

201332018A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上田 龍三

平成26（2014）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…………… 11
中山睿一（川崎医療福祉大学）
2. 臨床治験管理、第 I a/ I b 相治験…………… 18
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…………… 20
飯田真介（名古屋市立大学）
4. 第 Ia/Ib 相臨床治験の実施及び管理…………… 25
土岐祐一郎（大阪大学）
5. 第 I a/ I b 相臨床治験…………… 28
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とがん患者における抑制性細胞の解析…………… 32
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…………… 36
船越建（慶應義塾大学）
8. 臨床治験 抗体療法モニタリング…………… 40
石田高司（名古屋市立大学）
9. 抗 CCR4 抗体投与と制御性 T 細胞の関連の解析…………… 44
西川博嘉（大阪大学）
10. 液性免疫・細胞性免疫モニタリング…………… 49
鵜殿平一郎（岡山大学）
11. 治験症例がん組織での、CCR4 および腫瘍精巢抗原（NY-ESO-1, XAGE-1b）
の発現検査…………… 51
佐藤永一（東京医科大学）

| | |
|-------------------------|-----|
| Ⅲ. 別添文書 | 53 |
| 1) 治験実施計画書（改訂版） | |
| Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 123 |
| Ⅴ. 研究成果の刊行物・別刷 | 131 |

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 相医師主導治験を順調に実施している。Ia 相治験を予定より半年早く終了させ、平成 25 年 10 月 21 日より Ib 相治験の割り付け登録を開始した。Ia 相治験において、安全性と Treg 除去効果が確認され、Ib 相治験においては、平成 25 年度までに 14 症例においてプロトコール治療を開始した。そして、附随研究により、がん患者末梢血中 effector Treg 比率の上昇と腫瘍局所における effecor Treg の著明な浸潤、並びに、抗 CCR4 モノクローナル抗体を用いた Treg 除去による抗腫瘍免疫活性の亢進効果が明らかとなった。また、Treg アッセイの標準化を試みたところ、施設間での Treg 機能サブセットと測定結果の乖離が是正され、データの共有化が可能となった。

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

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

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

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 特任准教授

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 特任准教
授

鵜殿 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

佐藤 永一 東京医科大学臨床病理学 講師

A. 研究目的

制御性 T 細胞 (Treg) は腫瘍局所に多数浸潤していることが多くのがん種で知られ、腫瘍免疫の抑制を通して、がんの発症、進展に強くかかわっていることが明らかとなってきている。世界各国で実施された腫瘍抗原ワクチン療法臨床試験において思わしい結果が得られていないことの原因として腫瘍局所で働く Treg の強力な免疫抑制機構が重要であると考えられており、Treg の制御が、免疫治療法開発のキーポイントとなっている。最近、進行がんに対して劇的な治療効果がみられている免疫チェックポイント分子に対する抗体薬の腫瘍免疫亢進機序として、免疫抑制シグナルの阻害だけでなく、Treg への作用も重要であることが見いだされ、益々、Treg を標的とすることの重要性が高まっている。Treg は CD45RA と FOXP3 の発現パターンにより effector Treg;CD45RA⁺FOXP3^{hi},

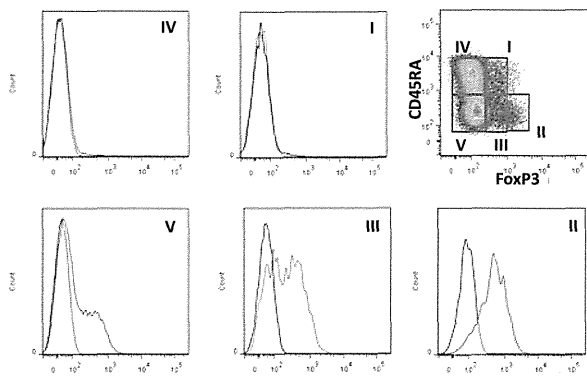


図1 TregにおけるCCR4の発現
I; naïve Treg, II; effector Treg
Red line; CCR4, Blue line; isotypic control

naïve Treg ; CD45RA⁺FOXP3^{lo} に分類される(図1)。CCR4はeffector Treg分画に強く発現し、naïve Treg分画にはほとんど発現しないことから、Tregの標的分子となり得る。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相治験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) 第Ia/Ib相治験

「研究体制」

研究代表者の所属する愛知医科大学に多施設臨床治験事務局を設置して本治験を統括し、臨床Ia相治験は国立がん研究センター東病院、大阪大学、川崎医科大学、名古屋市立大学の4施設で行い、第Ib相治験には東京大学、および慶応大学を加えた6施設で実施する。これらの施設では、多施設共同研究および医師主導臨

床治験においても豊富な経験を持つ。第Ib相から治験に参加する東京大学、および慶応大学においては、それぞれ、平25.9/26、平25.11/12にIRB承認を得た。Tregおよび抗原特異的免疫反応の解析は大阪大学、岡山大学、川崎医科大学で行う。また、NY-ESO-1, XAGE1b及びCCR4の発現解析は、東京医科大学にて行う。尚、研究協力者として、大阪大学大学院消化器外科臨床登録医 和田 尚、愛知医科大学医学部腫瘍免疫寄附講座 准教授 鈴木 進、及び、愛知医科大学医学部臨床研究支援部門 教授 吉川和宏が、本研究を支援する。

