

## がんワクチンの有効性評価手法に関する研究

研究分担者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

### 研究要旨

がんワクチンの開発が急速に進んでいるが、がんワクチンは従来の細胞障害性の抗がん剤と異なる作用メカニズムで臨床効果を発揮すると考えられ、がんワクチンに特化した評価が必要とされている。本年度は、がんワクチンの臨床評価や品質に関して次のような点を明らかにした。

1) NIH Clinical Trial に記載されているがんワクチンプロトコルやがんワクチンの臨床試験報告から、がんワクチンによって惹起される抗腫瘍免疫反応を評価するために複数の免疫評価指標が用いられることが必要と考えられる。免疫応答性の評価では、がん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞やがん抗原特異的なヘルパー T 細胞数の解析、機能解析に加えて液性免疫応答性も評価されることが多い、また、がんによる免疫抑制反応からの解除を目指して抗体医薬や特定の抗がん剤が用いられており、患者の免疫抑制に関わる Treg 細胞数や免疫応答性の強さを評価する目的として遅延型アナフィラキシー応答性などが評価されている。またがんワクチンの投与方法や投与スケジュール、投与量の設定がこれまでの抗がん剤の臨床試験とは異なっていることが明らかになった。2) がんワクチンでは従来の最大耐性投与量や毒性制限投与量の設定は不要な場合が多いと想定されるが、いくつかの臨床試験では MTD や DLT を主用評価項目や副次評価項目としているプロトコルもある。3) これらの成果に基づいて昨年作成したがんワクチンの評価ガイダンスの素案の再検討を行った。ガイダンスでは臨床初期に絞った記載とし、特に免疫応答に対する評価や投与量の設定などを中心に書き、臨床後期での有効性の評価については、他のがん治療と大きな差異はないと考えられるために簡略な記載とし、がんワクチン特有の留意点のみを記載することとした。

### 協力研究者

佐藤大作 医薬品医療機器総合機構・部長  
井口豊崇 医薬品医療機器総合機構・審査役  
朝倉 渡 医薬品医療機器総合機構・審査役  
野中孝浩 医薬品医療機器総合機構・主任専門員  
甘粕晃平 医薬品医療機器総合機構・審査専門員  
老邑温子 医薬品医療機器総合機構・審査専門員  
秦 利幸 医薬品医療機器総合機構・審査専門員

### A. 研究目的

近年患者自身の免疫能を賦活化することにより抗腫瘍効果を発揮させる治療法が開発されつつある。樹上細胞の機能をはじめ、がんに対する基礎的研究の進展やがんによる免疫抑制効果についての解析が進むと共に、強力な腫瘍免疫法が開発されがん免疫療法に期待が持てる成果が得られ始めている。

米国 NIH の臨床研究ウェブページによると既に 1000 を超えるがん免疫療法が登録されており、年々増加の一途に至っており、ペプチドワクチンをはじめ、タンパク質、組換えウイルスなど多様

な製品を複雑に組み合わせた治療もおこなわれている。それぞれの製品の製法や特性解析、品質管理などは各種ガイドラインや指針に従った解析や管理が求められると考えられるが、非臨床試験や臨床試験では、安全性や有効性の評価において様々な課題が存在する。

非臨床試験では免疫応答性の種差もあり、必ずしも適切なモデル動物が存在するわけではないし、ヒト化モデルマウスを用いた検討も行われているが必ずしもヒトに外装できるデータがえられるとは限らない。

また、臨床試験では特に従来の抗がん剤とことなり、MTD や DLT が見られないケースも多い。またがん抗原を発現していない患者に対してはがんワクチンの効果がない可能性があり、そのためにがん抗原の発現を評価するためのコンパニオン診断薬の開発も必要と思われる。また、治験初期で行われる多様ながん種の患者に対する試験の必要性についても、がん抗原の発現性の観点から再考する必要がある。

本年度は、種々のがんワクチンを用いたがん免疫

治療に関して臨床試験に関する国際的な登録情報やその臨床試験結果に関する論文等について調査し上で、臨床試験でどのような免疫応答性を評価しているかを明らかにしたうえで、有効性評価との関連についても明らかにした。また、品質、非臨床試験において考慮すべき事項について解析した。これらの成果から、がんワクチンガイドラインに取り込むべき要素について明らかにすると共に、がんワクチンガイドライン作成のための案を提示した。

