC	42日間														
4) 内分泌療法、免疫療法 (BRM療法を含む)	14日間														
5) 輸血、造血因子製剤	14日間														
6) 免疫抑制剤	28日間														
7) 他の治験薬、未承認薬	28日間														
<p>治験薬、投与量・投与方法</p>	<p>(1) 治験薬</p> <p>SVN-2B注1mg：1バイアル中に生理食塩水1mLあたり1.0mgのSVN-2Bを含有する注射剤</p> <p>SVN-2B注3mg：1バイアル中に生理食塩水1mLあたり3.0mgのSVN-2Bを含有する注射剤</p> <p>(2) 投与量および投与方法</p> <p>1) SVN-2Bの1回投与量は、登録後に割付けられた投与量(0.3、1.0、3.0mg/body)に基づき決定される。</p> <p style="margin-left: 40px;">0.3mg 群：SVN-2B 0.3mg / body / 2 週 (4 回投与)</p> <p style="margin-left: 40px;">1.0mg 群：SVN-2B 1.0mg / body / 2 週 (4 回投与)</p> <p style="margin-left: 40px;">3.0mg 群：SVN-2B 3.0mg / body / 2 週 (4 回投与)</p> <p>2) 本剤 1 mL と乳化用の添加剤 (Montanide ISA 51 VG) 1mL を混合して乳化調整した投与用薬液 2 mL を 2 カ所 (1 カ所 1 mL、計 2 mL) に分けて原則 14 日ごとに皮下投与する。ただし、0.3mg 群の場合には、SVN-2B 注 1mg 製剤 0.3mL と生理食塩水 0.7mL の割合に調整して使用する。</p> <p style="margin-left: 40px;">投与部位は限定しないが、可能な限り評価病変の所属リンパ節近傍の皮下とする。ただし、発赤や硬結の副作用が懸念されるため、前回までの投与部位反応が残存している部位を避け、患者の日常生活の妨げにならない部位を選択する</p> <p>(3) 投与期間</p> <p style="margin-left: 40px;">中止基準に該当するまで投与を継続することができる。</p>														
<p>投与開始基準</p>	<p>(1) 初回投与開始基準</p> <p style="margin-left: 40px;">「選択基準」をすべて満たし、「除外基準」のいずれにも抵触しないことを確認する。</p> <p>(2) 2回目以降の投与開始基準</p>														

	<p>2回目以降の投与開始に際しては、投与前に以下の基準をすべて満たすことを確認する。</p> <p>前回投与日から30日以内に投与できなかった場合は本剤の投与を中止する。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 好中球数 1,000 /μL以上 2) 血小板数 75×10^3 /μL以上 3) 非血液毒性 Grade1以下 (皮膚毒性の場合はGrade2以下) <p>ただし、Grade2以上の非血液毒性のうち治験責任医師および治験分担医師が医学的見地から投与継続可能と判断した事象については次投与を開始できるものとする。</p> <p>(3) 投与量の減量基準 同一被験者内では、治験薬の投与量を減量しない。</p> <p>(4) 投与量の増量基準 同一被験者内では、治験薬の投与量を増量しない。</p>
併用禁止薬剤・療法	<ol style="list-style-type: none"> (1) 抗悪性腫瘍治療 <ol style="list-style-type: none"> 1) 化学療法 (分子標的薬を含む) 2) 放射線療法 3) 内分泌療法 4) 免疫療法 (BRM療法を含む) 5) 温熱療法 6) 手術療法 7) その他 (2) 有害事象発現防止を目的とした予防的投与 (輸血、血液製剤など。発現が認められた有害事象に対する再発防止のための予防的投与は許容する) (3) 長期的なステロイドの投与 (頓用を除く全身投与) (4) 免疫抑制剤の全身投与 (5) G-CSF 製剤 (6) 他の治験薬、未承認薬
各被験者の治験期間	<p>各被験者の治験期間は、同意取得日から最終観察終了日までとする。ただし、他治療が施行される場合、転院等の理由により安全性の観察・調査が困難になった場合および被験者が中止を希望した場合は、その該当日の当日を最終観察終了日とする。</p>
中止基準	<p>被験者が以下のいずれかに該当する場合、治験責任医師または治験分担医師は当該被験者に対するその後の投与を中止する</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 被験者が中止を希望した場合 (2) 対象から除外すべき事項が登録後に判明した場合 (3) 明らかな病勢の進行が確認された場合 (4) 治験の継続が困難であると判断される有害事象の発現が認められた場合 (5) 前回投与日から30日以内に投与ができなかった場合 (6) その他、治験責任医師または治験分担医師が投与の継続を不相当と認めた場合。
被験者の追加	<p>SVN-2Bの投与を4回完了せず、免疫学的評価不能例が認められた場合等、新たな被験者を追加することがある。治験責任医師は被験者の追加等を行う際、必要に応じて効果安全性評価委員会の意見を求める。</p>
試験方法	<p>単施設非盲検無作為化比較試験</p>

