

201332006A

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)

肺癌に対するWT 1 ペプチド免疫療法の開発

(H23-実用化 (がん) 一般-006)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 杉山 治夫

平成26 (2014) 年 3月

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)

肺癌に対するWT 1 ペプチド免疫療法の開発

(H23-実用化 (がん) 一般-006)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 杉山 治夫

平成26 (2014) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発 ----- 1
杉山 治夫

II. 分担研究報告

1. 肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発 ----- 11
奥村明之進
2. 高齢者肺がんにおける術後補助療法に関する研究 ----- 13
坪井 正博
3. 病理病期I期非小細胞肺癌における組織学的血管浸潤による悪性度評価に
関する研究 ----- 17
池田 徳彦
4. 胸部薄切CT上スリガラス陰影を混じる腫瘍に対する縮小手術の妥当性に
関する研究 ----- 21
鈴木 健司
5. FDG-PET/CTを含む画像診断検査による肺癌の悪性度評価に関する観察研究 -----23
中山 治彦
6. 非小細胞肺癌術後補助療法に関する研究 ----- 25
多田 弘人
7. 非小細胞肺癌根治術後リンパ節再発に対する放射線治療に関する研究----- 27
東山 聖彦
8. 医師主導治験WT1抗原発現陽性の脈管侵襲を伴う病理病期IA期及びIB/II期
非小細胞肺癌完全切除例に対するWT4869のペプチド免疫療法の第I相試験に
おける症例登録適格例に関する研究 ----- 29
松村 晃秀
9. 肺癌切除標本を用いた肺癌の悪性度に関する免疫組織化学的研究 ----- 31
前田 元
10. 肺がんの集学的治療に関する研究 ----- 33
吉村 雅裕
11. WT1 がんワクチンの肺がん治療に関する研究 ----- 35
山下 素弘
12. 肺癌切除症例の予後を規定するバイオマーカーに関する研究 ----- 37
竹之山 光広
13. 肺癌術後補助療法としてのWT1ペプチド免疫療法に関する研究 ----- 41
吉田 純司
14. 肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発に関する研究 ----- 43
熊ノ郷 淳
15. 肺癌の治療効果評価における三次元的CT体積測定法の有用性に関する研究-- 45
富山 憲幸
16. 肺癌に対する WT1ペプチド免疫療法の開発に関する研究 ----- 49
坂本 純一

17. 肺癌術後補助療法としてのWT1ペプチド免疫療法の臨床統計解析 ----- 51
森田 智視

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 53

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 67

I. 総括研究報告

-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）
総括研究報告書

肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の開発

研究代表者 杉山 治夫 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

肺癌は年々増加している難治がんであり、この肺癌の治癒率を向上させるためには、作用機序が大きく異なる免疫療法の開発が必須である。本医師主導治験の目的は肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の有用性を確立することである。本治験では、病理学的に完全切除が確認された非小細胞肺癌で、HLA-A*24:02 を有し、肺癌細胞における WT1 タンパクの発現が確認されている患者に対して、WT1 ペプチドワクチンを、1 週間毎に 5 回、次に 2 週間毎に 4 回、さらに 4 週間毎に 10 回、1 年間にわたって計 19 回投与する WT1 ペプチドワクチン群とプラセボ群に 2:1 にランダム割付を行なう。主たる解析として、2 年間無再発生存割合を群ごとに推定すると共に、群間差の両側 90% 信頼区間を計算する。第 I 相部分である、WT1 ペプチド 3mg、6 人と 6mg、6 人の登録は終了した。今のところ、重大な副作用は見られていない。

研究分担者

奥村明之進 大阪大学 教授
坪井正博 横浜市立大学附属市民総合医療センター 准教授・部長
池田徳彦 東京医科大学 主任教授
鈴木健司 順天堂大学 教授
中山治彦 神奈川県立がんセンター 副院長
多田弘人 大阪市立総合医療センター 副院長
東山聖彦 大阪府立成人病センター 診療局長兼部長
松村晃秀 近畿中央胸部疾患センター 副院長
前田元 刀根山病院 部長
吉村雅裕 兵庫県立がんセンター 副院長 兼部長
山下素弘 四国がんセンター 部長
竹之山光広 九州がんセンター 医長
吉田純司 国立がん研究センター東病院 外来医長
熊ノ郷淳 大阪大学 教授

富山憲幸 大阪大学 教授
坂本純一 東海中央病院 病院長
森田智視 京都大学 教授

A. 研究目的

肺癌は、年々増加の一途をたどっており、手術適用にならない患者も多くみられ、手術が施行された患者においても、手術後、多くの患者が再発し、死に至る代表的な難治癌であり、肺癌の治療成績の向上が国民から切望されている。手術に加え、化学療法や放射線療法を併用し、既存の治療法の改良のみでは治療成績の飛躍的な向上は望みにくい。このような状況において、既存の治療法とはその作用機序の異なる免疫療法への期待が高まっている。近年免疫療法は、基礎免疫学の発展によってもたらされた科学的根拠にもとづいて構築できるようになったため、十分な臨床効果を期待しうるまでのレベルに到達してきた。免疫療法は、既存の治療法とはその殺細胞機序が異なり、他の治療法では不可能と考えられる静止期癌幹細胞を死滅させることができるので、免疫療法は、本来的には癌を完治させうるポテンシャルをもった治療法と考えられる。我々は、2001 年からトランスレーショナルリサーチとして、WT1 ペプチド免疫療法を 700 人以上の末期がん患者に実施し、本療法が、重篤な副作用を起