## B. 研究方法

2013年時点で、がんワクチンの臨床開発を目指してNIH Clinical Trialのウェブページに約1300の臨床プロトコルが掲載されている。これらのプロトコルの調査では、パピローマウイルスやがん患者の感染症防御のためのワクチンに関する研究もあり、それらを除いた上で、どのような免疫応答性について臨床試験で明らかにしようとしているかを調査した。ペプチド/タンパク質を用いた開発のみならず、糖脂質を用いた開発、さらには細胞治療、遺伝子治療として分類される臨床開発が行われている。また併用薬としてもアジュバント、核酸医薬、低分子化学医薬品など様々な取り組みが行われている。このような併用薬を含めた治療レジメンとその免疫応答性の評価の関係についても調査した。

さらに治療レジメンに関しても多岐にわたっている。このような現在実施されている臨床プロトコルの解析を行うと共に、FDAのがんワクチンガイドラインや公表文献等も含め調査の対象とした。

また、患者での免疫応答性を評価する国際的な標準化プロジェクトから出されたT細胞のバイオアッセイガイドライン (Minimal Information about T Cell Assays(MIATA)ガイドライン)の有効性についても取り上げた。

## C. 研究結果

### C-1. がんワクチンの臨床プロトコル

米国NIHのNIH Clinical Trialウェブページには2013年現在で1200を超えるがんワクチンプロトコルが掲載されている。がん抗原ペプチドとして短鎖ペプチド及び長鎖ペプチドの他、がん抗原ペプチドとKLHなどのスーパー抗原との融合タンパク質なども用いられている。がん抗原タンパク質そのもののみならずがん抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入するためのプラスミドやウイルスベクターの他、がん抗原でパルス刺激した樹上細胞による細胞治療も行われている。さらに、

自己や同種がん細胞を放射線照射などにより増殖能を失わせた細胞製品なども用いられている。このような細胞製品にがん抗原をより強く発現させるためにがん抗原の遺伝子を搭載したプラスミドやmRNAを導入して投与したり、さらに免疫応答性を刺激するためにGM-CSFやインターフェロン等のサイトカインの遺伝子を導入するなどの改変が行ったうえで、患者に投与することも行われている。

このような多様な製品が投与されるばかりでなく、投与レジメンとしてウイルスベクターのよるワクチン投与に引き続いてがん抗原ペプチドによる追加免疫やサイトカインによる刺激を行ったり、さらに数ヶ月から数年にわたる免疫刺激を行うことも試みられている。また、このような投与スケジュールのみならず、投与量、投与ルート、併用薬などについても様々な試みが行われている。このような情報を明らかにした上で、免疫応答性の評価項目、評価スケジュール、有効性の評価項目、評価スケジュールについて整理した(資料1)。

### C1.1. 製品群の多様性

図1に、NIH Clinical Protocolのデータベースの収載されているプロトコルで用いられている製品を分類してみた。最も多いのはペプチドであるが、この中には短鎖ペプチドと長鎖ペプチドが含まれる。また、KLHなどのキャリアタンパク質との融合ペプチドも含まれている。次に多いのが自己由来細胞であるが、この中には自己樹状細胞と自己のがん細胞に遺伝子導入などの何らかの処理をした後に抗原として投与される場合も含まれる。樹状細胞を用いたプロトコルが非常に多いが、この中には樹状細胞を刺激するペプチドやタンパク質、mRNA、プラスミドなども含まれている。タンパク質の中には、特定のがん抗原のイディオタイプ抗体なども含まれる。

遺伝子治療の中にはウイルスベクターを用いるケースからプラスミドやプラスミドをリポソームに封入した製品も含まれる。

またペプチドをスーパー抗原と結合させたり、がん抗原タンパク質をリポソームなどに封入することにより免疫応答性を高める製剤の開発も行われている。キャリアタンパク質が用いられるケースでは、キャリアタンパク質に対する免疫応答性を評価し、がんによる免疫抑制からどの程度回復しているのかについての解析も平行して行われることがある。

このほかに統計データとしては含めていないシアリルルイスXなどの糖鎖抗原やGD1、GD2などの

糖脂質抗原などをターゲットした試験が実施されている。

### C1.2. 併用薬

がんワクチンの併用薬として、免疫賦活化作用を有する顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) や IL-2、インターフェロン の他、がんによる免疫抑制に関与する Treg 細胞を抑制すると考えられているシクロフォルファミドやフルダラビン、Treg 細胞の機能を抑制するためのアンチセンス核酸や siRNA などが用いられている。

近年、がんによる免疫抑制解除に抗体医薬品を用いる試みが行われており、大きな成功を収めている。代表的な例として、Treg 細胞の発現する CTLA4 やケモカインレセプター CCR4 をターゲットとした抗体医薬品としてイピリムマブやモガムリズマブ、がん細胞に発現する免疫抑制性のリガンドである PDL-1 や PDL-1 に結合する PD-1 に対する抗体医薬品などが利用されており、イピリムマブや抗 PD-1 抗体では高い有効性が得られたとの報告がある。