目標症例数	安全性かつ免疫学的評価可能例数として計 15 例（1 群 5 例、計 3 群）
治験実施期間	2012 年 8 月～2013 年 9 月
実施医療機関	〒 060-8543 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目 TEL : 011-611-2111（内線 : 3281） FAX : 011-613-1678 札幌医科大学附属病院 第 1 外科
治験責任医師 （自ら治験を実施する者）	札幌医科大学附属病院 第 1 外科 准教授 水口 徹
治験薬製造者	〒 060-8543 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目 TEL : 011-611-2111（内線 : 3281） FAX : 011-613-1678 札幌医科大学附属病院 第 1 外科 准教授 水口 徹
治験調整事務局	〒060-8556 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目 TEL : 011-611-2111（内線 : 2690） FAX : 011-643-2310 札幌医科大学 病理学第一講座 准教授 鳥越 俊彦
効果安全性評価 委員会	〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1 TEL : 03-3443-8111 FAX : 03-5449-5930 東京大学医科学研究所附属病院 内科 病院長 今井 浩三
登録事務局	〒 060-0815 北海道札幌市北区北 15 条西 6 丁目 TEL : 011-706-7478 FAX : 011-706-6050 北海道大学 探索医療教育研究センター （北海道臨床開発機構）

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・松本 美佐子（北海道大学）

杉田 修（北海道大学）

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(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 鳥越 俊彦 札幌医科大学 准教授

研究要旨

- (1) SVN-2B 第 1 相臨床試験において、患者末梢血を用いた免疫モニタリングと腫瘍組織における Survivin および HLA class I 分子の発現評価を実施した。
- (2) がん幹細胞特異抗原 OR7C1 の発現評価系を確立し、ヒトがん組織における OR7C1 抗原発現の病理解析を実施した。また、がん患者末梢血から OR7C1 特異的 CTL を誘導し、大腸がん幹細胞を標的とした細胞障害活性の評価を実施した。
- (3) 新規サロゲートマーカーおよび効果予測マーカーの探索を実施中である。

A. 研究目的

テトラマー解析によるペプチド特異的 CTL の頻度は、最もよくワクチンの腫瘍抑制効果と相関するサロゲートマーカーである。そのため SVN-2B ワクチン第 1 相試験においては、ペプチド投与量の異なる 3 群にランダム割付し、テトラマー陽性 CTL の増加効果が最も大きく、かつ安全性の高い投与量を、至適投与量として決定する。本研究ではペプチドワクチン投与前と投与後の末梢血リンパ球を用いてテトラマー解析および ELISPOT 解析を実施し、ワクチンの免疫学的効果を検証することを目的とする。また、腫瘍組織における HLA class I 抗原の発現およびワクチン標的抗原分子の発現レベルは、ワクチンの臨床効果を予測する指標となり得る。本研究ではホルマリン固定がん組織標本の免疫染色によって、Survivin, OR7C1, HLA class I の各抗原発現を評価し、効果予測マーカーとしての有用性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

