

**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）
分担研究報告書**

プロトコール作成細胞製剤の調製、免疫解析

研究分担者：神奈木真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) は急激な発症と高頻度の再発のため予後不良であることが知られている。このため、即効性のある導入療法とともに長期間有効な寛解維持療法が必要である。我々は ATL に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植療法に関する 12 年間の共同研究の間に、移植後の ATL 症例で活性化した Tax 特異的 CTL の主要認識エピトープを同定し、CTL エピトープ部位の Tax ペプチドと自家樹状細胞を用いた抗腫瘍ワクチン療法を開発してきた。既にそのプロトタイプとなる抗腫瘍ワクチン療法の予備的な第 1 相試験を、導入療法後の ATL 患者 3 例に対して開始した。現在、これらの症例の経過を追跡するとともに、新規にモガムリズマブとワクチンの併用療法の実用化を目指した臨床治験に向け準備を行なっている。本年度は、PMDA との頻回の事前相談、安全性試験の計画を行なうとともに、前回の第 1 相試験参加者 3 例の免疫解析を行なった。3 例中 2 例は HLA-A*2402 のエピトープである Tax301-309 ペプチド、1 例は HLA-A*0201 の主要エピトープである Tax11-19 ペプチドを添加した樹状細胞療法を 2 週間隔で 3 回接種され、以後抗がん剤治療の投与無しに安定した状態が続いている。免疫解析の結果、樹状細胞ワクチン接種後、炎症性サイトカインの一時的な増加が 1 例に認められた。Tax 特異的 CTL は、3 例中 2 例ではワクチン接種前にも後にも検出されたが、1 例ではワクチン接種後はじめて検出可能となった。この 1 例は HLA-A*0201 とともに HLA-A*1101 が陽性であるが、検出できた CTL はワクチンに用いた HLA-A*0201 のエピトープを認識していた。興味深いことに、3 症例ともワクチン接種開始から 16~20 週目の時期に、PBMC 培養中に Tax 特異的 CTL の強い増殖が認められた。これまでのところ、Tax ペプチド添加樹状細胞ワクチンは安全で有効性を持つことが示唆される。

A. 研究目的

ATL 患者に対する Tax 特異的 CTL 応答の強化を意図した、CTL エピトープ部位のペプチドを付加した樹状細胞 (DC) 免疫ワクチン療法の確立を目的とする。本年度は、新規にモガムリズマブとワクチンの併用療法の実用化を目指した臨床治験に向けて準備を行なうとともに、昨年より予備的に開始した第 I 相臨床試験 (プロトタイプ) を施行した 3 人の ATL 症例の宿主免疫応答を追跡するため Tax 特異的 CTL をはじめとする T 細胞応答解析を行った。

B. 研究方法

1. ATL 患者に対する Tax ペプチド添加 DC 免疫ワクチン療法 (プロトタイプ)
試験参加の同意を得た既治療の ATL 患者由来のアフェレーシス採取単核球から密度勾配法と接着法により単球を分離し、AZT 存在下で、DC 誘導刺激 (GM-CSF, IL-4)、DC 成熟刺激 (TNF-

, KLH, OK432) を加え培養する。得られた成熟 DC に患者 HLA に合致する Tax 特異的 CTL エピトープ部位のペプチドを添加し一旦凍結し製剤とする。安全性試験を経た後、2 週間隔で 3 回、Tax ペプチド添加 DC を皮下投与する。今回の 3 名の患者は九州癌センターでリクルートされ、DC 調整は九州大学病院の細胞調整施設で実施された。

2. Tax ペプチド添加 DC 免疫ワクチン療法 (プロトタイプ) 施行後の ATL 患者の免疫解析
i) DC 免疫ワクチン療法前後の免疫解析として、末梢血単核球の細胞表面抗原、HLA/Tax ペプチドテトラマー染色による CTL 頻度の解析、Tax 抗原および CMV に対する応答性をフローサイトメトリーで評価した。
ii) ATL 細胞の定性
ATL 患者リンパ節細胞の表面形質、短期培養後の HTLV-1 抗原発現をフローサイトメトリー、

