

201332022A

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)

ヒト型抗CD4抗体の癌免疫細胞療法への  
適応を目指した前臨床開発研究  
(H25-実用化(がん)-一般-002)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松島 綱治

平成26(2014)年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

ヒト型抗CD4抗体の癌免疫細胞療法への適応を目指した前臨床開発研究	1
松島綱治	

### II. 分担研究報告

1. ヒト型抗CD4抗体のGMP基準生産と前臨床開発研究	8
伊藤 哲	
2. ヒト型抗CD4抗体による抗腫瘍効果の細胞・分子機序解析	11
上羽悟史	
竹田和由	
3. マウスモデルを用いた抗CD4抗体併用によるペプチドワクチンの増強効果の検討	16
中面哲也	
4. 医師主導第1相臨床試験（医師主導治験）の計画、および、 臨床サンプルを用いた抗CD4抗体の効果の検証を目的とした臨床研究計画書の作成	19
北野滋久	
中面哲也	
塚崎邦弘	
佐藤暁洋	
渡邊協孝	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
---------------------	----

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# 総括研究報告書

ヒト型抗 CD4 抗体の癌免疫細胞療法への適応を目指した前臨床開発研究

研究代表者 松島綱治 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野 教授

研究分担者

伊藤 哲 IDAC セラノスティクス株式会社 社長  
上羽悟史 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野 講師  
竹田和由 順天堂大学医学部免疫学講座 准教授  
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  
塚崎邦弘 国立がん研究センター東病院血液腫瘍内科 科長  
北野滋久 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター先端医療科 医員  
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  
渡邊協孝 国立がん研究センター東病院治験管理室 治験事務局長

研究協力者

荻原 春 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野 特任研究員  
横地祥司 IDAC セラノスティクス株式会社 研究部長

研究要旨

新規ヒト型化抗 CD4 抗体は、同種造血幹細胞移植（allo-HSCT）への適応のみならず種々の癌治療・免疫細胞療法との併用が期待される。本研究では GMP 基準抗体の生産とそれを使用した GLP 基準での安全性・毒性試験の実施計画立案と実施、固形癌患者における抗体単独投与による医師主導第 1 相臨床試験プロトコール作成および様々な癌治療への応用可能性を検証するための前臨床研究を主な目的とする。そのために本研究では、1) 本抗体の GMP 基準生産と GLP 基準での安全性・毒性試験立案・実施（平成 25-27 年）が最も重要な課題である。委託先として選定した英国の Cobra Biologics 社にて GMP 製造に向けて必要な種々作業を順調に進めている。平成 25 年度、ADCC 活性の安定的評価法として Promega 社の Jurkat 細胞に Fc $\gamma$ R1IIa 遺伝子を導入し、更に effector 細胞・抗体・target 細胞が全て同時に結合して初めて光を発するという試薬系を採用することにした。Jurkat 細胞自体が CD4 陽性細胞であった為に、遺伝子操作した Jurkat 細胞を target & effector 細胞として利用する ADCC 活性評価法を仕上げた。CDC 活性による細胞傷害活性がないことも確認した。また、PMDA と平成 25 年 12 月 26 日に事前相談を実施した。2) 医師主導第 1 相臨床治験プロトコールを作成する（平成 26-27 年度）。この間試験デザインを決定しプロトコールおよび付随する IC 文書・SOP を準備中である。治験薬概要書の作成が済み次第施設の倫理委員会に提出する予定である。3) CD4 (+) 免疫抑制性細胞制御による様々な癌免疫細胞療法への応用を検討する（平成 25-27 年度）。本年度は B16F10-C57BL/6、colon26-BALB/c、および LLC-C57BL/6 の皮下腫瘍モデルにおいて、抗 CD4 抗体単回投与、複数回投与、投与時期について検討し、単回よりも複数回（2 回）投与でより効果が高いこと、腫瘍の種類により投与時期に至適時期があることが判明した。現在、世界的に Immuno-checkpoint 阻害抗体の効果が注目されているので、それらとの併用についても検討した結果、抗 PD1 抗体と抗 CD4 抗体併用において劇的な相乗効果が観察された。全ての研究はヘルシンキ宣言および各種法令、倫理指針などを遵守し遂行した。本研究を達成することで難治癌患者に対して抗 CD4 抗体により安全性を担保した allo-HSCT の施行、ならびに免疫不全解除による単独、他の免疫・細胞療法との併用治療など斬新な治療法を提供でき、医療上の大きなメリットがある。本抗体は知財、研究面いずれに於いても日本発のオリジナルであり、経済的波及効果も大きい。

## A. 研究目的

新規ヒト型化抗 CD4 抗体は、同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) への適応のみならず種々の癌治療・免疫細胞療法との併用が期待される。本研究では GMP 基準抗体の生産とそれを使用した GLP 基準での安全性・毒性試験の実施計画立案と実施、固形癌患者における抗体単独投与による医師主導第 1 相臨床治験プロトコール作成および様々な癌治療への応用可能性を検証するための前臨床研究を主な目的とする。

## B. 研究方法

### GMP 製造委託会社選定：

GMP 委託製造を受託する会社をリスト化し、種々解析能力等技術評価を行い、詳細な見積もり依頼を行った。その後、面談・技術内容レベルの評価を実施後に実地調査を行った。またできる限り一社で抗体バルク製造から注射液分注まで一貫して実施できる会社を探索した。

ADCC 活性評価の標準化：健常人由来血液を用いず、ヒト型化抗 CD4 抗体の NK 細胞依存性細胞傷害活性、ADCC (CDC 活性ではない) の安定的定量法を確立する。

### 抗 CD4 抗体単独による抗腫瘍作用：

C57BL/6 マウスにメラノーマ細胞株 B16F10 または肺がん細胞株 Lewis Lung Carcinoma (LLC)、BALB/c マウスに大腸がん細胞株 Colon16 を腹側に皮下 (s. c.) 移植し固形腫瘍を作製した。腫瘍移植前 2 日目 (day-2)、移植後 3 日目 (day3)、5 日目 (day5)、9 日目 (day9)、あるいは 12 日目 (day12) に抗 CD4 抗体 (GK1.5, 200ug) を腹腔内 (i. p.) 投与して、2~3 日おきに腫瘍径を測定した。腫瘍体積、生存率を指標として抗 CD4 抗体の抗腫瘍効果を評価した。

### 抗 CD4 抗体と抗 PD-1 (CD279) 抗体との併用：

C57BL/6 マウスにメラノーマ細胞株 B16F10 または肺がん細胞株 Lewis Lung Carcinoma (LLC)、BALB/c マウスに大腸がん細胞株 Colon26 を腹側に皮下 (s. c.) 移植し固形腫瘍を作製した。腫瘍移植後 5 日目 (day5) に抗 CD4 抗体 (200ug) を腹腔内 (i. p.) 投与して、2~3 日おきに腫瘍径を測定した。抗 PD-1 抗体 (J43, 200ug) は day4 から 5 日間連続 (1クール) i. p. 投与した。

### 抗 CD4 抗体と抗 PD-1 (CD279) 抗体との併用一スケジュールおよび投与回数の最適化：

C57BL/6 マウスにメラノーマ細胞株 B16F10 を腹側に皮下 (s. c.) 移植し固形腫瘍を作製した。腫瘍移植後 5 日目 (day5) 単回、あるいは、day5 および day9 の 2 回、抗 CD4 抗体 (200ug) を腹腔内 (i. p.) 投与して、2~3 日おきに腫瘍径を測定した。抗 PD-1 抗体 (200ug) は day4 から 5 日間連続 (1クール)、あるいは、day4 から 5 日間かつ day14 から 5 日間の合計 10 日間 (2クール)、あるいは、day4, day8, day14, day18 の合計 4 日間 (2クール)、i. p. 投与した。