(1) SVN-2B 臨床試験免疫モニタリング

SVN-2B 第 1 相臨床試験において、ワクチン投与前と 4 回目投与から 2 週間後の末梢血を採取し、リンパ球を分離して -80°C に凍結保存。解析直前に凍結検体を解凍し、SVN-2B ペプチドおよび IL-2 存在下で 1 週間培養後、テトラマー解析と ELISPOT 解析を実施した。

(2) 腫瘍組織における Survivin, HLA class I

抗原発現解析

臨床試験に登録された患者のがん組織における HLA class I 分子と Survivin 抗原の発現レベルを、免疫組織染色法によって解析した。

(3) 腫瘍組織におけるがん幹細胞特異抗原発現解析

がん組織における OR7C1 抗原の発現レベルを免疫染色によって評価した。

(4) 新規免疫マーカーの探索

患者のがん組織に浸潤している CD8 陽性 T 細胞数と FoxP3 陽性制御性 T 細胞数を免疫組織染色によって評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は大学の IRB 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 臨床試験免疫モニタリング

SVN-2B 第 1 相試験において、0.3mg 投与群、1.0mg 投与群、3.0mg 投与群の各群に 5 例ずつの患者がランダムに割り付けられ、ワクチン投与前と投与後のテトラマー陽性 T 細胞の頻度を比較した(表 1)。現時点で解析が終了している 10 症例の結果では、10 以上の上昇を示した 3 症例はいずれも 1.0mg 投与群であった。また、テトラマー陽性 T 細胞の増加が全く認められなかった 2 症例

(#109, #125)の患者治療背景を分析したところ、いずれも過去に免疫細胞療法を受けていたことが判明した。

表 1：患者登録状況と免疫解析結果
(H25. 4. 25)

番号	癌種	割付	状況	テトラマー解析値	
				前値	後値
101	膵がん	0.3mg	終了	1	9
108	胃がん	1.0mg	終了	3	10
109	大腸がん	0.3mg	終了	4	0
117	膵がん	1.0mg	終了	0	21
119	大腸がん	1.0mg	終了	0	29
121	膵がん	0.3mg	終了	0	
123	膵がん	3.0mg	終了	0	9
125	膵がん	3.0mg	終了	0	0
127	膵がん	3.0mg	終了	7	16
130	膵がん	3.0mg	終了	11	13
132	大腸がん	1.0mg	終了	0	15
133	膵がん	0.3mg	継続中	4	
135	膵がん	0.3mg	継続中	0	
136	膵がん	3.0mg	継続中	5	
138	大腸がん	1.0mg	継続中	10	

テトラマー解析値は、CD8 陽性 T 細胞 10000 個あたりの SVN-2B テトラマー陽性 T 細胞数を表す。

(2) 腫瘍組織における Survivin, HLA class I 抗原発現解析

ワクチン投与前のがん組織における Survivin 発現レベルと HLA class I 発現レベルを解析した結果、Survivin 陰性の症例は 1 例もなく、HLA class I 抗原は 1 例で陰性であった。今後、腫瘍抑制効果との相関を検討する。また、第 2 相試験においても症例数を増やして解析する。

(3) 腫瘍組織におけるがん幹細胞特異抗原発現解析

市販の OR7C1 抗体を用いて、ホルマリン固定がん組織における抗原の発現を免疫染色によって検出・評価できることが判明した。大腸がんにおける発現解析を実施し、予後との相関性を解析中である。

(4) 新規免疫マーカーの探索

ワクチン投与前のがん組織に浸潤している CD8 陽性 T 細胞数と FoxP3 陽性 T 細胞数を解析中。前者はワクチン感受性の、後者はワクチン抵抗性の予測指標となる可能性があり、今後も分析と評価を継続する。

D. 考察

最終結果は第 1 相試験の終了を待たな

ければならないが、現時点では 1.0mg 投与群で最も免疫効果（ワクチン特異的 T 細胞数の増加率）が高い可能性がある。

免疫効果が認められなかった患者の治療背景を分析した結果、2 症例とも過去に免疫細胞療法を受けた治療歴を持っていた。これがワクチン不応性の原因となっている可能性は否定できない。また、免疫細胞療法に不応性となった同じ原因が、ワクチン不応性にも関与している可能性もある。第 2 相試験においては、患者の治療背景をそろえるために、免疫細胞療法の治療歴のある患者は除外することが望ましいと考えられた。