併用薬の効果とがんワクチンの効果が同じであれば臨床的な応答性について区別して評価する必要はないが、例えば Treg 細胞の抑制を評価する場合には、Treg 細胞集団のどれほど低下したのが評価する必要があるかもしれない。

また、Treg 細胞のようにいくつかのサブセットが存在する場合には、サブセットを区別して解析することも有用であると考えられる。

### C.1.3. 臨床開発初期での安全性

従来の細胞傷害性の抗がん剤と異なり、僅かな例外を除いてがんワクチンで最大耐性毒性が同定されたことは無いと考えられる。がんワクチンの臨床試験では、投与可能な最大投与量は毒性というより製品の製造上の限界や投与部位の物理的あるいは解剖学的な観点からの制限を受けることになると考えられる。従って従来の 3+3 用量試験を用いて最大耐毒性 (MTD) や用量制限毒性 (DLT) を明らかにする必要がないと考えられる。

一方で、がんワクチンの臨床試験のデザインにかんする調査では、MTD や DLT を明らかにすることを主用評価項目や副次評価項目に挙げているプロトコルもある。がんワクチンの製品は非常に多用であり、これらの中には細胞製剤やアジュバントを用いたプロトコルが含まれており、そのためにこのような MTD や DLT を明らかにすることを目指しているとも考えられる。

### C.1.4. がんワクチンの免疫応答性評価

がんワクチンの有効性を予測可能な PD マーカーのとして、抗原特異的な細胞性免疫の活性測定や液性免疫反応の評価が行われてきている。また非特異的な免疫応答性として標準抗原に対する遅延型アナフィラキシー反応の強度を測定することも行われている。

細胞性免疫の応答性の評価に当たってはがんワクチンの投与スケジュール等を考慮する必要がある。すなわちがんワクチンの投与では、ウイルスベクター等による持続刺激がある場合を除いて 1-2 ヶ月の反復投与から、3-4 年といった長期にわたる反復投与を行うプロトコルも試みられている。また免疫応答性の評価ポイントも投与スケジュールに応じて数ヶ月から数年という長期の評価を行う場合もある。従って長期にわたる細胞を用いた評価を行うのに際して、異なる日時での測定データの比較可能な結果が得られるような標準化が重要となる。

主とした有効性を示唆する細胞免疫応答性の評価項目としては、細胞傷害性 T 細胞やヘルパー T 細胞の増減をテトラマーアッセイや ELISPOT アッセイ、サイトカイン産生能をフローサイトメトリーで解析する方法など複数の方法で解析されている。

テトラマーアッセイ、ELISPOT アッセイ、サイトカイン産生フローサイトメトリーアッセイについては国際的なタスクフォースで標準化が試みられており、参考になる部分が多い。

#### (1) クラス I あるいはクラス II の MHC ポリマーを用いた抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) あるいは抗原特異的 CD4+ 細胞の定量

ウイルス感染細胞やがん細胞の除去に免疫学的に重要な役割を担っている細胞傷害性 T 細胞は、抗原提示細胞の MHC クラス I 分子と結合した抗原ペプチドを認識し、標的細胞を特異的に攻撃、排除するとされている。この MHC 主要組織適合遺伝子複合体のクラス I 分子上に抗原ペプチドを提示することが出来る。さらに、CD8+ の細胞傷害性 T 細胞は HLA-I 分子に結合したがん抗原ペプチドを T 細胞受容体 (TCR) が認識し、刺激を受けた抗原を発現している標的細胞を攻撃するようになるとされている。抗原が特定されたがんワクチンの臨床試験評価では、がんワクチンの接種により増加するがん抗原特異的 CTL ががん細胞を攻撃すると想定されており、特異ペプチドを結合した HLA class-1 複合体を用いて、その血中の抗原特異的

CTL 数を測定することがPD マーカーとなると考えられる。

しかし、MHC Class-1/ペプチド複合体は、単量体では TCR への結合親和性が低いために、抗原特異的な CTL の検出に HLA class-1/ペプチド複合体を利用するには、HLA の多量体化が必要とされている。すなわち、がん特異的なペプチドと MHC-class1 ポリマーを作製し、さらにそのペプチドポリマー複合体を蛍光標識したものをを用いて、フローサイトメーターにより CD8 陽性でかつポリマーとの結合能をもつ陽性ゲートの T 細胞数を測定することにより、抗原特異的な CTL 数を算出する。さらに、蛍光標識された MHC Class-1/ペプチド複合体は、CTL の特異的な T 細胞受容体 (TCR) との結合能を有するが、一方で MHC は CD8 とも非特異的に結合する性質があるために、特異結合を抑制する必要があるとされている。このために非特異的な HLA の結合部位に変異を導入する方法も考案されている。