### (倫理面への配慮)

本研究で使用した研究代表者の遺伝子組換え実験に関する二種申請は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「T/B リンパ球、樹状細胞におけるケモカイン/ケモカイン受容体の炎症・免疫疾患における役割の解析と新規治療法の開発 (承認番号20-2)」により東京大学・医学部組換えDNA実験安全委員会から承認されており、適切な拡散防止措置のもと研究を遂行した。

本研究で行った研究代表者の動物実験は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「炎症・免疫疾患における免疫担当細胞・組織細胞の動態制御 (承認番号：医-P12-35P2A)」により東京大学医学系研究科・医学部動物実験委員会から承認されており、法令および東京大学動物実験実施マニュアルに則って遂行した。

(研究分担者については分担報告書に記載)

## C. 研究結果

### GMP 製造：

委託先企業の種々選択基準を満足した企業として英国の Cobra Biologics 社を選定し、契約を締結した。Cobra 社は培養タンク設備、培養・精製研究施設を Sweden に有する会社で、AstraZeneca 社が Biologics 部門を MedImmune 社に統合した際に切り出された部門を施設・人材共に買収したもので、現在も AstraZeneca 社の敷地内で活動している。契約は平成 25 年 11 月 20 日付で締結した。特にヒト型化抗 CD4 抗体の GMP 製造に当たり注力した ADCC 活性測定法は、Promega 社が販売を始めた ADCC reporter Bioassay KIT を基本にした。従来から用いられている個人末梢血由来の測定

系は、個人差、季節差がある事が知られている事から、より定量的な議論ができる系を求めたものである。Target細胞としてTHP-1細胞を使用した。残念ながらKITが提供するFc $\gamma$ RIIIa遺伝子を導入したJurkat細胞自体がCD4を発現していたので、Jurkat細胞がtarget細胞としても、effector細胞としても作用する事が判明した。種々検討の末、Jurkat細胞をtarget・effector細胞として利用する系で十分ADCC活性の評価が可能と判断した。

本年度はCobra社によりDevelopment of a Binding Assay、Set-up of an ADCC potency assay、Set-up of a CDC potency assay、cell culture process development、cell culture supply run for purification process evaluation、purification process developmentが実施された。

**PMDA 対面助言：**

対面助言に向けての事前相談を平成25年12月26日に受けた。東京大学・がん研究センター・IDACの担当者が相談しながら質問事項を持参し、PMDA審査官から回答を貰ったが、データ提示なしでの質問に対しては「回答するになじまない」と指摘を受けたが、正式な対面助言に向けての質問に対しての考え方は理解できるよう丁寧な説明がなされた。平成26年度には各担当者がデータ整理を行い、臨床プロトコルを念頭にしたGLP安全性試験内容を設計してPMDAの対面助言を受ける予定である。

また、国立がん研究センターにおいてCCR4(-)CD4(+)白血病細胞への殺細胞効果、ならびに、進行がん患者で本抗体によるCD4陽性T細胞、単球(CD4弱陽性)、さらには、免疫抑制作用をもつ制御性T細胞やMDSC(Myeloid derived suppressor cells)の減少効果について臨床サンプルを用いた*in vitro*での検証を行うための臨床研究計画書を、国立がん研究センターの研究倫理審査委員会へ提出する。国立がん研究センターにおける医師主導第1相臨床試験(治験)のプロトコルを作成するために、この間試験デザインを基本的に決定しプロトコルおよび付随するIC文書・SOPを準備し、治験薬概要書の作成が済み次第、施設の治験審査委員会に提出する予定である。

**抗CD4抗体単独による抗腫瘍作用：**

抗CD4抗体は、B16固形腫瘍の増殖をday-2~day5の投与タイミングで有意に抑制した(図1)。また、Colon26固形腫瘍の増殖もday3~day12の投与タイミングで有意に抑制した(図2)。さらに、LLC固形腫瘍の増殖も抗CD4抗体はday3~day9の投与タイミングで有意に抑制した(図3)。

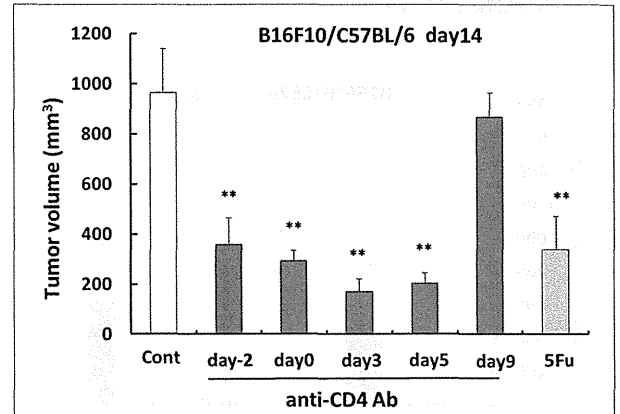


図1 B16F10固形がんに対する抗CD4抗体の作用

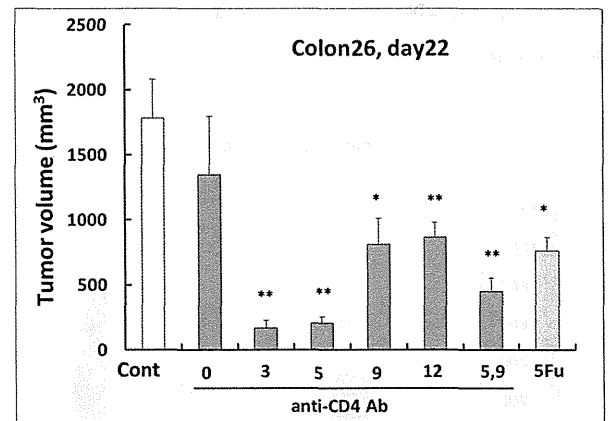


図2 Colon26固形がんに対する抗CD4抗体の作用

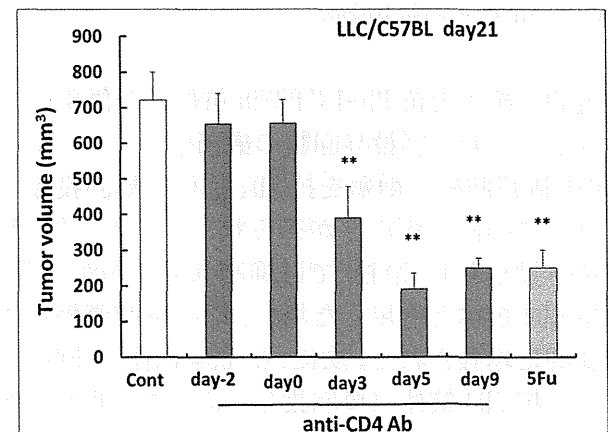


図3 LLC固形がんに対する抗CD4抗体の作用

### 抗 CD4 抗体と抗 PD-1 (CD279) 抗体との併用：

抗 CD4 抗体は、B16 固形腫瘍の増殖を有意に抑制した。一方、抗 PD-1 抗体投与群では抑制効果は弱かったが、抗 CD4 抗体と併用した場合、その抗腫瘍効果は相乗的に増強された (図 4)。また、Colon26 固形腫瘍の増殖も抗 CD4 抗体は有意に抑制した。一方、抗 PD-1 抗体投与群ではほとんど抑制されなかったが、抗 CD4 抗体と併用した場合、その抗腫瘍効果は見られた (図 5)。