がん組織における Survivin と HLA class I 抗原の発現を解析した結果、登録に至らなかった症例を含めて全症例で Survivin は陽性であり、効果予測指標とはなり得ないことは明らかである。しかし、HLA class I に関しては陰性症例が 1 例見出されたため、第 2 相試験においても発現解析を継続する必要があると思われた。

がん幹細胞特異抗原 OR7C1 の発現を免疫染色によって検出できるようになり、OR7C1-A24 ペプチドワクチンの臨床試験に向けて準備が整った。次年度には第 1 相試験を開始したい。

E. 結論

第 1 相試験の免疫モニタリングを実施して、最も免疫効果の高いペプチド投与量を決定できる見通しが立った。また、患者の治療背景が免疫効果に影響する可能性が示唆された。これらの知見を第 2 相試験のプロトコルに反映させることが重要である。また、より感度の高いサロゲートマーカーや効果予測マーカーの探索を継続することも重要な課題である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kiriyama K, Hirohashi Y, Torigoe T, Kubo T, Tamura Y, Kanaseki T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Ragnarsson C, Nakatsugawa M, Inoda S, Asanuma H, Takasu H, Hasegawa T, Yasoshima T, Hirata K, Sato N. Expression and function of FERMT genes in colon carcinoma cells. *Anticancer research* 33: 167-173, 2013.
2. Kameshima H, Tsuruma T, Kutomi G, Shima H, Iwayama Y, Kimura Y, Imamura M, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sato N, Hirata K. Immunotherapeutic benefit of alpha-interferon (IFNalpha) in survivin2B-derived peptide

- vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer science* 104: 124-129, 2013.
3. Kitamura H, [Torigoe T](#), Hirohashi Y, Asanuma H, Inoue R, Nishida S, Tanaka T, Fukuta F, Masumori N, Sato N, Tsukamoto T. Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Modern pathology* 26: 117-124, 2013.
 4. Kitamura H, [Torigoe T](#), Hirohashi Y, Asanuma H, Inoue R, Nishida S, Tanaka T, Masumori N, Sato N, Tsukamoto T. Nuclear, but not cytoplasmic, localization of survivin as a negative prognostic factor for survival in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Virchows Archiv* 462: 101-107, 2013.
 5. Yasuda K, Hirohashi Y, [Torigoe T](#). [Breast cancer stem cells]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 70 Suppl 7: 76-83, 2012.
 6. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, [Torigoe T](#), Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine* 10: 205, 2012.
 7. Tamura Y, [Torigoe T](#), Kukita K, Saito K, Okuya K, Kutomi G, Hirata K, Sato N. Heat-shock proteins as endogenous ligands building a bridge between innate and adaptive immunity. *Immunotherapy* 4: 841-852, 2012.
 8. Mizuuchi M, Hirohashi Y, [Torigoe T](#), Kuroda T, Yasuda K, Shimizu Y, Saito T, Sato N. Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses. *Experimental and molecular pathology* 92: 185-190, 2012.
 9. Mori T, Nishizawa S, Hirohashi Y, [Torigoe T](#), Tamura Y, Takahashi A, Kochin V, Fujii R, Kondo T, Greene MI, Hara I, Sato N. Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population. *Experimental and molecular pathology* 92: 27-32, 2012.
 10. Hirohashi Y, [Torigoe T](#), Inoda S, Morita R, Kochin V, Sato N. Cytotoxic T lymphocytes: Sniping cancer stem cells. *Oncoimmunology* 1: 123-125, 2012.
 11. Nishida S, Hirohashi Y, [Torigoe T](#), Kitamura H, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Gene expression profiles of prostate cancer stem cells isolated by aldehyde dehydrogenase activity assay. *The Journal of urology* 188: 294-299, 2012.
 12. Nishizawa S, Hirohashi Y, [Torigoe T](#), Takahashi A, Tamura Y, Mori T, Kanaseki T, Kamiguchi K, Asanuma H, Morita R, Sokolovskaya A, Matsuzaki J, Yamada R, Fujii R, Kampinga HH, Kondo T, Hasegawa T, Hara I, Sato N. HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer research* 72: 2844-2854, 2012.
 13. Matsuzaki J, [Torigoe T](#), Hirohashi Y, Kamiguchi K, Tamura Y, Tsukahara T, Kubo T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Yasuda K, Takahashi S, Sato N. ECRG4 is a negative regulator of caspase-8-mediated apoptosis in human T-leukemia cells. *Carcinogenesis* 33: 996-1003, 2012.
 14. [Torigoe T](#), Asanuma H, Nakazawa E, Tamura Y, Hirohashi Y, Yamamoto E, Kanaseki T, Hasegawa T, Sato N. Establishment of a monoclonal anti-pan HLA class I antibody suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue: unusually high frequency of down-regulation in breast cancer tissues. *Pathology international* 62: 303-308, 2012.
 15. Takahashi A, [Torigoe T](#), Tamura Y, Kanaseki T, Tsukahara T, Sasaki Y, Kameshima H, Tsuruma T, Hirata K, Tokino T, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock enhances the expression of cytotoxic granule proteins and augments the activities of tumor-associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell stress & chaperones* 17: 757-763, 2012.
 16. Tamura Y, [Torigoe T](#), Kutomi G, Hirata K, Sato N. New paradigm for intrinsic function of heat shock proteins as endogenous ligands in inflammation and innate immunity. *Current molecular medicine* 12: 1198-1206, 2012.
 17. Michifuri Y, Hirohashi Y, [Torigoe T](#), Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, Fujino J, Asanuma H, Tamura Y, Nakamori K, Hasegawa T, Hiratsuka H, Sato N. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathology international* 62: 684-689, 2012.

