

Mogamulizumab 投与によって、HTLV-1 Tax に対する免疫応答が増強する傾向を認めた。

一方、サイトメガロウイルスに対する免疫応答が減弱し、サイトメガロウイルス血症をきたす症例を認めた。Active Treg の減少と、サイトメガロウイルスに対する免疫応答の減弱は現時点では説明が困難であり、血清サイトカインの網羅的な解析など更なる解析を必要とする。また重篤な、免疫関連有害事象(皮疹)は Active Treg の減少に伴い発症していた。しかしながら同等の Active Treg の減少程度であっても、有害事象を発症するケース、しないケースがあり、現時点では Active Treg の減少のみで免疫関連の有害事象は説明できないと結論している。今後、Mogamulizumab 投与に伴う免疫関連有害事象発症を規定する、宿主遺伝学的因子の同定が極めて重要である。研究分担者は名古屋市立大学ヒト遺伝子倫理委員会の承認を受けた研究計画に基づき、GWAS 解析を開始した。

E. 結論

ATLでの経験から、Mogamulizumab が強力な activate Treg 除去作用を有することは明らかである。重症の皮疹など免疫関連有害事象に十分な注意を払いつつ、本治験を遂行していく必要がある。

また、研究分担者の施設では Ia 相で、すでに2例の患者を登録、治験治療している。引き続き適格症例の適切なリクルートに努める。

F. 研究発表

1. 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 (*corresponding author*)
- (2) **Ishida T**, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Taniguchi S, Eto T, Takatsuka Y, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Hidaka M, Akashi K, Uike N, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishiyama T, Utsunomiya A. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study. *Blood.* 2012 ;120:1734-41. (*corresponding author*)
- (3) **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. (*corresponding author*)
- (4) 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. (*corresponding author*)
- (5) 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. (*corresponding author*)
- (6) Ri M, Tashiro E, Oikawa D, Shinjo S, Tokuda M, Yokouchi Y, Narita T, Masaki A, Ito A, Ding J, Kusumoto S, **Ishida T**, Komatsu H, Shiotsu Y, Ueda R, Iwawaki T, Imoto M, Iida S. Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood Cancer J.* 2012 Jul;2(7):e79.
- (7) 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]

(8) **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.* 2013 Jan 30. doi: 10.1111/cas.12116. [Epub ahead of print] (**corresponding author**)

(9) Suzuki T, Kusumoto S, Yoshida T, Mori F, Ito A, Ri M, **Ishida T**, Komatsu H, Niimi A, Iida S. Successful salvage therapy using lenalidomide in a patient with relapsed multiple myeloma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2013 Mar 2. [Epub ahead of print]

(10) 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.* in press.

(11) *Nishikawa H, *Maeda Y, ***Ishida T**, Gnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R,

Sakaguchi S. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2012;119:3097-104. DOI 10.1182/blood-2011-09-379982. (***equally contributed**)

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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： 制御性T細胞解析

研究分担者 西川 博嘉 大阪大学 特任准教授

研究要旨

ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体（Mogamulizumab/KW-0761）は、脱フコシル化技術によりADCC活性を飛躍的に高めた抗体で、CCR4を発現する成人T細胞白血病・リンパ腫（ATL）に対する治療薬として承認されている。一方、これまで様々ながん抗原分子を標的とした臨床研究が行われ、がんワクチンが宿主に抗原特異的免疫を誘導することが明らかになっているが、臨床効果は限定的である。この原因としてがん組織に浸潤しているリンパ球中の制御性T細胞（Tregs）に注目が集まっている。抗腫瘍免疫応答を抑制するTregsは、がんワクチン療法が十分な効果をあげられない一因と考えられており、Tregsの制御はがん免疫療法が克服すべき大きな課題である。

がん組織に浸潤するTregにCCR4が強発現していることから、本研究ではヒト化抗CCR4モノクローナル抗体を投与することによりこれらのTregsが減少するとともにエフェクターT細胞の活性化といった抗腫瘍免疫応答の活性化が誘導されるか、またそれらが臨床効果につながるかを検討する。

今年度は、1) Tregsがヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与によりどのような動態を示すかを標準化され、かつ科学的にも十分に妥当な手法を用いて検討することが必要である。よって、末梢血および腫瘍局所のTreg動態を検討する上で必要な手技の標準化を行った。また、2) ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与で誘導・活性化される広範な免疫応答を検討するための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を確立した。

A. 研究目的

現在進行中の種々のがん免疫療法は、一部の患者で臨床効果を示すものの、大多数の患者では満足すべき臨床効果をあげていない。その原因として、Tregs ががん組織に多数浸潤し、抗腫瘍免疫応答を抑制していることがあげられる。

ヒト CD4+Tregs は遺伝子発現およびマーカーの上でも多様であることが明らかとなってきたが、CD4、FOXP3 および CD45RA(もしくは CD45RO)発現を組み合わせることにより、CD4+Tregs を CD4+CD45RA+FOXP3^{low}Tregs（ナイーブ型）と CD4+CD45RA-FOXP3^{high}Tregs（エフェクター型）に分けられることが明らかになっている(Miyara et al. Immunity 30:899-911 2009)。本分類によりエフ

