

201332009A

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）

小児の肉腫や脳腫瘍等に対する
がんペプチドワクチン単剤療法の開発
に関する研究

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 中面 哲也

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 研究班構成員名簿 1
II. 平成 25 年度総括研究報告	
小児の肉腫や脳腫瘍等に対するがんペプチドワクチン単剤療法の開発 3
研究代表者 中面 哲也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表13
IV. 研究成果の刊行物・別刷15

I. 研究班構成員名簿

小児の肉腫や脳腫瘍等に対するがんペプチドワクチン単剤療法の開発
に関する研究班（平成 25 年度）

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	中面 哲也	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野	分野長
研究分担者	細野 亜古	国立がん研究センター東病院 小児腫瘍科 兼 中央病院 小児腫瘍科	医長
	金田 英秀	国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科	医員
	原 純一	大阪市立総合医療センター	副院長
	真部 淳	聖路加国際病院 小児科	医長
	木下 義晶	九州大学大学院医学研究院 小児外科分野	准教授
	塩田 曜子	国立成育医療研究センター 小児がんセンター血液腫瘍科	医員
	金森 豊	国立成育医療研究センター 臓器・運動器病態外科部外科	医長
	孝橋 賢一	九州大学病院 病理部	講師
	吉村 健一	神戸大学医学部附属病院 臨床研究推進センター	特命准教授
	佐藤 暁洋	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 臨床試験支援室	室長
研究協力者	河本 博	国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科	医員
	仁谷 千賀	大阪市立総合医療センター 小児血液腫瘍科	医長
	吉原 宏樹	聖路加国際病院 小児科	医員
	陳 基明	日本大学医学部 小児科学系小児科学分野	准教授
	小島 隆嗣	国立がん研究センター東病院 消化管内科	医員
	堀之内 秀仁	国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科	医員
	福谷 美紀	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 臨床試験支援室	
	長谷川 裕美	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 臨床試験支援室	
	大角 佳代子	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 臨床試験支援室	
	野村 尚吾	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 臨床試験支援室	
	吉田 浩二	オンコセラピー・サイエンス株式会社 安全性情報室	室長
	上田 恵一	塩野義製薬株式会社 グローバルプロジェクトマネジメント部	次長

Ⅱ. 平成 25 年度総括研究報告

小児の肉腫や脳腫瘍等に対するがんペプチドワクチン単剤療法の開発

研究代表者 中面哲也 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野長

研究要旨

小児がんの克服は国民的な課題である。集学的治療の発達により、その予後は劇的に改善してきた一方、発達途中の強力な治療による成長障害、二次がんなどの晩期合併症が問題視されている。また、依然3割程度は難治であり、現時点の治療開発は難治例の生存にあまり寄与していない。

本研究では、小児がんの中でも比較的对象も多く予後も不良な神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫を対象に、GCPに準じた臨床試験体制の下で、薬事承認につなげるためのペプチドワクチン療法の第I相の医師主導治験を実施する。神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫に高発現している3種類の抗原（KOC1、FOX1、KIF20A）由来のがんペプチドカクテルワクチン療法の医師主導治験を実施し、科学的エビデンスを創出することを目的としており、当該ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請までの道のりを一気に短縮することを目指している。

本研究の特色、独創的な点は、対象の小児がんにも最も効果が期待できる組み合わせとして、成人のがん患者に既に投与実績があり、企業が成人がんを対象に開発中である3種類の抗原ペプチドを選択して組み合わせたペプチドカクテルワクチンを用いる点であり、本治験で期待できる成果が得られた場合は、即座に企業治験に移行できる可能性が高い。

平成23年度は、当該臨床試験を治験で実施する手続きを進め、薬事戦略相談を行った。平成24年度は、追加を要求された非臨床試験の実施に時間がかかったものの、国立がん研究センターならびに大阪市立総合医療センターの倫理審査委員会に24年12月末に承認を得た後、25年1月初めに治験開始届を提出して、25年3月に症例登録を開始した。平成25年度は、聖路加国際病院も実施施設として追加し、治験開始が遅れた分を取り戻せるよう、迅速な症例登録により早期の症例登録終了を目指してきた。25年度内に計12例登録し、うちDLT評価対象の10例全例でDLT無が確認され、本治験の主要評価項目であるDLT評価の目的を達成して、症例登録が完了した。治験開始が遅れた分を迅速な症例登録でなんとか挽回できたと言える。平成26年度は、2例には投与を継続しながら、1年間経過を追跡するとともに、副次的評価項目である、有害事象、病勢制御割合、無増悪生存期間、全生存期間と、Proof of principleとしての、がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果、抗原発現と有効性の相関についても検討して、研究年度終了時には臨床試験の経過観察まで含めた研究総括を行い、十分な成果を報告できるよう努める。

研究分担者

細野 亜古	国立がん研究センター東病院 小児腫瘍科 医長 兼 国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科	金森 豊	国立成育医療研究センター 臓器・運動器病態外科部外科 医長
金田 英秀	国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科 医員	孝橋 賢一	九州大学病院 病理部 講師
原 純一	大阪市立総合医療センター 副院長	吉村 健一	神戸大学医学部附属病院 臨床研究推進センター 特任准教授
真部 淳	聖路加国際病院 小児科 医長	佐藤 暁洋	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 臨床試験支援室 室長
木下 義晶	九州大学大学院医学研究院 小児外科分野 准教授		
塩田 曜子	国立成育医療研究センター 小児がん センター血液腫瘍科 医員		