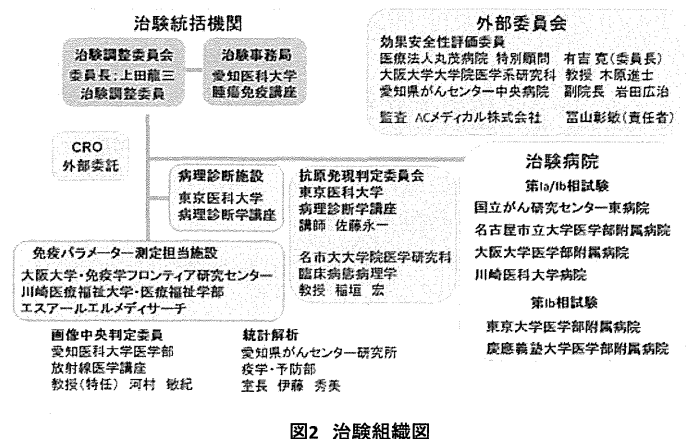


図2 治験組織図

「治験基本デザイン」

第Ia相: 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。0.1mg/kg投与群3例(最大6例)から開始し、0.5mg/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。
 第1b相：忍容性の確認された投与群のうち高用量(20例)及び0.1mg/kg(20例)の2群(第1a相部で0.5mg/kgがMTDの場合、0.1mg/kg1群)についてMogamulizumabを毎週1回計8回投与する。安全性と、末梢血中Treg除去効果を主要評価項目とし、副次目的として、有効性を評価する。第1a/1b相ともに有効性はRECISTにて評価するとともに、無増悪生存期間(PFS)、全生存期間(OS)を観察する。腫瘍抗原特異的液性反応はELISA法にて評価する。また附随研究として第1a/1b相ともに細胞性免疫反応をELISPOT法、サイトカイン捕捉法、細胞内サイトカイン染色法で解析するほか、Tregの機能活性についても検討する。さらに、モニタリングマーカーの探索についても実施する。

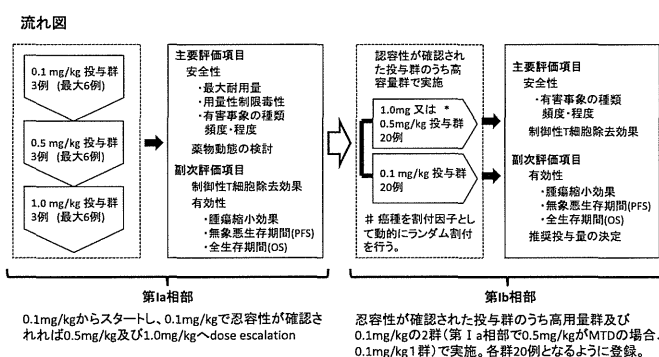


図3 治験計画の概要

2) 附随研究

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、分担研究者により、治験と並行して、下記の研究が、実施されている。

- ① 抗CCR4抗体投与と制御性T細胞の関連の解析；大阪大学特任准教授 西川博嘉
- ② 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
- ③ XAGE-1bおよびNY-ESO-1抗原特異的抗体反応およびCD4、CD8 T細胞反応の解析、T細胞表面マーカー解析；川崎医療福祉大学教授 中山睿一
- ④ 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

- ⑤ 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
- ⑥ 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；慶応大学助教 船越健

3) Tregアッセイ標準化

各施設で取得したTreg測定データの共有化をはかるため、大阪大学特任教授 西川博嘉が中心となり、Treg機能分画を適正に測定するための解析方法、測定方法について標準化、共有化を試みた。

(倫理面への配慮)

1. 本研究は多施設共同の医師主導治験としてGCPに則り実施する。
2. 本臨床研究への参加はヘルシンキ宣言にのっとり、十分な説明のもと本人の書面による同意(インフォームド・コンセント)を得て実施される。
3. 検体の解析は院内IRBの承認後関連する指針を遵守して実施する。本研究は本人の書面による同意を得て実施され、検体は匿名化され、情報は厳重に管理される。

C. 研究結果

1) 第1a相治験

平成24年度状況

治験開始に向け、治験実施計画書等、治験関連書類を作成し、医薬品医療機器総合機構(PMDA)対面助言を受けた。また平行して、治験実施体制の整備、各医療機関におけるIRBの承認、医薬品(モガムリズマブ)の供与に関する契約締結等、事務的手続きを完了させた。さらに技術面の準備として、制御性T細胞検査、抗原特異的抗体免疫反応検査に対するバリデーションを実施した。これら準備期間を経て、予定どおり平成24年2月末より、第1a相治験を開始した。登録状況を平成25年度と併せて、表1に示した。

表1 第Ia相治験患者登録状況

| 投与量 | 登録 | 対象 | 施設名 |
|--------|-------|------|------|
| 0.1mg | A1-01 | 肺がん | 川医大 |
| | A1-02 | 肺がん | 川医大 |
| | A1-03 | 肺がん | 名市大 |
| 0.5 mg | A2-01 | 肺がん | 川医大 |
| | A2-02 | 肺がん | 名市大 |
| | A2-03 | 食道がん | 国がん東 |
| 1.0 mg | A3-01 | 食道がん | 国がん東 |
| | A3-02 | 肺がん | 川医大 |
| | A3-03 | 食道がん | 阪大 |
| | A3-04 | 肺がん | 川医大 |

平成25年度状況

継続して第Ia相治験を推し進め、半年前倒しで完遂させた。主要評価、及び副次評価結果について以下に示した。

① 主要評価項目

- ・安全性；DLTに該当する事象は認められなかった。1.0mg/kg投与群までDLTの発現が認められなかったことから、MTDは1.0mg/kgを超える用量と推察できる。従って、1.0mg/kgを忍容性が確認された投与量とした。その他、有害事象の内容・発現率等に用量依存性は認められなかった。ATL患者治療において、重篤な皮膚障害が報告されている。本第Ia相治験10例においては、7例に皮疹を認めたが、いずれもグレード2以下であった。
- ・薬物動態；検討中。

② 副次評価項目

- ・制御性T細胞(Treg)除去効果；検討し得た6症例全例において末梢血においてエフェクターTreg除去効果を確認した。
- ・有効性(RECIST変法)；SD 4例、PD 3例

2) 第Ib相治験

第Ia相治験の結果を踏まえ、効果安全性評価委員会において、DLT発現が無かったことの確認と、忍容量を1.0mg/kgとすることの承認を得た後、平成25年10月21日から、第Ib相での患者登録が開始された。癌種を割り付け因

子として動的にランダム割り付けを行い、平成25年度内に合計14名の患者にプロトコール治療が開始された(表2)。

表2 第Ib相治験患者登録状況

| 対象 | 登録No. | 施設名 | |
|------|-------|------|------|
| 食道がん | B-01 | 国がん東 | |
| | B-08 | 国がん東 | |
| | B-09 | 大阪大学 | |
| | B-10 | 大阪大学 | |
| | B-11 | 名市大 | |
| | 悪性黒色腫 | B-04 | 慶應大学 |
| | | B-05 | 慶應大学 |
| | | B-06 | 慶應大学 |
| | | B-07 | 名市大 |
| | | B-12 | 慶應大学 |
| | 卵巣がん | B-02 | 大阪大学 |
| B-13 | | 大阪大学 | |
| 肺がん | B-03 | 川崎医大 | |
| | 胃がん | B-14 | 国がん東 |