エクター型 Tregs に分画される部分に CCR4 が高発現していることが明らかになっている。よってヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与によりこれらの Tregs の動態を末梢血およびがん組織で解析することが本治験において抗体の効果判定の一つとして必須であり、その手技を標準化することが求められる。

一方でヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与により広範な免疫応答の誘導・活性化が期待されるが、特定のがん抗原への免疫応答のみならず網羅的な免疫反応への影響を解析する必要がある。このため、蛋白アレイシステムを用いて、9000個の自己抗原分子に対する抗体反応を検索し、広範な免疫応答への影響を検討する手技を確立する。

本分担研究では上記の2つの免疫学的検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

書面にて同意が得られた健常人およびがん患者の末梢血単核球を用いて Tregs およびがん抗原を含む自己抗原分子に対する免疫反応を解析した。

次年度よりはヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者で検討を行うため、本年度はがんワクチン療法を受けた患者サンプルを用いて検討した。末梢血単核球より単核球を分離し、CD4、CD25、CD45RA、FOXP3 を用いて Tregs を同定し、さらに CCR4 発現をフローサイトメトリーにて検討した。また、蛋白アレイシステムを用いて、網羅的に抗体反応を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪大学研究倫理審査会にて審査され、承認されたプロトコールに準拠して行った。また、すべての健常人および患者検体は書面での同意が得られたのち採取し、研究に用いた。

C. 研究結果

1. 制御性T細胞応答モニタリング法の確立

Tregアッセイ方法が、がん患者末梢血およびがん組織浸潤単核球に適応可能か、またその標準化の検討を行った。がん患者末梢血および腫瘍浸潤細胞より単核球を分離し、CD4+T細胞についてさらに2つの分子マーカー(CD45RAとFOXP3)の発現を検討し、ナイーブ型とエフェクター型のTregsに分類した。25例のがん患者を検討したところ、がん組織では末梢血に比較してエフェクター型Tregsの浸潤が多く認められた。また、これらのエフェクター型Tregsは、CCR4を高発現していた。

また、ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与前後でのがん組織でのアッセイを行うため生検組織でTregアッセイ方法による検討が必要となる。がん組織のホモジェナイズ方法を最適化することにより、がん組織からの単核球の回収量を飛躍的に増加させることができ、生検組織でもTregsの解析が可能となった。

2. タンパクアレイを用いた網羅的液性免疫応答解析法の確立

がん免疫療法において、免疫した抗原のみならず、がん細胞に含まれる他の抗原に免疫応答が引き起こされること(抗原拡散)が、臨床的抗腫瘍効果(腫瘍縮小等)に重要な役割を示していることが明らかとなっている。また、本研究課題内で行われるヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与により免疫応答の広範な誘導・活性化が期待される。このことから、タンパクアレイを用いてがん抗原を含む9000個の自己抗原タンパクに対する液性免疫応答を一度に解析する方法を確立した。

次年度でヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与を受けた患者で検討を行うため、本年度はがんワクチン療法を施行された患者検体を用いてアッセイした。患者検体をStable disease以上のレスポンドーとそれ以外のノンレスポンドーに分類して検討したところ、レスポンドー患者検体では、より多くの自己抗原分子に対して抗体反応が誘導されていることが明らかになった。また個々の抗原に着目すると、レスポンドーでは、がん・精巣抗原のひとつであるCT45に対する抗体反応が共通して認められるのに対して、ノンレスポンドーでは認められなかった。

D. 考察

Treg 除去により抗腫瘍免疫応答を活性化するため、Treg マーカーの一つであるCD25を標的とした抗体(抗 CD25 抗体)が臨床試験に用いられ、検討されてきた。しかし、CD25 の発現がエフェクター T 細胞にも認められることから、抗腫瘍活性を発揮するエフェクターT細胞もTregsとともに除去してしまうため、十分な抗腫瘍活性が認められないことがこれらの臨床試験から明らかになっている。一方、数々の免疫チェックポイントを標的とした抗体が現在臨床応用、もしくはその過程にあるが、腸炎等のさまざまな免疫関連有害事象が報告され、その一部は極めて重篤化することも明らかになっている。よって、自己免疫寛容でも重要な役割を有するTregを除去することによる免疫増強法では、がん組織内に選択的に存在するTregsを除去することが、効果を最大限発揮する上でもまた、有害事象を最小限にするうえでも重要である。本研究結果から、がん組織に浸潤しているTregsはエフェクター型Tregsであり、腫瘍局所での免疫抑制の本態であると考えられた。このことから、がん組織浸潤Tregsに発現しているCCR4を標的とすることは極めてリーズナブルであり、抗腫瘍免疫応答を最大限に活性化でき、かつ免疫関連有害

事象を最小化できる理想的な手法となり得ると期待される。

9000個の自己抗原タンパクに対する液性免疫応答を一度に解析できる方法を確認し、がん患者および健常人でのデータを得た。これらのデータは今後ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与により広範な免疫応答が誘導・活性化されることを考えると、免疫動態を適切に把握する上での比較対象群として非常に重要であると考えられる。

E. 結論

本年度は、1)Tregs がヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与によりどのような動態を示すかをアッセイする手法を確認し、末梢血およびがん組織でアッセイを行った。また、2) ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与での広範な免疫応答を検討するための 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を確認した。以上の手法を用いて平成25年度からヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者検体での検討を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- (1) 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**. 2013 Feb 22. [Epub ahead of print] *Equal contribution (Corresponding author)
- (2) 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**. 2013 Mar 11. [Epub ahead of print] (Corresponding author)
- (3) 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.