こさず、末期癌に対して臨床効果を発揮しうる治療法であることを明らかにしてきた。これらの実績から、難治性の高い肺癌に対しても臨床効果が期待されるものと考え、本研究が立案、計画された。本研究は、難治がんの一つである肺癌の術後補助療法としてのWT1ペプチドワクチン療法のfeasibility、有用性をランダム化第I/II相試験で評価するとともに、臨床第III相試験（治験）の実施可能性を検討することを目的とする。本研究は、厚生労働省の「健康長寿社会実現のためのライフ・イノベーションプロジェクト」の施策に合致するとともに、医師主導治験を経て、日本発の肺癌に対するWT1ペプチドワクチンの製薬化につながると思われる、厚生労働行政に大きく貢献するものと考えられる。

B. 研究方法

【研究形式】盲検的ランダム化第I・II相臨床試験。

主評価項目は、第I相は有害事象発生割合（安全性）、第II相で2年無再発生存割合

副次的評価項目は、1年無再発生存割合、無再発生存期間、全生存期間、有害事象発生割合、

【対象症例】患者選択規準のうち主なものは、次の通り。1) 脈管侵襲を伴う病理病期IA期、IB期およびII期非小細胞肺癌、2) 病理学的に完全切除が確認されている、3) 年齢：20歳以上、4) Performance status (ECOG) 0～1、5) 術後補助療法が未施行 6) HLA-A*24:02を有する、7) 肺癌細胞におけるWT1の発現、8) 主要臓器機能の保持、9) 患者本人からの文書による参加同意

【症例登録とランダム割付】

症例登録はデータセンターでの中央登録方式とする。第II相部ではデータセンターで、「A群: WT1ペプチドワクチン群」と「B群: プラセボ群」に2:1でランダムに割付けられる。ランダム割付に際し、1) 性別（男/女）、2) 年齢（70歳未満/70歳以上）、3) 病理病期（IA・IB・II期）、4) 施設で大きな偏りが生じないように、これらを割付調整因子とする最小化法を用いる。

【治療内容】

WT1ペプチドワクチンは、HLA-A*24:02用WT1ペプチドワクチン（WT4869）である。1回につき3mgまたは6mg/bodyを、両上腕伸側～腋窩に皮下注射する。3mgの場合は1ヵ所、6mgの場合は2ヶ所投与を行う。プラセボ群で用いる製剤は、WT1ペプチドを含まないペプチド溶解液とアジュバントとのエマルジョン製剤である。

治療開始日をDay1とし、Day365まで合計19回の投与を行う。Day29まで週1回投与。その後、Day85まで2週毎に投与を行い、以後、Day365まで4週毎に投与する。

第I相部でWT1ペプチド3mgを6例、6mgを6例に投与を行い忍容性ならびにWT1特異的免疫反応の誘導効率により推奨投与量を決定する。

第II相部では第I相で決定したWT1ペプチドの推奨投与量を用いて登録後割付けられた治療を開始する。治療法は、「A群: WT1ペプチドワクチン群」と「B群: プラセボ対象群」の2群でいずれも治療期間は1年間とする。プロトコール治療完了後、再発を認めるまで無治療で観察する。プロトコール治療中止後の治療、および再発後の後治療は規定しないが、試験薬であるWT1ペプチドワクチンの再投与は認めない。

【集積目標症例数】

対象とする症例において、術後補助療法なしで経過観察した場合の2年無再発生存割合は65%と見込まれ、これをA群の閾値2年無再発生存割合と設定する。これに対し臨床的に有用な再発予防効果をハザード比で0.75と仮定したとき、期待2年無再発生存割合は72%となる。 α エラー＝（片側）0.05、検出力＝80%のもと、登録期間2年、追跡期間2年で必要登録数を計算すると、試験治療群での最小必要症例数は140例と計算される。A群とB群との割付比を2:1にしたとき、試験全体での必要症例数は210例となる（B群は70例）。不適格例などを考慮して試験全体の目標登録数を225例[A群: WT1ペプチドワクチン群150例、B群: プラセボ対象群75例]と設定した。

なお、症例集積期間2年、最小追跡観察期間2年を予定する。

【実施施設・症例集積見込み】

第I相の症例登録は終了した。第II相部の症例集積見込みについてである

が、本臨床研究参加13施設における年間切除症例数は、少なめに見積もって約1560例ある。この内、病理病期が適格で、重複癌などの不適格例を除くと約20% (約280例) が一次同意取得可能と考えられる。その内HLAタイプとWT1の発現が適格である適格率は約50% (約140例) と想定される。最終同意取得率は適格症例中95%と見込み年間130例程度の集積可能となり、2年集積で約225例の患者登録は可能と判断する。

【研究実施体制】

臨床試験実施計画書は、研究代表者、研究事務局、統計解析責任者、臨床研究アドバイザー等の合議で作成し、実施に当たって各施設の倫理委員会またはIRBの承認を得る。症例集積は試験分担医師がそれぞれの施設から行う。研究登録、モニタリング等は、外部CRO (EPS社、ACメディカル社、ファイブリングス社) に依頼し、研究事務局がその状況を把握し、安全な研究の遂行に努める。予期せぬまたは重篤な有害事象については、第三者機関である効果安全評価委員会にて審査される。再発確認の画像は画像中央判定委員会中