研究協力者

河本 博 国立がん研究センター中央病院
小児腫瘍科 医員

仁谷 千賀 大阪市立総合医療センター
小児血液腫瘍科 医長

吉原 宏樹 聖路加国際病院 小児科 医員

陳 基明 日本大学医学部
小児科学系小児科学分野 准教授

小島 隆嗣 国立がん研究センター東病院
消化管内科 医員

堀之内秀仁 国立がん研究センター中央病院
呼吸器内科 医員

福谷 美紀 国立がん研究センター 早期・探索臨床
研究センター 臨床試験支援室

長谷川裕美 国立がん研究センター 早期・探索臨床
研究センター 臨床試験支援室

大角佳代子 国立がん研究センター 早期・探索臨床
研究センター 臨床試験支援室

野村 尚吾 国立がん研究センター 早期・探索臨床
研究センター 臨床試験支援室

吉田 浩二 オンコセラピー・サイエンス株式会社
安全性情報室 室長

上田 恵一 塩野義製薬株式会社 グローバル
プロジェクトマネジメント部 次長

A. 研究目的

我々はglypican-3(GPC3)ペプチドワクチンの臨床第I相試験を先行して実施しているが、GPC3を発現する小児がんは、肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍などに限られており、適応患者数も限られている。そのため、本研究では小児がんの中でも比較的对象も多く予後も不良な神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫を対象に、GCPに準じた臨床試験体制の下で薬事承認につなげるためのペプチドワクチン療法の第I相の医師主導臨床試験を実施する。それらのがんに高発現している3種類の抗原(KOC1、FOXM1、KIF20A)由来のがんペプチドカクテルワクチン療法の医師主導治験を実施して科学的エビデンスを創出し、当該ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請の早期実現を目指している。

本研究の特色、独創的な点は、対象の小児がんに最も効果が期待できる組み合わせとして、成人のがん患者に既に投与実績があり、企業が成人がんを対象に開発中である3種類の抗原ペプチドを選択して組み合わせたペプチドカクテルワクチンを用いる点であり、本治験で期待できる成果が得られた場合は、即座に企業治験に移行できる可能性が高い。

平成23年度は、当該臨床試験を治験で実施する手続きを進めるとともに、2回の事前面談を経て、非臨床試験成績の充足性を主な相談事項として薬事戦略相談を行った。平成24年度は、追加を要求された非臨床試験の実施に予想以上に時間がかかったものの、研究計画書の内容検討を十分に行い、万全な治験実施体制を整えた。国立がん研究センター並びに大阪市立総合医療センターの倫理審査委員会に申請して、24年12月末に承認を得た後、25年1月初めに治験開始届を提出した。その後、PMDAからの照会事項に対応し、治験を開始できる許可を得た。医師主導治験実施計画書の改訂版を両倫理審査委員会に提出済みであり、25年2月末に承認され、3月に症例登録を開始した。また、国立がん研究センター東病院臨床開発センター内の治験薬GMP準拠のCell Processing Center (CPC) で、ペプチド製剤カクテルワクチン(NCCV Cocktail-1)、IFA製剤を作製して、品質を確認したのちに、各実施施設に搬送した。平成25年度は、聖路加国際病院も実施施設として追加し、治験開始が遅れた分を取り戻せるよう、迅速な症例登録により早期の症例登録終了を目指し、25年度終了時にはできる限りの成果を報告できるように努めることとした。

B. 研究方法

再発小児腫瘍を対象としたがんペプチドカクテルワクチン療法の第I相臨床試験医師主導治験

目的： 治癒の見込めない神経芽腫、Ewing肉腫ファミリー腫瘍、横紋筋肉腫、骨肉腫患者に対するがん抗原KOC1、FOXM1、KIF20A由来のがんペプチドカクテルワクチン(NCCV Cocktail-1)の有害事象を評価し、用量制限毒性(Dose limiting toxicity: DLT)発現割合から推奨用量を決定する。

ペプチドの選択： 免疫染色において、KOC1蛋白、FOXM1蛋白については、神経芽腫5例中5例、ユーイング肉腫5例中5例、横紋筋肉腫6例中6例、骨肉腫5例中5例、KIF20A蛋白については、神経芽腫5例中4例、ユーイング肉腫5例中5例、横紋筋肉腫6例中6例、骨肉腫5例中5例で発現を確認している。ほとんどの神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫にKOC1、FOXM1、KIF20A蛋白発現が確認されることから、これらの症例に対して上記3種類の抗原蛋白由来ペプチドワクチン療法開発が可能と判断した。

試験対象： 治癒の見込めない、再発神経芽腫、ユーング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫患者

主要評価項目： 週に1回で4回接種する期間の用量制限毒性（DLT）の発現

副次的評価項目： 有害事象、病勢制御割合、無増悪生存期間、全生存期間

Proof of principle： がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果、抗原発現と有効性の相関

投与量と試験デザイン：

用量レベル	体重 20kg 未満	体重 20kg 以上
レベル 1	0.5 ml	1 ml
レベル 0	0.25 ml	0.5 ml

（1 ml中に各ペプチドワクチンが2 mgずつ配合されている3ペプチド配合剤を使用する）

各ペプチド2 mgを基本とする体重調整投与量で開始して本用量での安全性及び実施可能性を評価し、本用量で問題があると判断された場合に限り1レベル下（用量レベル0）で、過小な量とならない範囲と考えられる各ペプチド1 mgを基本とする体重調整投与量での安全性及び実施可能性を評価する。

治療方法： NCCV Cocktail-1は7日（±1日）毎に投与し、「プロトコール治療中止規準」に該当しない限り、最大1年間投与を継続する。9週以降については、寛解維持されているもしくは寛解に入っている場合は14日（±2日）毎の投与を許容する。