- (4) Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Takahashi T, Fujita J, Hirao T, Shibata K, Makari Y, Iijima S, Nishikawa H, Jungbluth A, Nakamura Y, 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** 2013 Feb 12. doi: 10.1038/bjc.2013.51. [Epub ahead of print]
- (5) Eikawa S, Kakimi K, Isobe M, Kuzushima K, Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, Nishikawa H, Udono H, Oka M, 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):345-354 2013.
- (6) 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**. 2012 Dec 17. [Epub ahead of print]
- (7) 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**. 103(10):1764-1773 2012.

和文

- (1) 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
- (2) 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

2. 学会発表

(1) 前田 優香、西川 博嘉、種村 篤、西岡めぐみ、杉山 大介、片山 一郎、坂口 志文
Immunosuppression by regulatory T cells in malignant melanoma、第41回日本免疫学会 2012年12月6日 神戸

(2) 西川 博嘉 成人 T 細胞白血病患者における免疫応答 ー免疫療法への応用の可能性ー、第60回日本ウイルス学会 教育講演 2012年11月14日 大阪

(3) Daisuke Sugiyama, Yuka Maeda, Jianda Yuan, Takuma Kato, Shimon Sakaguchi, Hiroshi Shiku, Lloyd J. Old, Jedd D. Wolchok, Hiroyoshi Nishikawa, Effects of corticosteroids on tumor immunity induced by CTLA-4 blockade depends on dose and timing, Cancer Immunotherapy 2012, 2012年10月2日 米国ニューヨーク市

(4) Yuka Maeda, Hiroyoshi Nishikawa, Atsushi Tanemura, Daisuke Sugiyama, Ichiro Katayama, Shimon Sakaguchi, Immunosuppression by regulatory T cells in malignant melanoma, Cancer Immunotherapy 2012, 2012年10月2日 米国ニューヨーク市

(5) 西川 博嘉 Regulatory T cells in anti-tumor immunity、第71回日本癌学会 Lloyd J Old メモリアルシンポジウム 2012年9月20日 札幌

(6) 西川 博嘉 制御性T細胞を標的としたがん免疫療法の開発、第16回日本がん免疫学会 シンポジウム 2012年7月28日 札幌

(7) 前田 優香、杉山 大介、Jianda Yuan、加藤 琢磨、坂口 志文、珠玖 洋、Lloyd J Old、Jedd D Wolchok、西川 博嘉、抗 CTLA-4 抗体治療におけるステロイド剤投与量と投与時期の重要性、第16回日本がん免疫学会 シンポジウム 2012年7月28日 札幌

(8) 西川 博嘉、坂口志文 制御性 T 細胞による疾患制御、第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会 シンポジウム 2012年6月22日 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定含む)

該当なし

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 鵜殿平一郎 岡山大学 教授

研究要旨

固形がん患者を対象に、ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体（mogamulizumab/KW-0761）の医師主導第 I/II 相臨床治験を多施設で実施する。第 I 相では、各症例につき mogamulizumab の安全性を検討し、制御性 T 細胞 (Treg) の除去 (減少) を確認した後に、岡山大学では抗原特異的免疫応答（液性免疫・細胞性免疫）増強効果を検討する。

A. 研究目的

固形がん患者の抗 CCR4 抗体投与前後に於ける抗原特異的液性免疫及び細胞性免疫機能について解析を行う。

B. 研究方法

抗 CCR4 抗体投与前後の患者末梢血単核球 (PBMC) の解析のため、健常人 PBMC を PMA および ionomycin により刺激し、細胞内染色法により CD8 T 細胞におけるサイトカイン (IL-2, TNF α , IFN γ) および免疫疲弊分子 (PD-1, Tim-3) を検出し、CD8 T 細胞の多機能性評価のための機器設定を行った。また、既存の患者検体を用いて、健常人 (10 例) における多機能性と患者 (40 例) における多機能性を比較した。

C. 研究結果

疲弊分子 PD-1 について、健常人 (20-60%)、患者 (20-40%) において、CD8 T 細胞における発現割合は健常人で高い。Tim-3 について、健常人 (1-5%)、患者 (10-75%) で患者において統計学的に優位な発現 ($P < 0.01$) が見られた。また Tim-3 の発現割合が高い患者では、サイトカインの産生低下が見られた。

D. 考察

患者 CD8 T 細胞の PD-1 発現とサイトカイン産生は正の相関関係があり、Tim-3 発現とサイトカイン産生の低下には負の相関関係がある。

E. 結論

CD8 T 細胞における Tim-3 発現の検出およびサイトカイン産生の検出により、患者の免疫疲弊状態を把握することができる。この検出系により、免疫療法による治療対象者 (high responder) を選別でき得る可能性がある。また、抗原特異的反応 (NY-ESO-1 および XAGE-1b) についても、同様の検出を行い、抗腫瘍免疫応答の質を評価する。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- (1) 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
- (2) 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.