## (2) MHC-class2/がん特異的なペプチド複合体の 4 量体を用いたヘルパー T 細胞 (CD4 陽性) の検出

クラス 2 分子は、HLA のクラス II (HLA-2) 領域にコードされる鎖と鎖から構成されており、HLA-DR、DQ、DP がある。ヘルパー T 細胞は、HLA-2 分子に結合した抗原ペプチドを、TCR/CD3 複合体が認識し、同時に抗原提示細胞の補助刺激分子 (インテグリンリガンド; CD86) を補助受容体 (CD28) が認識することにより抗原特異的な活性化が起こる。抗原刺激によって活性化された抗原特異的なヘルパー T 細胞は、CTL の活性化のみならずがん組織への浸潤にも必要とされていることから、血中における抗原特異的なヘルパー T 細胞の濃度を測定することにより、がんワクチンの有効性を予測可能な指標となるとされている。

抗原特異的なヘルパー T 細胞の測定では、細胞傷害性 T 細胞と同様に MHC Class-2 とペプチド複合体の 4 量体やポリマーに蛍光物質で標識し、患者由来血液細胞等と反応させ、同時に蛍光標識した CD4 抗体とのダブルラベルを行い、CD4 陽性でかつ MHC Class-1/ペプチドの反応性の細胞をフローサイトメーターにて定量する。測定では MHC Class-2/ペプチド複合体ポリマーとの非特異反応性を排除することである。

テトラマーアッセイのフローサイトメトリーを用いた解析において細胞傷害性 T 細胞の表現系について同時測定が可能である。しかし、長期保存中にテトラマーの立体構造が変化しやすいことが知られており、安定性について十分な評価が必要

である。また検出した細胞傷害性 T 細胞の機能的な面の評価ができないという欠点がある。また末梢血中で目的とする T 細胞の検出感度としては 0.01 から 0.2% であり、これより少ない T 細胞の検出が難しい。このために *in vitro* で抗原刺激を与え目的とする細胞傷害性 T 細胞を増幅させることにより感度を増加させる工夫も行われている。

さらに混合リンパ球反応を利用した細胞傷害性 T 細胞の *in vitro* での増幅法も用いられており、単なる抗原刺激よりも増幅能が高いとされている。しかし、*in vitro* 刺激を加えても感度は 100 倍ほど増加するが、それより少ない T 細胞集団を検出することは技術困難とされている。

## (3) . 特異的な抗原刺激によって活性化された CD4+ または CD8+ T 細胞数の ELISPOT による計測、あるいは細胞内サイトカイン染色による解析

がん抗原特異的に反応する CD4 陽性や CD8 陽性細胞を測定するもので、Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT) では、特異抗原刺激によりこれらの T 細胞が産生するインターフェロン (IFN-) の産生を測定するものである。IFN- は CD4、CD8、NK 細胞などが産生するサイトカインであり、炎症免疫反応の調整に関与すると考えられ、抗原刺激を受けたこれらの細胞の反応性を検出することが可能とされる。産生した細胞内サイトカインアッセイでは、抗原刺激により T 細胞が活性化され産生するサイトカインを細胞内に蓄積させサイトカイン陽性細胞を定量するものである。

### (3-1) ELISPOT アッセイ

がんワクチンの投与を行った患者末梢血より白血球を分離し、リンパ球層あるいは、CD8 や CD4 細胞を分離して、一定期間抗原刺激を与えながら培養を行う。その際、培養プレートを抗 IFN- コートとしておき、T 細胞が産生する IFN- をトラップ可能としておく。所定の培養期間を経過した後、T 細胞やリンパ球を除去した後、トラップした IFN-

量を酵素免疫反応により検出する。細胞から産生される IFN- は培養プレートにコートされた抗 IFN- により効率よくトラップされ、IFN- 産生細胞が存在した部位のみがプラーク状に染色される。この染色パターンから IFN- 産生細胞量の推定が可能となる。培養プレートのスポットとして検出されるために、定量範囲がそれほど広がらないが、機器を用いなくても解析可能な測定法である。

