

201239018A

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）

固形がんに対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia / Ib 相医師主導治験

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上田 龍三

平成 25（2013）年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 研究代表者、治験調整委員長（治験名；進行又は再発固形がん患者に対する
モガムリズマブの第 Ia/Ib 相多施設共同医師主導治験）…………… 1
上田龍三（愛知医科大学）

II. 分担研究報告

1. 液性免疫・細胞性免疫モニタリング…………… 9
中山睿一（川崎医療福祉大学）
2. 進行又は再発固形がん患者に対する Mogamulizumab の第 Ia/Ib 相多施設
共同医師主導治験…………… 16
土井俊彦（国立がん研究センター東病院）
3. 抗体療法企画・管理…………… 18
飯田真介（名古屋市立大学）
4. 第 I/II 相臨床治験の実施及び管理…………… 22
土岐祐一郎（大阪大学）
5. 第 I a/ I b 相臨床治験…………… 26
岡三喜男（川崎医科大学）
6. 第 Ib 相治験実施のための体制構築…………… 28
垣見和宏（東京大学）
7. 日本人の悪性黒色腫患者における NY-ESO-1, XAGE など腫瘍抗原の発現と
免疫に関する解析…………… 32
船越建（慶應義塾大学）
8. 臨床治験 抗体療法モニタリング…………… 35
石田高司（名古屋市立大学）
9. 制御性 T 細胞解析…………… 38
西川博嘉（大阪大学）
10. 液性免疫・細胞性免疫モニタリング…………… 42
鵜殿平一郎（岡山大学）
11. 固形がん組織での CCR4 および腫瘍精巢抗原（NY-ESO-1, XAGE-1b）
発現検出の標準化…………… 44
佐藤永一（東京医科大学）

Ⅲ. 別添文書	45
1) 治験計画書	(45)
2) 同意説明書	(111)
3) 簡易版治験参加についてのご説明	(138)
4) 新聞報道 朝日新聞、毎日新聞	(146)
Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表	151
Ⅴ. 研究成果の刊行物・別刷	155

I. 総括研究報告書

固形がんに対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia/Ib 相医師主導治験

研究代表者 上田 龍三 愛知医科大学 教授

研究要旨

ヒト化抗 CCR4(C-C chemokine receptor type 4) モノクローナル抗体、Mogamulizumab (KW-0761)を用いた固形がんに対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia/Ib 相医師主導治験の実施に向け、治験体制の整備、構築、治験計画書の立案、作成を行った。医薬品医療機器総合機構(PMDA)事前面談(H24. 9/13)、対面助言(H24.11/15)、治験計画届(H24.1/25)を経て、各治験施設 IRB 承認を得た後、川崎医科大学での一例目の投薬を皮切りに、第 Ia 相治験を開始した。今期末までに計 3 例に対して投薬を開始し、順調な滑り出しとなった。3 例とも、これまでのところ、有害事象は認められていない。また、3 例とも、投薬後、末梢血において著しいエフェクター型 Treg の減少がみられた。

平行して免疫学的検査項目、病理学的検査項目について検査操作手順の標準化が当該分担研究者らによって進められ、第 Ia 相治験開始までに確定している。

研究分担者

中山 睿一 川崎医療福祉大学医療福祉学部
教授

鶴殿 平一郎 岡山大学大学院医歯薬学総合研
究科免疫学分野 教授

土井 俊彦 国立がん研究センター東病院消化
管内科 副科長

佐藤 永一 東京医科大学臨床病理学 講師

飯田 真介 名古屋市立大学大学院医学研究科
腫瘍・免疫内科学 准教授

A. 研究目的

腫瘍免疫における分子生物学の進展に伴い、腫瘍免疫を応用した、がん免疫治療法の研究開発に期待が集まっている。これまで、腫瘍免疫の活性化、亢進を中心として、研究が進められ、主に、ワクチン療法の臨床試験が世界各国で実施されたが、思わしい結果は得られていない。腫瘍局所で強力な免疫抑制機構が働いていることがその原因と考えられるようになり、最近では、免疫抑制機構の制御に研究の中心が移ってきている。免疫チェックポイントは、感染免疫、腫瘍免疫双方において、免疫抑制機構の主要な役割を果たしていることから、免疫チェックポイントに関わる分子は、がん免疫治療の新たな標的となっている。主要な免疫チェックポイント分子である CTLA-4, PD-1, PD-L1 に対す

土岐 祐一郎 大阪大学大学院医学系研究科外
科学講座・消化器外科学 教授

岡 三喜男 川崎医科大学呼吸器内科学 教授

垣見 和宏 東京大学医学部附属病院免疫細胞
治療学講座 准教授

船越 建 慶應義塾大学医学部皮膚科学 助教

石田 高司 名古屋市立大学大学院医学研究科
腫瘍・免疫内科学 准教授

西川 博嘉 大阪大学・免疫学フロンティア研
究センター実験免疫学 准教授

るモノクローナル抗体、ipilimumab, BS-936558, BS-936559 は、いずれも単剤で、進行がんに対して劇的な治療効果が認められ、益々、この方向でのがん治療研究の重要性が認識されている。

制御性 T 細胞 (Treg) は、免疫チェックポイントと共に重要な免疫制御の一翼を担うことが知られている。Treg は腫瘍局所に多数浸潤していることが、様々ながん種で報告され、腫瘍免疫の抑制に関わっていることが強く示唆されていること、マウスでの実験において、CD25 による Treg 除去により、抗腫瘍免疫効果の亢進が示されていることから、Treg の制御は、免疫チェックポイントの制御と並んでがん治療研究の中心となりつつある。CCR4 は、Treg 上に選択的に発現するケモカインレセプターで、成人 T 細胞白血病 (ATL) 治療薬である、抗 CCR4 モノクローナル抗体、Mogamulizumab (KW-0761) は、ATL 細胞以外に正常 Treg も除去することが明らかにされており、同抗体は、Treg 制御によるがん免疫治療薬として関心が高まっている。以上の経緯を踏まえ、本研究において、進行再発固形がん患者を対象に、Mogamulizumab/KW-0761 の医師主導第 Ia/Ib 相治験を計画、実施する。第 Ia 相では、Mogamulizumab の安全性の確認および薬物動態を検討する。第 Ib 相では、安全性および制御性 T 細胞除去効果を検討し、第 II 相部での推奨投与量を決定することを目的とする。さらに付随研究として、治療経過と免疫動態について検討し、治療効果との関連について明らかにする。

B. 研究方法

1) 治験計画書の作成

治験調整委員会を中心に、治験計画案を作成、PMDA 事前面談、対面助言を経て、治験計画内容を確定する。

2) 試験評価項目の標準化

① Treg 測定

CD4/CD45RA/FoxP3/CD25 4color 染色によるナイーブ型 Treg とエフェクター型 Treg の測定；愛知医科大学教授 上田龍三

エスアールエルメディサーチ社に以下の内容で実施を依頼

・凍結アフレーションバッグ PBMC のポジコンとしての使用可否

愛知医大凍結 PBMC の保存パックから PBMC を分注し、分注後の保存によるデータの変化を測定することで PBMC が精度管理試料として使用できるか確認を行った。