3) 附随研究

附随研究成果の概略を以下に示した。詳細は各分担研究報告を参照されたい。

① 抗CCR4抗体投与と制御性T細胞の関連の解析

- 悪性黒色腫浸潤リンパ球におけるTreg機能サブセットの解析を行ったところ、浸潤しているTregの大部分はCCR4を強発現するeffector T細胞であった。
- 悪性黒色腫由来末梢血単核球から、抗CCR4モノクローナル抗体でCCR4陽性細胞を除去したところ、effector Tregがほぼ100%除去された。さらに、除去後、NY-ESO-1に特異的なT細胞の誘導を試みたところ、CD4+T, CD8+Tともに、特異的な反応が明らかに増強した。

② Mogamulizumab投与ATL患者における、Treg及び特異的免疫の動態解析

- Mogamulizumabを投与したATL患者末梢血中のTreg機能サブセットを解析したところ、effector Tregの顕著な低下がみられ、HTLV-1 Tax特異的CTLの誘導効率の著しい向上が認められた。
- 皮膚障害をはじめとするMogamulizumabの

有害事象は effector Treg の低下による異常免疫の活性化が関与するものと考えられた。

③ XAGE-1b および NY-ESO-1 抗原特異的抗体反応および CD4、CD8 T 細胞反応の解析、T 細胞表面マーカー解析

a. 投薬前に XAGE-1b 抗体反応陽性であった 4 例中 3 例において、抗体反応の有意な上昇を認めた。投薬前に NY-ESO-1 抗体反応陽性であった 1 例においても有意な上昇を認めた。

b. 抗原特異的 CD4⁺、CD8⁺T 細胞反応を解析したところ、XAGE-1b 抗原抗体陽性の 1 例で CD8⁺T 細胞の TNF α 産生細胞の有意な上昇を認めた。

c. 投薬前後で末梢血中 M-MDSC の解析を行ったところ、検討した 3 例全例においてその増加を認めた。

④ 健常者、がん患者における PD-1、Tim-3 の発現解析

CD8⁺T 細胞上 PD-1 の発現はがん患者において発現が低く、サイトカイン産生と正相関がみられた。Tim-3 については、がん患者において高く、サイトカイン産生と逆相関の関係にあり、免疫治療効果とも相関した。

⑤ 癌性胸膜炎/腹膜炎による胸水/腹水中の免疫環境の解析

様々な癌種において、末梢血中 Treg 機能サブセット解析を行ったところ、いずれのがん種(肺癌、胆管癌、膵臓癌、胃癌、食道癌、大腸癌)においても健常人に比べて、effector Treg の値が高くなった。また、卵巣癌患者腹水中 Treg 機能サブセットについて解析したところ、effector Treg の比率が高値であった。さらに、腹水中のがん細胞は PD-L1 を高発現し、CD8⁺T 細胞は、PD-1 の発現が高かった。

⑥ 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

NY-ESO-1 免疫染色を行った悪性黒色腫のうち、27 症例において予後の比較を行ったところ、統計学的有意差はみられなかったものの、NY-ESO-1 を発現している症例において予後の良い傾向がみられている。

4) Treg アッセイ標準化

大阪大学免疫学フロンティア研究センター

(西川特任准教授)で測定したデータを本研究事業参加施設 10 施設に送付し、解析方法の標準化を実施した。第一回目の集計では、施設間でのばらつきが生じたが、同センターからの解析方法の指導により、改善された。次に、あらかじめ測定方法について、同センターのレクチャーにより共有化した上で、配布した凍結末梢血単核球の測定を実施したところ、施設間のばらつきは小さく、十分に測定法、解析法の標準化が達成された。

5) プロトコール改訂

25 年度は以下に示したようにプロトコールの改訂を 3 度にわたり実施した。

a. 第 2.0 版 (平 25. 4/16)

HBV-DNA 検査を実施する条件、MTD の定義、並びに遺伝子解析方法の明確化

b. 第 3.0 版 (平 25. 8/20)

腫瘍ワクチン等の免疫療法の wash out 期間の変更、治験薬提供者による安全

c. 第 4.0 版 (平 26. 1/19)

サイトカイン療法の wash out 期間の変更、甲状腺機能検査の追加明確化

D. 考察

医師主導治験として順調に患者登録、プロトコール治療が進み、Ia 相については半年前倒しで完了し、Ib 相についても、25 年度内に 14 症例についてプロコール治療が開始された。Ia 相における、重要な評価項目である、安全性については効果安全性評価委員会において DLT 発現が無かったことの確認と、忍容量を 1.0mg/kg とすることの承認をもって担保された。また、Treg 除去効果については、全例において減少効果を認め、治験薬の標的に対する直接的効果が証明された。同時並行的に附随研究においては、Treg 除去による、抗腫瘍免疫活性の増強効果が明らかとなっている。大阪大学 西川特任准教授は、健常人、がん患者末梢血単核球を用いた *in vitro* 実験において、抗 CCR4 モノクローナル抗体による Treg の除去により、NY-ESO-1 に対する細胞性免疫の増強効果を報告している。また、名古屋市立大学 石田准教授は、

Mogamulizumab 治療を受けた ATL 患者において、effector Treg の顕著な低下と、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の誘導効率の著しい向上を報告している。さらに、川崎福祉医療大学 中山教授により、Mogamulizumab 治療後に、XAGE-1b, NY-ESO-1 に対する、液性免疫、細胞性免疫の増強を認めた症例が報告されている。これらの研究結果は、Mogamulizumab 投与を受けた、患者においては、Treg の減少のみでなく、抗腫瘍免疫活性が上昇していることが考えられ、Mogamulizumab の proof of concept の実証に近づいていることを期待させる。

Treg の患者末梢血における解析、腫瘍局所による解析も進められた。東京大学 垣見特任准教授からは、様々な癌種において、末梢血中 effector Treg 比率の上昇が報告された。卵巣癌患者腹水中においても高い値を示している。西川特任准教授からは悪性黒色腫において、CCR4 強発現 effector Treg の顕著な浸潤を認めることが報告された。これまでも、多くの論文において、がんの発症、進行における Treg の重要性が指摘されているが、改めて、Treg 除去による、免疫抑制環境の改善の重要性を認識した。