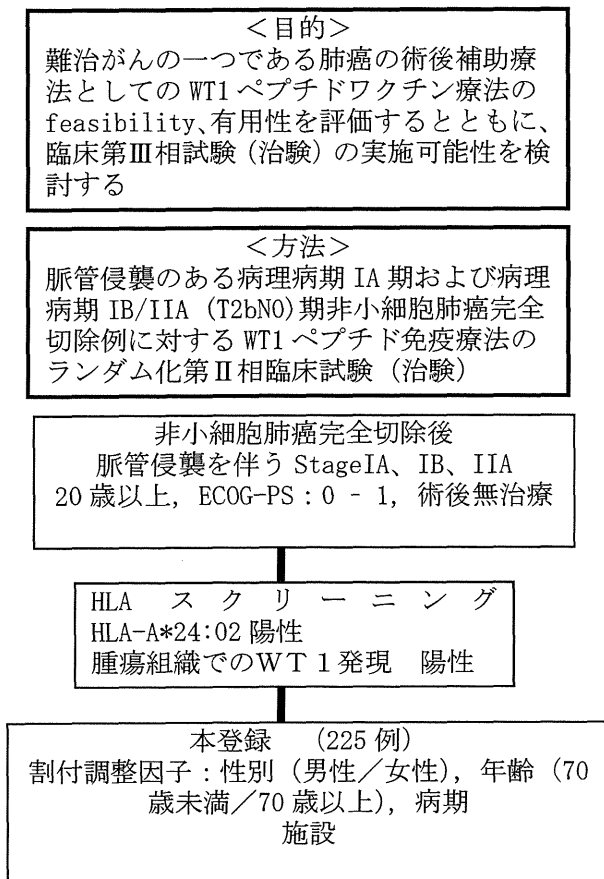
央判定する。統計解析に関しては統計解析責任者のもとで実施する。研究代表者が総括を行う。

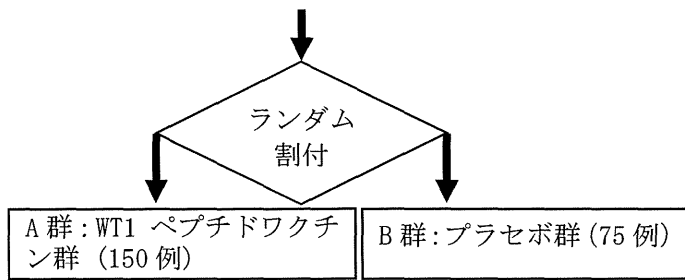
A群、B群共に治療開始日をDay1とする。
Day365まで1年間投与。
合計19回、投与する。
・Day29まで週1回の投与
・Day85まで2週毎に投与
・Day365まで4週毎に投与

(倫理面への配慮)

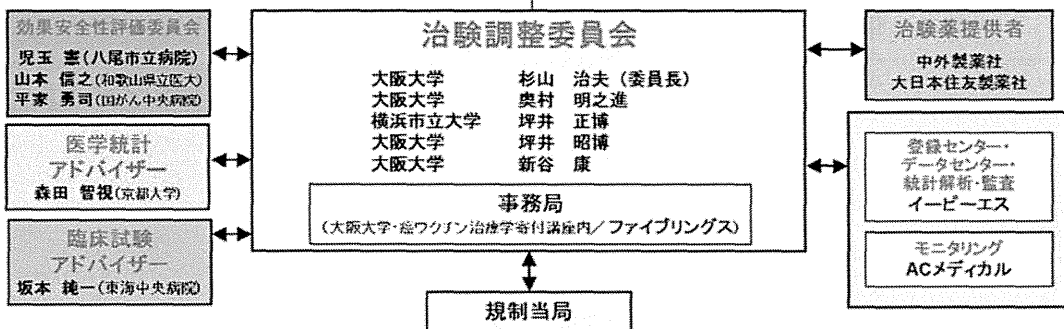
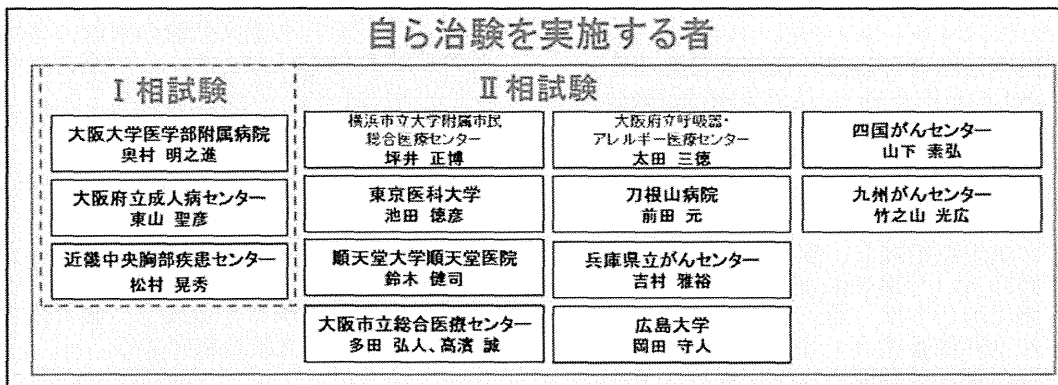
参加患者の安全性確保については、適格条件やプロトコール治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化される。また、「臨床研究に関する倫理指針」、「医薬品の臨床試験の実施の基準 (省令GCP)」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則に従い以下を遵守する。
1) 研究実施計画書のIRB承認が得られた施設のみから患者登録を行う。
2) すべての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得る。
3) データの取り扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報 (プライバシー) 保護を厳守する。