ELISPOT アッセイの感度は 0.01% とされている。ELISPOT アッセイでは細胞傷害性 T 細胞の機能面

の評価も可能であるが、陽性細胞傷害性 T 細胞の回収が出来ないために、その機能や抗原特異性などについて詳細な検討が出来ない。

### (3-2) 細胞内サイトカインアッセイ

フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカインアッセイは、ELISPOT と同様にがん抗原特異的な T 細胞の機能情報に着目したアッセイ法である。抗原刺激に应答して、CD4 細胞や CD8 細胞が産生するサイトカイン（インターロイキン 2；IL-2）を産生するが、その IL-2 再生している細胞を特異的に染色する。このために、Monensin や Brefeldin-A などの細胞内タンパク質輸送を阻害する薬剤を用いて抗原刺激を行い、細胞内に蓄積された IFN- $\gamma$  や IL-2 を膜透過処理を行ったうえで蛍光免疫染色により検出する。同時に、CD4 及び CD8 抗体を用いて蛍光免疫染色し、CD4 陽性 / IL-2 陽性、あるいは CD8 陽性 / IL-2 陽性の細胞をフローサイトメーターにより解析する。細胞内サイトカインアッセイの特徴は、抗原刺激による機能（サイトカイン産生）を測定できるだけでなく、CD4 と CD8 陽性の細胞を同時に測定することも可能とされている。

細胞内サイトカインアッセイの感度は 0.02% ほどであり、感度の点が課題となっている。

### (4) がん抗原の特異性が不明な場合

がん抗原タンパク質やこれをコードするような遺伝子を発現させる製品では、抗原のどの部位に対する免疫応答が惹起されるか不明であり、また MHC-1 と MHC-2 の両方に別々の抗原ペプチドが呈示される可能性がある。さらに、複数の MHC に異なるがん抗原ペプチドが提示される可能性がある。従って、がん抗原タンパク質の中の複数のペプチドに対する免疫応答性を評価することが有用と考えられる。

このために、導入したがん抗原タンパク質をコードするプラスミド等を導入した抗原提示細胞を用いて複数の抗原ペプチドを MHC 上に発現させることも行われている。例えば、複数のがんペプチド発現する抗原提示細胞と患者由来のリンパ球分画を *in vitro* で同時に反応させ、抗原提示細胞からの刺激を受けた特異的な細胞傷害性 T 細胞や CD4 陽性細胞のサイトカイン放出を ELISPOT アッセイにより検出するというものである。

一方で、抗原タンパク質の全体を網羅するようにペプチドライブラリーを合成し、ELISPOT アッセイやサイトカインフローサイトメトリーアッセイを行うものである。

### (5) 制御性 T 細胞の測定

以上のがんワクチンの免疫応答性の評価では、がん組織は様々な因子を放出したりすることにより、がんに対する免疫応答を抑制する機構があることが知られている。このがんによる免疫抑制機構の中で重要な役割を果たしているのが制御性 T 細胞（Treg 細胞）といわれている（図 2）。また、がん細胞は肝臓などに発現される PD-L1 を発現することがあり、この PD-L1 は免疫細胞の PD-1 に結合し、免疫細胞を不活化することが知られている。

このために Treg 細胞上に発現する機能タンパク質である CTLA4 やケモカイン受容体である CCR4 に対する抗体や、PD-L1 や PD-1 に対する抗体を用いてがんによる免疫抑制を回避する方策が試みられている（図 2）。

また Treg 細胞の抑制効果があるとされるサイクロヘキシミド(CHX)投与などの投与ががんワクチンの併用薬として用いられている。

このような免疫抑制からの解除を評価することもがんワクチンの効果を評価する上で非常に重要とされる。例えば Treg 細胞の血中濃度やがん組織やリンパ節内での Treg 細胞の量を測定することも有用と考えら得る。また、Treg 細胞の活性化状態に関しては、末梢血中の Treg 細胞数や Treg 細胞のサブタイプの解析、さらには腫瘍内に浸潤している Treg 細胞数やそのサブタイプ解析が行われている。また、特異抗原に対する免疫応答性のみならず、がんには関連しない非特異的な標準抗原に対する免疫応答性とした遅延型アナフィラキシー応答性の評価も行われている。

### (6) 抗原提示細胞によるがん抗原のクロスプレゼンテーション

MHC-1 は基本的に全ての細胞に発現しており、内在性タンパク質がプロテアソームにより分解され生成したペプチドが抗原処理関連トランスポーター（TAP）依存的に小胞体に運ばれ MHC-1 と結合して細胞外へ提示されるようになる。一方で外来性抗原はカテプシン S などの分解を受け、分解されたペプチドは抗原提示細胞特異的に発現される MHC-2 に発現される。

ナイーブな CD8 陽性細胞が外来抗原への応答性を誘導するためには抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）により外来性抗原がその MHC-1 に提示される必要がある（クロスプレゼンテーション：図 3）とされている。いくつかの概念的な仮説も含め、外来性抗原に対する細胞傷害性 T 細胞誘導の機能をになうのがどのような細胞なのか明確にはされていない。本来内在性抗原を提示する