ELISA を用いて測定した。

3. ワクチン原候補となる Tax 特異的 T 細胞エピトープの探索

骨髄非破壊的造血幹細胞移植前の ATL 患者から自家 HTLV-1 感染 T 細胞株を樹立し、これを抗原として移植後寛解時の PBMC を刺激培養した。

得られた HTLV-1 特異的 T 細胞株の認識エピトープを同定するため、自家 B 細胞株に HTLV-1 抗原、およびペプチドを添加し反応性を IFN 産生能で評価した。また、種々の HLA を有する allo-HTLV-1 感染細胞株を用いて HLA の拘束性を調べた。

4. 新規モガムリズマブ / Tax ペプチド添加 DC ワクチンの併用療法の実用化を目指した臨床試験に向け準備

医師主導臨床試験の承認を受けるため、申請に必要なプロトコール作成、安全性試験、品質試験に関する班員による打ち合わせを九州または東京で頻回に行い、複数回の PMDA への事前相談を経て、申請書類の作成を行った。

（倫理面への配慮）

「成人 T 細胞白血病(ATL)に対する HTLV-Tax 特異的 T 細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法第 I 相臨床試験」は、九州大学と東京医科歯科大学の倫理審査委員会により承認済みである。

C. 研究結果

1. 第 I 相臨床試験（プロトタイプ）参加 ATL 患者における Tax ペプチド添加 DC ワクチン接種後の免疫応答追跡

現在、九州がんセンター病院でフォローアップされている第 I 相臨床試験（プロトタイプ）参加 ATL 患者 3 名の T 細胞応答解析を行った。3 名中 2 名は HLA-A*2402 のエピトープ Tax301-309 ペプチドを添加した DC ワクチンの接種、1 名は HLA-A*0201 のエピトープ Tax11-19 ペプチドを添加した DC ワクチンの投与を 3 回受け、以後抗がん剤の投与無しに経過している。末梢血 CD8+細胞中の Tax 特異的テトラマー陽性 CTL の頻度は、DC 接種以前から検出できていた例では大きな変化はなかった。HLA-A*0201 のエピトープペプチドパルス DC を投与された症例では、Tax 特異的 CTL は DC

ワクチン前には検出されなかったが、ワクチン後 2 週目以降に HLA-A*0201/Tax11-19 テトラマー陽性 CTL が検出された。同症例では HLA-A11*01 も陽性であったが、HLA-A*1101/Tax 88-96 テトラマー陽性 CTL は検出されなかったことから、ワクチン用いた Tax11-19 ペプチドに対する特異的応答であることが示唆された。3 症例とも DC 接種開始から 16-20 週目の末梢血検体で、培養中に Tax 特異的 CTL の増殖が観察された。

2. Tax 特異的 CD4+T 細胞の認識エピトープ探索九州がんセンターを試験本部として実施している ATL に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植の臨床試験（第 4 期試験、非血縁者間骨髄移植）参加患者の免疫応答解析の結果、Tax 特異的 CD4 陽性 T 細胞の認識エピトープマッピングを行い、Tax 蛋白の中央部分に 13 アミノ酸から成る最小認識エピトープ配列を同定した。さらにこれが HLA-DR1 に拘束されることが判明した。

D. 考察

ATL に対する Tax ペプチド添加樹状細胞療法の第 I 相試験（プロトタイプ）参加症例の経過は安定しており安全性が確認された。今回の免疫解析で Tax 特異的 CTL の活性も確認されたことから、今後、ATL に対する腫瘍ワクチン療法は有望な治療方法として期待できる。これらの症例では前治療にレナリドマイド、モガムリズマブ等が含まれていたことから、前治療の免疫修飾効果が好影響を及ぼした可能性がある。本研究で新規に医師主導臨床試験を計画しているプロトコールでは、これまでの研究成果を踏まえ、モガムリズマブと Tax ペプチドパルス DC ワクチンを併用する。試験の申請のために多大な準備が必要であるが、安全性に注意を払い必要な手続きを進めたい。新たに同定された Tax 特異的 CD4+T 細胞の認識エピトープは、Tax 特異的 CTL 応答を助長する効果がある。現在は 1 種類の HLA に限られるため限定的だが、今後、このようなヘルパーエピトープが複数同定できればワクチンへの貢献が期待される。

E. 結論

成人 T 細胞白血病(ATL)に対する HTLV-Tax 特異的 T 細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた免疫療法第 I 相臨床試験（プロ