和文

- (1) 鵜殿平一郎, 熱ショックタンパク質と交差抗原提示機構 生化学 第 84 巻 第 10 号, 829-839, 2012
- (2) 樹状細胞による交差抗原提示と HSP 山崎千尋, 鵜殿平一郎, 臨床免疫・アレルギー科, 58:143-147, 2012

2. 学会発表

本件に関しては特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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：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

研究分担者 佐藤 永一 東京医科大学 講師

研究要旨

「固形がんに対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia/Ib 相医師主導治験」では腫瘍細胞での CCR4，腫瘍精巢抗原（NY-ESO-1 および XAGE-1b）の発現を免疫組織化学で評価する。この分担研究課題では，免疫組織化学の至適条件を確認し，標準化された染色手順を確立した。標準化された手順を用いて，被験者の抗原発現をスクリーニングした。

A. 研究目的

この医師主導治験では候補患者の腫瘍細胞での CCR4 と腫瘍精巢抗原(NY-ESO-1 および XAGE-1b) の発現を評価する。評価に際しては，生検や手術により摘出され，ホルマリン固定・パラフィン包埋された組織標本を用いた免疫組織化学を行うこととしている。

この治験は多施設共同研究であるため，各施設での検体処理法，保存方法の条件が一定していないことが想定される。さらに多臓器，多種の癌腫を対象とする治験であり，治験の事前準備として，染色条件の十分な検討が必要である。

本分担課題は，上記のごとく多様な組織標本に対して，普遍的に利用できる免疫組織化学の至適条件を見出し，染色手順を確立することを目的とした。また治験で被験者選択のための発現検査を実際に施行することも目的とした。

B. 研究方法

東京医科大学病院にて切除され，ホルマリン固定・パラフィン包埋標本として保存されている肺癌，胃癌，食道癌，悪性黒色腫，卵巣癌の組織標本を材料として用いた。なお，いずれの組織標本も連結不可能な匿名化されている。

CCR-4 発現については，mogamulizumab のコンパニオン試薬（ポテリジオテスト IHC）を用いた染色を施行した。NY-ESO-1 については clone E978（マウスモノクロナル抗体），

XAGE-1b については clone US09-13（マウスモノクロナル抗体）を用いて，抗原賦活法，一次抗体希釈濃度，抗体反応条件（温度および時間），検出法，発色法をそれぞれ詳細に検討し染色条件を検討した。

C. 研究結果

CCR-4 発現については，コンパニオン試薬で指定された染色条件で，いずれの癌腫でも良好な染色態度が得られることを確認した。NY-ESO-1 と XAGE-1b についても，染色の至適条件を決定した。さらに過固定状態や固定不良状態の標本でも，決定した至適条件での染色が可能であることを確認した。至適条件での染色手順に従って，標準操作手順書を作成した。標準操作手順書に従い，被験者選択のための抗原発現検査を実行した。

D. 考察

免疫組織化学の至適条件を確定できたと考える。ただし今後の被験者検査は十分に慎重を期して行い，不備が見出された際には改めて条件の再設定を行うことが必要である。

E. 結論

被験者選択のための抗原発現検査について，免疫組織化学の至適条件を見出し，標準操作手順書を確定し，抗原発現検査を適切に行った。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Ⅲ. 別添文書

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

治験実施計画書

治験実施計画書番号：KW0761-IIT-01
版 数：第 1.0 版
作 成 年 月 日：2012 年 12 月 19 日作成

秘密の保全に関する記述

本治験実施計画書は、治験実施医療機関の長、治験分担医師、治験協力者、治験薬管理者及び治験審査委員会等の本治験の関係者にのみ提供されるものです。本治験実施計画書の記載内容については、第三者に漏洩することなく秘密情報としてお取り扱い頂きますようお願い致します。

治験実施計画書の要約

1. 治験の目的

進行再発がん患者に対して Mogamulizumab (抗 CCR4 抗体) を週 1 回反復投与した際の安全性及び薬物動態を検討すること (第 I a 相部)、及び週 1 回反復投与した際の安全性及び制御性 T 細胞除去効果を検討すること (第 I b 相部) を目的とする。

2. 評価項目

2-1. 主要評価項目

2-1-1. 第 I a 相部

- 1) 安全性：最大耐用量 (MTD)、用量制限毒性 (DLT)、有害事象の種類・頻度・程度
- 2) 薬物動態の検討

2-1-2. 第 I b 相部

- 1) 安全性：有害事象の種類・頻度・程度
- 2) 制御性 T 細胞除去効果

2-2. 副次的評価項目

2-2-1. 第 I a 相部

- 1) 制御性 T 細胞除去効果
- 2) 有効性：腫瘍縮小効果、無増悪生存期間 (PFS)、全生存期間 (OS)