18. Kawaguchi S, Tsukahara T, Ida K, Kimura S, Murase M, Kano M, Emori M, Nagoya S, Kaya M, Torigoe T, Ueda E, Takahashi A, Ishii T, Tatzaki S, Toguchida J, Tsuchiya H, Osanai T, Sugita T, Sugiura H, Ieguchi M, Ihara K, Hamada K, Kakizaki H, Morii T, Yasuda T, Tanizawa T, Ogose A, Yabe H, Yamashita T, Sato N, Wada T. SYT-SSX breakpoint peptide vaccines in patients with synovial sarcoma: a study from the Japanese Musculoskeletal Oncology Group. Cancer science 103: 1625-1630, 2012.

2.学会発表（国際会議・シンポジウム）

1. Toshihiko Torigoe, Yoshihiko Hirohashi, Noriyuki Sato. Immunopathological properties of cancer stem cells and application to immunotherapy. The International Symposium in UNIST (IVRC & C5) : Recent Trends in in vivo Reseach. Ulsan, Korea, Jan. 15, 2013
2. Toshihiko Torigoe, Kazuyo Yasuda, Yoshihiko Hirohashi, Noriyuki Sato. Constitutive expression and activation of stress-responsive genes is the Achilles' tendon of cancer stem cells. The 6th International Symposium on Stress Proteins in Biology and Medicine. Alexandria, VA, USA. Nov. 3-7, 2012
3. 鳥越俊彦: Immunopathological properties of cancer stem cells and application to cancer immunotherapy、第71回日本癌学会学術総会 JCA- AACR Joint Symposium、札幌、9月20日、2012年。
4. Toshihiko Torigoe, Kazuyo Yasuda, Yoshihiko Hirohashi, Noriyuki Sato. Stress response genes are molecular targets of cancer stem cells. The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology (ICHO2012). Kyoto, Japan. Aug 28-31, 2012
5. 鳥越俊彦: ヒト癌幹細胞特異的発現分子の免疫病理学と免疫応答、第101回日本病理学会総会シンポジウム、東京、4月26日、2012年。
6. Toshihiko Torigoe, Yoshihiko Hirohashi, Reina Morita, Satoshi Nishizawa, Kazuyo Yasuda, Akari Takahashi, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato. immune responses against cancer stem cell-specific tumor antigens and tumor microenvironment. The 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Chicago, IL, USA. March 31-April 4, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 特願 2012/189224、田村保明、久木田和晴、廣橋良彦、鳥越俊彦、佐藤昇志、癌の検出方法、診断薬および診断キット並びに癌治療用