・同時再現性

健康成人 3 名の末梢血をヘパリン管で採血し暗所・室温・24 時間保管した後に 3 重測定を行う。また、同時にセラムチューブに分割した PBSC も 3 重測定を行う。

・保存安定性

健康成人 3 名の末梢血をヘパリン管で採血した後、暗所・室温で保管して、サンプル保存によるデータの影響を確認する。保管時間は採血直後、24 時間、31 時間、48 時間の 4 ポイントとし各ポイントでシングル測定を行う。また、同時にセラムチューブに分割した PBSC も測定を行う。

② 液性免疫応答

NY-ESO-1 及び XAGE1b に対する自己抗体 ELISA；川崎医療福祉大学教授 中山睿一

③ 免疫染色

固形がん組織での CCR4 および腫瘍精巣抗原 (NY-ESO-1, XAGE1b) 発現検出；東京医科大学講師 佐藤栄一

②、③の詳細は分担研究者報告書参照。

3) 第 Ia 相治験

NY-ESO-1 あるいは XAGE1b 抗原陽性かつ CCR4 陰性で、標準治療抵抗性の進行・再発固形がんのうち、肺癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、悪性黒色腫患者を対象に、Mogamulizumab の投与量増量試験を行う。Mogamulizumab を毎週 1 回計 8 回投与し、安全性及び薬物動態の検討から、忍容性の認められる用量を決定する。0.1 mg/kg

投与群 3 例(最大 6 例)から開始し、0.5 mg/kg 投与群 3 例(最大 6 例)、1.0mg/kg 投与群 3 例(最大 6 例)に移行する。安全性は、CTCAE v4.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版に準じて評価する。群間移行は、用量制限毒性の評価対象である第 12 週までのデータにて可能とする。尚、用量制限毒性(DLT)に相当する Grade3 以上の非血液毒性が各群 1 例に見られた場合には、6 例中 2 例までを許容する。また、CCR4 陽性 Treg 細胞除去効果、NY-ESO-1 あるいは XAGE1b に対する免疫応答増強効果についてそれぞれ解析するとともに、有効性についても検討する。

4) 付随研究

治験と並行して、治療と免疫動態との関連について明らかにするため、付随研究として、下記の研究が、分担研究者により実施されている。

- ① 健常者、がん患者における PD-1, Tim-3 の発現解析; 岡山大学教授 鵜殿平一郎
- ② 癌性胸膜炎/腹膜炎による胸水/腹水中の免疫環境の解析; 東大附属病院特任准教授 垣見和宏
- ③ Treg における CCR4 発現解析; 大阪大学特任教授 西川博嘉
- ④ 9000 個の自己抗原に対する蛋白アレイを用いた抗体同定の方法の確立; 大阪大学特任教授 西川博嘉
- ⑤ NY-ESO-1 自己抗体の腫瘍マーカーとしての検討; 大阪大学教授 土岐祐一郎
- ⑥ 抗腫瘍免疫を増強する治療が有効と予測できる因子の探索、及び、黄色人種の悪性黒色腫における主要シグナル伝達経路の活性化の検討と、患者の予後を予測し得るマーカーの探索; 慶応大学助教 船越健
- ⑦ Mogamulizumab 投与 ATL 患者における、Treg 及び特異的免疫の動態解析; 名市大准教授 石田高司

C. 研究結果

1) 治験体制の整備

治験組織の全体像(組織図)を図 1 のようにまとめた後、治験実施病院において各施設CRCとの調整を中心に本治験の受け入れ体制の整備を行った。また、治験を円滑にすすめるため、CRO の選定、条件交渉を行い、契約を締結した。これと、平行して治験評価項目に関連した検査の実施、検

体の運搬について部分的に外部委託することを検討した。SRLメディサーチ社との間で当該契約について交渉し、第Ia開始時までに合意に達した。さらに本治験で用いる医薬品(Mogamulizumab)の入手にあたり、協和発酵キリン株式会社との間でMogamulizumab無償供与に関する、契約を締結した。これらの整備により、今期末からの第Ia相治験の開始を可能とした。

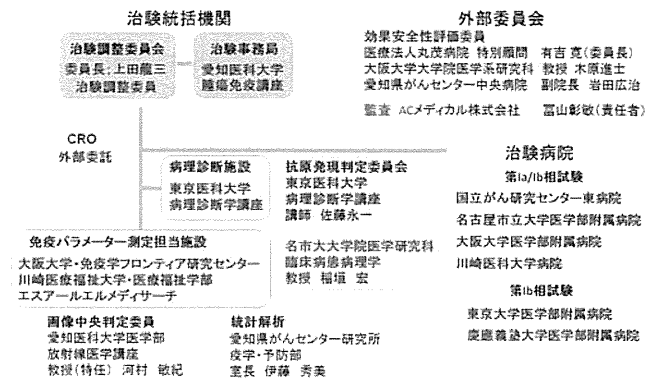


図1 治験組織図

2) 治験計画書の作成

治験調整委員会を中心に治験計画書(案)を作成、医薬品医療機器総合機構(PMDA)との事前面談、対面助言において受けた指摘事項を踏まえ、治験計画書を完成させた(別添;「進行又は再発固形がん患者に対するMogamulizumabの第Ia/Ib相多施設共同医師主導治験」の実施計画書参照)。図2にその要約を示した。

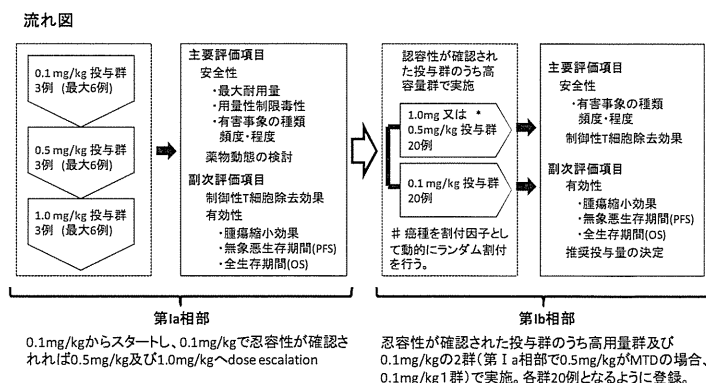


図2 治験計画の概要

併せて、同意説明文書、治験薬概要書、各種手順書を完成させ、上田班班会議(H24.12/17)において各分担研究施設の合意を得た後、治験計画書を提出した(H25.1/25)。また、完成した治験計画書をもとに、各治験施設IRBにて、治験承認申請作

業が行われ、今期3月までにすべての治験施設において、本治験の実施について承認された。尚、治験同意説明書については川崎医療福祉大学医療福祉マネジメント学部 医療福祉デザイン学科の協力を得て、患者向けにわかりやすい、簡易版を作成、冊子としてまとめた(別添；簡易版治験参加についてのご説明)。その内容については、後日、患者、家族からの再評価を受ける予定である。