試験実施施設と研究分担者の役割： 臨床試験：国立がん研究センター東病院（細野）、国立がん研究センター中央病院（金田、研究協力者：河本）、大阪市立総合医療センター（原、研究協力者：仁谷）の3施設で実施。25年度から聖路加国際病院（真部、研究協力者：吉原）も実施施設に追加。九州大学病院（木下）、国立成育医療研究センター（塩田、金森）は実施可能性を検討するとともに本臨床試験への登録等に協力する。がん抗原の発現の検査：九州大学（孝橋）。製剤の作成・提供、非臨床試験、免疫学的解析：国立がん研究センター（中面）。症例数算定・試験デザイン、疫学・生物統計（吉村、研究協力者：野村）。GCP試験の体制整備（佐藤、研究協力者：福谷、長谷川、大角）。

予定登録数と試験期間： 本臨床試験全体で10例ないし20例とする。登録期間1年、追跡期間1年。

〔倫理面への配慮〕

GCPの遵守

本治験は本治験実施計画書、薬事法第14条第3項および第80条の2の規定ならびに平成9年3月27日付厚生省令第28号、平成15年6月12日付厚生労働省令第106号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令」（改正GCP）、平成15年6月12日付医薬発第0612001号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令の施行について」および平成16年7月22日付薬食審査発第0722014号「医薬品の臨床試験の実施の基準の運用について」を遵守し、医師主導治験として実施する。実施に際しては、ヘルシンキ宣言の倫理的原則を遵守して、被験者の人権、福祉および安全を最大限に確保する。

治験審査委員会（IRB）

本治験は各実施医療機関が設置した治験審査委員会において審査され、承認された後に実施する。また、本治験実施中においては、年に1回または治験審査委員会の求めに応じてそれ以上の頻度で、治験の継続の可否について審査を受ける。

治験計画の届け出

本治験においては、各実施医療機関の長が治験審査委員会の意見に基づいて治験の実施を了承した後に、薬事法第80条の2に基づき各実施医療機関の治験責任医師が“自ら治験を実施する者”として連名で厚生労働大臣に治験の計画を届け出た上で実施する。

被験者の同意

治験責任医師は、治験への参加の同意を得るために用いる同意・説明文書およびその他の説明文書を作成する。これらの文書の使用にあたっては、あらかじめ治験審査委員会の承認を得る。なお、原則として小児の被験者から法的に定められた同意を得ることはできないため、代諾者（親権者または後見人）より同意を得ることとするが、可能な限り被験者本人からもアセントを取得する。

被験者のプライバシー保護

被験者のプライバシー保護の観点から、本治験中は全てのデータを被験者識別コードのみで特定する。データは解析の全過程においても同様にマスクして処理する。尚、本治験への登録に際しては被験者識別コードにより症例を特定し、登録後は登録センターより割り振られた症例番号で特定する。

治験責任医師／治験分担医師は、原資料等の直接閲覧または治験成績の公表があること、および直接閲覧または治験成績の公表により被験者のプライバシーが侵されることはないことを、あらかじめ被験者または代諾者に説明し、同意を得る。

安全性情報の管理と提供

本治験に用いる全ての薬剤（ペプチド）の安全性等に関する新たな情報を得た場合、治験調整医師は必要に応じて他の実施医療機関の治験責任医師に文書にて報告する。必要な場合には、治験責任医師から当該実施医療機関の長にも文書にて報告する。国内および海外治験における安全性情報については、委託先のCROと治験実施企業とが密な連携をとり迅速な情報共有を行う体制が構築済みである。

重篤な有害事象が発生した場合の措置

治験責任医師／治験分担医師は、有害事象を認めた場合、被験者のリスクを最低限にするよう、速やかに適切な診断と処置を行う。同時に下記に該当する重篤な有害事象と判断した場合には速やかに当該実施医療機関の長および治験調整医師に文書を用いて報告する。治験調整医師は情報を入手後、すみやかに他の治験責任医師ならびに治験薬提供者に報告する。また、薬事法施行規則第273条に基づき、厚生労働大臣への報告の必要性を判断する。

当該治験責任医師／治験分担医師は、試験の継続等について当該実施機関の治験審査委員会の意見に基づき、当該実施医療機関の長の指示を受ける。また、発現した有害事象については可能な限り追跡調査を行い、必要な場合には追加報告書を治験調整医師に報告し、治験調整医師は初回報告と同様に扱う。

治験調整医師および各治験責任医師は、効果安全性評価委員会に対し、重篤な有害事象の報告を行うと共に、治療の継続、変更または中止について諮問できる。

健康被害に関する補償

本試験に起因して患者に健康被害が生じた場合には、実施医療機関は当該実施医療機関に法的責任がなくとも「健康被害の補償に関する手順書」に従って補償を行う。本試験における補償の内容は医療の提供とし、医療費、医療手当、補償金の支払いは行わない。補償原則は患者の損害賠償請求権の行使を妨げるものではない。健康被害が治験薬および治験目的のために実施計画書で使用することが定められた薬剤投与によるもの、または実施計画書に定