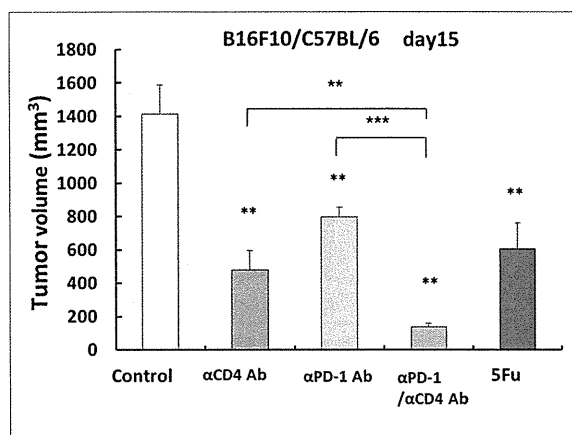


図 4 B16F10 固形がんに対する抗 CD4 抗体と抗 PD-1 抗体との併用効果

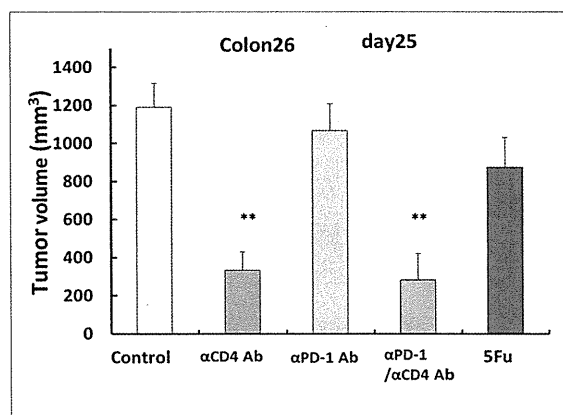


図 5 Colon26 固形がんに対する抗 CD4 抗体と抗 PD-1 抗体との併用効果

### 抗 CD4 抗体と抗 PD-1 (CD279) 抗体との併用スケジュールおよび投与回数の最適化：

B16 固形腫瘍の増殖を抗 CD4 抗体 (単回投与) は有意に抑制し再現性が得られた。一方、抗 PD-1 抗体投与群 (5 連投) では抑制効果は弱かったが、抗 CD4 抗体と併用した場合、その抗腫瘍効果は相加的に増強された。次に、抗 CD4 抗体 (2 回投与) は、抗 CD4 抗体 (単回投与) よりも、B16 固形腫瘍の増殖を顕著に抑制し、腫瘍対照群との腫瘍体積の平均値の差は有意であった。一方、抗 PD-1

抗体投与群 (4 回投与、2 クール) では抗 PD-1 抗体投与群 (5 連投、1 クール) よりも抑制効果が増強された (図 6)。

抗 CD4 抗体と抗 PD-1 抗体を併用した場合、抗 PD-1 抗体投与群 (4 回投与、2 クール) も抗 PD-1 抗体投与群 (10 連投、2 クール) も、その抗腫瘍効果は相乗的に増強され、一時的には退縮するものもあらわれた。

また、B16 担癌マウスに対する延命試験を行ったところ、抗 CD4 抗体を投与した群では延命効果を認めた。特に、2 回投与でその効果は著しく増強された。

一方、抗 PD-1 抗体投与では延命効果は見られなかったが、興味深いことに両抗体の併用では抗 CD4 抗体 2 回投与と同程度のきわめて顕著な延命効果の増強が見られた。

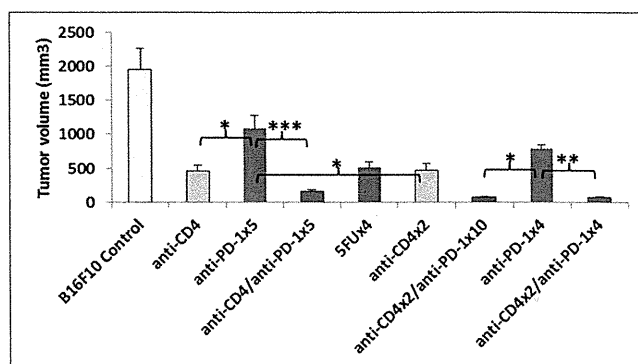


図 6 B16F10 固形がんに対する抗 CD4 抗体と抗 PD-1 抗体との併用効果—投与スケジュールと回数の最適化

### D. 考察

今回、抗 CD4 抗体投与療法が複数の固形がんモデルに対して腫瘍増殖を抑制し、延命効果につながることを確認された。一方、その効果が期待されている抗 CD137 抗体あるいは抗 PD-1 抗体は抗 CD4 抗体よりもその効果は弱かった。

しかしながら抗 CD4 抗体とその他の抗体の併用療法では抗 CD137 抗体あるいは抗 PD-1 抗体はもちろん、抗 CD4 抗体単独のそれを上回るほど相加あるいは相乗的に抗腫瘍作用の増強が見られた。

今後、抗 CD4 抗体の抗腫瘍作用における作用機序の詳細な解析を進める予定である。

### E. 結論

委託先として選定した英国の Cobra Biologics 社にて GMP 製造に向けて必要な種々作業が順調に

進行している。本抗体の ADCC 活性の安定的評価法を確立した。PMDA と平成 25 年 12 月 26 日に事前相談を実施し、今後対面助言を得る予定である。マウス皮下腫瘍モデルにおいて、抗 CD4 抗体単回投与、複数回投与、投与時期について検討し、至適時期があることが判明した。現在、世界的に注目されている Immuno-checkpoint 阻害抗体との併用についても検討した結果、Colon26 については抗 PD1 抗体と抗 CD4 抗体併用において劇的な相乗効果が観察された。今後の臨床開発プロトコールに反映させる。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Toda E, Terashima Y, Esaki K, Yoshinaga S, Sugihara M, Kofuku Y, Shimada I, Suwa M, Kanegasaki S, Terasawa H, Matsushima K. Identification of a binding element for the cytoplasmic regulator FROUNT in the membrane-proximal carboxy-terminal region of chemokine receptors CCR2 and CCR5. *Biochem J.* 457 (2) :313-22, 2014.
2. Hosoi A, Matsushita H, Shimizu K, Fujii SI, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Maekawa R, Matsushima K, Kakimi K. Adoptive cytotoxic T lymphocyte therapy triggers a counter-regulatory immunosuppressive mechanism via recruitment of myeloid-derived suppressor cells. *Int J Cancer.* 34 (8) :1810-22, 2013.
3. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, 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, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature.* 500 (7461) :232-6, 2013.
4. Hashimoto S, Ogoshi K, Sasaki A, Abe J, Qu W, Nakatani Y, Ahsan B, Oshima K, Shand FH, Ametani A, Suzuki Y, Kaneko S, Wada T, Hattori M, Sugano S, Morishita S, Matsushima K. Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells. *J Immunol.* 190 (8) :4076-91, 2013.
5. Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaki M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba K, Ohteki T. A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity.* 38 (5) :943- 57, 2013.
6. Suzuki H, Fukuhara M, Yamaura T, Mutoh S, Okabe N, Yaginuma H, Hasegawa T, Yonechi A, Osugi J, Hoshino M, Kimura T, Higuchi M, Shio Y, Ise K, Takeda K, Gotoh M. Multiple therapeutic peptide vaccines consisting of combined novel cancer testis antigens and anti-angiogenic peptides for patients with non-small cell lung cancer. *J Trans Med.* 11 (1) :97, 2013.
7. Takahashi K, Takeda K, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. Functional roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-DR5 interaction in B16F10 cells by activating the nuclear factor-kB pathway to induce metastatic potential. *Cancer Sci.* 104 (5) :558-562, 2013.
8. Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, Okuyama R, Matsushita N, Ohta T, Takeda K, Yamamoto M. Long-term vaccination with multiple peptides derived from cancer-testis antigens can maintain a specific T-cell responses and achieve disease stability in advanced biliary tract cancer. *Clin Cancer Res.* 19 (8) :2224-2231, 2013.
9. Asahara S, Takeda K, Yamao K, Maguchi H, Yamaue H. Phase I/II clinical trial using HLA-A24-restricted peptide vaccine derived from KIF20A for patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med.* 11 (1) :291, 2013.
10. Okuyama R, Aruga A, Hatori T, Takeda K, Yamamoto M. Immunological responses to a multi-target vaccine composed of peptides of cancer testis antigens and vascular