第I相試験の流れ図





- <期待される効果>
1. WT1 ペプチド免疫療法により術後肺癌の再発予防効果が得られる。
 2. 第Ⅲ相臨床治験への基盤の確立



C. 研究結果

1. 本研究課題の採択から、現在までの経過

平成 23 年 10 月 6 日 本研究課題が採択される。12 月 20 日 (独)医薬品医療機器総合機構(PDMA)との対面助言に向けた事前面談。平成 24 年 1 月 24 日 二度目の PMDA との事前面談。GCP に準拠した医師主導治験を実施するよう指示を受ける。6 月 1 日 PMDA の対面助言の申込。8 月 9 日 PMDA 対面助言。本医師主導治験が承認される。治験実施申請書(表1)及び SOP・手順書(表2)の作成。12 月 3 日 大阪大学医学部附属病院 IRB 承認。12 月 18 日 大阪大学医学部附属病院 PMDA に治験計画書を届け出。12 月 26 日 国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター IRB 申請。平成 25 年 1 月 11 日 IRB 承認。1 月 30 日 国立病院機構 近畿中央胸部疾患センターを追加した治験計画変更届書の PMDA への届け出。1 月 23 日 大阪府立成人病センター IRB 申請。3 月 4 日 IRB 承認。3 月 25 日 大阪府立成人病センター を追加した治験計画変更届書の PMDA への届け出。

第I相部はWT4869 3mg 6例、6mg 6例の計12例の予定であるが、平成26年3月5日時点で一次同意患者 36名。その内、病期、HLAタイピング、腫瘍組織でのWT1発現などの患者選択基準を満たし、除外基準に該当しない12例(3mg 6例、6mg 6例)が第I相試験に参加している。現時点いずれの投与量でもDLTやWT4869 の関与が否定できないNCI-CTC で Grade 3 以上の有害事象を認めていない。

2. WT1 タンパク免疫染色の中央診断化

大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座免疫造血制御研究室での WT1 免疫染色法を基にして、7か国12施設により WT1 タンパク免疫染色の国際標準化を行なった。WT1 発現判定にあたっては判定の客観性を担保するために施設外部の以下の病理医による中央診断判定委員会を設置した。

一迫 玲 (東北大学大学院医学系研究科・造血器病理学寄附講座・教授)
平岡 伸介 (国立がん研究センター研究所・分子病理分野・ユニット長)
森井 英一 (大阪大学大学院医学系研究科・病理学講座・教授)
鳥越 俊彦 (札幌医科大学・病理学第一講座・准教授)

3. 関連研究成果

- (1). 上皮間葉移行 EMT シグナルを制御することで肺癌を dormant な状態

に維持することができれば、外科治療や放射線治療といった局所制御、全身治療である抗癌剤に加える有用な癌治療法になると考えられる。線維芽細胞から分泌された液性因子によって癌細胞で EMT が誘導されることが明らかになった。炎症性サイトカインの中和抗体を用いて、炎症を抑制することで、EMT 誘導効果が阻害され、腫瘍悪性度が低下した

最近、EMT は免疫寛容に関係するといった報告が最近報告されている。我々の研究結果をふまえると、WT1 ペプチドなどの癌ワクチンに対して EMT がその効果に関与する可能性があり、EMT メカニズムを追求・制御することで、癌ワクチンの効果を高めることが期待できる。

- (2). I 期 (T1bN0, T2aN0) 非小細胞肺癌完全切除例に対しては、UFT による術後化学療法が推奨されているが、70 歳以上の高齢者においては、その有用性については十分に証明されたとは言い難い。一方、高齢者においては若年層に比べると毒性などから治療コンプライアンスが良好ではないことから、毒性を改善する方策もしくは毒性の少ない治療の開発が望まれる。毒性の面から UFT よりもペプチドワクチンなどによる免疫療法の介入は治療選択肢のひとつとして期待される。
- (3). WT1 ペプチドワクチン適格症例の概数を把握するため、当院における 2013 年 1 月から 12 月までの肺悪性手術手術例の臨床病理学的背景を検討した。1 年間の手術例 222 例中 15 例の患者から 1 次同意を得た。全例で WT1 発現が認められたが、HLA が適合したのは 15 例中 6 例で、うち 5 例から 2 次同意を得、ワクチン投与を開始した。肺癌切除症例の約 1/3 以上が今回の適格条件に適合するワクチン治療の候補で、1 次同意を得られたのは切除症例の 1/4 であった。
- (4). 肺癌術後再発症例の予後解析から、今後の WT1 がんワクチンの術後補助療法の対象症例では、driver mutation の検索が必要と考えられる。
- (5). 肺腫瘍は周囲を CT 濃度が大きく