められた臨床上の介入、または手順によるものであり、患者が治験に参加していなければ起きなかったと判断されるものであれば、その蓋然性も考慮の上、補償する。

さらに動物実験に際しては、施設の動物実験指針を遵守し、動物愛護にも留意して研究を遂行するよう努める。

C. 研究結果

平成 23 年度の結果

当初の研究計画では「予後も比較的不良な神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫などを対象に、研究機関・企業が知財を有する GMP グレードのペプチドワクチンを用いて、GCP に準じた臨床試験体制の下で、薬事承認につなげるための第 I 相の医師主導臨床試験を実施する。治験での実施を目指して戦略薬事相談を行い、当該臨床試験を治験ないしは高度医療評価制度で実施する手続きを進める。」としていたが、本事業では治験での実施を目指して薬事戦略相談を行うことが義務付けられた。23 年度は、骨肉腫においても免疫染色において KOC1、FOXM1、KIF20A 抗原蛋白の発現を確認し、対象を神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫の 4 疾患にした。KOC1、FOXM1、KIF20A 由来の HLA-A24 結合性の 3 種類の Good Manufacturing Practice (GMP) グレードのペプチドを米国 PolyPeptide Laboratories 社に作製を依頼し、薬監証明を取得して輸入した。当院の治験薬 GMP 準拠の Cell processing center (CPC) 内でペプチド製剤、IFA 製剤を作製する方針を決定し、様々な検討、手順書の作成等により、治験薬として実施施設に提供できる準備を整えた。また、当該臨床試験を治験で実施する手続きを進めるとともに、2 回の事前面談を経て、非臨床試験成績の充足性を主な相談事項として薬事戦略相談を行った。

平成 24 年度の結果

1. 平成 24 年 6 月 10 日に 24 年度第 1 回班会議を開催した。23 年度の経過と PMDA との薬事戦略相談について概要を報告し、不足している非臨床試験について確認するとともに、研究実施計画書についての様々な細かい点まで討論を行って、修正すべき点、追記すべき点を確認した。
2. PMDA との薬事戦略相談において追加を要求された非臨床試験（FOX M1 由来ペプチドのラット

を用いた4週間反復皮下投与GLP毒性試験)を実施して、毒性所見の有無を評価したところ、明らかな毒性所見を示さなかった。この非臨床試験の実施に予想以上に時間がかかったものの、研究計画書の内容検討を十分に行い、各実施施設において治験開始に向けた実施体制の整備を進めた。

3. 平成24年10月18日に24年度第2回班会議を開催し、治験実施計画書の修正点、実施体制等について討論し、計画書最新版を国立がん研究センターならびに大阪市立総合医療センターのIRBに申請した。12月末に両センターでの承認を得て、25年1月8日に治験開始届を提出した。
4. 3種類のGMPグレードのペプチドは、一旦、試験研究目的で薬監証明を取得して輸入していたため、平成25年1月8日に使用目的を臨床試験用に変更する旨の転用願書を厚生労働大臣宛で関東厚生局に提出した。
5. 当院の治験薬GMP準拠のCPC内で、ペプチド製剤カクテルワクチン(NCCV Cocktail-1)、IFA製剤を作製して、品質を確認したのちに、各実施施設に搬送した。
6. 治験開始届提出後、PMDAからの照会事項に回答し、平成25年2月に治験を開始できる許可を得た。それに伴い適宜修正した治験実施計画書を研究計画書改訂として国立がん研究センターならびに大阪市立総合医療センターのIRBに申請し、いずれも2月末に承認された。それらの申請と並行して25年1月31日に第3回班会議としてKick-off meetingを開催し、実施体制を整えた。25年3月6日から症例登録を開始した。

平成25年度の結果

平成25年度は、聖路加国際病院も実施施設として追加して早期の症例登録終了を目指した。国立がん研究センター中央病院7例、同東病院1例、大阪市立総合医療センター4例の計12例が登録された。PMDAから要求された最初の2例は16才以上という要件も満たし、患者の年齢は7才～32才、平均は18.0才であった。がん種は、神経芽腫3例、ユーイング肉腫2例、横紋筋肉腫5例、骨肉腫2例で、4つのがん種とも登録できた。うちDLT評価対象の10例全例でDLT無が確認され、本治験の主要評価項目であるDLT評価の目的を達成し、登録が完了した。治験開始が遅れた分を迅速な症例登録でなんとか挽回できたと言える。しかし、経過観察期間1年であり、現在も2

例の患者にはペプチドワクチン投与継続中であることから、25年度内に完了しない見込みとなった。26年度は、2例には投与を継続しながら、1年間経過を追跡するとともに、副次的評価項目である、有害事象、病勢制御割合、無増悪生存期間、全生存期間と、Proof of principleとしての、がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果、抗原発現と有効性の相関についても検討して、研究年度終了時には臨床試験の経過観察まで含めた研究総括を行い、十分な成果を報告できるよう努める。

現時点では、RECISTでの評価は、SD3例、NE2例、PD5例となっており、評価できた8例中4例に、KOC1、FOXM1、KIF20A蛋白由来ペプチド3種類のうちのいずれか1種類以上のがん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果が認められた。KOC1、FOXM1、KIF20A蛋白3種類の抗原の発現は、評価できた6例中4例、5例、5例で認められ、いずれか1種類以上の抗原の発現は6例全例において認められた。一方、HLA class Iの発現は6例中2例に認められた。

D. 考察

DLT評価対象の10例全例でDLT無が確認され、医師主導治験としてのPhase Iの主な目的である安全性を示すことができ、今後、Phase IIに進む足がかりはできた。今のところ、今回のような進行小児がん患者を対象とした場合、ペプチドワクチンの投与回数が限られたものになってしまう患者も多く、わずか10例とはいえ、劇的な臨床効果や、満足のいくがん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果が認められているとは言い難い状況である。Phase IIは、今回と同じ進行小児がん患者よりは、再発の危険性が高い2回目以降の寛解状態の患者を対象として、再発予防を目的とした試験を実施した方がよいのではないかという意見が多い。Phase IIについては、今後1年間経過を追跡して、副次的評価項目である、有害事象、病勢制御割合、無増悪生存期間、全生存期間と、Proof of principleとしての、がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果、抗原発現と有効性の相関についても検証し、Phase Iの最終的な評価を行った上で改めて検討する。企業側も加えて議論を行い、対象症例をどう設定するかを含めて適切なPhase IIのデザインを決めたいと考えている。