2-2-2. 第 I b 相部

- 1) 有効性：腫瘍縮小効果、無増悪生存期間(PFS)、全生存期間(OS)
- 2) 第 II 相試験以降の推奨投与量の決定

3. 対象

進行又は再発固形がん患者

3-1. 被験者の選択基準

進行又は再発固形がん患者で、登録時に以下の基準を全て満たす患者を適格とする。

- 1) 腫瘍細胞の CCR4 発現が陰性 (診断は本邦で商品化されている方法を用いること) であり、且つ病理組織診断で肺がん、胃がん、食道がん、悪性黒色腫、卵巣がん等の悪性腫瘍の診断が確定している患者
- 2) 標準治療法に不応・不耐性の患者、適切な治療法がない患者、又は標準治療を拒否した患者
- 3) performance status (ECOG 基準) が 0、1、2 であること
- 4) 治験参加同意取得日の年齢が 20 歳以上であること
- 5) 主要臓器 (骨髄、心、肺、肝、腎等) に高度な障害がなく臨床検査値 (登録前 2 週間以内)

が以下の基準を満たすこと

好中球数：	1,500/ μ L 以上
ヘモグロビン値：	8.0g/dL 以上
血小板数：	75,000/ μ L 以上
血清総ビリルビン値：	2.0 mg/dL 以下
AST(GOT)、ALT(GPT)値：	施設基準値上限 \times 2.5 以下（原疾患による肝浸潤に起因すると判断される場合においては、施設基準値上限 \times 5.0 以下）
血清クレアチニン：	1.5 mg/dL 以下
動脈血酸素飽和度：	93%以上（室温）
心電図：	治療を要する異常所見を認めない
左心駆出率（心エコー検査による）：	50%以上

- 6) 同意取得時から治験薬投与終了後 24 週まで、コンドーム等の避妊方法による避妊に同意していること（閉経後（最終月経から 1 年以上経過）又は外科的不妊手術を施行した女性及び外科的避妊術を施行した男性は除く）
- 7) 本人が文書により同意していること
- 8) Mogamulizumab の初回投与前から初回投与翌日まで投与入院が可能な患者
- 9) 効果判定の対象になる RECIST ver.1.1（New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1).）¹²⁾における測定可能病変を有すること
- 10) 3 カ月間以上の生存が期待できること

