

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、CD8T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、CD8T細胞反応は、IFN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、CD8T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、CD8T細胞反応は、IFN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。この他、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CD8T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 6W (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

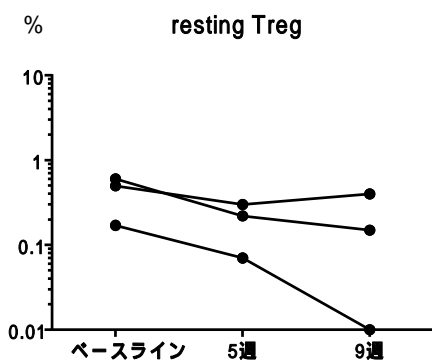
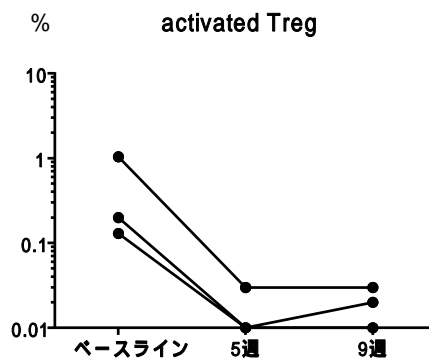
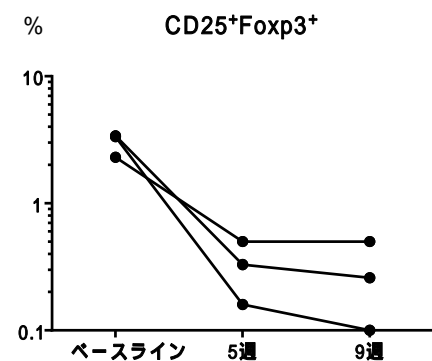
XAGE-1b 抗体反応は、3 例（肺癌 3 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で 2 例（肺癌 2 例）において抗体価の有意な上昇を認めた。NY-ESO-1 抗体反応は、3 例（肺癌 3 例：抗原陽性抗体陽性 2 例、抗原陰性抗体陽性 1 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で 1 例（肺癌）において抗体価の有意な上昇を認めた。

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 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 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

- (104th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR))
2013 年 4 月 6 日
- (14) Ohue Y, Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Matsumoto H, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Nakayama E, Oka M, Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance.(ポスター) Washington, DC, USA (104th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR)) 2013 年 4 月 6 日
- (15) 黒瀬浩史, 松本博文, 大植祥弘, 阿部公亮, 榮川伸吾, 溝手 雄, 磯辺みどり, 上中明子, 永安 武, 中山睿一, 岡 三喜男、非小細胞肺癌患者における癌精巢抗原 XAGE-1d に対する免疫応答 (口頭) 東京 (第 53 回日本呼吸器学会学術講演会) 2013 年 4 月 19 日
- (16) 大植祥弘, 橋高 誠, 黒瀬浩史, 池田征樹, 阿部公亮, 清水大樹, 毛利圭二, 加藤茂樹, 尾長谷 靖, 小橋吉博, 福田 実, 中山睿一, 岡 三喜男、がん精巢抗原 XAGE-1b を標的にしたがん免疫療法の開発 (ポスター) 東京 (第 53 回日本呼吸器学会学術講演会) 2013 年 4 月 19 日
- (17) Isobe M, Eikawa S, Kakimi K, Wada H, Mizote Y, Ohue Y, Kurose K, Uenaka A, Oka M, Nakayama E, phase I study of vaccination with 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. (口頭) 山口 (第 17 回日本がん免疫学会総会) 2013 年 7 月 3 日
- (18) 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. (口頭) 山口 (第 17 回日本がん免疫学会総会) 2013 年 7 月 3 日
- (19) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto Y, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Oka M, Nakayama E, Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance.(口頭) 山口 (第 17 回日本がん免疫学会総会) 2013 年 7 月 3 日
- (20) 溝手 雄, 若松一雅, 伊藤祥輔, 上中明子, 黒瀬浩史, 大植祥弘, 西尾祐美, 岡 三喜男, 神保孝一, 中山睿一、新規製剤 N-propionyl cysteaminyphenol-maleimid-dextran(NP-CMD)による免疫応答賦活効果 (口頭) 山口 (第 17 回日本がん免疫学会総会) 2013 年 7 月 3 日
- (21) Kurose K, Ohue Y, Mizote 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) 仙台 (第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会) 2013 年 8 月 29 日
- (22) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto Y, Isobe M, Fukuda M, Uenaka A, Nakayama E, Oka M, Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance.(口頭) 仙台 (第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会) 2013 年 8 月 29 日
- (23) Kurose K, Ohue Y, Mizote 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) New York, USA (21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium) 2013 年 9 月 30 日
- (24) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto H, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Oka M, Nakayama E, Prolonged overall survival in XAGE-1b(GAGED2a) antibody positive NSCLC patients. (ポスター) New York, USA (21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium) 2013 年 9 月 30 日
- (25) 西塔拓郎, 和田 尚, 磯辺みどり, 垣見和宏, 榮川伸吾, 大植祥弘, 西川博嘉, 岡 三喜男, 森 正樹, 土岐祐一郎, 中山睿一、

NY-ESO-1 重複長ペプチドを用いたがんワクチン第 相臨床試験(口頭) 横浜(第 72 回日本癌学会学術総会) 2013 年 10 月 4 日

(26) 榮川伸吾、垣見和宏、磯辺みどり、和田 尚、上中明子、葛島清隆、西川博嘉、鶴殿平一郎、岡 三喜男、中山睿一、NY-ESO-1(NY-ESO-1 91-110)ペプチドワクチンによる抗体 CD4・CD8 T 細胞免疫応答の誘導(口頭) 横浜(第 72 回日本癌学会学術総会) 2013 年 10 月 4 日

(27) 溝手 雄、若松一雅、伊藤祥輔、上中明子、黒瀬浩史、大植祥弘、西尾祐美、岡 三喜男、神保孝一、中山睿一、新規製剤 NPCMD による TLR4、NLRP3 の活性化と T 細胞免疫応答の賦活化(ポスター) 横浜(第 72 回日本癌学会学術総会) 2013 年 10 月 4 日

(28) 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

(29) 黒瀬浩史、大植祥弘、堅田洋佑、阿部公亮、磯辺みどり、松本博文、上中明子、中山睿一、

岡 三喜男、Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb.(ポスター) 東京(第 54 回日本肺癌学会総会) 2013 年 11 月 21 日

(30) 大植祥弘、黒瀬浩史、松本博文、阿部公亮、堅田洋佑、磯辺みどり、上中明子、福田実、中山睿一、岡 三喜男、Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance.(口頭) 東京(第 54 回日本肺癌学会総会) 2013 年 11 月 21 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

3. その他