小児がんは70～80%の症例で治癒が見込めるようになったが、手術や放射線、化学療法などによる

従来型の集学的治療のみでは 20～30%が原病死する。また治癒した小児の中には、放射線、化学療法などによる様々な晩期障害に苦しんでいる例も少なくない。このような難治性の小児腫瘍に対する有効な治療手段の確立は急務である。最近脚光を浴びている分子標的治療薬は高額であり、医療費の高騰を招き財政を圧迫しているばかりでなく、新たな有害事象の発生や無効例も多いことが問題であるが、免疫療法はこれらの諸問題を克服できる新規治療法となりうる可能性がある。未来を担う小児を一人でも多く救済できる治療を開発することは、福祉を超えた意義をもつ重要な仕事であると考えられる。投与局所の発赤腫脹以外には主だった有害事象のないワクチンの治療薬としての有効性が証明できれば、抗がん剤治療に頼ってきたがん治療を変え、患者の生活の質（QOL）の改善にとっても大きな役割を果たすものと考えている。

本研究で実施する臨床試験では、企業が成人がんを対象に開発中である3種類の抗原ペプチドを選択して組み合わせたペプチドカクテルワクチンを用いるため、本試験で期待できる成果が得られた場合は即座に企業治験に移行できる可能性が高い。

本研究により、質の高い臨床試験の遂行による科学的エビデンスの創出が実現し、小児がんにおけるがんペプチドワクチンの迅速な創薬化が加速し、がん患者の QOL・予後の改善、医療費の削減など保健医療への多大な貢献が期待される。

E. 結論

小児がんの中でも比較的对象も多く予後も不良な神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫を対象に、それらががんを高発現している3種類の抗原（KOC1、FOX1、KIF20A）由来のがんペプチドカクテルワクチン療法の科学的エビデンスを創出することを目的として、GCPに準じた臨床試験体制の下で、薬事承認につなげるためのペプチドワクチン療法の第 I 相の医師主導治験を実施している。平成25年度内に計12例登録し、うちDLT評価対象の10例全例でDLT無が確認され、本試験の主要評価項目であるDLT評価の目的を達成して、症例登録が完了した。治験開始が遅れた分を迅速な症例登録でなんとか挽回できたと言える。平成26年度は、2例には投与を継続しながら、1年間経過を追跡するとともに、副次的評価項目である、有害事象、病勢制御割合、無増悪生存期間、全生存期間と、Proof of

principleとしての、がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果、抗原発現と有効性の相関についても検討して、研究年度終了時には臨床試験の経過観察まで含めた研究総括を行い、十分な成果を報告できるよう努める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nobuoka D, Yoshikawa T, Takahashi M, Iwama T, Horie K, Shimomura M, Suzuki S, Sakemura N, Nakatsugawa M, Sadamori H, Yagi T, Fujiwara T, Nakatsura T. Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 62 (4):639-652, 2013.
- 2) Sawada Y, Yoshikawa T, Fujii S, Mitsunaga S, Nobuoka D, Mizuno S, Takahashi M, Yamauchi C, Endo I, Nakatsura T. Remarkable tumor lysis in a hepatocellular carcinoma patient immediately following glypican-3-derived peptide vaccination: An autopsy case. *Human Vaccines and Immunotherapeutics.* 9(6):1228-1233, 2013.
- 3) Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Sawada Y, Sakai M, Shirakawa H, Nobuoka D, Nakatsura T. Analysis of cytotoxic T lymphocytes from a patient with hepatocellular carcinoma who showed a clinical response to vaccination with a glypican-3-derived peptide. *Int. J. Oncol.* 43(4):1019-1026, 2013.
- 4) Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Significant clinical response of progressive recurrent ovarian clear cell carcinoma to glypican-3-derived peptide vaccine therapy: Two case reports. *Human Vaccines and Immunotherapeutics.* 10(2):1-8, 2014.
- 5) Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, Nakatsura T. Identification of

- HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 31(3):1051-1058, 2014.
- 6) Kohashi K, Nakatsura T, Kinoshita Y, Yamamoto H, Yamada Y, Tajiri T, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression. *Hum. Pathol.* 44(4):526-533, 2013.
- 7) 大藤和也、中面哲也、特集 変貌するがん免疫療法 ペプチドカクテルワクチン療法、腫瘍内科 12(2):122-129, 2013.
- 8) 澤田雄、中面哲也、第1部 第1章 腫瘍免疫における免疫担当細胞と免疫分子の役割 6. 腫瘍抗原の分類と抗原特異的免疫療法の免疫学的評価法、*実験医学 (増刊号)* 31(12):66-71, 2013.
- 9) 大藤和也、中面哲也、トピックス 2. 肝癌のワクチン療法、*コンセンサス癌治療* 12(2):114-116, 2013.
- 5) 小児がんに対するペプチドワクチン、中面哲也 ワークショップ「がんペプチドワクチン療法の臨床試験」、第11回日本臨床腫瘍学会学術集会 (仙台)、2013年8月29日～31日
- 6) 肝細胞がん小児がんに対するペプチドワクチン療法の開発、中面哲也 コアシンポジウム がんペプチドワクチン療法の最近の進歩と臨床応用の展望、第72回日本癌学会 (横浜)、2013年10月3日～5日
- 7) Glypican-3ペプチドワクチン投与によって誘導されたペプチド特異的CTLの腫瘍内浸潤の証明、吉川聡明、下村真菜美、酒井麻友子、大藤和也、高橋真理、澤田雄、信岡大輔、中面哲也 第72回日本癌学会 (横浜)、2013年10月3日～5日
- 8) 肝細胞がんに対する γ δ T細胞の細胞傷害性はゾレドロン酸処理で増強する、須貝詩織、吉川聡明、下村真菜美、中面哲也 第72回日本癌学会 (横浜)、2013年10月3日～5日
- 9) リンパ球減少誘導後のホメオスタティック プロリファレーションを利用した癌抗原特異的免疫療法の増強を目指した検討、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、中面哲也 第72回日本癌学会 (横浜)、2013年10月3日～5日
- 10) Possibility of immunotherapy Targeting EGFR T790M Mutation for EGFR TKI-resistant Non-Small Cell Lung Cancer. Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Sakai M, Shimomura M, Yamada T, Sasada T, Nakatsura T. The International Symposium on Immunotherapy (London), October 11-12, 2013
- 11) Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy combined with Chemotherapy against Progressive Ovarian Clear Cell Carcinoma. Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. The International Symposium on Immunotherapy(London), October 11-12, 2013
- 12) 癌ペプチドワクチンの展望：企業治験と医師主導臨床治験、中面哲也 シンポジウム、第26回日本バイオセラピー学会 (盛岡)、2013年12月5日～6日
- 13) 非小細胞肺癌におけるEGFR-TKIに対する耐性獲得変異EGFR T790M由来抗原の免疫原性の評価、大藤和也、吉川聡明、下村真菜美、多田好孝、

酒井麻友子、中面哲也 第26回日本バイオセラピー学会（盛岡）、2013年12月5日～6日

- 14) CTLおよび γ δ T細胞の細胞移入療法と効果増強を目指した検討、粕谷匡史、下村真菜美、多田好孝、吉川聡明、安部良、中面哲也 第26回日本バイオセラピー学会（盛岡）、2013年12月5日～6日
- 15) 放射線治療との融合も期待される最近のがん免疫療法の進歩、中面哲也 第5回日本放射線外科学会（高崎）、2014年1月18日
- 16) 卵巣明細胞腺癌に対するGlypican-3ペプチドワクチン療法の臨床的・免疫学的検討～臨床的寛解が得られた症例に対するAdjuvant therapyに関して～、鈴木史朗、柴田清住、中面哲也 第11回日本免疫治療学研究会学術集会（東京）、2014年2月22日
- 17) Analysis of glypican-3 peptide specific cytotoxic T lymphocyte clones established from patients vaccinated with peptide and development of combination therapy of anti-FITC CAR T cells together with FITC-labeled antitumor Abs. Nakatsura T. The 17th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference: Chimeric Antigen Receptor T Cells for Cancer Therapy(Washington D.C.), March 6, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

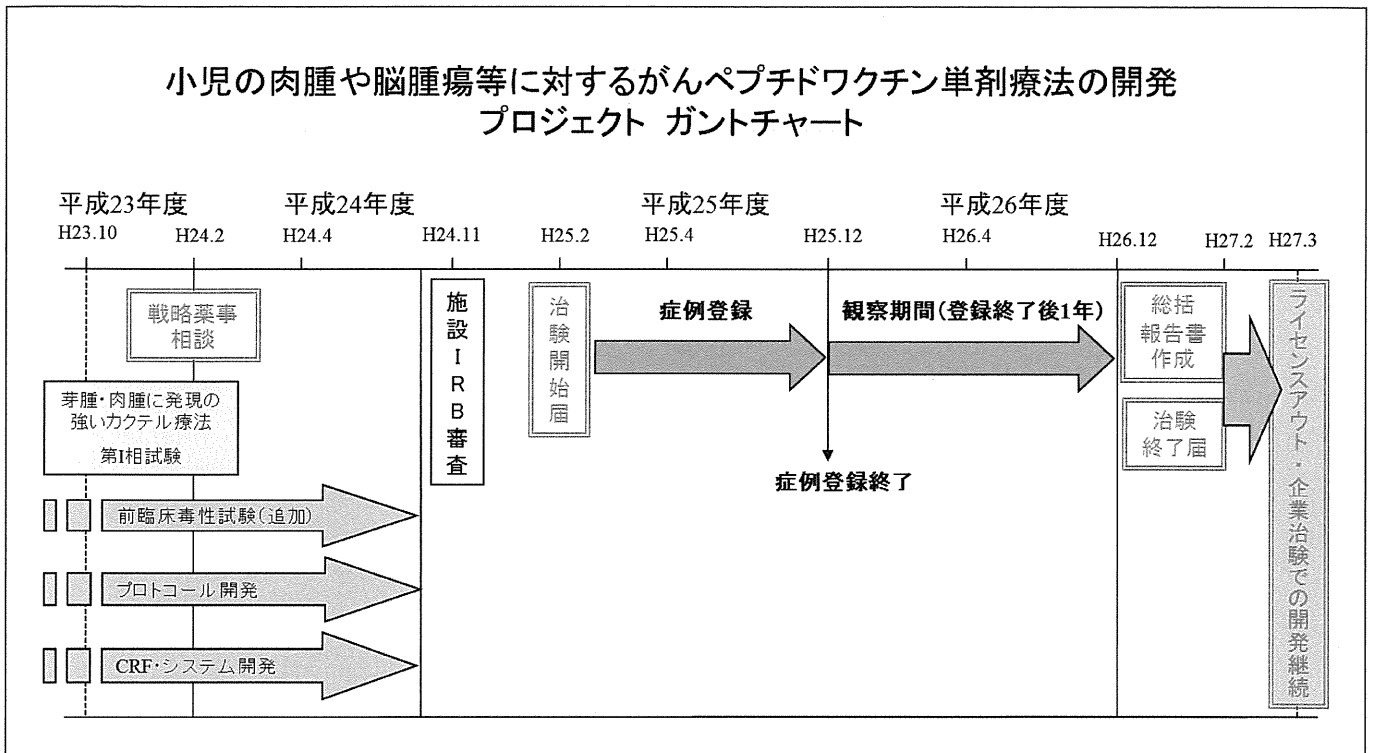
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究の概要図