さらに大学病院医療情報ネットワーク研究センター(UMIN)に登録し(ID;UMIN000010050)、本治験の実施について公表している。米国NIH ClinicalTrial.gov には現在、登録作業中である。

3) 試験評価項目の標準化

① Treg 測定

CD4/CD45RA/FoxP3/CD25 4color 染色による、ナイーブ型 Treg とエフェクター型 Treg の測定；
愛知医科大学教授 上田龍三

愛知医大で保存されているアフレーシスバッグ PBMC(その使用に関しては愛知医大 IRB 承認済)のポジコンとしての使用は可能であることが確認された。また、同時再現性、保存試験においても良好な結果を得た。

② 液性免疫応答

NY-ESO-1 及び XAGE1b に対する自己抗体 ELISA；
川崎医療福祉大学教授 中山睿一

以下の項目についてバリデーションを実施し、測定系の標準化を行った。

1. カットオフ値の決定
2. ノーマライゼーションファクターの算出
3. 日差、検査実施者 による影響の検討
4. 凍結融解、保存期間による影響の検討

③固形がん組織での CCR4 および腫瘍精巢抗原(NY-ESO-1, XAGE1b)発現検出；東京医科大学講師 佐藤栄一

CCR4 については、コンパニオン試薬(ポテリジオテスト IHC)の操作手順で染色を行い、いずれのがん種においても良好な染色像を得ることが確認された。NY-ESO-1, XAGE1b についても染色の至適条件が決定された。

②、③の詳細は分担研究者報告書参照。

3) 第 Ia 相治験

今期末までに川崎医科大学で2例、名古屋市立大学で1例の計3例について投薬(0.1mg/kg)を開始した。いずれの例においても有害事象は確認されず、0.1mg/kg 投与における忍容性が確認された。また、いずれの例においても末梢血中 Treg の明瞭な減少がみられた。

現在、0.5mg/kg 群に移行して1例目の投薬を開始している。

4) 付随研究

各分担研究者の報告参照

D. 考察

治験計画書の作成、各治験施設 IRB の治験承認を経て、今期末までに、3症例について投薬(0.1mg/kg)を開始し、これまでに8回の投与を終了している。いずれも、有害事象を認めることなく、末梢血 Treg の減少が確認されている。Treg は CD4 陽性分画を CD45RA と FoxP3 の二次元に展開し、CD4+CD45RA+FOXP3^{low}Tregs (ナイーブ型)と CD4+CD45RA-FOXP3^{high}Tregs (エフェクター型)として分類されることが報告されている(Miyara et al. Immunity 30:899-911 2009)。これまでの症例では、エフェクター型 Treg の選択的な著減がみられている。これに比べて、ナイーブ型 Treg の減少はほとんどみられていない。大阪大学西川らは、エフェクター型 Treg に CCR4 が高発現することを見出している。また、愛知医大においても、CD4/CD45RA/FoxP3/CCR4 4重染色解析からエフェクター型 Treg に CCR4 が高発現することと併せて、ナイーブ型 Treg には CCR4 の発現がみられないことを確認している(図3)。ことから、今回得られた Mogamulizumab 投与後の Treg 測定データは妥当なものと考えられる。ナイーブ型 Treg の減少がほとんどみられず、エフェクター型 Treg のみを減少させることができることから、一時的に免疫抑制能の低下が起こっても、その回復は早いと思われ、このことが、有害事象がみられていない理由となっているのかもしれない。ただ、ATL 患者では、臨床効果が出た後に、重篤な皮膚障害がみられているの

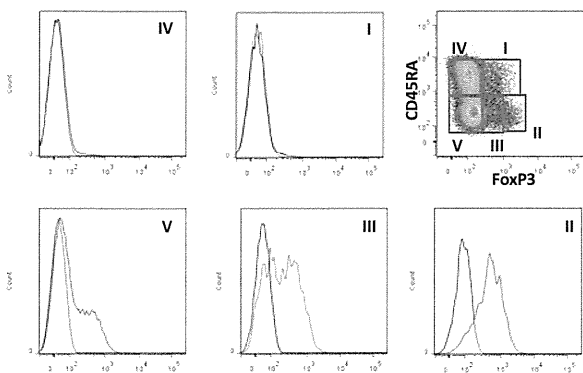


図3 TregにおけるCCR4の発現
I; ナイーブ型Treg, II; エフェクター型Treg
Red line; CCR4, Blue line; isotypic control

で、今後も慎重な観察が必要である。また、これまでのところ腫瘍局所での Treg の測定はまだなされていないが、腫瘍局所ではエフェクター型 Treg の著しい侵潤がみられることを大阪大学 西川らが報告している。腫瘍局所においてもエフェクター型 Treg の著減がみられるかどうか、その結果は興味深い。今後の検討が待たれる。

その他、試験評価項目の標準化、付随研究が各分担研究者により実施された。いずれも、本研究の遂行に重要なデータの蓄積となった。

E. 結論

- 1) 治験計画書を作成、治験届を完了させ、併せて、各治験施設 IRB において、治験承認を得た。
- 2) 第 Ia 相治験を開始し、今期末までに、3 例について投薬を開始した。
- 3) 投薬(0.1mg/kg)した 3 例については 8 回投薬後まで有害事象はみられず、現在、0.5mg/kg 投与群に移行し、1 例目の投薬を開始した
- 4) 投薬(0.1mg/kg)した 3 例については投薬後、エフェクター Treg が著減した。ナイーブ型 Treg の減少はほとんどみられなかった。
- 5) 試験評価項目の標準化を完了した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 関連論文発表

英文

- (1) Sato F, **Ishida T**, Ito A, Mori F, Masaki A, Takino H, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Suzuki S, Komatsu H, Niimi A, **Ueda R**, Inagaki H, **Iida S**. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model. *Leuk Res.* 2013;37:21-7
- (2) **Ishida T**, Ito A, Sato F, Kusumoto S, **Iida S**, Inagaki H, Morita A, Akinaga S, **Ueda R**. Stevens-Johnson Syndrome associated with mogamulizumab treatment of adult T-cell leukemia / lymphoma. *Cancer Sci.* 104, 647-50, 2013
- (3) Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, **Ishida T**, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, Mizokami M, **Ueda R**, Utsunomiya A. Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepatol Res.* 2013 [Epub ahead of print]
- (4) Eikawa, S., Kakimi, K., Isobe, M., Kuzushima, K., Luescher, I., Ohue, Y., Ikeuchi, K., Uenaka, A., **Nishikawa, H.**, **Udono, H.**, Oka, M., and **Nakayama, E.** Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. *Int. J. Cancer*, 132(2):345-54, 2013.
- (5) Fujiwara S, **Wada H**, Kawada J, Kawabata R, Takahashi T, Fujita J, Hirao T, Shibata K, Makari Y, Iijima S, **Nishikawa H**, Jungbluth AA, Nakamura Y, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, **Nakayama E**, Mori M, **Doki Y**. NY-ESO-1 antibody as a novel tumour marker of gastric cancer. *Br J Cancer.* 108(5):1119-25. 2013
- (6) Hirayama M*, **Nishikawa H***, Nagata Y, Tsuji