医薬組成物、北海道公立大学法人札幌医科大学、2012年8月28日。

2. PCT/JP2012/002958、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、2012年5月1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 (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バイピンを標的とする SVN-2B ペプチドワクチン第 I 相臨床試験の臨床データをもとに、(1) 安全性として有害事象、バイタルサインの評価 (2) ワクチンの効果を予測する免疫学的評価、(3) 画像検査による腫瘍縮小効果について分析した。その結果、

(1) SVN-2B ワクチンには Grade 3 以上の副作用は認められず、副作用の発現に用量依存性はない。安全性に関しては問題のないことが明らかとなった。

(2) 免疫学的評価ではテトラマー解析にて、一部の症例でワクチン前後の上昇率が著明に見られ、SVN-2B 特異的 CTL の誘導が示唆された。

(3) 腫瘍縮小効果に関しては、rapid growth な癌腫である膵がんにおいても増大を抑制し、一定の clinical benefit が見られた。

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

非臨床試験の結果から安全性に問題はないことが明瞭となった本剤は、新たな作用機序を有し全身性の副作用が少ない治療薬として開発が期待される。SVN-2B ペプチドワクチンの先行する臨床研究を参考に、本剤の国内外での臨床開発の可能性を総合的に判断して、腫瘍抑制効果を認めた大腸がん膵がんを含む進行消化器がんを対象に、安全性および有効性を検討するため国内での第 I 相臨床試験を計画した。本臨床試験は SVN-2B 単独投与時の安全性を検討する。副次的に有効性として免疫学的評価、腫瘍縮小効果を検討する。

B. 研究方法

本治験は単施設で非盲検にて実施する中央登録方式による無作為化用量比較試験である。0.3mg, 1.0mg, 3.0mg 群それぞれ 5 例、合計 15 例に 2 週間に 1 度、SVN-2B を免疫賦活剤であるモンタナイドと混合して投与を行う。2 週間に 1 度の投与で 4 回実施した後、有害事象の記録を行い、安全性について評価を行う。また、治療効果判定の後、有用性を評価する。

(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, 1mg, 3mg 群いずれも薬剤と因果関係のある Grade 3 以上の副作用を認めなかった。また、副作用には用量依存性が認められなかった。本薬剤と因果関係が示唆される副作用は 3 例に見られているが、いずれも軽微であった。安全性については問題のないものと判断された。

(2) 腫瘍縮小効果については、rapid growth ながん腫である膵がんにおいても増大を抑制し、一定の clinical benefit は得られる傾向にある。また、テトラマー解析法におけるテトラマー上昇率は、一部の症例で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有用性が確認されている。

(3) SVN-2B・モンタナイドに加えて、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ている。

(4) 以上の成果に基づいて、第 II 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問題なく、

有用性の面から本治療法が妥当であることが確認された。また、過去の自主臨床研究からインターフェロン併用によるレジメンがより高い奏効率を示している。今回の第I相試験の結果を含めて奏効を示した膵がんに着目し、対象疾患は有効な治療法のない進行膵がん患者とした。探索的に実臨床での有効性が得られるかを検証するため、第II相試験では、主要評価項目として無増悪生存率を、副次評価項目として免疫学的効果、安全性を設定した。

E. 結論

15症例のSVN-2Bペプチドワクチン第I相試験臨床データを統計学的に分析し、第II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. Kameshima H, Tsuruma T, Kutomi G, Shima H, Iwayama Y, Kimura Y, Imamura M, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sato N, Hirata K: Immunotherapeutic benefit of IFN α in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Sci.* 2013 Jan;104(1):124-9. doi: 10.1111/cas.12046. Epub 2012 Dec 16
2. 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
3. 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