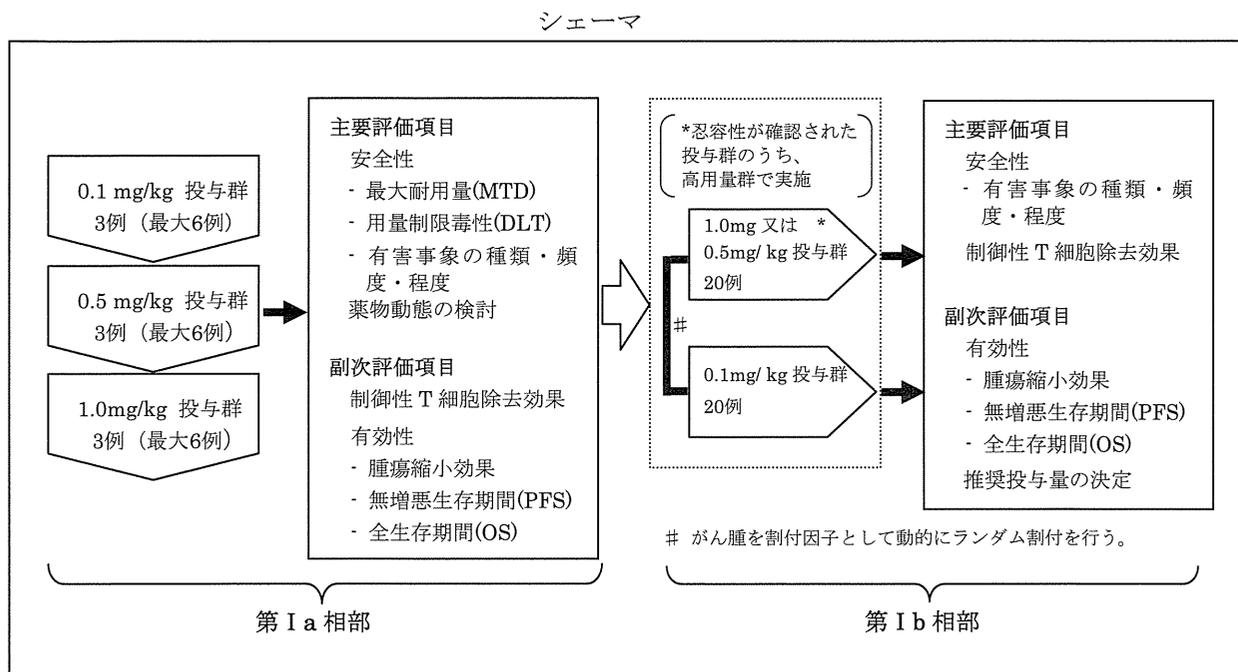
3-2. 被験者の除外基準

登録時に以下のいずれかの基準に該当する患者は除外する。

- 1) HIV 抗体陽性例
- 2) HCV 抗体陽性例
- 3) 自己免疫疾患例
- 4) HBs 抗原が陽性、もしくは HBV-DNA がリアルタイム PCR 法により「検出」と報告された患者
- 5) 抗体製剤の投与により重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 6) 重複がんを有する患者。ただし、重複がんとは、同時性重複がん及び無病期間が 5 年以内の異時性重複がんである。局所治療により治癒と判断される Carcinoma in situ（上皮内がん）もしくは粘膜内がん相当の病変は重複がんに含めないこととする。
- 7) 抗がん剤、副腎皮質ステロイド剤の持続全身投与、免疫抑制剤及び免疫強化剤の投与、放射線療法及び原疾患に対する手術の施行から治験薬投与開始予定日まで 4 週以上経過していない場合
- 8) 妊娠中、授乳中、あるいは妊娠の可能性のある患者
- 9) 活動性の感染症を合併している患者
- 10) 精神障害又は認知症患者
- 11) 全身性のステロイド剤投与による治療の継続が必要な患者

- 12) 造血幹細胞移植等の移植療法が実施された患者
- 13) 中枢神経腫瘍浸潤を有する患者又はそれを疑わせる臨床所見を有する患者
- 14) 症例登録 4 週間以内に他の治験薬を投与された患者
- 15) その他治験遂行に不相当と考えられる患者

4. 治験デザイン



【第 I a 相部】 0.1mg/kg からスタートし、忍容性が確認されれば 0.5mg/kg 及び 1.0mg/kg へ dose escalation。

【第 I b 相部】 忍容性が確認された投与群のうち高用量群及び 0.1mg/kg の 2 群 (第 I a 相部で 0.5mg/kg が MTD の場合、0.1mg/kg 1 群) で実施。各群 20 例となるように登録。

5. 投与方法

投与する際は、「7-7-1.投与基準」を満たしており、且つ「7-7-2.投与延期基準」及び「7-7-3.投与中止基準」に抵触していないことを確認する。

【第 I a 相部】 0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg のいずれかの投与量を 1 週間に 1 回 2 時間かけて静脈内投与し、計 8 回投与する。

【第 I b 相部】 第 I a 相部で 1.0mg/kg までの忍容性が確認された場合は 0.1mg/kg 又は 1.0mg のいずれか、0.5mg/kg までの忍容性が確認された場合は 0.1mg/kg 又は 0.5mg/kg のいずれか、0.1mg/kg までの忍容性が確認された場合は 0.1mg/kg を 1 週間に 1 回 2 時間かけて静脈内投与し、計 8 回投与する。

【第 I a 相部・第 I b 相部共通】

1) 維持投与

9 回目以降の投与は、「7-8.維持投与の実施基準」を満たした場合に実施可能とし、4 週毎に治験薬を維持投与する。8 回投与までと同様に、投与する際は、「7-7-1.投与基準」を満たしており、且つ「7-7-2.投与延期基準」及び「7-7-3.投与中止基準」に抵触していないことを

確認する。

2) 投与間隔

8 回投与までは投与間隔の短縮は行わない。ただし、祝祭日又は休院日によって投与を 1 日延期した場合のみスケジュール調整のため次回投与を 1 日短縮することは可能とする。9 回投与以降は、最大 2 週間までの投与延期を可とし、次回投与を最大 2 週間短縮することは可能とする。

3) 投与時の前処置

注入に伴う反応はほぼ全例に見られることが想定されるため、治験薬の投与 30 分前に、ジフェンヒドラミン 30-50mg 及びアセトアミノフェン 300-500mg を内服する。また、ハイドロコチゾン 100mg を静脈内に前投与する。2 回目の投与以降はジフェンヒドラミン 30-50mg 及びアセトアミノフェン 300-500mg の前投与を行う。投与量については年齢、症状により適宜増減する。

6. 前治療及び併用療法

治験開始前 4 週間以内に対象疾患に対して前治療（化学療法、放射線療法等）が行われていないことを確認する。除外基準に抵触しないことを確認する。

抗がん剤、免疫抑制剤（ステロイド剤を除く）、免疫強化剤、放射線療法、原疾患（転移した腫瘍を含む）に対する手術は治験薬投与期間中、併用禁止とする。副腎皮質ステロイド剤は、治験薬投与のための前処置、合併症及び有害事象の症状改善のための局所投与又は全身投与を許容する。

骨転移例に対するゾレドロン酸やパミドロネートの静脈内点滴、及びデノスマブの皮下注射については、本治験参加前から継続していた場合は、4 週に 1 回の投与であれば併用可とする。ただし、治験薬と同日の投与は避けることとする。