- T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnjatich S, and Shiku H.; Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of *Streptococcus pyogenes*. *Eur J Immunol.* 43, 989-1000, 2013 *Equal contribution (Corresponding author)
- (7) Muraoka D, **Nishikawa H**, Noguchi T, Wang L, Harada N, Sato E, Luescher I, Nakayama E, Kato T; Hiroshi Shiku H.; Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8+ T cells. *Vaccine.* 31, 2010-8, 2013 (Corresponding author)
- (8) Gupta A, Nuber N, Esslinger C, Wittenbrink M, Treder M, Landshammer A, Noguchi T, Kelly M, Gnjatich S, Ritter E, von Boehmer L, **Nishikawa H**, Shiku H, Old LJ, Ritter G, Knuth A, and van den Broek M.; A novel human-derived monoclonal antibody against NY-ESO-1 improves the efficacy of chemotherapy. *Cancer Immun.* 2013 Jan;13:E3.
- (9) Yamamoto H, Oshiro R., Ohtsuka M., Uemura M., Haraguchi N., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., **Doki Y**, Mori M. Distinct expression of C4.4A in colorectal cancer detected by different antibodies. *Int J Oncol* 42(1) : 197-201, 2013
- (10) Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, **Nishikawa H**, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N.; Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol.* 41, 367-76, 2013
- (11) **Ishida T**, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A, Yoshida S, Saburi Y, Miyamoto T, Takemoto S, Suzushima H, Tsukasaki K, Nosaka K, Fujiwara H, Ishitsuka K, Inagaki H, Ogura M, Akinaga S, Tomonaga M, Tobinai K, **Ueda R**. Defucosylated Anti-CCR4 Monoclonal Antibody (KW-0761) for Relapsed Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: A Multicenter Phase II Study. *J Clin Oncol*, 2012; 30:837-42.
- (12) Suzuki S, Masaki A, **Ishida T**, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Fukumori Y, Nishikawa H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, **Iida S**, **Ueda R**. Tax is a potential molecular target for immunotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* 2012; 103:1764-73.
- (13) Mori F, **Ishida T**, Ito A, Sato F, Masaki A, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, **Ueda R**, Inagaki H, Iida S. Potent antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human lymphoma mouse model. *Blood Cancer J.* 2012 Apr;2(4):e67.
- (14) Kato H, Saito C, Ito E, Furuhashi T, Nishida E, **Ishida T**, **Ueda R**, Inagaki H, Morita A. Bath-PUVA Therapy Decreases Infiltrating CCR4-Expressing Tumor Cells and Regulatory T Cells in Patients With Mycosis Fungoides. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013 Jan 15. doi:pii: S2152-2650(12)00288-1.10.1016/j.clml.2012.12.002. [Epub ahead of print]
- (15) Fujiwara, S., Wada, H., Kawada, J., Kawabata, R., Fujita, J., Hirao, T., Makari, Y., Shibata, K., Iijima, S., Jungbluth, A.A., Nakamura, Y., Takahashi, T., Kurokawa, Y., Yamasaki, M., Miyata, H., Nakajima, K., Takiguchi, S., **Nakayama, E.**, Mori, M., and **Doki, Y.** NY-ESO-1 antibody as a novel tumor marker of gastric cancer. *Br. J. Cancer.* 108. 1119-25, 2012
- (16) Ohue, Y., Eikawa, S., Okazaki, N., Mizote, Y., Isobe, M., Uenaka, A., Fukuda M., Old, L.J., **Oka, M.**, and **Nakayama, E.** Spontaneous antibody,

- and CD4 and CD8 T-cell responses against XAGE-1b (GAGED2a) in non-small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, 131(5): E649-658, 2012.
- (17) Kawada, J., Wada, H., Isobe, M., Gnjatic, S., Nishikawa, Y., Jungbluth, A.A., Okazaki, N., Uenaka, A., Nakamura, Y., Fujiwara, S., Mizuno, N., Saika, T., Ritter, E., Yamasaki, M., Miyata, H., Ritter, G., Murphy, R., Hoffman, E.W., Pan, L., Old, L.J., Doki, Y., and **Nakayama, E.** Heteroclitic serological response in esophageal and prostate cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int. J. Cancer*, 130(3): 584-92, 2012.
- (18) Hiura Y., Takiguchi S., Yamamoto K., Takahashi T., Kurokawa Y., Yamasaki M., Nakajima K., Miyata H., Fujiwara Y., Mori M., Kangawa K., **Doki Y.** Effects of ghrelin administration during chemotherapy with advanced esophageal cancer patients: a prospective, randomized, placebo-controlled phase 2 study. *Cancer* 118(19) : 4785-4794, 2012
- (19) Motoori M. Yano M., Yasuda T., Miyata H., Peng YF., Yamasaki M., Shiraishi O., Tanaka K., Ishikawa O., Shiozaki H., **Doki Y.** Relationship between Immunological Parameters and the Severity of Neutropenia and Effect of Enteral Nutrition on Immune Status during Neoadjuvant Chemotherapy on Patients with Advanced Esophageal Cancer. *Oncology* 83(2) : 91-100, 2012
- (20) Ito S, Nagata Y, Susumu S, Yoneda A, Matsuo M, Yui K, **Udono H**, Eguchi S, Kanematsu T. Phenotypic analysis of monocyte-derived dendritic cells loaded with tumor antigen with heat-shock cognate protein-70. *Anticancer Res.* 32(11):4897-904, 2012
- 和文
- (21) 和田 尚、**中山睿一**、「がん患者における免疫モニタリング—評価法と国際標準化」、週刊 医学のあゆみ がんの免疫制御—研究と臨床の最前線、医歯薬出版株式会社、244(9): 871-877, 2013.
- (22) 和田 尚、**中山睿一**、解説「腫瘍による制御性 T 細胞の浸潤誘導」、月刊 臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、59(2): 253-258, 2013.
- (23) **西川博嘉**、坂口志文；制御性 T 細胞の臨床応用への展望 炎症と免疫 21: 66-72 2013
- (24) **西川博嘉**、坂口志文；ヒトにおける制御性 T 細胞と関連疾患 感染・炎症・免疫 42 20-27 2012
- (25) 和田 尚、**土岐祐一郎**、**中山睿一**、特論「免疫増強・制御モニタリングとがんワクチン」、日本臨床 特集 固形がんの免疫・抗体療—基礎研究の進歩と臨床応用—、日本臨床社、70(12): 2183-2188, 2012.
- (26) 藤原義之、岸健太郎、本告正明、矢野雅彦、石川治、岡田かおる、益澤徹、森正樹、**土岐祐一郎**、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔 "特集 消化器がんにおけるがんワクチン療法 胃がんに対するがんペプチドワクチン療法 *G.I.Research* 20(2) : 30120-37127 2012
2. 学会発表 (統括研究者のみ)
- (1) **Ishida T**, Ogura M, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, Fujimoto K, Yamamoto K, Miyamoto T, Uike N, Tanimoto M, Tsukasaki K, Ishizawa K, Suzumiya J, Inagaki H, Tamura K, Akinaga S, Tomonaga M, **Ueda R**. Multicenter Phase II Study of Mogamulizumab (KW-0761), a Defucosylated Anti-CCR4 Antibody, in Patients with Relapsed Peripheral and Cutaneous T-Cell Lymphoma (oral presentation), 54th ASH Annual Meeting and Exposition December 8-11, 2012, Atlanta, GA