- endothelial growth factor receptors in patients with advanced pancreatic cancer. *OncoImmunology*. 2 (11):e27010, 2013.
11. Suzuki N, Hazama S, Ueno T, Matsui H, Shinoda Y, Iida M, Yoshimura K, Yoshino S, Takeda K, Oka M. A phase I clinical trial of vaccination with KIF20A-derived peptide in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother*. 37 (1): 36-42, 2014.
  12. Yoshimura S, Tsunoda T, Osawa R, Harada M, Watanabe T, Hikichi T, Katsuda M, Miyazawa M, Tani M, Iwahashi M, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Yamaue H. Identification of an HLA-A2-restricted epitope peptide derived from hypoxia-inducible protein 2 (HIG2). *PLoS ONE*. 9 (1):e85269, 2014.
  13. Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, Okuyama R, Matsushita N, Ohta T, Hatori T, Takeda K, Yamamoto M. Phase I clinical trial of multiple-peptide vaccination for patients with advanced biliary tract cancer. *J Transl Med*. 12 (1):61, 2014.
  14. Hazama S, Nakamura Y, Takeuchi H, Suzuki N, Tsunedomari R, Inoue Y, Iizuka N, Yoshino S, Takeda K, Shinozaki H, Kamiya A, Furukawa H, Oka M. A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome. *J Transl Med*. 12 (1):63, 2014.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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. *Hum Vaccin Immunother*. 10 (2):1-6, 2014.
  18. Kitano S, Tsuji T, Liu C, Hirschhorn-Cymerman D, Kyi C, Mu Z, Allison JP, Gnjatic S, Yuan JD, Wolchok JD. Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients. *Cancer Immunol Res*. 1:235-244, 2013.
  19. Callahan MK, Masters G, Pratilas CA, Ariyan C, Katz J, Kitano S, Russell V, Gordon RA, Vyas S, Yuan J, Gupta A, Wigginton JM, Rosen N, Merghoub T, Jure-Kunkel M, Wolchok JD. Paradoxical activation of T cells via augmented ERK signaling mediated by a RAF inhibitor. *Cancer Immunol Res*. 2:70-79, 2014.
2. 学会発表
    1. Role of Neogenin n GD3- expressing human melanoma cells. 癌内線維芽細胞の近傍のヒト乳がん細胞に転移能を授ける. 折茂彰、伊藤恭彦、竹田和由、奥村康、樋野興夫、堀本義哉. 第72回日本癌学会学術総会(横浜). 2013年10月3日-5日.
    2. A phase 1 clinical trial with KIF20A peptide in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer patients. 切除不能・進行膵癌に対する新規膵癌ペプチドワクチンとゲムシタピン塩酸塩を用いた第1相試験. 鈴木伸明、裕彰一、上野富雄、吉野茂文、竹田和由、中村祐輔、岡正朗. 第72回日本癌学会学術総会(横浜). 2013年10月3日-5日.
    3. Pluripotents stem cell-derived myeloid cells engineered to express TRAIL as a possible cell medicine for cancer. TRAILを発現する多機能幹細胞由来ミエロイド細胞を用いた細胞医薬の開発. 牧寛之、植村靖

- 史、張エイ、竹田和由、劉天懿、鈴木元晴、都築忍、岡村文子、赤塚美樹、西村泰治、千住覚、葛島清隆。第72回日本癌学会学術総会(横浜)。2013年10月3日-5日。
4. Pulripotents stem cell-derived myeloid cells engineered to express TRAIL as a possible cell medicine for cancer. MAKI Hiroyuki, UEMURA Yasushi, AHANG Rong, LIU Tianyi, SUZUKI Motoharu, HIROSAW Natsumi, TAKEDA Kazuyoshi, SAKAMOTO Yasushi, SENJU Satoru, KUZUSHIMA Kiyotaka. 第42回日本免疫学会学術総会(幕張)。2013年12月11日-13日。
  5. 肝細胞がん和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。
  6. 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。
  7. 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。
  8. 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), Oct. 11-12, 2013.
  9. 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。第26回日本バイオセラピー学会(盛岡)。2013年12月5日-6日。
  10. 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。
  11. CTL および $\gamma\delta$ 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。
  12. 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。
  13. Kitano S, Tsuji T, Liu C, Hirschhorn-Cymerman D, Kyi C, Mu Z, Allison JP, Gnjjatic S, Yuan JD, Wolchok JD. Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients. 21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium. CANCER IMMUNOTHERAPY 2013: Dynamics of Host-Tumor Interaction (New York). Sep. 30-Oct. 2, 2013.
  14. Immunomonitoring for anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) therapy in metastatic melanoma. Kitano S, Yuan J, Tada K, Itoh A, Ueda R, Hashimoto H, Mostow MA, Lesokhin AM, Wolchok JD, Heike Y. 第17回日本がん免疫学会(山口)。2013年7月3日-5日。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
発明の名称：固形がんの治療剤  
出願国：日本  
出願番号：特願2014-032241  
出願日：2014年2月21日  
発明人：伊藤哲、横地祥司、松島綱治、上羽悟史、石渡義郎  
特別出願者：IDAC セラノステイクス株式会社、国立大学法人東京大学
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

# 分担研究報告書

## ヒト型抗 CD4 抗体の GMP 基準生産と前臨床開発研究

研究分担者 伊藤 哲 IDAC セラノスティクス株式会社 社長

### 研究要旨

ヒト型化抗 CD4 抗体を GMP 基準で製造し、GLP 基準での安全性を検証する事を主たる分担研究課題としている。GMP 基準での製造に関しては、種々委託先候補会社を候補としてあげ、質的要件を満たしている事が前提で、更に注射薬としての納入が可能な委託先を選定した。Research Cell Bank (RCB)を樹立し、RCB の感染性の否定を英国の BioReliance 社で検証した後に、委託先として選定した英国の Cobra Biologics 社に RCB を送付し、GMP 製造に向けて必要な種々作業を IDAC セラノスティクス社 (IDAC) の指示のもと、順調に各 step を検証しながら進めている。平成 25 年度での重要な step としては、ADCC 活性の評価法で、個人の末梢血に依存する方法では、個人差、季節差が出る事が知られている為に、安定的なデータが得られる方法論の確立に注力した。Promega 社から ADCC 活性評価用試薬として Jurkat 細胞に FcγRIII 遺伝子を導入し、更に effector 細胞・抗体・target 細胞が全て同時に結合して初めて光を発するという試薬系が発表された。Jurkat 細胞自体が CD4 陽性細胞であった為に、遺伝子操作した Jurkat 細胞を target & effector 細胞として利用する系を採用する事で ADCC 活性評価法を仕上げた。CDC 活性による細胞傷害活性では無い事も確認できた。

### A. 研究目的

主目的は、ADCC 活性を賦与したヒト型化抗 CD4 抗体の GMP 製造に向けて必要な各 step の方法論の検証 (validation) を行いながら、GMP 製造を遂行する事、また臨床治験のための GLP 基準に基づく安全性試験実施の計画立案を準備する事。

### B. 研究方法

#### GMP 製造委託会社選定：

GMP 委託製造を受託すると表明している会社をリスト化し、種々解析能力等技術評価を行い、詳細な見積もり依頼を行った。その後、面談・技術内容レベルの評価を実施後に実地調査を行った。またできる限り一社で抗体バルク製造から注射液分注まで一貫して実施できる会社を探索した。今回のヒト型化抗 CD4 抗体は NK 細胞依存性に細胞傷害活性を示す ADCC が担う (CDC 活性ではない) 事を提示する為の方法論の検証に注力した。

PMDA 対面助言：臨床治験申請には PMDA の承認が必要であるが、事前相談をがん研究センター・東京大学と共に相談しながら、対面助言に向けた活動を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した遺伝子組換え実験に関する

申請は、研究代表者の東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「T/B リンパ球、樹状細胞におけるケモカイン/ケモカイン受容体の炎症・免疫疾患における役割の解析と新規治療法の開発 (承認番号20-2)」により東京大学・医学部組換えDNA実験安全委員会から承認されており、適切な拡散防止措置のもと研究を遂行した。