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nobuoka D, Yoshikawa T, Takahashi M, Iwama T, Horie K, Shimomura M, Suzuki S, Sakemura N, Nakatsugawa M, Sadamori H, Yagi T, Fujiwara T, <u>Nakatsura T.</u>	Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy.	Cancer Immunol Immunother.	62 (4)	639-652	2013
Sawada Y, Yoshikawa T, Fujii S, Mitsunaga S, Nobuoka D, Mizuno S, Takahashi M, Yamauchi C, Endo I, <u>Nakatsura T.</u>	Remarkable tumor lysis in a hepatocellular carcinoma patient immediately following glypican-3-derived peptide vaccination: An autopsy case.	Human Vaccines and Immunotherapeutics.	9(6)	1228-1233	2013
Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Sawada Y, Sakai M, Shirakawa H, Nobuoka D, <u>Nakatsura T.</u>	Analysis of cytotoxic T lymphocytes from a patient with hepatocellular carcinoma who showed a clinical response to vaccination with a glypican-3-derived peptide.	Int. J. Oncol.	43(4)	1019-1026	2013
Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, <u>Nakatsura T.</u>	Significant clinical response of progressive recurrent ovarian clear cell carcinoma to glypican-3-derived peptide vaccine therapy: Two case reports.	Human Vaccines and Immunotherapeutics.	10(2)	1-8	2014
Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, <u>Nakatsura T.</u>	Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer.	Oncol. Rep.	31(3)	1051-1058	2014
<u>Kohashi K, Nakatsura T, Kinoshita Y,</u> Yamamoto H, Yamada Y, Tajiri T, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y.	Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression.	Hum. Pathol.	44(4)	526-533	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大藤和也、 <u>中面哲也</u>	特集 変貌するがん免疫療法 ペプチドカクテルワクチン療法	腫瘍内科	12(2)	122-129	2013
澤田雄、 <u>中面哲也</u>	第1部 第1章 腫瘍免疫における免疫担当細胞と免疫分子の役割 6. 腫瘍抗原の分類と抗原特異的免疫療法の免疫学的評価法	実験医学 (増刊号)	31(12)	66-71	2013
大藤和也、 <u>中面哲也</u>	トピックス 2. 肝臓のワクチン療法	コンセンサス癌治療	12(2)	114-116	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy

Daisuke Nobuoka · Toshiaki Yoshikawa · Mari Takahashi · Tatsuaki Iwama · Kazutaka Horie · Manami Shimomura · Shiro Suzuki · Noriko Sakemura · Munehide Nakatsugawa · Hiroshi Sadamori · Takahito Yagi · Toshiyoshi Fujiwara · Tetsuya Nakatsura

Received: 29 June 2012 / Accepted: 29 October 2012 / Published online: 11 November 2012
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Antigen-specific cancer immunotherapy is a promising strategy for improving cancer treatment. Recently, many tumor-associated antigens and their epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) have been identified. However, the density of endogenously presented antigen-derived peptides on tumor cells is generally sparse, resulting in the inability of antigen-specific CTLs to work effectively. We hypothesize that increasing the density of an antigen-derived peptide would enhance antigen-specific cancer immunotherapy. Here, we demonstrated that intratumoral peptide injection leads to additional peptide loading onto major histocompatibility complex class I molecules of tumor cells, enhancing tumor cell recognition by antigen-specific CTLs. In *in vitro* studies, human leukocyte antigen (HLA)-A*02:01-restricted glypican-3_{144–152} (FVGEFFTDV) and cytomegalovirus_{495–503} (NLVPMVATV) peptide-specific CTLs showed strong activity against all peptide-pulsed cell lines, regardless of whether the tumor cells expressed the antigen. In *in vivo* studies using immunodeficient mice, glypican-3_{144–152} and cytomegalovirus_{495–503} peptides injected into a solid mass were loaded onto HLA class I molecules of tumor cells. In a peptide vaccine model and an adoptive cell transfer model using C57BL/6 mice, intratumoral injection of

ovalbumin_{257–264} peptide (SIINFEKL) was effective for tumor growth inhibition and survival against ovalbumin-negative tumors without adverse reactions. Moreover, we demonstrated an antigen-spreading effect that occurred after intratumoral peptide injection. Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity and may be a useful option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy against solid tumors.