- (2) **Ueda R**: Chemokine receptor 4(CCR4) is a promising new target for tumor immunotherapy. The Sino-Japan Symposium on Translational Research for Cancer Therapy. Nov.27, 2012. Kobe
- (3) Suzuki S, Yoshikawa K, Takahashi Y, Kojima S, **Ueda R**: Development of CTL preparation kit for adoptive T cell immunotherapy. 20th Annual Cancer Research Institute International Symposium. Cancer Immunotherapy 2012. Oct. 1-3, 2012. New York.
- (4) **Ueda R**: Chemokine receptor 4 (CCR4) is a promising target for development of new tumor immunotherapy. Inter. Academy for Advanced Oncology (IAAO), Aug. 3, 2012. Tokyo
- (5) Totani H, Kusumoto S, **Ishida T**, Suzuki T, Narita T, Masaki A, Mori F, Ito A, Ri M, Komatsu H, **Ueda R**, Tanaka Y, **Iida S**: Reactivation of hepatitis B virus infection in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct. 19-21, 2012
- (6) Masaki A, **Ishida T**, Suzuki S, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, **Ueda R**, Inagaki H, Iida S: Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOG mouse model. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct. 19-21, 2012, Kyoto
- (7) Mori F, **Ishida T**, Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imado K, Takaori A, **Ueda R**, Inagaki H, Iida S: Potent antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human ATL mouse model. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct. 19-20, 2012, Kyoto
- (8) **Ishida T**, **Ueda R**: Anti-CCR4 Monoclonal antibody, Mogamulizumab, targeting regulatory T cells. Lloyd J. Old Memorial Symposium in Cancer Immunology. –Challenge for the next generation of Dr. Old’s view- Sept. 21-22, 2012. Sapporo
- (9) **Ueda R**, **Ishida T**, Mogamulizumab is a promising new candidate of incorporated modulators for the cancer vaccine. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep. 19-21, 2012, Sapporo
- (10) **上田龍三**: バイオテクノロジーが招く、近未来の医学. 第 21 回日本 Cell Death 学会講演 H24 年 7 月 28 日-29 日 名古屋(名古屋大学医学部)
- (11) **上田龍三**: 日本発 CCR4 抗体開発の歩みーベンチワークからベットサイドまでー. 第 16 回日本がん免疫学会総会、平成 24 年 7 月 26 日-28 日 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

XAGE-1b 特異的免疫反応を誘導するペプチドおよびその利用 (国際特許出願中: OP00570/PCT/US) 川崎医療福祉大学 教授 中山睿一

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

II. 分担研究報告書

固形がんに対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia/Ib 相医師主導治験

分担研究課題： 液性免疫・細胞性免疫モニタリング

研究分担者 中山 睿一 川崎医療福祉大学 教授

研究要旨

制御性 T 細胞のうち、特に活性化制御性 T 細胞は膜表面に CCR4 を発現することから、抗 CCR4 抗体投与により活性化制御性 T 細胞分画を除去し臨床効果をもたらすことを期待して「固形がん患者に対する第 Ia/Ib 相医師主導治験」を開始した。本治験では、附随探索研究として、XAGE-1b および NY-ESO-1 抗原特異的抗体反応検査および CD4、CD8 T 細胞反応検査を実施する。抗体反応検査は ELISA 法により、また、CD4、CD8 T 細胞反応検査は、IFN γ 捕捉法を用いて解析する。今年度は、バリデーションを実施した。

A. 研究目的

がん死亡は本邦の死因の第一位となり、新規のがん治療法の開発が急務である。免疫療法は、次世代のがん治療法として注目されている。また、近年、がん患者では、制御性 T 細胞が抗腫瘍免疫反応を抑制していることが明らかになった。制御性 T 細胞のうち、特に活性化制御性 T 細胞は膜表面に CCR4 を発現することから、抗 CCR4 抗体投与により活性化制御性 T 細胞分画を除去し臨床効果をもたらすことを期待して固形がん患者に対する第 Ia/Ib 相医師主導治験を開始した。

本治験では、附随探索研究として、XAGE-1b および NY-ESO-1 抗原特異的抗体反応検査および CD4、CD8 T 細胞反応検査を実施する。抗体反応検査は ELISA 法により、また、CD4、CD8 T 細胞反応検査は、IFN γ 捕捉法を一次モニタリング法として用い、次いで細胞内染色法などの他の方法も用いて解析する。今年度は、バリデーションを実施した。

B. 研究方法

抗 CCR4 抗体投与による有効性の指標として、抗原特異的抗体反応検査（XAGE-1b および NY-ESO-1）を行う。ベースライン、7 週、12 週、12 週以降は可能な限り 4 週毎、維持投与時は 9 回目投与日より 4 週毎にサンプルを採取する。採取した血漿又は血清中の XAGE-1b および NY-ESO-1 抗原に対する抗体価は、ELISA 法により、合成 XAGE-1b タンパク及び組換え NY-ESO-1 タンパクに対する反応を測定する。この目的のために、健常人における血漿又は血清中の XAGE-1b 及び NY-ESO-1 抗原に対する抗体価の平均+3SD 値を求めるとともに、ELISA 法および機器のバリデーションを行った。バリデーションの実施項目としては、1. ELISA 法プロトコールの作成、2. 日差変動試験、3. 抗体陽性・陰性のカットオフ値の設定およびノーマライゼーションファクターの算出、4. 日内変動試験、5. 凍結融解試験、6. 保存試験、7. 機器の精度管理などである。この他、ワークシートも作成した。

試験試薬および機材は、96 ウェルプレート

(Nunc immunoplate #475094)、ELISA バッファークット (PeproTech #900-K00)、蒸留水 (WAKO #041-16786)、二次抗体GAH IgG-HRP (MBL #208)、OPD タブレット (DAKO S2045)、過酸化水素水 31% (WAKO 081-04215)であり、使用機器は、プレートリーダー (DSファーマ、PowerScan HT #238254)、プレートウォッシャー (DSファーマ、Bio-washer 50 #251901)を用いた。さらに、バリデーション後に測定を行った。

C. 研究結果

1. カットオフ値の決定

カットオフ値の検討を、非悪性腫瘍患者の血清を用いて行った。偽陽性による異常値の混入を防ぐため、測定値が平均値±3 S.D. を超える個体は除いた。カットオフ値は、陰性対照個体サンプルを用いて、0.3%の疑陽性を含む 99.7%信頼区間上限を用い、3回計測した測定値から次式に従い算出した。