本研究で行った動物実験は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「炎症・免疫疾患における免疫担当細胞・組織細胞の動態制御 (承認番号：医-P12-35P2A)」により東京大学医学系研究科・医学部動物実験委員会から承認されており、法令および東京大学動物実験実施マニュアルに則って遂行した。

### C. 研究結果

#### GMP 製造：

委託先企業の種々選択基準を満足した企業として英国の Cobra Biologics 社を選定し、契約を締結した。Cobra 社は培養タンク設備、培養・精製研究施設を Sweden に有する会社で、AstraZeneca 社が Biologics 部門を MedImmune 社に統合した際に、切り出された部門を施設・人材共に買収したもので、現在も AstraZeneca 社の敷地内で活動している。契約は 2013 年 11 月 20 日付で締結した。

特にヒト型化抗 CD4 抗体の GMP 製造に当たり注力した ADCC 活性測定法は、Promega 社が販売を始めた ADCC reporter Bioassay KIT を基本にした。従来から用いられている個人末梢血由来の測定系は、個人差、季節差がある事が知られている事から、より定量的な議論ができる系を求めたものである。Target 細胞として THP-1 細胞として使用した。残念ながら KIT が提供する FcγRIIIa 遺伝子を導入した Jurkat 細胞自体が CD4 を発現していたので、Jurkat 細胞が target 細胞としても、effector 細胞としても作用する事が判明した。種々検討の末、Jurkat 細胞を target・effector 細胞として利用する系で十分 ADCC 活性の評価が可能と判断した(図1)。

本年度は Cobra 社により Development of a Binding Assay、Set-up of an ADCC potency assay、Set-up of a CDC potency assay、cell culture process development、cell culture supply run for purification process evaluation、purification process development が実施された。

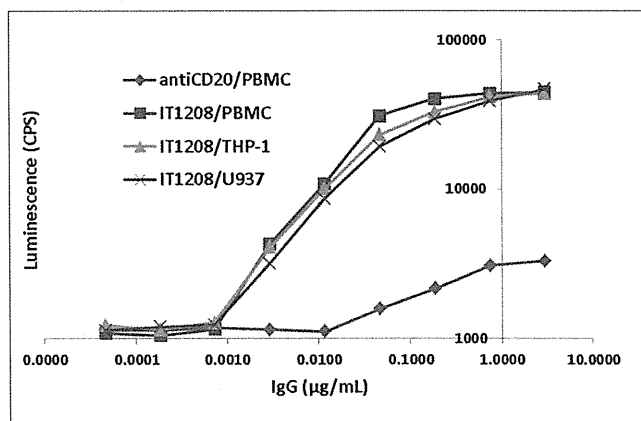


図1 Promega社 ADCC reporter Bioassay KIT による ADCC 活性の測定

#### PMDA 対面助言：

対面助言に向けての事前相談を12月26日に受けた。東京大学・がん研究センター・IDACの担当者が相談しながら質問事項を持参し、PMDA 審査官から回答を貰ったが、データ提示なしでの質問に対しては「回答するになじまない」と指摘を受けたが、正式な対面助言に向けての質問に対しての考え方は理解できるよう丁寧な説明がなされた。平成26年度には各担当者がデータ整理を行い、臨床プロトコルを念頭にしたGLP安全性試験内容を設計してPMDAの対面助言を受ける予定である。

マウス腫瘍モデルでの抗 CD4 抗体単独ならびに他の Immune Checkpoint 抗体との併用実験  
研究代表者らとともにマウス実験腫瘍モデルを用いた種々条件下での抗 CD4 抗体の抗腫瘍効果も検討し、腫瘍増殖抑制効果は一回投与よりは抗 CD4 抗体の2回投与で、より腫瘍増殖抑制効果が強い事と共に、抗 CD4 抗体が生存率に対する延命効果も強い事を確認できた。また、現在世の中で注目を帯びている Immune Checkpoint 抑制剤等との併用効果についても検討し、melanoma、大腸がん、肺がん細胞担がんモデル検討で、いずれも併用効果が確認された。特に大腸がんにおいては抗 CD4 抗体・抗 PD1 抗体の併用で3/8例において腫瘍消失が認められ、腫瘍消失後に改めて5倍量の腫瘍移植後、抗体の追加投与なしに腫瘍の消失を確認したので、免疫系のメモリー樹立が関与しているものと理解できる(これらについては、研究代表による総括で詳述する)。

#### D. 考察

本研究により、GMP製造に係る重要なstepであるADCC活性評価法が確定できた。今後、精製法の確立と共に、Master Cell Bank (MCB) 樹立後に toxicological LOT製造に移行できる可能性が高まった。

皮下腫瘍モデル3種を用い、いずれの腫瘍モデルにおいても抗CD4抗体投与による抗腫瘍増殖効果が確認されると共に延命効果も観察できた事は、これまでのようなTreg以外のCD4陽性細胞を除去する事へのネガティブな影響懸念というイメージとは逆に、マウスモデルにおいては、よりポジティブな面が明らかになってきたと言える。

#### E. 結論

マウスモデルで抗 CD4 抗体単独ならびに Immune Checkpoint 抗体併用投与による強力な腫瘍抑制効果が認められているが、First-in-Human を実現するための必須条件であるヒト型化抗 CD4 抗体の GMP 製造が順調に進捗している。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：固形がんの治療剤

出願国：日本

出願番号：特願 2014-032241

出願日：2014年2月21日

発明人：伊藤哲、横地祥司、松島綱治、上羽  
悟史、石渡義郎

特別出願者：IDAC セラノステイクス株式会社、  
国立大学法人東京大学

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

## ヒト型抗 CD4 抗体による抗腫瘍効果の細胞・分子機序解析

研究分担者 上羽悟史 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野 講師  
研究分担者 竹田和由 順天堂大学医学部免疫学講座 准教授

### 研究要旨

抗 CD4 抗体投与により得られる抗腫瘍効果は、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞をはじめとする免疫抑制性の細胞集団除去によるものと考えられるが、一方で CD4<sup>+</sup> T 細胞は抗腫瘍 CTL 応答の誘導、維持にも関与することが知られており、免疫学的作用機序には未解明な点が残されている。本研究では、抗 CD4 抗体療法の対象疾患選択、治療プロトコルの最適化、治療応答マーカー確立の基礎を築くべく、マウス皮下腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果の細胞・分子機序の解析を行った。3LL 皮下腫瘍モデルにおいて、腫瘍接種 5 日目に抗 CD4 抗体を投与した後、経時的に腫瘍増殖および腫瘍、リンパ組織などにおける免疫担当細胞集団の数的変動を解析した。抗 CD4 抗体投与群では未処置担癌群と比較し、抗体投与 4 日目以降に腫瘍増殖抑制を認めた。抗 CD4 抗体投与群では、全身性に CD4<sup>+</sup> T 細胞ならびに形質細胞様樹状細胞数が減少する一方、CD44<sup>hi</sup> エフェクター型 CD8<sup>+</sup> T 細胞数が増加した。B16F10 皮下腫瘍モデルにおいて、腫瘍接種 1 日前に黒色細胞腫抗原特異的 TCR 発現 CD8<sup>+</sup> T 細胞 (Pmel1) を養子移入し、腫瘍接種 5 日目に抗 CD4 抗体を投与した後、Pmel1 の動態を解析したところ、未処置群では抗体投与 9 日目から 13 日目にかけて全身性に Pmel1 細胞数が減少し、一方、抗 CD4 抗体投与群では特に腫瘍および腫瘍所属リンパ節において Pmel1 細胞数の増加を認めた。さらに、3LL 担癌モデルにおける腫瘍部位では、抗 CD4 抗体投与により *Tnfa*, *Ifng* ならびに IFN- $\gamma$  誘導性遺伝子である *Cxcl10*, また IFN- $\gamma$  による抗腫瘍作用に重要な役割を果たすことが報告されている細胞周期制御分子 *Pml* および *Trp53* などの発現亢進を認めた。これらの結果から、抗 CD4 抗体は腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞の反応を増強することで、腫瘍細胞の細胞周期を抑制し、腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆された。今後、抗 CD4 抗体投与による腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞応答増強の細胞・分子機序を解析するとともに、transcriptome、proteome 解析による治療応答マーカーの探索を行う予定である。