- 異なる肺組織に囲まれているため、腫瘍の抽出（セグメンテーション）が容易であり、コンピュータ支援画像診断プログラムを用いることにより三次元的に体積を測定することができる。三次元的体積測定は、コンピュータを用いるため、測定者間の誤差が少なく、客観的に腫瘍全体の体積を測定できるため、腫瘍縮小効果の判定に大きく寄与できることが予想される。本研究では、非小細胞肺癌の治療効果判定に三次元的体積測定を応用し、RECISTと対比しながら、その有用性を検証する。この手法を確立し、WT1 がんワクチンによる肺癌の治療効果判定に応用する。
- (6). 肺がん術後の患者において3年以内の再発頻度が高く、術後経過観察方法では標準的方法の確立が求められる。がんワクチン治療においても、治療後綿密な経過観察とともに補完代替医療に関する患者・医療者間の情報共有が必要であると考えられる。
- (7). 上皮間葉移行 EMT シグナルを制御することで肺癌を dormant な状態に維持することができれば、外科治療や放射線治療といった局所制御、全身治療である抗癌剤に加える有用な癌治療法になると考えられる。線維芽細胞から分泌された液性因子によって癌細胞で EMT が誘導されることが明らかになった。炎症性サイトカインの中和抗体を用いて、炎症を抑制することで、EMT 誘導効果が阻害され、腫瘍悪性度が低下した。最近、EMT は免疫寛容に関係するといった報告が最近報告されている。我々の研究結果をふまえると、WT1 ペプチドなどの癌ワクチンに対して EMT がその効果に関与する可能性があり、EMT メカニズムを追求・制御することで、癌ワクチンの効果を高めることが期待できる。
- (8). 病理病期 I 期非小細胞肺癌完全切除例において、BVI 陽性は予後不良因子であった。各 T 因子における BVI 陽性例は、陰性例に比し予後不良な集団であり、BVI を考慮した病期分類を作成することがより予後を正確に反映しうると考えられた。さらにこのように BVI を有する予後不良な集団に対しては、術後補助療法も考慮すべきであると考えられた。
- (9). 胸部薄切 CT 上、solid 径の方が腫瘍最大径よりもリンパ節転移予測因子として有用である。さらに、solid 径だけでなく、GGO 成分の有無 (part-solid か pure-solid か) もリンパ節転移予測因子として有用であり、solid 径が同一であっても、pure-solid 腫瘍は part-solid 腫瘍よりもリンパ節転移の頻度が高いことが示唆された。
- (10). 肺野条件 CT での GGO 率と原発巣の SUVmax はともに臨床病期 I 期腺癌の悪性度を予測する有意な因子であった。この両者を組み合わせることで、臨床病期 I A 期腺癌の治療戦略に役立つ可能性がある。
- (11). 術後病期 2-3 期完全切除非小細胞肺癌に対する補助化学療法として、TS-1 vs CDDP+TS-1 の比較 2 層試験をおこなった。両群に重篤な合併症はなく、無再発生存でも統計学的有意差は認められなかった。遺伝子解析では UMPS のみが治療法との相関が得られた。
- (12). 非小細胞肺癌根治手術後の胸腔内リンパ節再発に対する放射線治療は安全で、しかも再発時無症状、リンパ節再発が single station 例では生存率の改善につながり、局所治療としての臨床的意義はみられる。
- (13). 小細胞肺癌 (SCLC) における接着分子の発現状態について検討し、pure SCLC と他の非小細胞癌成分を含む combined SCLC の相違点について検討した。pure SCLC は combined SCLC と比較して接着分子の発現が低く、発現パターンにも異常を多く認めた。
- (14). 単独では浸潤能を持たない A549 (肺胞上皮癌細胞) の浸潤には WI38 (肺線維芽細胞) の足場が必要と考えられた (癌-間質相互作用)。またその際の A549 の形状の変化も注目された (上皮間葉移行)。さらに、この現象には A549 由来の Necl-5 の発現が重要な働きを持つことが示唆された。本タンパク質は癌浸潤コントロ

ールのための有力な標的になりうると考えられた。

- (15). 本研究においては、原発性肺癌術後の予後因子となるバイオマーカー等を検討し、術後に免疫療法や抗癌剤療法を施行すべき症例の選択を行い、集学的治療により予後の改善を目指す。

D. 考察

平成25年6月3日から1例目の治験を開始し、平成26年2月28日に第I相部の予定集積人数に達した。最終参加患者が開始後第I相の観察期間である3ヵ月が経過するのが5月となる。第I相部終了後、安全性の評価、至適投与量の決定を速やかに行い、7月には第II相試験と開始する予定である。

E. 結論

平成25年度中に第I相部分の予定集積人数に達する事ができた。平成26年度は第I相終了後できるだけ速やかに第II相部に入る。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida S, Koido S, Takeda Y, Honma S, Kimita H, Takahara A, Morita S, Ito T, Morimoto S, Hara K, Tsuboi A, Oka Y, Yanagisawa S, Toyama Y, Ikegami M, Kitagawa T, Eguchi H, Wada H, Nagano H, Nakata J, Nakae Y, Hosen N, Oji Y, Tanaka T, Kawase I, Kumanogoh A, Sakamoto J, Doki Y, Mori M, Ohkusa T, Tajiri H, Sugiyama H. Wilms Tumor Gene 1 (WT1) Peptide-based Cancer Vaccine Combined With Gemcitabine for Patients With Advanced Pancreatic Cancer. J Immunother, in press.
- 2) Maeda T, Hosen N, Fukushima K, Tsuboi A, Morimoto S, Matsui T, Sata H, Fujita J, Hasegawa K, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Nakajima H, Fujiki F, Tatsumi N, Kondo T, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kanakura Y, Kumanogoh A and

Sugiyama H. Maintenance of complete remission after allogeneic stem cell transplantation in leukemia patients treated with Wilms tumor 1 peptide vaccine. Blood Cancer Journal, 3: e130, 2013.

- 3) Ueda Y, Mizutani C, Nannya Y, Kurokawa M, Kobayashi S, Takeuchi J, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kanakura Y, Niimi K, Sasaki K, Watanabe M, Emi N, Teramura M, Motoji T, Kida M, Usuki K, Takada S, Sakura T, Ito Y, Ohyashiki K, Ogawa H, Suzuki T, Ozawa K, Imai K, Kasai M, Hata T, Miyazaki Y, Morita Y, Kanamaru A, Matsuda A, Tohyama K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. Leuk Lymphoma, 54: 1450-1458, 2013.
- 4) Tachino S, Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Morimoto S, Lin Y, Tamanaka T, Kondo K, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Functional human Th17 clones with WT1-specific helper activity. Cancer Immunol Immunother, 62: 801-10, 2013.
- 5) Lin Y, Fujiki F, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tani S, Nakajima H, Tatsumi N, Morimoto S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. HLA-DPB1*05:01-restricted WT1332-specific TCR-transduced CD4(+) T lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a cytotoxicity against leukemia cells. J Immunother, 36:159-170, 2013.
- 6) Miyatake T, Ueda Y, Morimoto A, Enomoto T, Oka Y, Nishida S, Tsuboi A, Shirakata T, Oji Y, Hosen N, Aozasa K, Morita S, Sakamoto J, Sugiyama H, Kimura T. WT1 Peptide

Immunotherapy for Gynecologic Malignancies Resistant to Conventional Therapies: a Phase II trial. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139: 457-463, 2013.

- 7) Anguille S, Fujiki F, Smits EL, Oji Y, Lion E, Oka Y, Berneman ZN, Sugiyama H. Identification of a Wilms' tumor 1-derived immunogenic CD4(+) T-cell epitope that is recognized in the context of common Caucasian HLA-DR haplotypes. *Leukemia*, 27:748-750, 2013.

2. 学会発表

- 1) Hashii Y, Watanabe A, Tsuboi A, Oji Y, Hosen N, Miyamura T, Oka Y, Ozono K, Sugiyama H: Clinical study of WT1 peptide vaccination for pediatric leukemia after stem cell transplantation, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Hokkaido, Oct. 13, 2013.
- 2) Kobayashi S, Ueda Y, Kurokawa M, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kihara R, Emi N, Motoji T, Sasaki K, Usuki K, Ogawa H, Sakura T, Ohyashiki K, Ogawa K, Imai K, Miyazaki Y, Morita Y, Matsuda A, Toyama K, Kakumoto K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H: WT-1 expression level in BM is the great prognostic marker with Revised IPSS, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Hokkaido, Oct. 11, 2013.
- 3) Kondo A, Tamura H, Inokuchi K, Ogata K, Kakumoto K, Matsuda A, Tohyama K, Ueda Y, Kurokawa M, Takeuchi J, Shibayama H, Emi N, Motoji T, Miyazaki Y, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F: Prognostic impact of the IPSS-R and CD7 expression on myeloblasts in Japanese patients with MDS, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Hokkaido, Oct. 11,

2013.

- 4) Hahii Y, Hosen N, Miyamura T, Nishida S, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Ozono K, Sugiyama H: WT1 based immunotherapy after stem cell transplantation for pediatric hematological malignancy: Phase II clinical study, the 5th Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies, Nagoya, Aug. 24, 2013.
- 5) Oji Y, Tatsumi N, Fukuda M, Nakatsuka S, Fujiki F, Nakajima H, Hasegawa K, Nezu R, Morii E, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H: Oncogenic function of eEF2 in cancers and in vivo humoral and in vitro CTL responses against eEF2 protein, the 5th Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies, Nagoya, Aug. 24, 2013.
- 6) 藤木文博、林兪宏、勝原晶子、岡芳弘、坪井昭博、青山奈央、谷井里江、中島博子、森本創世子、保仙直毅、西田純幸、尾路祐介、熊ノ郷淳、杉山 治夫: HLA class II拘束性WT1由来ヘルパーペプチド特異的TCRを導入されたCD4⁺T細胞はヘルパー活性と細胞傷害活性を有する, the 5th Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies, Nagoya, Aug. 24, 2013.
- 7) Hosen N, Maeda T, Fukushima K, Morimoto S, Nakata J, Nakae Y, Nishida S, Tsuboi A, Kondo T, Kadowaki N, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kumanogoh A, Kanakura Y, Sugiyama H: Clinical trial of WT1 peptide vaccination post allo HSCT in patients with high risk for relapse, the 5th Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies, Nagoya, Aug. 24, 2013.
- 8) Nakae Y, Hosen N, Nakata J, Maeda T, Fukushima K, Morimoto S, Takashima S, Nakajima H, Fujiki F, Tastmi N, Nishida S, Tsuboi A,

Kondo T, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kumanogoh A, Kanakura Y, Sugiyama H: Wilms Tumor 1 (WT1) Peptide Vaccine as an Enhancer of Graft Versus Leukemia Effects, The 4th JSH International Symposium 2013, Ehime, 2013年5月24日 (国際学会)

- 9) Fujiki F, Lin Y, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tanii S, Nakajima H, Tatsumi N, Morimoto S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: HLA class II-restricted WT1-specific TCR-transduced CD4⁺ T cell Display a Helper Activity for WT1-specific CTL Induction and a Cytotoxicity Against Leukemia Cells, The 4th JSH International Symposium 2013, Ehime, 2013年5月24日 (国際学会)
- 10) Nakata J, Hosen N, Nakano K, Nshida S, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H: NK cells Have Potential to Eradicate Leukemia cells in vivo in the Absence of Adaptive Immunity in the MLL-ENL Model, The 4th JSH International Symposium 2013, Ehime, 2013年5月24日 (国際学会)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
特記すべきことなし

II. 分担研究報告

肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の開発

研究分担者 奥村 明之進 大阪大学 教授

研究要旨

癌を取り巻く間質や細胞は、腫瘍の微小環境に寄与し、腫瘍の進展に深く影響している。我々は、癌細胞とその微小環境との関わりを標的とした癌治療の開発を目的とした研究を進めてきた。中でも癌周囲の炎症に注目し、さまざまな炎症性サイトカインが肺癌腫瘍悪性度におよぼす影響を解析した。今後も引き続き、微小環境の制御とペプチドワクチンについての関連を解析していきたい。