カットオフ値 (99.7%信頼区間上限) = 平均値 + 3 S.D. 実際に、非悪性腫瘍患者の血清を用いて行った各タンパクに対する ELISA 法の結果を図 1 に示す。計測は 3 回行った。上記の解析より、血清抗体価 (400 倍希釈、490nm) におけるカットオフ値は、
 XAGE-1b 平均値 + 3 S.D. = 0.049
 NY-ESO-1 平均値 + 3 S.D. = 0.050
 とした。

2. ノーマライゼーションファクターの算出

図 1 で行った解析より、測定プレートごとのカットオフ値と陰性コントロール値との隔たりを 99.7%信頼区間上限 / 陰性対照試料の測定値を用いて算出し、ノーマライゼーションファクター = カットオフ値と陰性コントロール値との隔たりの 3 回の平均を求めた。

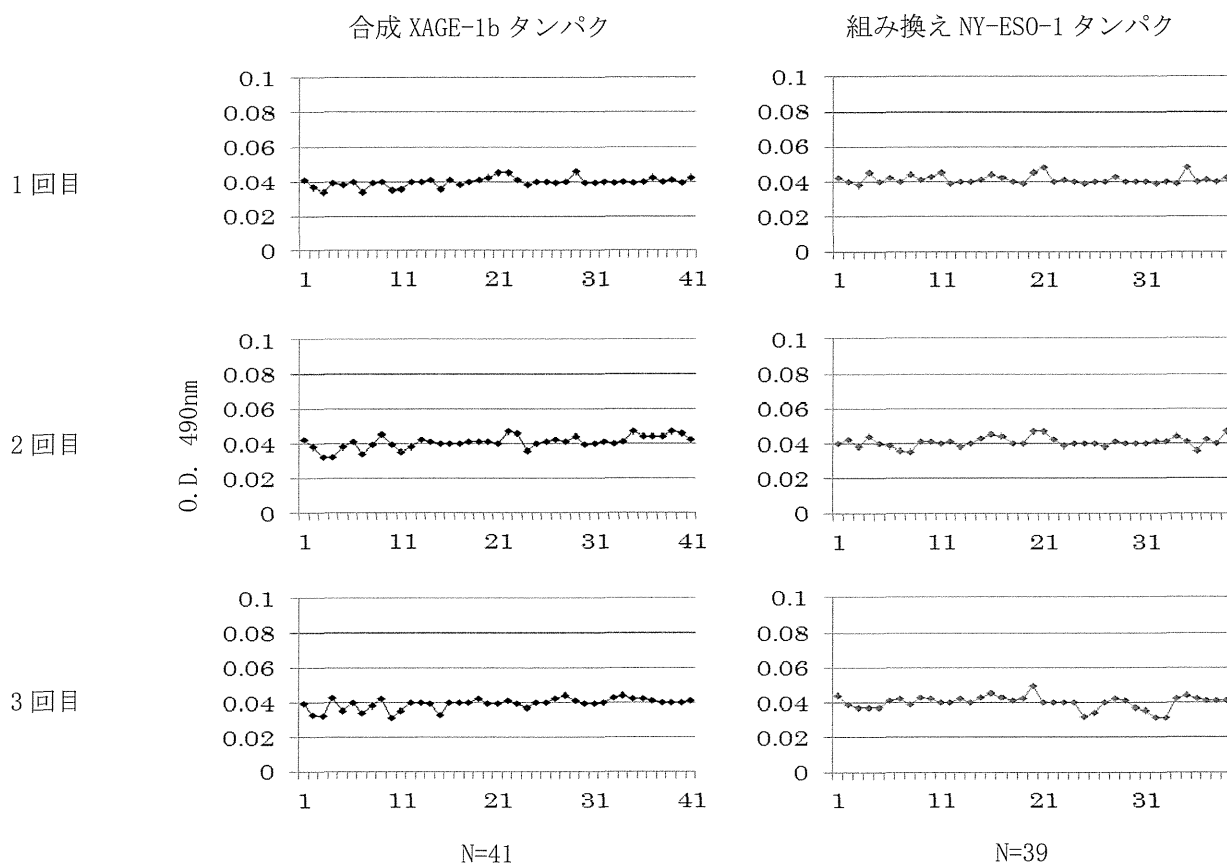


図 1. 非悪性腫瘍患者の血清 (400 倍希釈) を用いた合成 XAGE-1b タンパク (N=41) および組換え NY-ESO-1 タンパク (N=39) に対する ELISA 吸光度値 (O.D. 490 nm)

その結果、血清抗体価（400倍希釈、490nm）におけるノーマライゼーションファクターは、
 XAGE-1b ノーマライゼーションファクター = 1.14
 NY-ESO-1 ノーマライゼーションファクター = 1.18
 とした。

3. 日差、検査実施者による影響の検討
 同様の検体を用い、検査実施者 A,B,C でそれぞれ別の日に検体処理を行った結果、測定値の平均値+S.D.は再現性が得られ、日差変動と検査実施者による影響は許容できると判断した（図2）。

4. 凍結融解、保存期間による影響の検討
 血清抗体が強陽性サンプル2例、弱陽性サンプル2例、陰性サンプル3例を用い、凍結融解と血清の保存期間が、血清400倍希釈における

組み換え NY-ESO-1 タンパクに対する ELISA の測定値に及ぼす影響を検討した。

凍結融解試験では - 80℃に保存した患者血清を1週間毎に凍結融解を計6回繰り返し検討した。血清の保存期間が ELISA の測定値に及ぼす影響の検討に関しては、- 80℃で保存された検体を1週間後毎に4℃環境下で保存し、同環境下で最長4週間保存した条件が測定値に及ぼす影響を検討した。