免疫治療効果のバイオマーカー検索についても若干の成果があった。CD8+T 細胞上 Tim-3 の発現ががん患者において高く、サイトカイン産生と逆相関し、治療効果も反映していることが岡山大学 鷗殿教授より報告された。表面マーカーによる免疫モニタリングは、検査コスト、労力の点でサイトカインの測定より、実用的であり、今後の展開が期待される。

一方で、*in vitro* ではあるが活性化 CTL 上に CCR4 が発現するという検討結果が研究協力者である愛知医科大学 鈴木准教授により得られている。抗腫瘍免疫活性を上昇させるはずの Mogamulizumab が、逆に低下させてしまう事態となることが憂慮されるため、現在、腫瘍局所における CD8+T 細胞上の CCR4 の発現について検討中である。これまでのところ CCR4 陽性 CD8+T 細胞はまれにみられるのみであり、治療効果への影響は限定的と考えている。

Treg アッセイ法の標準化を本研究事業参加施設 10 施設において実施した。西川特任准教

授主導の下、Treg 機能サブセットの解析、測定を共通プロトコール作成の下実施し、各施設間でのデータの乖離を縮小、標準化させることに成功した。このような取り組みはデータの施設間での共有につながり、非常に有用と考えられた。今後の全国的な広がりが期待される。

E. 結論

1) Ia 相治験を完了した。安全性と、Treg 除去効果が確認された。また、Ib 相治験を開始し、25 年度までに、14 症例についてプロトコール治療を開始した。

2) Treg 除去による、抗腫瘍免疫亢進効果が附随研究により明らかとなった。

3) Treg アッセイの標準化を実施した。施設間における測定結果の乖離が是正され、データの共有化が可能となった。

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. Ogura M, **Ishida T**, 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 T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014 Apr 10;32(11):1157-63.
2. Narita T, **Ishida T**, Masaki A, Suzuki S, Ito A, Mori F, Yamada T, Masaki Ri, Kusumoto S, Komatsu H, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Niimi A, **Iida S**, **Ueda R**. HTLV-1 bZIP factor specific CD4 T cell responses in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol*. 2014 Feb 1;192:940-7.
3. Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, Honda H, Yamashita T, Nohara S, **Oka M**, Jimbow K, and

- Nakayama E.** TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimid-dextran (NPCMD). *J Dermatol Sci*, 73(3): 209-215, 2014.
4. Mizote Y, Uenaka A, Isobe M, Wada H, **Kakimi K**, Saika T, Kita S, Koide Y, **Oka M**, and **Nakayama E.** Production of NY-ESO-1 peptide/DRB1*08:03 tetramers and ex vivo detection of CD4 T-cell responses in vaccinated cancer patients. *Vaccine*, 32(8): 957-964, 2014.
 5. Wada H, Isobe M, **Kakimi K**, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, **Udono H**, Seto Y, Yamada K, **Nishikawa H**, Pan L, Venhaus R, **Oka M**, **Doki Y**, **Nakayama E.** Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother*, 37(2): 84-92, 2014.
 6. 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*. 2014 Mar;44(3):354-7.
 7. **Nishikawa H**, Sakaguchi S; Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. Jan 9;27:1-7 2014.
 8. Mori F, **Ishida T**, Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Yamada T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imada K, Takaori-Kondo A, Niimi A, **Ueda R**, Inagaki H, **Iida S**. Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. *Eur J Haematol*. 2014 Mar;92(3):219-28.
 9. Zwick C, Held G, Auth M, Bernal-Mizrachi L, Roback JD, Sunay S, **Iida S**, Kuroda Y, Sakai A, Ziepert M, **Ueda R**, Pfreundschuh M, Preuss K-D. Over one third of African-American MGUS and multiple myeloma patients are carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, an autosomal-dominantly inherited risk factor for MGUS/MM. *Int J Cancer* 2014; Jan 20 Epub ahead of print.
 10. Nishikawa S, Konno M., Hamabe A., Hasegawa S., Ogawa H., Kano Y., Fukusumi T., Ohta K., Noguchi Y, Ozaki M., Kudo T., Sakai D., Haraguchi N., Satoh T., **Doki Y.** Mori M. and Ishii. Aldehyde dehydrogenasehigh gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy. *Int J Oncol* 2014; 42: 1437-1442
 11. Ogino T., Nishimura J., Barman S., Kayama H., Uematsu S., Okuzaki D., Osawa H., Haraguchi N., Uemura M., Hata T., Takemasa I., Mizushima T., Yamamoto H., Takeda K., **Doki Y.** Mori M. Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterol* 2014;145 (6):1380-1391
 12. Wada I, Matsushita H, Noji S, Mori K, Yamashita H, Nomura S, Shimizu N, Seto Y, **Kakimi K**. Intraperitoneal injection of in vitro expanded Vγ9Vδ2 T cells together with zoledronate for the treatment of malignant ascites due to gastric cancer. *Cancer Med*. 2014 Apr;3(2):362-75.
 13. Ichimura T, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Matsushita H, **Kakimi K**, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M. Prognostic Significance of CD204-Positive Macrophages in Upper Urinary Tract Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014 Feb 4. [Epub ahead of print]
 14. Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, **Ishida T**, **Ueda R**, Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H. Prognostic impact of miR-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Human Pathol*, in press
 15. Sugiyama D, **Nishikawa H**, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E and Shakaguchi S; Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking anti-tumor immune responses in humans. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 110(44):17945-17950 2013.
 16. **Ishida T**, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Takatsuka Y, Eto T, Miyazaki Y, Hidaka M, Uike N, Miyamoto T, Tsudo M, Sakamaki H, Morishima Y, Suzuki R, Utsunomiya A. Impact of GVHD on allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma focusing on preconditioning regimens: nationwide retrospective study *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*. . 2013;19:1731-9.
 17. 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;97:540-3.
18. Masaki A, **Ishida T**, Suzuki S, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Yamada T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, **Iida S**, **Ueda R**. Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ^{null} mouse model. *J Immunol*. 2013;191(1):135-44.
 19. 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.
 20. Inagaki A, Tajima E, Uranishi M, Totani H, Asao Y, Ogura H, Masaki A, Yoshida T, Mori F, Ito A, Yano H, Ri M, Kayukawa S, Kataoka T, Kusumoto S, **Ishida T**, Hayami Y, Hanamura I, Komatsu H, Inagaki H, Matsuda Y, **Ueda R**, **Iida S**. Global real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detecting proto-oncogenes associated with 14q32 chromosomal translocation as a valuable marker for predicting survival in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2013;37:1648-55.
 21. Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, **Ishida T**, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood*. 2013 Jun 13;121(24):4894-901.
 22. 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 Jun;13(3):273-80.
 23. **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; 104: 647-650.
 24. Takaki A, Yagi T, Yasunaka T, Sadamori H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Sato D, Nobuoka D, Utsumi M, Yasuda Y, **Nakayama E**, Miyake Y, Ikeda F, Shiraha H, Nouse K, Fujiwara T, and Yamamoto K. Which patients respond best to hepatitis B vaccination after a hepatitis B virus-related liver transplantation? *J Gastroenterol*, 48(12): 1373-1383, 2013.
 25. Pandey J, Namboodiri A, Ohue Y, **Oka M**, **Nakayama E**. Genetic variants of immunoglobulin γ and κ chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Exp Immunol*, 176(1): 78-83, 2013.
 26. Reis BS, Jungbluth AA, Frosina D, Holz M, Ritter E, **Nakayama E**, Ishida T, Obata Y, Carver B, Scher H, Scardino P, Slovin S, Subudhi SK, Reuter VE, Savage C, Allison JP, Melamed JM, Jager E, Ritter G, Old LJ, Gnjjatic S. Prostate cancer progression correlates with increased humoral immune response to a human endogenous retrovirus GAG protein. *Clin Cancer Res*, 19(22): 6112-6125, 2013.
 27. Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, **Nakayama E**, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, and Kamihira M. T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 8(6): 891-902, 2013.
 28. Muraoka D, **Nishikawa H**, Noguchi T, Wang L, Harada N, Guillaume P, Luescher I, Uenaka A, **Nakayama E**, Old LJ, Kato T, and Shiku H. Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8+ T cells. *Vaccine*, 31(17): 2110-2118, 2013.
 29. 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*, 2013: 742925, 2013.
 30. Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Fujita J, Hirao T, Makari Y, Shibata K, Iijima S, Jungbluth AA, 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(5): 1119-1125,