A. 研究目的

上皮間葉移行 EMT シグナルを制御することで肺癌を dormant な状態に維持することができれば、外科治療や放射線治療といった局所制御、全身治療である抗癌剤に加える有用な癌治療法になると考えられる。本研究の目的は、癌微小環境を調節する EMT の関連シグナル分子を明らかにし、癌細胞の EMT を制御することであり、新たな癌治療の開発につながると考えている。とくに癌周囲の炎症性サイトカインを注意とした微小環境の変化が癌悪性に関連していると考えられる。

B. 研究方法

肺癌周囲の間質 tumor stroma を形成する微小環境に注目し、癌細胞と周囲の間質細胞や細胞外基質のクロストークを解析する。中でも、癌細胞の EMT 誘導・癌幹細胞様形質転換における線維芽細胞(Cancer associated fibroblast: CAF)と炎症細胞(Tumor associated macrophage: TAM や Lymphocyte)の役割を明らかにし、そのシグナル伝達経路を制御することで癌細胞の悪性化を抑制できるか検討する。

(倫理面への配慮) 術前に Informed Consent を得られた症例の肺癌切除標本から肺癌細胞、間質細胞を採取し、実験材料を得る。間質細胞を不死化して研究に用いることを院内で承認されており(当院臨床研究委員会へ「呼吸器外科手術で得られた新鮮切除標本を用いた不死化細胞株樹立」)、実際に蓄積しつつある。さらに市販の肺由来正常線維芽細胞を購入し、実験に用いた。

C. 研究結果

①肺癌細胞は、肺癌関連線維芽細胞株 CAF や肺由来正常線維芽細胞との共培養によって、上皮様形態から Spindle な細胞に変化し、

E-cadherin などの上皮系マーカーは減少し N-cadherin や Vimentin などの間葉系マーカーが上昇した。浸潤・転移能は上昇し、さらに抗癌剤や分子標的薬への耐性を獲得した。また足場非依存的培養により、sphere 形成能が高くなっていることがわかった。以上より、線維芽細胞から分泌された液性因子によって癌細胞で EMT が誘導されることが明らかになった。

②手術標本から腫瘍周囲の癌関連線維芽細胞 CAF を初代培養し、癌細胞株と共培養したところ、①と同様に EMT が誘導された。この現象は、同時期に初代培養で得られた正常肺線維芽細胞 NF の共培養よりも EMT 誘導が迅速であり、CAF から分泌される液性因子の方が、NF に比して EMT 誘導効果が強いことが示された。

③炎症性サイトカインの中和抗体を用いて、炎症を抑制することで、①②に関連した EMT 誘導効果が阻害され、腫瘍悪性度が低下した。

D. 考察

最近、EMT は免疫寛容に関係するといった報告が最近報告されている。我々の研究結果をふまえると、WT1 ペプチドなどの癌ワクチンに対して EMT がその効果に関与する可能性があり、EMT メカニズムを追求・制御することで、癌ワクチンの効果を高めることが期待できる。

E. 結論

従来の癌治療によって癌幹細胞様形質を維持または誘導する niche が誘導され、治療抵抗性を示す癌幹細胞が残存する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shintani Y, Funaki S, Nakagiri T,

Inoue M, Sawabata N, Minami M, Kadota Y, Okumura M., Experience with thoracoscopic resection for mediastinal mature teratoma: a retrospective analysis of 15 patients. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 16:441-444, 2013

2. Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M. Pulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer., *Ann Thorac Surg.*, 96:425-433, 2013

3. Funaki S, Sawabata N, Abulaiti A, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M., Significance of tumour vessel invasion in determining the morphology of isolated tumour cells in the pulmonary vein in non-small-cell lung cancer., *Eur J Cardiothorac Surg.* 43:1126-1130, 2013

2. 学会発表

1. Okumura M, Discussion on lung cancer – multi focal adenocarcinoma, European Society for Thoracic Surgeons (ESTS) Postgraduate course, Birmingham, 2013/5/26

2. Okumura M, Current status and outcome of surgical treatment for lung cancer and thymic epithelial tumors in Japan, 日露医学交流国際シンポジウム, Osaka, 2013/10/31-2013/11/1

3. Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M., Pulmonary fibroblasts increase EMT signaling and decrease sensitivity to chemotherapy in non-small cell lung cancer cells via TGF-beta and IL-6 signaling, The 15th World Conference on Lung Cancer, Sydney, 2013/10/27-2013/10/31

4. Funaki S, Sawabata N, Abulaiti A, T. Kawamura, T. Nakagiri, Y. Shintani,

M. Inoue, M. Minami, M. Okumura, In the new adenocarcinoma classification, histo-pathological finding-invasion-reflects the presence of isolated tumor cells, 27th European Association for Cardio-Thoracic Surgery, Vienna, 2013/10/5-2013/10/9

5. 新谷康, 木村亨, Abulimiti Abulaiti, 中桐伴行, 井上匡美, 澤端章好, 南正人, 奥村明之進, 癌幹細胞の微小環境 (niche) を標的とした肺癌治療の開発, 第 113 回日本外科学会総会, 福岡, 2013/4/11-2013/4/13

6. Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M. IL-6 enhances EMT signaling and decreases sensitivity to chemotherapy in non-small cell lung cancer cells, 第 72 回日本癌学会, 横浜, 2013/10/3-2013/10/5