MHC-1 に外来性抗原を提示するクロスプレゼンテーションが惹起されることにより細胞傷害性 T 細胞の強力な誘導が起り、高い抗腫瘍効果が発揮されると考えている研究者も多い。

クロスプレゼンテーションに関わる抗原提示細胞としては、*in vitro* での解析結果から樹状細胞がその主役とされているが、どの樹状細胞サブタイプがその役割を担っているのか明確でない状況で、クロスプレゼンテーションの誘導を評価することを求めるのは時期尚早の感がある。また抗原提示に関わる樹状細胞が局在すると想定される腫瘍内から樹状細胞を収集することも想定されるが、少なくともクロスプレゼンテーションに関わる樹状細胞が特定される必要があったが、近年の解析でその候補となる樹状細胞が特定されつつある。

マウスでの樹状細胞の解析結果から、リンパ節に常在するレジデント樹状細胞 (cDC)、タイプ 1 インターフェロンを産生する形質細胞様樹状細胞 (pDC)、移住性樹状細胞 (mDC) のサブタイプが知られている。さらに、cDC は CD8<sup>+</sup> 陽性 (CD8<sup>+</sup> cDC 細胞) の CD8<sup>-</sup> 陰性 (CD8<sup>-</sup> cDC 細胞) の 2 種類があり、クロスプレゼンテーションに関与する樹状細胞は CD8<sup>+</sup> cDC 細胞とされている。このマウスの CD8<sup>+</sup> cDC 細胞に相当するヒト細胞について最近の研究で DC antigen-3 (BDCA3) 陽性 (CD141 陽性) 細胞であるとする報告がされつつある。

しかし BDCA3<sup>+</sup> 細胞はリンパ節や骨髄等でも非常に僅かなポピュレーションしかない細胞であり、クロスプレゼンテーションの有無の指標として BDCA3<sup>+</sup> 細胞の抗原提示能を指標とした場合に測定法として成立するのかが問題となる。

マウス DC8<sup>+</sup> cDC やヒト BDCA3<sup>+</sup> 細胞は高い IL-12 やインターフェロン産生能をもつと共に トールライク受容体 3 (TLR3) や TLR7 を発現している。

マウス DC8<sup>+</sup> cDC やヒト BDCA3<sup>+</sup> 細胞は MHC-1 上に外来性抗原を提示できるされるが、TLR3 に 2 本鎖 RNA や polyI:C などが結合すると MHC-1 への抗原提示が活性化され、細胞傷害性 T 細胞の誘導が上昇する。また、産生する IL-12 やインターフェロンを介してこの細胞傷害性 T 細胞の分化誘導を亢進させる能力を持つとされている (図 3)。

クロスプレゼンテーション能を持つヒト樹状細胞 (BDCA3<sup>+</sup> 細胞) はがん免疫療法のキーとなる細胞と想定されている。樹状細胞を用いた抗腫瘍細胞製剤として FDA が唯一承認している

Sipleucel-T (Provenge) もこのような観点からの承認であると理解される。ただし、Provenge でられている患者の全生存率の延長は対象に比べて統計的有意さはあるものの僅かであり、様々な改善の余地があるとされている。

例えば投与される樹状細胞の刺激因子、投与する樹状細胞量、投与頻度、投与ルート、投与部などである。このような解析が進展し、BDCA3<sup>+</sup> 樹状細胞が真にがん免疫応答の中心に位置することが明らかになり、さらにその解析手法が確立することが期待される。

従って、樹状細胞に関するこのような解析が進めば、がんワクチンにおけるクロスプレゼンテーションの評価の意義もさらに明確になると考えられる。

### C.1.5. がんワクチンガイドライン案

以上の調査研究を通じて得られた情報を基に、がんワクチンガイドラインに盛り込むべき要素を検討した。24 年度に実施した特別研究でがんワクチンガイドラインの素案を作成しているが、本年度に明らかにした要素をこの素案に追加した。また、後期臨床評価での全生存期間の延長等の有効性評価はがんワクチン特有の課題ではないことから、特にがんワクチンに特化した記載のみに限定することとした (資料 2)。

### D. 考察

本年度は、NIH Clinical Trial プロトコルや公表文献、MIATA プロジェクトガイドライン等に中心に調査を行った。これらの成果に基づいて、昨年作成したがんワクチンガイドライン素案に追記すべき内容として次のような要素が考えられた。

#### 1. ガイドライン作成に当たっての方向性

がんワクチンの対象として、ペプチドを長鎖ペプチドと単鎖ペプチドに分類して書き分けること。また単鎖ペプチドの役割は内在性のメモリー T 細胞の増幅能を期待している点、長鎖ペプチドやがん抗原免疫タンパク質を投与する場合には抗原提示細胞でのプロセッシングが期待されること。