その他合併症及び有害事象に対する治療は可能とする。

未承認医薬品や代替療法（民間療法等）は禁止するが、食品に準じたサプリメントの使用は禁止しない。

7. 治験スケジュール

次のスケジュール表 1 に従い、所定の観察・検査を実施する。なお、初回投与前から投与翌日まで入院する。

治験責任医師等は第 Ia 相部の被験者については 5 回目の投与に先立ち、治験の継続について再度同意を得ることとする。

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又は RECIST において SD 以上が確認された被験者については、被験者に治験薬の維持投与の希望があり、且つ治験責任医師等が治験薬の維持投与が適当と判断した場合は、治験薬の維持投与を可能とする。

初回の治験薬投与日を 1 週と定義する。

表 1. 治験スケジュール

	ベースライン	1週 d1 入院 ↔	2週 d8	3週 d15	4週 d22	5週 d29	6週 d36	7週 d43	8週 d50	9週 d57	10週 d64	12週 d78	13週以降 (12週又は 9回目投与 日から n週毎)	投与 中止時	治験 中止時
同意取得	●														
Mogamulizumab*1 (投与回数)		● (1)	● (2)	● (3)	● (4)	● (5)	● (6)	● (7)	● (8)			○ (9)	○ 4週毎		
再同意取得					●										
問診*2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	○ 4週毎	●	●
PS*3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	○ 4週毎	●	●
体重*3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	○ 4週毎	●	●
Vital check*4 (血圧・脈拍数 体温、呼吸数)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	○ 4週毎	●	●
一般血液検査*3*5	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	○ 4週毎	●	●*10
腫瘍マーカー*3*5 (任意)	●											●	● 12週毎		
尿検査*3	●		●									●	○ 12週毎	●	●
CT 又は MRI	●											●	● 12週毎		●*10
腫瘍抗原発現検査 (NY-ESO-1、XAGE-1b)	●														
CCR4 発現検査	●														
抗原特異的 抗体免疫反応検査*3*5 (採血量 mL)	● (5)					● (5)				● (5)			● 4週毎 (5)	● (5)	●*10 (5)
制御性 T 細胞検査*3*5 (採血量 mL)	● (10)					● (10)				● (10)			● 4週毎 (10)	● (10)	●*10 (10)
薬物動態検査*5*6 (採血量 mL)		● (2×4)	● (2)			● (2)	● (2)		● (2×4)	● (2)	● (2)	● (2)			
免疫増強効果検査*3*5*7 (任意) (採血量 mL)		●*8 (50×2)				● (30)		● (40)		● (30)		● (40)	● 4週毎 (50)	● (50)	●*10 (50)
遺伝子解析*3*5 (任意) (採血量 mL)	● (10)	● (5)													
有害事象*9		←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←

○：8回投与後に維持投与が行われた際に追加で実施する項目

*1：9回目以降の治験薬の投与は、制御性 T 細胞除去効果及び抗原特異的抗体免疫反応又は RECIST において SD 以上が確認され、被験者に治験薬の維持投与の希望があり、且つ治験責任医師等が治験薬の維持投与が適当と判断した場合に限る。

*2：治験薬投与開始前～終了まで継続的に観察する。

*3：治験薬投与期間中は治験薬投与前に実施する。

*4：治験薬投与前、投与開始 30分、1時間、1.5時間、投与終了時、投与終了後 30分後、1時間後に実施する。

*5：貧血の兆候が認められた場合等で規定量の採血が困難な場合は、被験者の安全性を考慮し、1.一般血液検査(施設の規定量)、2.制御性 T 細胞検査(10mL)、3.薬物動態検査(第 I a 相部のみ、2mL)、4.抗原特異的抗体免疫反応検査(5mL)、5.遺伝子解析(10mL 又は 5mL)、6.免疫増強効果検査(30~50mL)、7.腫瘍マーカー(施設の規定量)の優先順位で可能な範囲の採血を行う。

*6：1回あたりの採血量は 2mL とする。実施時期については表 2 を参照のこと。

*7：「8-3-3 その他の項目の定義」(2)～(6)に示した検査項目とする。

*8：複数日に分けて採血を行うことを可とする。

*9：有害事象は治験薬の最終投与から 12 週後まで観察する。ただし、Grade3 以上の非血液毒性に関しては 24 週後までを有害事象の観察期間とする。

*10：8回投与後に維持投与が行われず、12 週の検査実施後に治験中止した場合、治験中止時には一般血液検査、CT 又は MRI、抗原特異的抗体免疫反応検査、制御性 T 細胞検査及び免疫増強効果検査のみ実施する。

表 2. 薬物動態検査の採血スケジュール (第 Ia 相部のみ実施)

投与回数 採血時期	初回投与	2 回目	3 回目	4 回目	5 回目	6 回目	7 回目	8 回目
投与前	●	●				●		●
投与終了時/ 投与中止時	●				●			●
24 時間後 (1 日後)	●							●
72 時間後 (3 日後)	●							●
168 時間後 (7 日後)								●
14 日後								●
28 日後								●