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

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）
分担研究報告書

高齢者肺がんにおける術後補助療法に関する研究

研究分担者 坪井 正博

研究要旨 近年高齢化社会の到来により、70歳以上の高齢者、特に80歳以上の肺癌に対する手術例が急増しており、肺癌切除例の約半数を占めるに至っている。一方で、この集団に対する術後補助化学療法の報告は少ない。横浜市大外科治療学・呼吸器外科グループ関連施設内で集積したデータを用いて高齢者におけるI期術後補助療法の現状を調べるとともに、従来の臨床試験の成績と合わせて検討した。2005年から2007年の間に行われた肺癌完全切除例981例のうち、70歳以上のT1bN0, T2aN0, I期の高齢者は153例あり、テガフル・ウラシル配合剤(UFT)による術後化学療法実施率は26例(17%)であった。化学療法施行例のうち、1年以上の内服期間が得られた症例は、12例(治療例の46%)であり、食欲不振、体重減少を機に中止されていた。過去に報告されたUFTのI期肺腺癌に対する術後化学療法の臨床試験でも70歳以上の高齢者のコンプライアンスは有意に悪かった。70歳以上の高齢者の術後補助療法は、当該病期の予後を考慮すれば、毒性の面からUFTよりもペプチドワクチンなどによる免疫療法の介入、確立が期待される。

A. 研究目的

近年高齢化社会の到来により、70歳以上の高齢者、特に80歳以上の肺癌に対する手術例が急増している。日本胸部外科学会による2010年の集計では、肺癌手術例32801例のうち70歳以上の切除例が半数を占め、80歳以上の症例は全切除例の11.1%(3646例)と報告されている。しかし、高齢者の手術が増えている一方で、この集団に対する術後補助療法の報告は少ない。本研究では、70歳以上の高齢者I期非小細胞肺がんにおける術後補助化学療法の状況をretrospectiveに解析、検討する。

B. 研究方法

対象：2005年から2007年までの2年間で横浜市大外科治療学・呼吸器外科グループ関連施設内8施設

で行った原発性肺癌切除例981例中、肺葉切除以上の根治切除を施行し病理学的に完全切除が確認されたT1bN0, T2aN0のI期非小細胞肺癌の153例。

方法：術後化学療法施行群と非施行群を比較して、その予後、治療状況について検討を行った。

観察期間、統計分析：

すべての検討において、観察期間は再発症例では手術日から再発日までとし、無再発症例では最終無再発確認日までとした。再発日は画像上再発が確認された時点とした。統計学的検討はSPSSを使用した。生存率はKaplan-Meier法にて検討し、log-rank検定を使用した。さらに多変量解析ではCox proportional-hazardsモデルを使用した。P値は0.05未満をも

って有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究のプロトコールは施設の IRB 及び医療機関の長の承認を得た上で、実施した。

なお、本試験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言及び臨床研究に関する倫理指針に従って本試験を実施する。

C. 研究結果

平均年齢 75.6 歳。観察期間中央値は 68 ヶ月。組織型は腺癌 86 例、扁平上皮癌 49 例、大細胞癌 7 例、その他 11 例。T1b 58 例、T2a 92 例、不明 3 例であった。術後 5 年全生存割合 (OS) は、術後補助化学療法なし群の 66.8% に対し、化学療法あり群は 61.0% で、統計学的に有意差は認めなかった ($p=0.619$)。術後 5 年無再発生存割合 (DFS) は、化学療法なし群 55.8% に対し、化学療法あり群は 52.4% で、統計学的に有意差は認めなかった ($p=0.696$)。

D. 考察

ガイドラインでは、本研究の対象である T1bN0, T2aN0 の I 期非小細胞肺癌完全切除例に対して、UFT を推奨するあるいはやることを否定しない形で表記があるが、術後補助化学療法の実施率は、17% と低かった。病期本来の予後と毒性のバランスから、UFT による術後補助療法が実臨床において

は必ずしも積極的に受けいれられていない現状を反映していると思われる。予後に関する解析結果については、本研究は症例数が少なく、補助療法の適応が必ずしも一定でないことから、議論するに値しない。そこで、I 期肺腺がん完全切除例に対する UFT の術後補助化学療法臨床試験 (JLCRG study) の 70 歳未満と 70 歳以上の年齢別サブ解析に注目した。この研究では、UFT 治療群の全生存割合のハザード比は 70 歳未満で 0.77 (95% 信頼区間: 0.52-1.13) であるのに対し、70 歳以上の高齢者では 0.63 (95% 信頼区間: 0.35-1.10) とやや良好な結果であるものの統計学的有意差はなかったと報告されていた。本研究と同様、統計学的に有意差がないことから、70 歳以上の高齢者における UFT の術後化学療法の有用性は controversy と考えられる。一方、UFT 治療群の治療コンプライアンスについては、治療開始後 1 年、2 年のそれは、70 歳未満で 77.1%、64.1% であるのに対し、70 歳以上では 61.1%、49.4% であり、高齢者で有意に低かったことが報告され、本研究の解析同様、食欲不振などの毒性が治療継続に影響する可能性が示唆された。

E. 結論

I 期 (T1bN0, T2aN0) 非小細胞肺癌完全切除例に対しては、UFT に

よる術後化学療法が推奨されているが、70歳以上の高齢者においては、その有用性については十分に証明されたとは言い難い。一方、高齢者においては若年層に比べると毒性などから治療コンプライアンスが良好ではないことから、毒性を改善する方策もしくは毒性の少ない治療の開発が望まれる。毒性の面から UFT よりもペプチドワクチンなどによる免疫療法の介入は治療選択肢のひとつとして期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究に関する論文は、現在作成中である。

2. 学会発表

本研究の成果は、発表準備中である。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

1. 特許取得；なし

2. 実用新案登録；なし

3. その他

特記すべき事項なし。