#### 2. ガイダンス案作成のポイント

(非臨床)

・有効性を示唆するデータをモデル動物で実施することの困難さと局所認容性などの点。その中で、薬理試験については、HLA の構造は動物種差が大きく、薬理的活性発現メカニズムの観点から、適切な実験動物種は存在しないこと等に留意が必要。

・ 毒性試験については、合成ペプチドの場合には化学合成由来の不純物や意図しない化合物の混在による安全性リスクが懸念されることから、これを確認する上で動物試験も有用性への言及。

(臨床)

・ 投与方法

皮下、皮内、腫瘍内、リンパ節内など様々な投与方法が試みられている。投与部位/投与方法の説明(非臨床試験から)とその妥当性

・ 至適用量等

MTD や DLT についてはがんワクチンではこれまで殆ど報告されてこなかったことから、必ずしも MTD や DLT を明らかにすることは求めないこと。また、用量増加方法について従来の 3 + 3 用量を踏襲する必要がない点。

・ 投与スケジュール

長期にわたるワクチン投与(追加免疫の実施)も想定される。投与スケジュールの妥当性の説明。追加免疫では、異なるがんワクチンが投与されることもありうる。

・ 併用薬の記載

後述する免疫活性化薬、免疫抑制解除のための抗体/低分子薬; GM-CSF やインターロイキン 2 などの免疫活性化剤。抗 CTLA4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗腫瘍抗原抗体などの抗体医薬品の併用。シクロホスファミドや他の Treg 抑制抗がん剤。TGF- $\beta$  等に対するアンチセンスや siRNA などの核酸医薬。

・ 免疫応答性の評価

抗原特異的免疫応答性 (MIATA-P; テトラマーアッセイ、エリスポットアッセイ、フローサイトメトリ) の評価のポイントと抗原ペプチドが特製されない場合の対応について。

・ 免疫抑制状態の評価

評価方法: 標準抗原を用いた遅延型アナフィラキシー応答性、末梢血 Treg 細胞数、腫瘍内 Treg 細胞数、Treg 細胞のサブタイプの評価。

・ HLA

適合する HLA 型を有する被験者を対象とするのが一般的であるが、がん抗原タンパク質では HLA 型の特定が出来ないことが想定される。

同じ標的抗原であっても、被験者の HLA 型により選択すべきペプチドが異なる。治験を実施す

る際は、ペプチド 1 つ 1 つではなく血清 HLA グループ型毎 (例 A19 (A29、A30、A31、A32、A33、A74)) で計画するなど工夫が必要。

## E. 結論

1) NIH Clinical Trial に収載されているがんワクチンプロトコルやがんワクチンの臨床試験報告から、がんワクチンによって惹起される抗腫瘍免疫反応を評価するために複数の免疫評価指標が用いることが必要と考えられる。免疫応答性の評価では、がん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞やがん抗原特異的なヘルパー T 細胞数の解析、機能解析に加えて液性免疫応答性も評価されることが多い、また、がんによる免疫抑制反応からの解除を目指して抗体医薬や特定の抗がん剤が用いられており、患者の免疫抑制に関わる Treg 細胞数や免疫応答性の強さを評価する目的として遅延型アナフィラキシー応答性などが評価されている。またがワクチンの投与方法や投与スケジュール、投与量の設定がこれまでの抗がん剤の臨床試験とは異なっていることが明らかになった。2) がんワクチンでは従来の最大耐性投与量や毒性制限投与量の設定は不要な場合が多いと想定されるが、いくつかの臨床試験では MTD や DLT を主用評価項目や副次評価項目としているプロトコルもある。3) これらの成果に基づいて昨年作成したがんワクチンの評価ガイダンスの素案の再検討を行った。ガイダンスでは臨床初期に絞った記載とし、特に免疫応答に対する評価や投与量の設定などを中心に書き、臨床後期での有効性の評価については、他のがん治療と大きな差異はないと考えられるために簡略な記載とし、がんワクチン特有の留意点のみを記載することとした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Yamaguchi, H. Okuda, and T. Kawanishi, High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* 5, 5899-5902 (2013)
- 2) Itoh, S., Hiruta, Y., Ashii, N., Fujita, N., Natsuga, T., Hattori, T., Bandoc, A., Sekimoto, Y., Miyata, K., Namekawa, H., Mabuchi, K., Sakai, T., Shimahashi, H., Kawai, K., Yoden, H., Koyama, S., Odgaard Herr, S., Natsuka, S., Yamaguchi, T., Kawasaki, N.: Determination of Galactosamine

Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. Biologicals, in press

- 3) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. Chem. Pharm. Bull. 36, 176-181 (2013)
- 4) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 印刷中
- 5) 山口照英: バイオ医薬品の効率的製造に向けた世界動向と規制状況. BioIndustry, 30, 47-54 (2013)