8. 投与中止基準

以下のいずれかの規定に該当する場合は、当該被験者の投与を中止する。

- 1) 投与延期基準により、規定の投与予定日より 2 週間を超えて投与延期となった場合
- 2) 24 週目以降において「RECIST の変法の評価において総合効果が PD」であった場合
- 3) 治験責任医師等により治験の継続が困難と判断される有害事象が発現した場合
- 4) 被験者が治験薬の投与中止を申し出た場合
- 5) 不適格例であることが判明した場合
- 6) その他、治験責任医師等が中止すべきと判断した場合

9. 予定登録症例数

9-1. 第 I a 相部

- 0.1mg/kg 群 3 例 (最大 6 例)
- 0.5mg/kg 群 3 例 (最大 6 例)
- 1.0mg/kg 群 3 例 (最大 6 例)
- 計 9 例 (最大 18 例)

9-2. 第 I b 相部

- 1 群で実施する場合は 20 例
- 2 群で実施する場合は各群 20 例、計 40 例

10. 治験実施予定期間

2013 年 2 月～2015 年 6 月

略号一覧表

略号	英名	和名
5-FU	5-Fluorouracil	5-フルオロウラシル
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADP	Adenosine Diphosphate	アデノシンニリン酸
ALP	Alkaline Phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	Alanine Aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate Aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATL	Adult T-cell Leukemia	成人T細胞白血病リンパ腫
AUC _{0-7d}	Area Under the Curve 0-7day	0-7日目までの血漿中薬物濃度、時間曲線下面積
CBDCA	cis-Diammine(1,1-cyclobutanedicarbonylato)-Platinum(II), Carboplatin	カルボプラチン
CCR4	Chemokine (C-C motif) Receptor 4	CCケモカイン受容体 4
CD	Cluster of Differentiation	白血球分化抗原
CCDP	cis-Diamminedichloro-platinum(II), Cisplatin	シスプラチン
CL	Clearance	クリアランス
C _{max}	Maximum Concentration	最高血漿中薬物濃度
CPT-11	Camptothecin 11, Irinotecan Hydrochloride	イリノテカン
CR	Complete Response	完全奏功
C _{trough}	Trough Concentration	トラフ濃度
CT	Cancer-testis	がん精巣
CT	Computer Tomography	コンピューター断層造影撮影
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events	有害事象共通用語基準
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte	細胞傷害性 T 細胞
CTLA4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4	細胞傷害性 T リンパ球抗原 4
DCF	Data Clarification Form	データクラリフィケーションフォーム
DLT	Dose Limiting Toxicity	用量制限毒性
DTIC	Dimethyl Triazeno Imidazole Carboxamide	ダカルバジン
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group	(米国) 東部腫瘍共同研究グループ
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay	固相酵素免疫検定法
FCM	Flow Cytometry	フローサイトメトリー
GCP	Good Clinical Practice	医薬品の臨床試験の実施に関する基準
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor	顆粒球コロニー刺激因子
γ-GTP	Gamma-Glutamyl Transpeptidase	γ-グルタミルトランスペプチダーゼ
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則

略号一覧表

略号	英名	和名
GOT	Glutamic Oxaloacetic Transaminase	グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ
GPT	Glutamic Pyruvic Transaminase	グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ
GVHD	Graft-Versus-Host Disease	移植片対宿主病
HBc	Hepatitis B Core	B型肝炎コア
HBs	Hepatitis B Surface	B型肝炎表面
HBV-DNA	Hepatitis B Virus Deoxyribonucleotide	B型肝炎ウイルス-遺伝子 (DNA)
hCG	Human Chorionic Gonadotrophin	ヒト絨毛性ゴナドトロピン
HCV	Hepatitis C Virus	C型肝炎ウイルス
HIV	Human Immunodeficiency Virus	ヒト免疫不全ウイルス
HLA	Human Leukocyte Antigen	ヒト白血球型抗原
IFN- γ	Interferon-gamma	インターフェロン- γ
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織化学
LDH	Lactate Dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
MAGE-A4	Melanoma-Associated Antigen 4	メラノーマ関連抗原 4
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cell	ミエロイド由来免疫抑制細胞
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities	ICH 国際医薬用語集
MF	Mycosis Fungoides	菌状息肉症
miRNA	micro-RNA	マイクロ RNA
MRI	Magnetic Resonance Imaging	磁気共鳴映像法
MRT	Mean Residence Time	平均滞留時間
MTD	Maximum-tolerated Dose	最大耐用量
OS	Overall Survival	全生存期間
PCR	Polymerase Chain Reaction	ポリメラーゼ連鎖反応法
PD	Progressive Disease	病勢の進行
PFS	Progression Free Survival	無増悪生存期間
PR	Partial Response	部分奏効
PS	Performance Status	活動指標
PTCL	Peripheral T-cell Lymphoma	末梢性 T 細胞リンパ腫
PTX	Paclitaxel	パクリタキセル
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors	固形がんの治療効果判定のためのガイドライン
SD	Standard Deviation	標準偏差
SD	Stable Disease	安定した病状
$t_{1/2}$	Half Life	血中消失半減期