Keywords Intratumoral peptide injection · Antigen · Immunotherapy · Cytotoxic T lymphocyte

Abbreviations

CTL	Cytotoxic T lymphocyte
HLA	Human leukocyte antigen
GPC3	Glypican-3
HCC	Hepatocellular carcinoma
MHC	Major histocompatibility complex
CMV	Cytomegalovirus
HIV	Human immunodeficiency virus
OVA	Ovalbumin
TAP	Transporter associated with antigen processing
FBS	Fetal bovine serum
IFN	Interferon
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot
IFA	Incomplete Freund's adjuvant
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell

Introduction

Conventional modalities of cancer treatment, including surgery, radiotherapy, and chemotherapy, have made advancements in recent years, and the survival rate of cancer

D. Nobuoka · T. Yoshikawa · M. Takahashi · T. Iwama · K. Horie · M. Shimomura · S. Suzuki · N. Sakemura · M. Nakatsugawa · T. Nakatsura (✉)

Division of Cancer Immunotherapy, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa 277-8577, Japan
e-mail: tnakatsu@east.ncc.go.jp

D. Nobuoka · H. Sadamori · T. Yagi · T. Fujiwara
Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan

patients has gradually improved; however, these therapies remain far from being satisfactory in most cancers [1, 2]. Therefore, the development of novel treatment modalities, including antigen-specific cancer immunotherapies with peptide vaccines, dendritic cell vaccines, and adoptive cell transfer therapies, is critical for advancing effective cancer treatments [3–5]. While many tumor-associated antigens and epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) have been explored as possible antigen-specific cancer immunotherapies, the results of several anticancer immunotherapy clinical trials have been disappointing [6, 7]. We conducted a clinical trial using the glypican-3 (GPC3) peptide vaccine in advanced hepatocellular carcinoma (HCC) patients. While this carcinoembryonic antigen overexpressed in HCC seemed to be an ideal target for anticancer immunotherapy [8–15], only immunological efficacy was apparent [16], whereas the clinical benefit was limited in patients [17]. Therefore, the establishment of an innovative strategy to link the antitumor immune response with the clinical response and to enhance the power of antigen-specific cancer immunotherapy is urgently required.

In the antigen-specific cancer immunotherapy concept, antigen-specific CTLs recognize and destroy tumor cells that present antigen-derived peptides using cell surface major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. However, the density of the antigen-derived peptide endogenously presented on tumor cells is generally low, resulting in the ineffectiveness of antigen-specific CTLs [18]. This low density of presented antigen is one reason why antigen-specific cancer immunotherapy has been ineffective in clinical settings. One solution for overcoming this critical problem is to induce high-avidity CTLs. Such CTLs can recognize a smaller number of peptide–MHC class I complexes and would contribute to a better outcome [19]. Another solution is to enhance tumor cell antigenicity by means of additional peptide loading onto MHC class I molecules. Increasing the density of antigen-derived peptide would facilitate CTL recognition and destruction of the tumor cells.

In this study, we investigated whether intratumoral peptide injection would induce additional peptide loading onto tumor cells, and, if so, whether increased presentation would enhance antigen-specific CTL tumor cell recognition. Moreover, we evaluated whether intratumoral peptide injection could be a useful option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy against solid tumors.

Materials and methods

Synthetic peptides

The peptides used in this study were as follows: human leukocyte antigen (HLA)-A*02:01-restricted GPC3_{144–152} (FVGEFFTDV) peptide (American Peptide Company,

Sunnyvale, CA), HLA-A*24:02-restricted GPC3_{298–306} (EYILSLEEL) peptide (American Peptide Company), HLA-A*02:01-restricted cytomegalovirus (CMV)_{495–503} (NLVPMVATV) peptide (ProImmune, Rhinebeck, NY, USA), HLA-A*24:02-restricted CMV_{341–349} (QYDP-VAALF) peptide (ProImmune), HLA-A*02:01-restricted human immunodeficiency virus (HIV)_{77–85} (SLYNTYATL) peptide (ProImmune), and H-2 K^b-restricted ovalbumin (OVA)_{257–264} (SIINFEKL) peptide (AnaSpec, Fremont, CA, USA). The peptides were dissolved and diluted in 7 % NaHCO₃.

Cell lines

T2 cells (HLA-A*02:01), which lack the transporter associated with antigen processing (TAP), were purchased from Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan). The human liver cancer cell line HepG2 (GPC3⁺, HLA-A*02:01/A*24:02) was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The human liver cancer cell line SK-Hep-1 (GPC3[−], HLA-A*02:01/A*24:02), human colon cancer cell line SW620 (GPC3[−], HLA-A*02:01/A*24:02), murine lymphoma cell line RMA (OVA[−], H-2 K^b), EL4 (OVA[−], H-2 K^b), and EG7 (OVA⁺, H-2 K^b) were kindly provided by Dr. Yasuharu Nishimura (Kumamoto University, Kumamoto, Japan). SK-Hep-1/GPC3 is an established stable GPC3-expressing cell line transfected with a human GPC3 gene, and SK-Hep-1/vec is an established counterpart cell line, in which an empty vector was transfected. EG7 cells are OVA-transfected EL4 cells. Cells were cultured at 37 °C in RPMI 1640 or DMEM medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂.

Mice

Female BALB/c nude, NOD/SCID, and C57BL/6 mice (6–8 weeks old) were purchased from Japan Charles River Laboratories (Yokohama, Japan). OT-I mice [20], which are CD8⁺ T-cell TCR transgenic mice expressing the TCR α -chain recognizing OVA_{257–264} peptide in H-2 K^b, were kindly provided by Dr. Takashi Nishimura (Hokkaido University, Sapporo, Japan). All animal procedures were performed according to the guidelines for the Animal Research Committee of the National Cancer Center, Japan.

Preparation of OT-I mouse-derived CD8⁺ CTLs (activated OT-I CTLs)

Naïve CD8⁺ T-cells were purified from the spleens of OT-I mice using MACS anti-CD8a (Ly-2) MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). For *in vitro*