- 2013.
31. Atarashi K, Tanoue T, Suda W, Oshima K, Nagano Y, **Nishikawa H**, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M and Honda K; Treg induction by a rationally selected Clostridia cocktail from the human microbiota. *Nature*. 500 (7461):232-236 2013
 32. 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 (4):989-1000 2013
 33. Adeegbe DO, **Nishikawa H**; Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Frontiers in Immunology*. 4:190 2013
 34. Noguchi T, Ritter G, **Nishikawa H**; Antibody-based therapy in colorectal cancer. *Immunotherapy*. 5 (5):533-545 2013
 35. 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(4):367-376 2013
 36. Suzuki T, Kusumoto S, **Iida S**, Tada T, Mori F. Amelanotic malignant melanoma of unknown primary origin metastasizing to the bone marrow: case report and review of the literature. *Int Med*. 2013;53: 325-328.
 37. Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino SH, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osako M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, **Doki Y**, Shiku H. Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients. *J Transl Med*. 2013 11:246
 38. Takahashi T, Serada S., Ako M., Fujimoto M., Miyazaki Y., Nakatsuka R., Ikezoe T., Yokoyama A., Taguchi T., Shimada K., Kurokawa Y., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Takiguchi S., Mori M., **Doki Y**, Naka T., Nishida T. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. *Int J Cancer* 2013;133(11):2737-2743
 39. Suzuki R., Yamamoto H., Ngan CY., Ohtsuka M., Kitani K., Uemura M., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Sekimoto M., Minamoto T., **Doki Y**, Mori M. Inhibition of angiopoietin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels in vivo. *Int J Oncol* 2013;43(5):1447-1455
 40. Nagano H., Tomimaru Y., Eguchi H., Hama N., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S., Mori M., **Doki Y**. MicroRNA-29a induces resistance to gemcitabine through the Wnt/ β -catenin signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2013;43(4):1066-1072
 41. Tsujinaka T. Yamamoto K., Fujita J., Endo S., Kawada J., Nakahira S., Shimokawa T., Kobayashi S., Yamasaki M., Akamaru Y., Miyamoto A., Mizushima T., Shimizu J., Umeshita K., Ito T., **Doki Y**, Mori M.; Clinical Study Group of Osaka University on Section of Risk Management. Subcuticular sutures versus staples for skin closure after open gastrointestinal surgery: a phase 3, multicentre, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2013;382(9898); 1105-1112
 42. Iwagami Y., Eguchi H., Nagano H., Akita H., Hama N., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S., Tomokuni A., Tomimaru Y., Mori M., **Doki Y**. miR-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via SMARCC1. *Br J Cancer* 2013; 109(2):502-511
 43. Eikawa S, **Kakimi K**, Isobe M, Kazushima 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):345-54, 2013
- 和文
1. 和田 尚、**中山睿一**、免疫バイオマーカーと抗腫瘍効果、*実験医学 増刊 腫瘍免疫学とがん免疫療法*、羊土社、31(12): 204-208, 2013.
 2. 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.