下記の図3に示す通り、凍結融解（6回まで）および保存期間（4週間まで）が、ELISAの測定に及ぼす影響は少なく、同試験でも再現性が得られた。

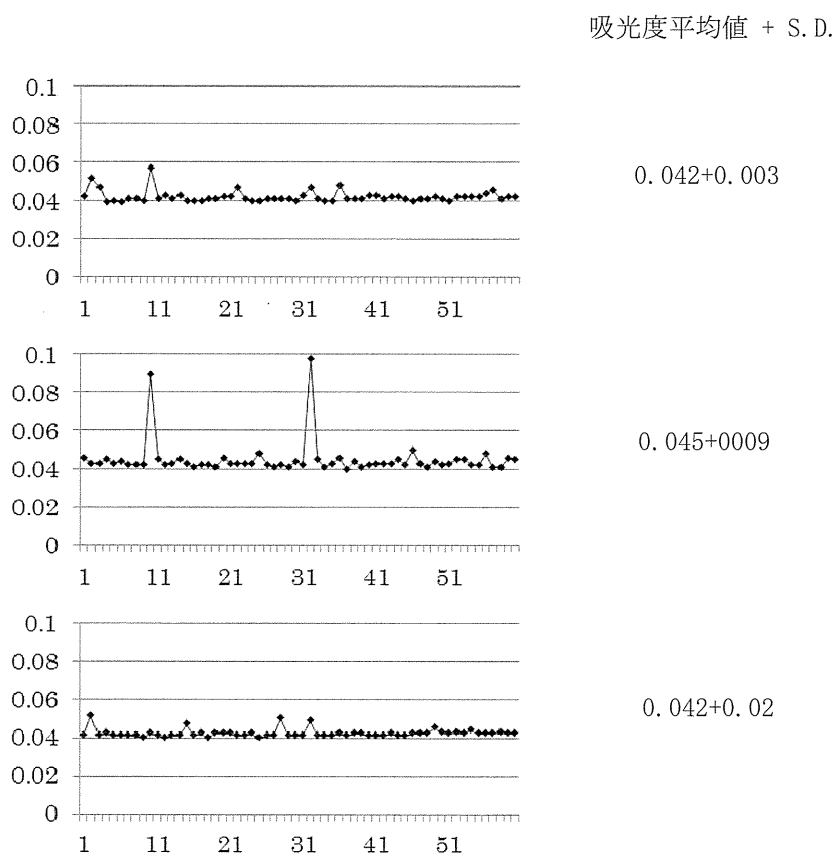


図2. 非悪性腫瘍患者59名の血清(400倍希釈)を用いた合成XAGE-1bタンパクに対するELISA (再現性試験)

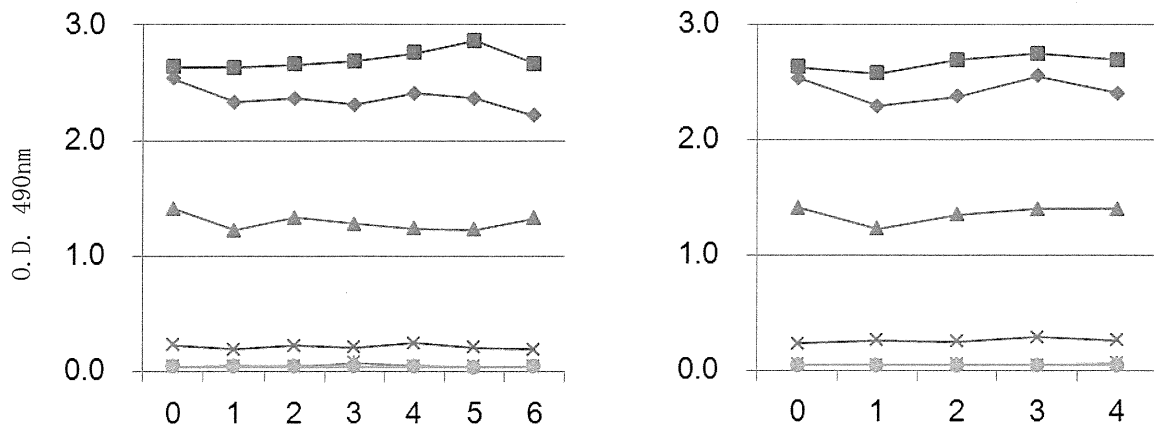


図 3. 悪性腫瘍患者血清(400倍希釈)を用いた組み換え NY-ESO-1 タンパクに対する ELISA (凍結・融解試験、保存試験)

D. 考察

本研究で ELISA 法の再現性を確認した。また、算出されたカットオフ値を用いて、現在進行中の「固形がん患者に対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia/Ib 相医師主導治験」臨床検体の抗原特異的抗体反応の評価を行う。血漿又は血清中の XAGE-1b 及び NY-ESO-1 抗原に対する抗体価をもって判定する。IgG 価が健常人血清での ELISA 吸光度の平均値+3SD を超えるものを陽性とし、ある 2 つの投与時点間で陽性を示す最大希釈倍数が変動した場合に「上昇」又は「低下」と定義する。また、本治験薬 8 回投与後に制御性 T 細胞除去効果及び抗原特異的抗体免疫反応上昇を認めた被験者または RECIST において SD 以上が確認された被験者については、治験薬の維持投与が可能となる。本研究によって得られたカットオフ値及びノーマライゼーションファクターおよびデータの再現性 (バリデーション) をもとに、治験薬の有効性を検討し、また、本治験薬の維持投与の判断基準とする。

E. 結論

本治験は、平成 25 年 4 月 5 日現在、3 名の患者が抗 CCR4 抗体 0.1 mg/kg の安全性を確認中であり、ベースライン、7 週、12 週、12 週以降は可能な限り 4 週毎、維持投与時は 9 回目投与日より 4 週毎にサンプルを採取する。今後、XAGE-1b および NY-ESO-1 発現腫瘍を有する症例で、上記サンプルを用い抗原特異的な免疫応答を解析する。血清抗体価が陽性もしくは抗体価が上昇した患者のサンプルを用いて、① XAGE-1b あるいは NY-ESO-1 以外の抗原に対する特異的抗体免疫反応検査、②抗原特異的細胞免疫反応検査、③サイトカイン産生能評価、④免疫担当細胞・制御性 T 細胞解析などを総合的に実施し抗原特異的な免疫反応の増強効果を検討する。