トタイプ)の安全性が確認された。
新規の医師主導臨床治験「抗CCR4抗体を併用した樹状細胞療法」の治験申請準備が進んだ。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, and Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to graft-versus-Tax effects in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunol* 190: 4382-4392, 2013
2. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, and Kannagi M. Interferon- α (IFN- α) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- α combined with zidovudin induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology*, 10:52, 2013

2. 学会発表 (国際学会)

1. Kannagi M., Kinpara S, Takamori A, Sasada A, and Hasegawa A. Impact of innate and acquired immune responses in Adult T-cell Leukemia. AACR/JCA Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research, taking place February 21-25, 2013, Maui. (Invited speaker)
2. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Identification of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-1 Tax-specific CD4⁺ T-cells augmenting HTLV-1-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic HSCT. The 9th AACR-Japanese cancer association joint conference, Feb. 2013, Maui.
3. Kannagi M. Allogeneic BM transplantation in ATL: Whom to transplant and which modality to use? Can we go beyond BM transplantation? 16th International Conference on Human

Retrovirology HTLV and Related Viruses, Clinical trial workshop. June 26-30, 2013, Montréal. (Solicited speaker)

4. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Augmentation of donor-derived Tax-specific CTL responses by a novel Tax epitope-specific CD4+ helper T-cells in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses. June 26- 30, 2013, Montréal.
5. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. IFN- α suppresses HTLV-1 expression via PKR in infected cells and renders them susceptible to AZT through p53 activation in AZT/IFN- α treatment. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses June 26-30, 2013, Montréal. (Young Investigator Award)
6. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Choi I, Fukuda T, Takaishi S, Tanosaki R, Utsunomiya A, Miura O, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M., Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with peptides corresponding to Tax-specific CTL epitopes. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses. June 26-30, 2013, Montréal.
7. Kannagi M. Hasegawa A, Suehiro Y, Takamori A, Kinpara S, Ando S, Utsunomiya A, Choi I, Uike N. Immunological control of HTLV-1: Prospective therapy towards prophylaxis of disease. 第6回HTLV-1研究会国際シンポジウム. 2013年8月, 東京 (Invited speaker).

(国内学会)

1. 長谷川温彦、安藤聡美、高森絢子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、神奈木真理. ATL 発症予防、治療を目的としたペプチドパルス樹状細胞療法に関する研究. 第23回日本樹状細胞研究会 2013年5月17日、京都

2. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Suehiro Y, Maeda Y, Yamano Y, Uike N, Kannagi M. Identification of novel HTLV-1-specific CD4 epitopes in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation [同種造血幹細胞移植後 ATL 患者からの新規 HTLV-1 特異的 CD4 エピトープの同定] 第 72 回日本癌学会 2013 年 10 月, 横浜
3. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. Therapeutic mechanism of AZT/IFN- α treatment for ATL: Involvement of RNA-dependent protein kinase and p53 pathway [インターフェロン α とAZTの併用はATL細胞に対しHTLV-I遺伝子発現低下とp53活性化を誘導する] 第72回日本癌学会2013年10月, 横浜
4. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Choi I, Tanosaki R, Eto T, Kato K, Tamai Y, Sasada A, Suehiro Y, Uike N, Kannagi M. Kinetics of Tax-specific CTL in ATL patients following hematopoietic stem cell transplantation from uninfected donors [造血幹細胞移植後のATL患者における HTLV-1 Tax特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) 応答の推移] 第72回日本癌学会2013年10月, 横浜
5. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M., and Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with Tax peptides [「ATLに対するHTLV-1 Tax特異的T細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた免疫療法」第一相臨床試験] 第72回日本癌学会シンポジウム2013年10月, 横浜
6. Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, Masuda T, Kannagi M. Peptide-pulsed dendritic cell vaccine reinduced functional Tax-specific CD8+ T cells in orally HTLV-1 infected rats with impaired Tax-specific CD8+ T cells responses. 日本免疫学会 2013 年 12 月、幕張

1 月 9 日出願 (特願 2013-002127、東京医科歯科大学)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 玉井洋太郎、長谷川温彦、神奈木真理、田野崎隆二. HLA-DR1 拘束性 HTLV-1 Tax 特異的 CD4+T 細胞エピトープ。平成 25 年