3. 前田優香、西川博嘉：成人 T 細胞白血病・
リンパ腫における免疫応答 臨床免疫・アレ
ルギー科, 59:367-376 2013
4. 杉山大介、西川博嘉：免疫抑制の克服による
抗腫瘍免疫応答増強の可能性 医学のあゆみ,
244:800-807 2013
5. 西塔拓郎、西川博嘉：Tregs 制御による抗腫
瘍免疫応答増強の可能性 医学のあゆみ,
246: 913-920 2013
6. 西岡めぐみ、西川博嘉：制御性 T 細胞による
抗腫瘍免疫抑制 —そのコントロールによる
効果的ながん免疫療法の可能性 実験医学
31, 1864-1872 2013

2. 学会発表 (総括研究者のみ)

海外

1. Tatsuro Jo, **Takashi Ishida**, Shigeki Takemoto, Hitoshi
Suzushima, Kimiharu Uozumi, Kazuhito Yamamoto,
Naokuni Uike, Yoshio Saburi, Kisato Nosaka, Atae
Utsunomiya, Kensei Tobinai, Hiroshi Fujiwara, Kenji
Ishitsuka, Shinichiro Yoshida, Naoya Taira, Yukiyo
Moriuchi, Kazunori Imada, Toshihiro Miyamoto, Masao
Tomonaga, **Ryuzo Ueda**. Randomized phase II study of
mogamulizumab (KW-0761) plus VCAP-AMP-VECP
(mLSG15) versus mLSG15 alone for newly diagnosed
aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL). 2013
ASCO Annual Meeting, Oral Abstract Session, J Clin
Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 8506)
2. **Ryuzo Ueda**, Michinori Ogura, **Takashi Ishida**,
Kiyohiko Hatake, Masafumi Taniwaki, Kiyohiko
Ando, Kensei Tobinai, Katsuya Fujimoto,
Kazuhito Yamamoto, Toshihiro Miyamoto,
Naokuni Uike, Mitsune Tanimoto, Kunihiro
Tsukasaki, Kenichi Ishizawa, Junji Suzumiya,
Hiroshi Inagaki, Kazuo Tamura, Shiro Akinaga,
Masao Tomonaga. The Efficacy and Safety of
Mogamulizumab (KW-0761) in Multicenter Phase
II Study for Patients with Relapsed Peripheral or
Cutaneous T-Cell Lymphoma (oral) (abs 041) 12th
International Conference on Malignant Lymphoma.
19-22 June 2013. Lugano, Switzerland.
3. Shigeki Takemoto, **Takashi Ishida**, Tatsuro Jo,

Kimiharu Uozumi, Hitoshi Suzushima, Kazuhito
Yamamoto, Naokuni Uike, Yoshio Saburi, Kisato
Nosaka, Atae Utsunomiya, Kensei Tobinai,
Hiroshi Fujiwara, Kenji Ishitsuka, Shinichiro
Yoshida, Naoya Taira, Yukiyo Moriuchi,
Kazunori Imada, Toshihiro Miyamoto, Kunihiro
Tsukasaki, Masao Tomonaga, **Ryuzo Ueda**.
Combination of Mogamulizumab (KW-0761) with
VCAP-AMP-VECP (mLSG15) is Well Tolerated
and Effective as an Initial Therapy for Aggressive
Adult T-Cell Leukaemia-Lymphoma (ATL) (oral)
(abs 154) 12th International Conference on
Malignant Lymphoma. 19-22 June 2013. Lugano,
Switzerland.

国内

1. 鈴木 進、石田高司、森 芙美子、伊藤 旭、
楠本 茂、小松弘和、吉川和宏、**中山睿一**、
飯田真介、新実彰男、**上田龍三**、ホジキンリ
ンパ腫における NY-ESO-1 に対する液性お
よび細胞性免疫応答 (ポスター)、横浜 (第
72 回日本癌学会学術総会)、2013 年 10 月 5
日

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)
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 細胞が膜表面に 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および CD4、CD8 T 細胞反応の解析を実施する。抗体反応は ELISA 法により、また、CD4、CD8 T 細胞反応は、IFN γ 捕捉法および細胞内染色法によりモニタリング解析した。また、T 細胞表面活性化および抑制性分子について解析した。

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 細胞分画を除去して抗腫瘍免疫応答の増強をもたらす、これによる臨床効果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、制御性 T 細胞除去効果、XAGE-1b および NY-ESO-1 抗原特異的抗体反応、および抗原特異的 CD4、CD8 T 細胞反応を解析する。また、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) 分画の解析および T 細胞表面活性化および抑制性分子の解析を行った。制御性 T 細胞除去効果は SRL 社でフローサイトメトリー法により解析し、抗体反応は ELISA 法、また、CD4、CD8 T 細胞反応は、IFN γ 捕捉法および細胞内染色法を一次モニタリングに用いて解析した。

B. 研究方法

抗 CCR4 抗体投与による有効性の指標として、XAGE-1b および NY-ESO-1 抗原に対する抗体反応を検討した。血液サンプルは、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 週毎に採取した。血漿又は血清中の抗体価は、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した。昨年度は、健常人における血漿又は血清を用いて、ELISA 法および機器のバリデーションを行った。バリデーション項目は、1. ELISA 法プロトコルの作成、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. 機器の精度管理である。その他、ワークシートも作成した。

今年度は、治験症例 16 例 (Ia 相 9 例、Ib 相 7 例) について XAGE-1b および NY-ESO-1 抗体価を測定し、このうち 3 例については抗原特異的 CD4 および CD8 T 細胞反応の解析を実施した。

Treg 解析はベースライン、5 週、9 週に、また、Treg および MDSC の同時解析については、ベースライン、7 週、9 週、12 週以降は可能な限り 4 週毎にサンプルを採取し、フローサイトメトリー法を用いて実施した。Treg は抗 CD4、CD8、CD25、CD45RA、Foxp3 抗体で染色し、MDSC は抗 CD3、CD11b、CD14、CD15、CD33、CD45 抗体、HLA-DR 抗体で細胞表面を染色した。

また、T 細胞表面活性化分子は ICOS、OX-40、GITR、4-1BB、抑制性分子は PD-1、BTLA、TIM-3、LAG-3 について、それらの発現を各々の抗体を用いてフローサイトメトリー法で経時的に解析した。

本医師主導治験は、川崎医大倫理委員会の承認を受け、本研究内容は付随研究として実施している。患者および家族の人権および利益の

保護に十分配慮している。がん患者の組織および血液は担当医によるインフォームド・コンセントを得て提供を受け、匿名化して研究室に保存している。

C. 研究結果

1. XAGE-1b および NY-ESO-1 抗体反応解析

第 Ia 相部症例 9 例（肺癌 7 例、食道癌 2 例）、第 Ib 相部症例 7 例（肺癌 1 例、食道癌 2 例、悪性黒色腫 3 例、卵巣癌 1 例）について XAGE-1b および NY-ESO-1 抗体反応を ELISA 法で検討した（表 1 および 2）。