## **G-2 学会発表**

- 1) Kishioka, Y, Sakurai, K, Yamaguchi, T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. APEC International Symposium **Soul Korea**, (2013)

## **H. 知的財産権の出願・登録状況**

- H-1 **特許取得** なし
- H-2 **実用新案登録** なし
- H-3 **その他** なし

図 1 製品群別のがんワクチンプロトコール数

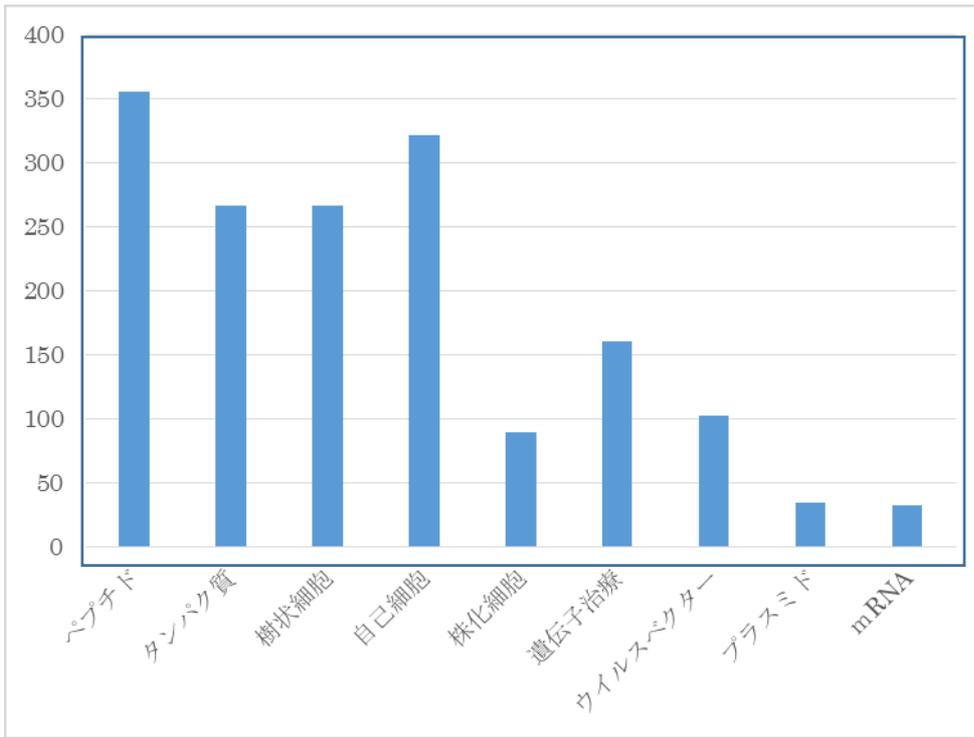


図 2 . Treg 細胞とその機能分子

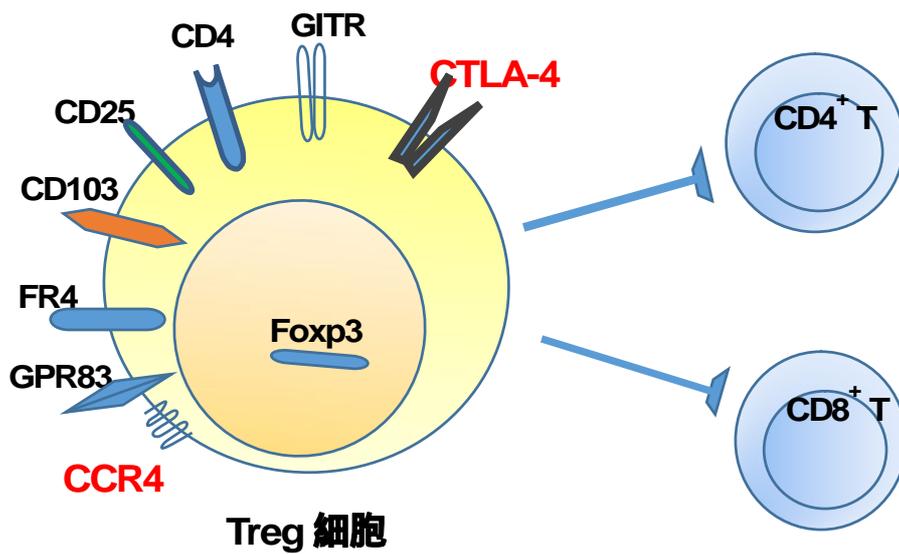


図3.樹状細胞のクロスプレゼンテーションとCTL活性化