### A. 研究目的

抗 CD4 抗体投与により得られる抗腫瘍効果は、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞をはじめとする免疫抑制性の細胞集団除去によるものと考えられるが、一方で CD4<sup>+</sup> T 細胞は抗腫瘍 CTL 応答の誘導、維持にも関与することが知られており、免疫学的作用機序には未解明な点が残されている。本研究では、抗 CD4 抗体療法の対象疾患選択、治療プロトコルの最適化、治療応答マーカー確立の基礎を築くことを目的とし、マウス皮下腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果の細胞、分子機序の解析を行った。

### B. 研究方法

マウス皮下腫瘍モデル：

3LL (Lewis lung carcinoma) 皮下腫瘍モデルおよび B16F10 (melanoma) 皮下腫瘍モデルを作成した。B16F10 モデルでは、黒色細胞腫抗原 gp100 特異

的 MHC class I 拘束性 TCR (Pmel-1) を遺伝子導入した Tg マウス由来 CD8<sup>+</sup> T 細胞を、腫瘍移植前日に養子移入した。両モデルにおいて、腫瘍移植後 5 日目に抗 CD4 抗体 (Clone GK1.5, 200ug/mouse) を腹腔内投与した。

免疫学的解析：

抗体投与後、2, 4, 8 日目に末梢血、脾臓、所属リンパ節、非所属リンパ節、腫瘍から細胞懸濁液を調整し、種々の表面マーカーを用いたフローサイトメトリーにより免疫担当細胞集団を同定し、細胞数の経時変化を解析した。

遺伝子発現解析：

抗体投与後、2, 4, 8 日目の腫瘍組織より RNA を調整し、RT-qPCR を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した遺伝子組換え実験に関する二

種申請は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「T/B リンパ球、樹状細胞におけるケモカイン/ケモカイン受容体の炎症・免疫疾患における役割の解析と新規治療法の開発（承認番号20-2）」により東京大学・医学部組織換えDNA実験安全委員会から承認されており、適切な拡散防止措置のもと研究を遂行した。

本研究で行った動物実験は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「炎症・免疫疾患における免疫担当細胞・組織細胞の動態制御（承認番号：医-P12-35P2A）」により東京大学医学系研究科・医学部動物実験委員会から承認されており、法令および東京大学動物実験実施マニュアルに則って遂行した。

### C. 研究結果

#### 腫瘍増殖：

3LL および B16F10 の両皮下腫瘍モデルにおいて、いずれも抗体投与4日目以降に腫瘍増殖の抑制傾向を認め、8日目以降に有意な増殖抑制を認め、先行データとほぼ同様の結果が得られた。

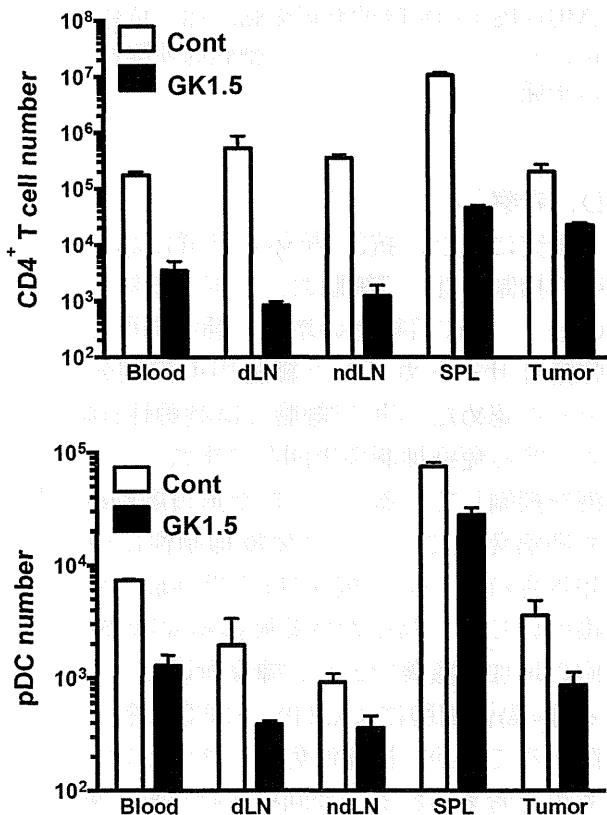


図1 GK1.5はCD4<sup>+</sup>T細胞およびpDCを全身性に除去する：3LL皮下担癌マウス9日目の組織画分におけるCD4<sup>+</sup>T細胞およびpDCの細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。Cont：未処置群、GK1.5：抗CD4抗体(GK1.5, 200ug/mouse)を5日目に投与。

#### 免疫学的解析：

3LL皮下腫瘍モデルでは、解析した組織コンパートメントにおけるLy-6C<sup>hi</sup>炎症性単球/マクロファージ、好中球などの細胞数は、抗CD4抗体投与群と未処置群の間に有意な差を認めなかった。一方、CD4<sup>+</sup>T細胞ならびに部分的にCD4を発現する形質細胞様樹状細胞数は、腫瘍、腫瘍所属リンパ節を含む解析した全ての組織コンパートメントで抗CD4抗体投与群における有意な減少を認めた。これらのCD4陽性細胞の減少は、抗体投与1日目から認められ、少なくとも12日目まで持続することが明らかになった(図1)。

抗腫瘍免疫応答に重要な役割を果たすCD8<sup>+</sup>T細胞数は、観察期間を通じて有意な差を認めなかったが、CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>エフェクター型CD8<sup>+</sup>T細胞数は、抗体投与後2日目および4日目には末梢血において抗体投与群に有意な増加を認め、また抗体投与後8日目には全組織コンパートメントで、抗体投与群における有意な増加を認めた(図2)。

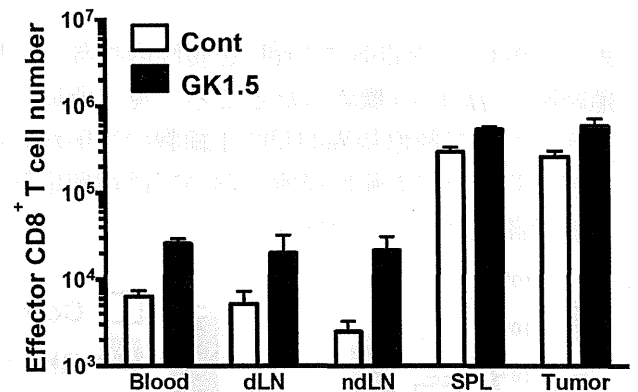


図2 GK1.5は全身性にエフェクター型CD8<sup>+</sup>T細胞を増加させる：3LL皮下担癌マウス13日目の組織画分におけるCD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>エフェクター型CD8<sup>+</sup>T細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。

B16F10皮下腫瘍モデルにおける腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞数の動態を解析したところ、未処置群では抗体投与9日目から13日目にかけて腫瘍増殖に伴い腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が全身性に減少する“deletion”または“exhaustion”に陥るのに対し、抗CD4抗体投与群では腫瘍、腫瘍所属リンパ節を含む全組織コンパートメントにおいて、腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が経時的に増加していた(図3)。