Ia 相部において XAGE-1b 抗原は 9 例中（肺癌 7 例、食道癌 2 例）3 例（肺癌 3 例）で陽性、NY-ESO-1 抗原も同じく 9 例中 3 例（肺癌 3 例）で陽性であった。そのうち 1 例（肺癌）は XAGE-1b および NY-ESO-1 共に陽性であった。

表 1 治験 Ia 相

| 症例 | XAGE-1b | | | NY-ESO-1 | | |
|-----------------------------|---------|-----------------|---|----------|----------------|---|
| | 抗原発現 | 投与前抗体価 | 抗体価増減 | 抗原発現 | 投与前抗体価 | 抗体価増減 |
| A1-01: KMSH-01 | - | 陰性 | なし | + | 陽性(0W: x45516) | なし |
| A1-02: KMSH-02 | - | 陰性 | なし | + | 陰性 | なし |
| A1-03: NCUH-01 投与中止8W(6) | - | 陰性 | なし | - | 陽性(0W: x1151) | なし |
| A2-01: KMSH-03 | + | 陽性(0W: x4491) | あり ^{5W: x6323} _{9W: x4923} | + | 陽性(0W: x2185) | あり ^{5W: x2983} _{9W: x4525} |
| A2-02: NCUH-02 投与中止7W | - | 陰性 | なし | - | 陰性 | なし |
| A2-03: NCC-01 | - | 陰性 | なし | - | 陰性 | なし |
| A3-01: NCC-02 | - | 陰性 | なし | - | 陰性 | なし |
| A3-02: KMSH-04 投与中止8W(7) | + | 陽性(0W: x128240) | なし | - | 陰性 | なし |
| A3-04: KMSH-05 | + | 陽性(0W: x1512) | あり ^{5W: x1534} _{9W: x1839} | - | 陰性 | なし |

表 2 治験 Ib 相

| 症例 | XAGE-1b | | | NY-ESO-1 | | |
|----------------------------|---------|----------------|---|----------|--------|-------|
| | 抗原発現 | 投与前抗体価 | 抗体価増減 | 抗原発現 | 投与前抗体価 | 抗体価増減 |
| B-01 NCC-03 投与中止8W(6) | - | 陰性 | なし | - | 陰性 | なし |
| B-02 OUH-04 | - | 陰性 | なし | - | 陰性 | なし |
| B-03 KMSH-07 投与中止10W(8) | + | 陽性(0W: x10561) | あり ^{5W: x9231} _{9W: x7503} | - | 陰性 | なし |
| B-04 KEI-01 | - | 陰性 | なし | - | 陰性 | なし |
| B-05 KEI-03 投与中止5W(5) | - | 陰性 | なし | - | 陰性 | なし |
| B-07 NCUH-08 | - | 陰性 | なし | + | 陰性 | なし |
| B-08 NCC-04 投与中止5W(2) | - | 陰性 | なし | - | 陰性 | なし |

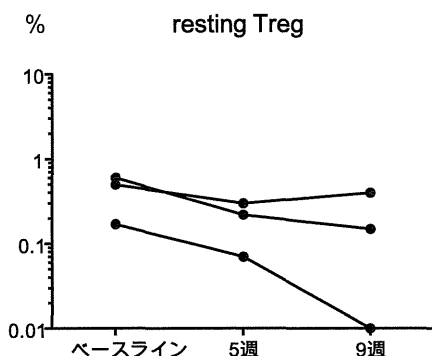
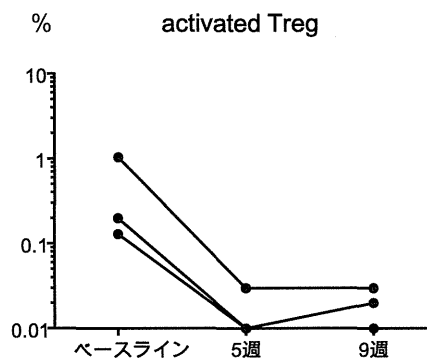
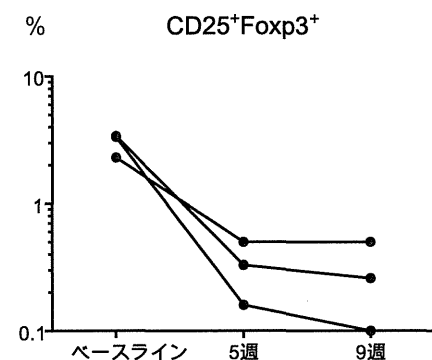
XAGE-1b 抗体反応は、3 例（肺癌 3 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で 2 例（肺癌 2 例）において抗体価の有意な上昇を認めた。NY-ESO-1 抗体反応は、3 例（肺癌 3 例：抗原陽性抗体陽性 2 例、抗原陰性抗体陽性 1 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で 1 例（肺癌）において抗体価の有意な上昇を認めた。

Ib 相部においては、XAGE-1b 抗原は 7 例中（肺癌 1 例、食道癌 2 例、悪性黒色腫 3 例、卵巣癌 1 例）1 例（肺癌）で陽性、NY-ESO-1 抗原も 7 例中 1 例（悪性黒色腫）で陽性であった。

XAGE-1b 抗体反応は、1 例（肺癌）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で抗体価の有意な低下を認めた。NY-ESO-1 抗体反応は、1 例（悪性黒色腫）で治験薬投与前に陰性で、治験薬投与 9 週時点で抗体価の上昇は認めなかった。

2. 抗原特異的 CD4、CD8 T 細胞反応解析

Ia 相部において川崎医科大学で登録した肺癌症例 5 例のうち 3 例について、抗原特異的 CD4、CD8 T 細胞反応を経時的に免疫モニタリングによって解析した。



XAGE-1b 抗原抗体陽性 1 例でベースライン、7 週、12 週の抗原特異的 T 細胞免疫応答を検討した結果、12 週時点で CD8 T 細胞の TNF α 産生細胞の有意な上昇を認めた。本症例では、XAGE-1b 抗体についても有意な上昇を認めている。

NY-ESO-1 抗原抗体陽性 1 例、抗原のみ陽性 1 例で同様の検討を行ったが、抗原特異的な T 細胞免疫応答の上昇は認めなかった。

3. Treg および MDSC 解析

Ia 相部において川崎医科大学で登録した肺癌症例 5 例のうち 3 例について、ベースライン、5 週、9 週における制御性 T 細胞分画（CD25⁺Foxp3⁺分画、CD45RA⁺Foxp3^{lo} resting Treg 分画、CD45RA⁻Foxp3^{hi} activated Treg 分画、CD45RA⁻Foxp3^{lo} non Treg 分画）および MDSC 分画をフローサイトメトリー法で解析した。その結果、3 例すべてにおいて、ベースラインに比較して投与 5 週、9 週において CD25⁺Foxp3⁺、Activated Treg、non Treg 分画の減少を認めた（図 1）。Resting Treg 分画は 3 例中 1 例で低下傾向であったが、2 例は横ばいであった。

MDSC 分画の解析においては、M-MDSC 分画は 3 例中 1 例で著明な増加を認め、2 例で緩やかな増加を認めた。

4. T 細胞表面活性化分子および抑制性分子解析

ベースライン、7 週、12 週における T 細胞表面活性化分子および抑制性分子の発現を検討した。CD4 表面上の ICOS 分子の発現が 3 例全例において上昇傾向であった。CD8 における ICOS 発現は 1 例において上昇傾向であったが、2 例は横ばいであった。CD4 表面上の PD-1 分子の発現は、2 例において上昇傾向であった。一方、CD8 における PD-1 分子の発現は 3 例において緩やかな上昇を認めた。

D. 考察

第 Ia/Ib 相部登録症例 16 例（肺癌 8 例、食道癌 4 例、悪性黒色腫 3 例、卵巣癌 1 例）のうち、XAGE-1b 抗原については 4 例（肺癌 4 例）が陽性、NY-ESO-1 抗原についても 4 例（肺癌 3 例、悪性黒色腫 1 例）が陽性であった。そのうち 1 例（肺癌）は XAGE-1b と NY-ESO-1 抗原共に陽性であった。

XAGE-1b 抗体反応は、4 例（肺癌 4 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与により 3 例（肺癌 3 例）で抗体価の有意な上昇を認めた。

NY-ESO-1 抗体反応は、4 例（肺癌 3 例、悪性黒色腫 1 例）で治験薬投与前に陽性であり、1 例（肺癌）で抗体価の有意な上昇を認めた。

肺癌症例 5 例のうち、3 例について経時的に抗原特異的 CD4、CD8 T 細胞反応を免疫モニタリングにより解析し、XAGE-1b 抗原抗体陽性例の 1 例で CD8 T 細胞の TNF α 産生細胞の有意な上昇を認めた。一方、NY-ESO-1 抗原陽性例 3 例では抗原特異的な T 細胞免疫応答の上昇は認めなかった。

Treg 分画の解析では、3 例すべてにおいて、CD25⁺Foxp3⁺、Activated Treg、non Treg 分画の減少を認めた。一方、M-MDSC 分画は 3 例で増加を認めた。

T 細胞表面活性化分子および抑制性分子解析では、CD4 表面上の ICOS 分子の発現が上昇し

た。

E. 結論

Mogamulizumab 投与によって、末梢血中の Treg は除去された。CD4 上の活性化分子である ICOS の誘導が確認されたが、Treg 除去によるものと考えられる。さらに、一部の症例においては、抗原特異的な液性および細胞性免疫が誘導されていることが確認できた。しかしながら免疫抑制細胞である M-MDSC の上昇を認め、Mogamulizumab 投与によって Treg が除去されても、免疫活性化が抑制されている可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

- (1) Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, Honda H, Yamashita T, Nohara S, Oka M, Jimbow K, and Nakayama E. TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimid-dextran (NPCMD). *J Dermatol Sci*, 73(3): 209-215, 2014.
- (2) Mizote Y, Uenaka A, Isobe M, Wada H, Kakimi K, Saika T, Kita S, Koide Y, Oka M, and Nakayama E. Production of NY-ESO-1 peptide/DRB1*08:03 tetramers and ex vivo detection of CD4 T-cell responses in vaccinated cancer patients. *Vaccine*, 32(8): 957-964, 2014.
- (3) Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Udono H, Seto Y, Yamada K, Nishikawa H, Pan L, Venhaus R, Oka M, Doki Y, Nakayama E. Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with

- cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother*, 37(2): 84-92, 2014.
- (4) Takaki A, Yagi T, Yasunaka T, Sadamori H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Sato D, Nobuoka D, Utsumi M, Yasuda Y, Nakayama E, Miyake Y, Ikeda F, Shiraha H, Nouse K, Fujiwara T, and Yamamoto K. Which patients respond best to hepatitis B vaccination after a hepatitis B virus-related liver transplantation? *J Gastroenterol*, 48(12): 1373-1383, 2013.
- (5) Pandey J, Namboodiri A, Ohue Y, Oka M, Nakayama E. Genetic variants of immunoglobulin γ and κ chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Exp Immunol*, 176(1): 78-83, 2013.
- (6) Reis BS, Jungbluth AA, Frosina D, Holz M, Ritter E, Nakayama E, Ishida T, Obata Y, Carver B, Scher H, Scardino P, Slovin S, Subudhi SK, Reuter VE, Savage C, Allison JP, Melamed JM, Jäger E, Ritter G, Old LJ, Gnajatic S. Prostate cancer progression correlates with increased humoral immune response to a human endogenous retrovirus GAG protein. *Clin Cancer Res*, 19(22): 6112-6125, 2013.
- (7) Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, Nakayama E, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, and Kamihira M. T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 8(6): 891-902, 2013.
- (8) Muraoka D, Nishikawa H, Noguchi T, Wang L, Harada N, Guillaume P, Luescher I, Uenaka A, Nakayama E, Old LJ, Kato T, and Shiku H. Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8⁺ T cells. *Vaccine*, 31(17): 2110-2118, 2013.
- (9) 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*, 2013: 742925, 2013.
- (10) Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Fujita J, Hirao T, Makari Y, Shibata K, Iijima S, Jungbluth AA, 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(5): 1119-1125, 2013.
- 和文
- (11) 和田 尚、中山睿一、免疫バイオマーカーと抗腫瘍効果、*実験医学 増刊 腫瘍免疫学とがん免疫療法*、羊土社、31(12): 204-208, 2013.
- (12) 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. 学会発表
- (13) Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Ohue Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E, Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb. (ポスター)、Washington, DC, USA