本治験は、現在 Ia 相の段階であり、安全性と推奨用量が決定されれば速やかに Ib 相に移行する。Ib 相では、肺がん、胃がん、食道がん、悪性黒色腫、卵巣がん症例が含まれ、抗 CCR4 抗体投与による免疫増強効果を臨床的有効性と合わせて評価し、次世代の治療に向け克服すべき課題を明らかにする。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- (1) Fujiwara, S., Wada, H., Kawada, J., Kawabata, R., Fujita, J., Hirao, T., Makari, Y., Shibata, K., Iijima, S., Jungbluth, A.A., Nakamura, Y., Takahashi, T., Kurokawa, Y., Yamasaki, M., Miyata, H., Nakajima, K., Takiguchi, S., Nakayama, E., Mori, M., and Doki, Y. NY-ESO-1 antibody as a novel tumor marker of gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 2012, in press.
- (2) Jimbow, K., Ishii-Osai, Y., Ito, S., Tamura, Y., Ito, A., Yoneta, A., Kamiya, T., Yamashita, T., Honda, H., Wakamatsu, K., Murase, K., Nohara, S., Nakayama, E., Hasegawa, T., Yamamoto, I., and Kobayashi, T. Melanoma-targeted chemo-thermotherapy and *in situ* peptide immunotherapy through HSP production by using melanogenesis substrate, NPrCAP and magnetite nanoparticles. *J. Skin Cancer*, 2012, in press.
- (3) Jimbow, K., Tamura, Y., Yoneta, A., Kamiya, T., Ono, I., Yamashita, T., Ito, A., Honda, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Nohara, S., Nakayama, E., and Kobayashi, T. Conjugation of magnetite nanoparticles with melanogenesis substrate, NPrCAP provides melanoma targeted, *in situ* peptide vaccine immunotherapy through HSP production by chemo-thermotherapy. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2012 in press.
- (4) Okochi, M., Matsumura, T., Yamamoto, S.A., Nakayama, E., Jimbow, K., and Honda, H. Cell behavior observation and gene expression analysis of melanoma associated with stromal fibroblasts in a three-dimensional magnetic cell culture array. *Biotechnol Prog.*, 29(1): 135-142, 2013.
- (5) Eikawa, S., Kakimi, K., Isobe, M., Kuzushima, K., Luescher, I., Ohue, Y., Ikeuchi, K., Uenaka, A., Nishikawa, H., Udono, H., Oka, M., and Nakayama, E. Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. *Int. J. Cancer*, 132(2):345-54, 2013.
- (6) Ohue, Y., Eikawa, S., Okazaki, N., Mizote, Y., Isobe, M., Uenaka, A., Fukuda M., Old, L.J., Oka, M., and Nakayama, E. Spontaneous antibody, and CD4 and CD8 T-cell responses against XAGE-1b (GAGED2a) in non-small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, 131(5): E649-658, 2012.
- (7) Ishii-Osai, Y., Yamashita, T., Tamura, Y., Sato, N., Ito, A., Honda, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Nakayama, E., Okura, M., and Jimbow, K. *N*-propionyl-4-*S*-cysteaminylphenol induces apoptosis in B16F1 cells and mediates tumor-specific T-cell immune responses in a mouse melanoma model. *J. Dermatol. Sci.*, 67: 51-60, 2012.
- (8) Ito, S., Nishigaki, A., Ishii-Osai, Y., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamashita, T., Tamura, Y., Ito, A., Honda, H., Nakayama, E., Jimbow, K. Mechanism of putative neo-antigen formation from *N*-propionyl-4-*S*-cysteaminylphenol, a tyrosinase substrate, in melanoma models. *Biochemical Pharmacology*, 84(5): 646-653, 2012.
- (9) Fujiwara, S., Wada, H., Miyata, H., Kawada, J., Kawabata, R., Nishikawa, H., Gnjjatic, S., Sedrak, C., Sato, E.,

Nakamura, Y., Sakakibara, M., Kanto, T., Shimosegawa, E., Hatazawa, J., Takahashi, T., Kurokawa, Y., Yamasaki, M., Nakajima, K., Takiguchi, S., Nakayama, E., Mori, M., and Doki, Y. Clinical trial of the intratumoral administration of labeled DC combined with systemic chemotherapy for esophageal cancer. *J. Immunotherapy*, 35(6): 513-521, 2012.

- (10) Kawada, J., Wada, H., Isobe, M., Gnjjatic, S., Nishikawa, Y., Jungbluth, A.A., Okazaki, N., Uenaka, A., Nakamura, Y., Fujiwara, S., Mizuno, N., Saika, T., Ritter, E., Yamasaki, M., Miyata, H., Ritter, G., Murphy, R., Hoffman, E.W., Pan, L., Old, L.J., Doki, Y., and Nakayama, E. Heteroclitic serological response in esophageal and prostate cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int. J. Cancer*, 130(3): 584-92, 2012.

和文

- (1) 和田 尚、中山睿一、「がん患者における免疫モニタリング—評価法と国際標準化」、週刊医学のあゆみ がんの免疫制御—研究と臨床の最前線、医歯薬出版株式会社、244(9): 871-877, 2013.
- (2) 和田 尚、中山睿一、解説「腫瘍による制御性 T 細胞の浸潤誘導」、月刊 臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、59(2): 253-258, 2013.
- (3) 和田 尚、土岐祐一郎、中山睿一、特論「免疫増強・制御モニタリングとがんワクチン」、日本臨床 特集 固形がんの免疫・抗体療—基礎研究の進歩と臨床応用—、日本臨床社、70(12): 2183-2188, 2012.

2. 学会発表

- (1) Yoshihiro OHUE, Shingo EIKAWA, Yu MIZOTE, Hirofumi MATSUMOTO, Koji KUROSE, Akiko UENAKA, Mkiio OKA,

Eiichi NAKAYAMA、Correlation of antibody and T-cell responses against XAGE-1n in NSCLC patients、第 16 回 日本がん免疫学会総会 (札幌)、2012 年 7 月 26 日~28 日

- (3) Shingo EIKAWA, Koji KUROSE, Hirofumi MATSUMOTO, Midori ISOBE, Akiko UENAKA, Shusaku MIZUKAMI, Chihiro YAMAZAKI, Mikio OKA, Heiichiro UDONO, Eiichi NAKAYAMA、第 16 回 日本がん免疫学会総会 (札幌)、2012 年 7 月 26 日~28 日
- (4) Yoshihiro Ohue, Shingo Eikawa, Yu Mizote, Koji Kutose, Midori Isobe, Minoru Fukuda, Akiko Uenaka, Mikio Oka, Eiichi Nakayama、Correlation of antibody and T-cell responses against XAGE-1b in NSCLC patients、第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012 年 9 月 19 ~21 日 ポスター
- (5) Shingo Eikawa, Koji Kurose, Hirofumi Matsumoto, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Shusaku Mizukami, Chihiro Yamazaki, Yoshihiro Ohue, Mikio Oka, Heiichiro Udono, Eiichi Nakayama、Inhibition of regulatory T-cell migration by ELR motif-binding peptide、第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012 年 9 月 19~21 日 口演 (日本語)
- (6) Kowichi Jimbow, Akihiro Yoneta, Yasuaki Tamura, Toshiharu Yamashita, Akira Ito, Hiroyuki Honda, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito, Satoshi Nohara, Eiichi Nakayama, Takeshi Kobayashi、Melanoma-targeted chemo-thermo-immunotherapy and in situ peptide vaccine by NPrCAP、第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012 年 9 月 19~21 日 口演 (英語)
- (7) Hisashi Wada, Kazuhiro Kakimi, Midori Isobe, Shingo Eikawa, Akiko Uenaka, Masaki Mori, Yuichiro Doki, Eiichi

Nakayama、NY-ESO-1 long peptide vaccine、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌）、2012 年 9 月 19～21 日 口演（日本語）

- (8) 非小細胞肺癌患者における XAGE-1b (GAGED2a) に対する宿主免疫応答の解析、大植祥弘、榮川伸吾、黒瀬浩史、溝手雄、松本博文、阿部公亮、磯辺みどり、上中明子、岡 三喜男、中山睿一、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 13～14 日 シンポジウム
- (9) CD8 T cell response in NY-ESO-1f peptide vaccinated patients、榮川伸吾、垣見和宏、磯辺みどり、葛島清隆、Immanuel Leuscher、大植祥弘、黒瀬浩史、阿部公亮、

水上修作、山崎千尋、西川博嘉、上中明子、鵜殿平一郎、岡 三喜男、中山睿一、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 13～14 日 口演（日本語）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
XAGE-1b 特異的免疫反応を誘導するペプチドおよびその利用（国際特許出願中：OP00570/PCT/US）
2. 実用新案登録
3. その他