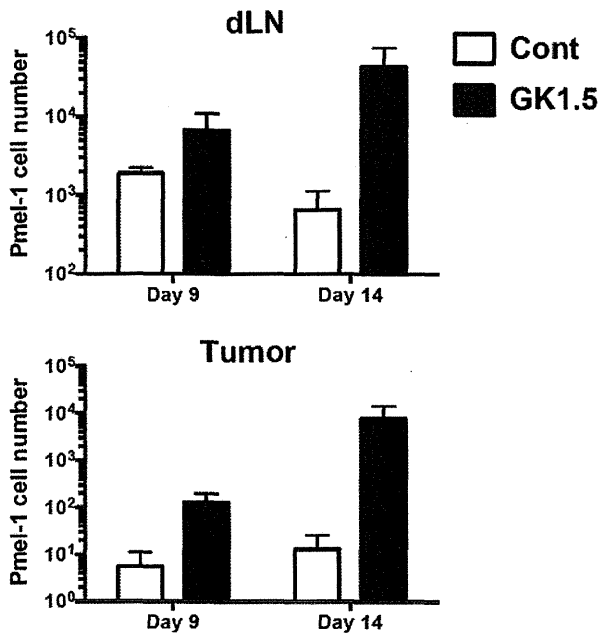


図3 GK1.5は腫瘍抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T細胞を増加させる：黒色細胞腫抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T細胞 (Pmel-1)を養子移入し、黒色細胞腫 B16F10を皮下に移植した担癌マウスの腫瘍所属リンパ節 (dLN) および腫瘍組織における Pmel-1細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。

また、解析1時間前に BrdUを腹腔内投与し、増殖細胞を *in vivo* 標識したところ、特に所属リンパ節において腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup> T細胞の増殖が亢進しており、一方で腫瘍局所においては増殖応答の亢進を認めなかった (図4)。

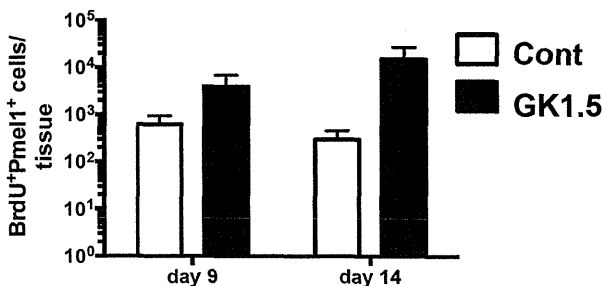


図4 GK1.5は腫瘍抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T細胞の増殖を促進する：Pmel-1-B16F10皮下担癌モデルにおいて、解析1時間前に BrdUを腹腔内投与し、増殖細胞を *in vivo* 標識した後、BrdU陽性 Pmel-1細胞をフローサイトメトリーにより解析した。

#### 遺伝子発現解析：

抗 CD4抗体投与前、および投与後 1, 2, 4, 8日後の腫瘍組織における遺伝子発現を RT-qPCR で確認したところ、抗 CD4抗体投与 2日目に *Tnfa*, *Ifng* および IFN-g 誘導性遺伝子である *Cxcl10* などの抗腫瘍性サイトカイン、*Prfl*, *Gzmb* などのエフェ

クター型<sup>+</sup> T細胞に発現する細胞傷害性因子、また細胞周期抑制に関わる *Pml* および *Trp53* の発現上昇を認めた (図5)。

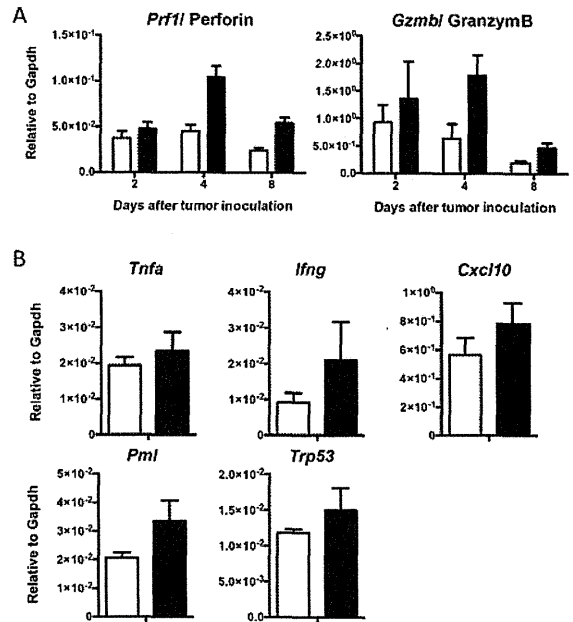


図5 GK1.5は腫瘍局所に抗腫瘍性分子の発現を誘導する：3LL皮下担癌マウスの腫瘍組織における遺伝子発現を RT-PCRにより解析した。(A)細胞傷害性因子の経時的発現変動。(B)抗体投与2日目におけるサイトカイン、細胞周期関連分子の遺伝子発現。

#### D. 考察

本研究により、抗CD4抗体投与群において腫瘍増殖の抑制、CD4<sup>+</sup> T細胞および形質細胞様樹状細胞の減少、CD8<sup>+</sup> T細胞の増加、腫瘍局所における抗腫瘍性サイトカインと細胞周期抑制分子の発現上昇を認めた。CD4<sup>+</sup> T細胞には制御性T細胞をはじめとする免疫抑制性集団が含まれており、腫瘍免疫を抑制していること、また形質細胞様樹状細胞も腫瘍免疫においては免疫抑制性に働くことが報告されている。抗CD4抗体投与群では、特に腫瘍所属リンパ節における腫瘍抗原特異的CD8<sup>+</sup> T細胞の増加が顕著であり、腫瘍所属リンパ節におけるCD4陽性細胞によるCD8<sup>+</sup> T細胞応答の抑制を解除することが、抗腫瘍免疫の増強に繋がっているものと考えられる。今回抗体投与群の腫瘍局所で遺伝子発現上昇を認めたTNF-a, IFN-gは、がん細胞に老化 (不可逆的な細胞周期抑制) を誘導することで、アポトーシス誘導とは異なる機序の抗腫瘍作用をもたらすことが、近年報告された。抗CD4抗体投与群で腫瘍局所に増加するCD8<sup>+</sup> T細胞は代

表的なIFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 産生細胞の一つであり、抗CD4抗体療法の機序の一つとして、抑制性CD4<sup>+</sup>細胞集団の除去による腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞応答の増強、CD8<sup>+</sup>T細胞由来サイトカインによる腫瘍の細胞周期抑制の関与が示唆された。今後、CD4<sup>+</sup>細胞集団による免疫抑制とCD8<sup>+</sup>T細胞による腫瘍増殖抑制の分子機序について、さらなる検討を進めるとともに、臨床応用可能な治療応答マーカーの探索を進める予定である。

本研究により抗CD4抗体の投与が、腫瘍特異的CTLを含むCD8<sup>+</sup>T細胞を増加させることが示された。しかし、癌抗原特異性を示す基となるCD8<sup>+</sup>T細胞中のclonalityの変化は明らかでなく、これはT細胞レセプター (TCR) の解析でのみ示される。我々は、次世代シーケンサーを用いた存在率を反映して網羅的にTCRを解析する手法を開発中である。そこで、この手法を用いて、CD8<sup>+</sup>T細胞中に含まれるgp100特異的なPmel-1 CTLの比率、および他のTCRのclonalityの変化を解析する。この網羅的にTCRを解析する手法は、抗CD4抗体の投与が患者に誘導する免疫反応の癌抗原特異性、および癌抗原特異的CTLの動態を明らかにすることができる手法である。また、他の免疫療法のモニタリングとしても応用可能な手法と考えられ、multimer染色等の他の解析法との併用も考え開発を進める。

## E. 結論

抗CD4抗体療法の機序の一つとして、抑制性CD4<sup>+</sup>細胞集団の除去による腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞応答の増強、CD8<sup>+</sup>T細胞由来サイトカインによる腫瘍の細胞周期抑制の関与が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hosoi A, Matsushita H, Shimizu K, Fujii SI, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Maekawa R, Matsushima K, Kakimi K. Adoptive cytotoxic T lymphocyte therapy triggers a counter-regulatory immunosuppressive mechanism via recruitment of myeloid-derived suppressor cells. *Int J Cancer*. 34 (8) :1810-22, 2013.
2. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W,

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, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 500 (7461) :232-6, 2013.

3. Suzuki H, Fukuhara M, Yamaura T, Mutoh S, Okabe N, Yaginuma H, Hasegawa T, Yonechi A, Osugi J, Hoshino M, Kimura T, Higuchi M, Shio Y, Ise K, Takeda K, Gotoh M. Multiple therapeutic peptide vaccines consisting of combined novel cancer testis antigens and anti-angiogenic peptides for patients with non-small cell lung cancer. *J Trans Med*. 11 (1) :97, 2013.
4. Takahashi K, Takeda K, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. Functional roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-DR5 interaction in B16F10 cells by activating the nuclear factor- $\kappa$ B pathway to induce metastatic potential. *Cancer Sci*. 104 (5) :558-562, 2013.
5. Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, Okuyama R, Matsushita N, Ohta T, Takeda K, Yamamoto M. Long-term vaccination with multiple peptides derived from cancer-testis antigens can maintain a specific T-cell responses and achieve disease stability in advanced biliary tract cancer. *Clin Cancer Res*. 19 (8) :2224-2231, 2013.
6. Asahara S, Takeda K, Yamao K, Maguchi H, Yamaue H. Phase I/II clinical trial using HLA-A24-restricted peptide vaccine derived from KIF20A for patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med*. 11 (1) :291, 2013.
7. Okuyama R, Aruga A, Hatori T, Takeda K, Yamamoto M. Immunological responses to a multi-target vaccine composed of peptides of cancer testis antigens and vascular endothelial growth factor receptors in

- patients with advanced pancreatic cancer. *OncoImmunology*. 2(11):e27010, 2013.
8. Suzuki N, Hazama S, Ueno T, Matsui H, Shinoda Y, Iida M, Yoshimura K, Yoshino S, Takeda K, Oka M. A phase I clinical trial of vaccination with KIF20A-derived peptide in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother*. 37(1): 36-42, 2014.
  9. Yoshimura S, Tsunoda T, Osawa R, Harada M, Watanabe T, Hikichi T, Katsuda M, Miyazawa M, Tani M, Iwahashi M, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Yamaue H. Identification of an HLA-A2-restricted epitope peptide derived from hypoxia-inducible protein 2 (HIG2). *PLoS ONE*. 9(1):e85269, 2014.
  10. Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, Okuyama R, Matsushita N, Ohta T, Hatori T, Takeda K, Yamamoto M. Phase I clinical trial of multiple-peptide vaccination for patients with advanced biliary tract cancer. *J Transl Med*. 12(1):61, 2014.
  11. Hazama S, Nakamura Y, Takeuchi H, Suzuki N, Tsunedomari R, Inoue Y, Iizuka N, Yoshino S, Takeda K, Shinozaki H, Kamiya A, Furukawa H, Oka M. A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome. *J Transl Med*. 12(1):63, 2014.
2. 学会発表
    1. Role of Neogenin n GD3- expressing human melanoma cells. 癌内線維芽細胞の近傍のヒト乳がん細胞に転移能を授ける. 折茂彰、伊藤恭彦、竹田和由、奥村康、樋野興夫、堀本義哉. 第72回日本癌学会学術総会(横浜). 2013年10月3日-5日.
    2. A phase 1 clinical trial with KIF20A peptide in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer patients. 切除不能・進行膵癌に対する新規膵癌ペプチドワクチンとゲムシタピン塩酸塩を用いた第1相試験. 鈴木伸明、碓彰一、上野富雄、吉野茂文、竹田和由、中村祐輔、岡正朗. 第72回日本癌学会学術総会(横浜). 2013年10月3日-5日.
  3. Pulripotents stem cell-derived myeloid cells engineered to express TRAIL as a possible cell medicine for cancer. TRAILを発現する多機能幹細胞由来ミエロイド細胞を用いた細胞医薬の開発. 牧寛之、植村靖史、張エイ、竹田和由、劉天懿、鈴木元晴、都築忍、岡村文子、赤塚美樹、西村泰治、千住覚、葛島清隆. 第72回日本癌学会学術総会(横浜). 2013年10月3日-5日.
  4. Pulripotents stem cell-derived myeloid cells engineered to express TRAIL as a possible cell medicine for cancer. MAKI Hiroyuki, UEMURA Yasushi, AHANG Rong, LIU Tianyi, SUZUKI Motoharu, HIROSAW Natsumi, TAKEDA Kazuyoshi, SAKAMOTO Yasushi, SENJU Satoru, KUZUSHIMA Kiyotaka. 第42回日本免疫学会学術総会(幕張). 2013年12月11日-13日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 

発明の名称：固形がんの治療剤  
出願国：日本  
出願番号：特願 2014-032241  
出願日：2014年2月21日  
発明人：伊藤哲、横地祥司、松島綱治、上羽悟史、石渡義郎  
特別出願者：IDAC セラノステイクス株式会社、国立大学法人東京大学
  2. 実用新案登録
 

なし
  3. その他
 

なし

## マウスモデルを用いた抗 CD4 抗体併用によるペプチドワクチンの増強効果の検討

研究分担者 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  
研究協力者 藤浪紀洋 東京理科大学大学院生命科学研究科生命科学専攻 博士後期課程 2 年

### 研究要旨

これまでの癌ワクチン療法単独での腫瘍縮小効果、いわゆる奏効率は数%程度しかなく、その臨床効果は不十分であると言わざるを得ない。一方、抗 CD4 抗体は担癌時の免疫抑制に関わる Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T 細胞) や腫瘍会合性 M2 マクロファージ (CCR4<sup>+</sup>blood monocyte 由来 MDSC) を同時に除去できることが示されている。この抗 CD4 抗体とペプチドワクチンを併用することでペプチドワクチン療法の増強効果が得られるかをマウスの系で検討した。その結果、抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用によるペプチド特異的 CTL (細胞傷害性 T 細胞) の頻度の増加を IFN- $\gamma$  ELISPOT により確認した。今後は移植腫瘍による治療実験を行い、抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用による腫瘍縮小効果の有無を検討すると同時に作用機序の解析を行い、ペプチドワクチン療法に抗 CD4 抗体を併用して得られる効果増強について検証する。

### A. 研究目的

現在の癌ペプチドワクチン療法単独での腫瘍縮小効果、いわゆる奏効率は数%程度しかなく、その臨床効果は不十分であると言わざるを得ない。抗 CD4 抗体をマウスに投与すると、Treg 等を含む CD4<sup>+</sup>T リンパ球、免疫抑制性癌浸潤性マクロファージ等が除去されることが示されており、癌ペプチドワクチン療法によるペプチド特異的 CTL 誘導効果を増強できる可能性があると考えられる。本研究ではモデル抗原として OVA ペプチドを用いて、マウスモデルにおいて、ペプチドワクチン療法に抗 CD4 抗体を併用することにより、ペプチドワクチン療法の増強効果が見られるかどうかを検討することを目的とした。

### B. 研究方法

・抗 CD4 抗体投与後のマウス末梢血リンパ球数の推移の検討  
マウスに抗 CD4 抗体を投与した後にマウスの尾先端から末梢血を採取する。その末梢血中の CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞などのリンパ球数の推移をフローサイトメトリーにより解析する。この結果を参考に抗 CD4 抗体の投与量及び治療スケジュールを決定する。

・抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用によるペプチド特異的 CTL の増強の検討

ペプチドワクチン単独群と抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用群にマウスを分け、処置後のペプチド特異的 CTL の頻度の比較を IFN- $\gamma$  ELISPOT により解析する。

・抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用による腫瘍縮小効果の増強の検討

マウスに腫瘍細胞を移植後に抗 CD4 抗体とペプチドワクチンで治療を行う。未治療群、ペプチドワクチン単独群、抗 CD4 抗体単独群、抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用群にマウスを分け、腫瘍の成長を比較する。

・抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用による抗腫瘍効果の作用機序の検討

抗 CD4 抗体とペプチドワクチンによる治療後の CTL (CD8<sup>+</sup>細胞) の腫瘍内への浸潤や腫瘍微小環境における Treg や MDSC の局在を免疫染色により解析する。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイ