

201411029A

厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業
(革新的がん医療実用化研究事業)

肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発

(H23-実用化(がん)一般-006)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 杉山 治夫

平成27(2015)年5月

厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業
(革新的がん医療実用化研究事業)

肺癌に対するWT 1 ペプチド免疫療法の開発

(H23-実用化 (がん) 一般-006)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 杉山 治夫

平成27 (2015) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- 肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の開発に関する研究----- 1
杉山 治夫

II. 分担研究報告

1. 肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の開発 ----- 9
奥村明之進
2. 高齢者肺癌における術後補助療法に関する研究 ----- 11
坪井 正博
3. 肺腺癌における悪性度評価に関する研究：画像・病理・幹細胞マーカーによる検討 ----- 14
池田 徳彦
4. 放射線学的小型肺癌と胸膜浸潤に関する研究 ----- 18
鈴木 健司
5. FDG-PET/CT を含む画像診断検査による肺癌の悪性度評価に関する観察研究--20
中山 治彦
6. 進行肺癌に対する Central airway obstruction に対する姑息治療としての
Interventional Pulmonology の妥当性に関する研究 ----- 25
高濱 誠
7. 肺癌術後補助療法としての WT1 ペプチド免疫療法に関する研究----- 28
東山 聖彦
8. WT1抗原発現陽性の脈管侵襲を伴う病理病期IA期及びIB/II期非小細胞肺癌
完全切除例に対するWT4869のペプチド免疫療法の早期再発2例の検討----- 30
松村 晃秀
9. 肺癌切除標本を用いた肺癌の悪性度に関する免疫組織化学的研究----- 32
前田 元
10. 肺癌の集学的治療に関する研究 ----- 34
吉村 雅裕
11. WT1 がんワクチンの肺癌治療に関する研究 ----- 35
山下 素弘
12. 肺癌切除症例の予後を規定するバイオマーカーに関する研究 ----- 38
竹之山 光広
13. 肺癌術後補助療法としてのWT1ペプチド免疫療法に関する研究 ----- 41
吉田 純司
14. 肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発に関する研究 -----43
熊ノ郷 淳
15. 肺癌術後補助療法としてのWT1ペプチド免疫療法（治験）：画像中央判定一 45
富山 憲幸
16. 肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発に関する研究 ----- 48
坂本 純一

1.7. 肺癌術後補助療法としてのWT1ペプチド免疫療法の臨床統計解析 ----- 49
森田 智視

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 53

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 69

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（がん対策推進総合研究事業）
総括研究報告書

肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の開発に関する研究

研究代表者 杉山 治夫 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

肺癌は年々増加している難治がんであり、この肺癌の治癒率を向上させるために、作用機序が異なり、副作用の少ない免疫療法の開発が切望されている。肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の医師主導治験は「WT1 抗原発現陽性の脈管侵襲を伴う病理病期 IA 期及び IB、II 期非小細胞肺癌完全切除例に対する WT4869 のペプチド免疫療法の第 I / II 相臨床試験」という実施計画のもと、PMDA 対面助言後、本医師主導治験の届け出を行った。本治験の目的は術後肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の再発予防効果を検証することである。本治験では、病理学的に完全切除が確認され、脈管侵襲を伴う病理病期 IA 期及び IB 期、II 期の非小細胞肺癌を有する患者に対して、WT1 ペプチドワクチン（WT4869）を 1 年間にわたって計 19 回投与を行った。第 I 相部では安全性評価と推奨用量決定のために WT1 ペプチド 3mg 6 例、6mg 6 例の用量増加試験を行った。平成 25 年 5 月 27 日に 1 例目の登録を行い、平成 26 年 3 月 17 日に最後の 12 例目が登録され、平成 26 年 5 月 26 日、第 I 相部の主要評価項目である安全性の観察期間を終了し、目標症例集積数に達した。本治験では、重篤な副作用は見られず、WT4869 の安全性が確認された。副次的評価項目である無再発生存期間、全生存期間を現在追跡中である。

研究分担者

奥村明之進 大阪大学 教授
坪井正博 国立がん研究センター東病院
科長
池田徳彦 東京医科大学 主任教授
鈴木健司 順天堂大学 教授
中山治彦 神奈川県立がんセンター
副院長
高濱誠 大阪市立総合医療センター
部長
東山聖彦 大阪府立成人病センター
副院長
松村晃秀 近畿中央胸部疾患センター
副院長
前田元 刀根山病院 部長
吉村雅裕 兵庫県立がんセンター
副院長
山下素弘 四国がんセンター 部長
竹之山光広 九州がんセンター 医長
吉田純司 国立がん研究センター東病院
外来医長
熊ノ郷淳 大阪大学 教授

富山憲幸 大阪大学 教授
坂本純一 東海中央病院 病院長
森田智視 京都大学 教授

A. 研究目的

肺癌は、年々増加の一途をたどっており、手術適用にならない患者も多くみられ、手術が施行された患者においても、手術後、多くの患者が再発し、死に至る代表的な難治癌であり、肺癌の治療成績の向上が国民から切望されている。手術に加え、化学療法や放射線療法を併用し、既存の治療法の改良のみでは治療成績の飛躍的な向上は望みにくい。このような状況において、既存の治療法とはその作用機序の異なる免疫療法への期待が高まっている。近年免疫療法は、基礎免疫学の発展によってもたらされた科学的根拠にもとづいて構築できるようになったため、十分な臨床効果を期待するまでのレベルに到達してきた。免疫療

法は、既存の治療法とはその殺細胞機序が異なり、他の治療法では不可能と考えられる静止期癌幹細胞を死滅させることができるので、免疫療法は、本来的には癌を完治させるポテンシャルをもった治療法と考えられる。我々は、2001年からトランスレーショナルリサーチとして、WT1ペプチド免疫療法を770人以上の末期がん患者に実施し、本療法が、重篤な副作用を起こさず、末期癌に対して臨床効果を発揮しうる治療法であることを明らかにしてきた。これらの実績から、難治性の高い肺癌に対しても臨床効果が期待されるものと考え、本研究が立案、計画された。本研究は、難治がんの一つである肺癌の術後補助療法としてのWT1ペプチドワクチン療法のfeasibility、有用性をランダム化第I/II相試験で評価するとともに、臨床第III相試験（治験）の実施可能性を検討することを目的とする。本研究は、厚生労働省の「健康長寿社会実現のためのライフ・イノベーションプロジェクト」の施策に合致するとともに、医師主導治験を経て、日本発の肺癌に対するWT1ペプチドワクチンの製薬化につながると考えられ、厚生労働行政に大きく貢献するものと考えられる。

B. 研究方法

【研究形式】

第I相：多施設非盲検試験

第II相：盲検的ランダム化試験

主評価項目

第I相：有害用量制限毒性（DLT）発現割合、最大耐用量（MTD）の事象発生割合、WT1特異的免疫反応（CTL頻度、DTH、WT1ペプチド抗体）

第II相：2年無再発生存割合

副次的評価項目

1年無再発生存割合、無再発生存期間、全生存期間、有害事象発生割合

【対象症例】患者選択規準のうち主なものは、次の通り。1) 脈管侵襲を伴う病理病期IA期およびIB/II期非小細胞肺癌、

2) 病理学的に完全切除が確認されている、3) 年齢：20歳以上、4) Performance status (ECOG) 0～1、5) 術後補助療法が未施行 6) HLA-A*24:02を有する、7) 肺癌細胞におけるWT1の発現、8) 主要臓器機能の保持、9) 患者本人からの文書による参加同意

【症例登録とランダム割付】

症例登録はデータセンターでの中央登録方式とする。第II相部ではデータセンターで、「A群：WT1ペプチドワクチン群」と「B群：プラセボ群」に2：1でランダムに割付けられる。ランダム割付に際し、1) 性別（男/女）、2) 年齢（70歳未満/70歳以上）、3) 病理病期（IA・IB期/II期）、4) 施設で大きな偏りが生じないように、これらを割付調整因子とする最小化法を用いる。

【治療内容】

WT1ペプチドワクチンは、HLA-A*24:02用WT1ペプチドワクチン(WT4869)である。1回につき3mgまたは6mg / bodyを、両上腕伸側～腋窩に皮下注射する。3mgの場合は1ヶ所、6mgの場合は2ヶ所に投与を行う。プラセボ群で用いる製剤は、WT1ペプチドを含まないペプチド溶解液とアジュバントとのエマルジョン製剤である。治療開始日をDay1とし、Day29まで週1回投与。その後、Day 85まで2週毎に投与を行い、以後、Day 365まで4週毎に投与し、合計19回の投与を行う。

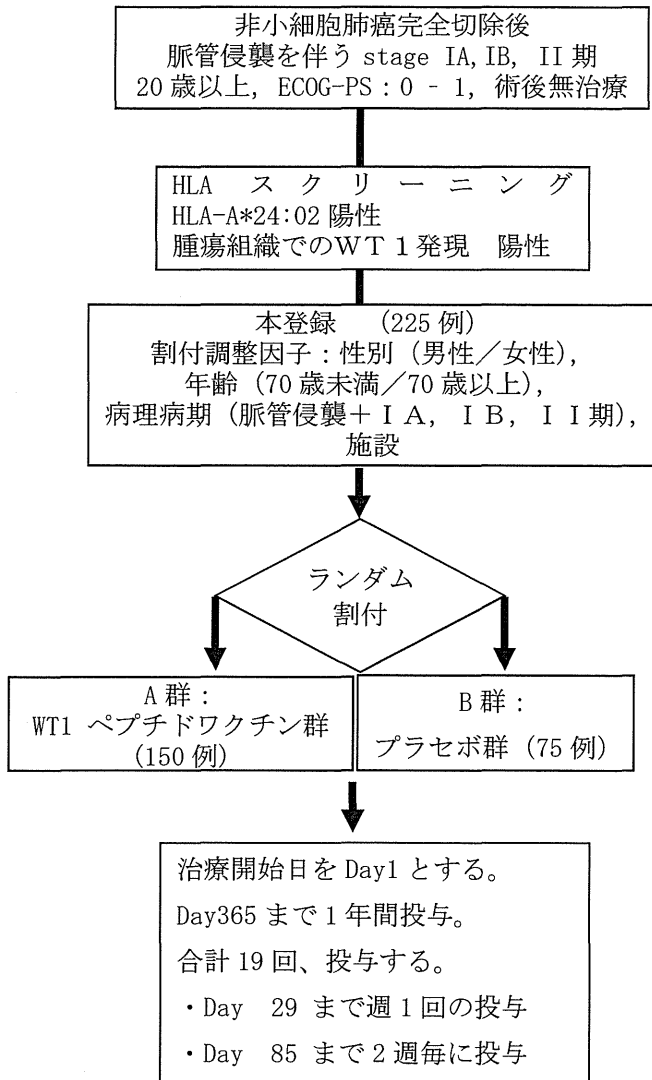
第I相部でWT1ペプチド(WT4869) 3mgを6例、6mgを6例に投与を行い忍容性ならびにWT1特異的免疫反応の誘導効率により推奨投与量を決定する。

第II相部では第I相で決定したWT1ペプチドの推奨投与量を用いて登録後割付けられた治療を開始する。治療法は、「A群：WT1ペプチドワクチン群」と「B群：プラセボ対象群」の2群でいずれも治療期間は1年間とする。プロトコール治療完了後、再発を認めるまで無治療で観察する。プロトコール治療中止後の治療、および再発後の後治療は規定しない

が、試験薬であるWT1ペプチドワクチンの再投与は認めない。

流れ図

第 I I 相試験の流れ図



【集積目標症例数】

第 I 相：WT1ペプチド (WT4869) 3mg投与群 6例、6mg投与群 6例

第 I I 相：対象とする症例において、術後補助療法なしで経過観察した場合の2年無再発生存割合は65%と見込まれ、これをA群の閾値2年無再発生存割合と設定する。これに対し臨床的に有用な再発予防効果を

ハザード比で0.75と仮定したとき、期待2年無再発生存割合は72%となる。αエラー＝(片側)0.05、検出力＝80%のもと、登録期間2年、追跡期間2年で必要登録数を計算すると、試験治療群での最小必要症例数は140例と計算される。A群とB群との割付比を2:1にしたとき、試験全体での必要症例数は210例となる (B群は70例)。不適格例などを考慮して試験全体の目標登録数を225例 [A群：WT1ペプチドワクチン群150例、B群：プラセボ対象群75例] と設定した。なお、症例集積期間2年、最小追跡観察期間2年を予定する。

【研究実施体制】

臨床試験実施計画書は、研究代表者、研究事務局、統計解析責任者、臨床研究アドバイザー等の合議で作成し、実施に当たって各施設の倫理委員会またはIRBの承認を得る。症例集積は試験分担医師がそれぞれの施設から行う。研究登録、モニタリング等は、外部CRO (EPS社、ACメディカル社、ファイブリングス社) に依頼し、研究事務局がその状況を把握し、安全な研究の遂行に努める。予期せぬまたは重篤な有害事象については、第三者機関である効果安全評価委員会が審査される。再発確認の画像は画像中央判定委員会で中央判定する。統計解析に関しては統計解析責任者のもとで実施する。研究代表者が総括を行う。

(倫理面への配慮)

参加患者の安全性確保については、適格条件やプロトコル治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化される。また、「臨床研究に関する倫理指針」、「医薬品の臨床試験の実施の基準 (省令GCP)」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則に従い以下を遵守する。

- 1) 研究実施計画書の IRB 承認が得られた施設のみから患者登録を行う。
- 2) すべての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得る。
- 3) データの取り扱い上、患者氏名等直接個

人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報（プライバシー）保護を厳守する。

C. 研究結果

I. 第 I 相医師主導治験 実施状況

肺癌に対するWT1ペプチドワクチン医師主導治験は「WT1抗原発現陽性の脈管侵襲を伴う病理病期IA期及びIB/II期非小細胞肺癌完全切除例に対するWT4869のペプチド免疫療法の第 I / II 相臨床試験」という実施計画のもと、平成24年8月9日のPMDA対面助言後、本医師主導治験が承認された。

医師主導治験実施のため、事務局、データセンター、モニタリング体制など治験実施体制の構築や SOP・手順書を作成した。本医師主導治験は、平成 24 年 12 月 3 日から 3 月 4 日までの間に大阪大学医学部附属病院、国立病院機構近畿中央胸部疾患センターと大阪府立成人病センターのそれぞれの IRB で承認され、PMDA 届出後、治験開始となった。平成 24 年 12 月より第 I 相部を開始した。目標症例数は 12 例（WT1 ペプチド 3mg 6 例、6mg 6 例）で、1 例目の登録は平成 25 年 5 月 27 日で平成 26 年 3 月 17 日に 12 例目が登録され、平成 26 年 5 月 26 日に第 I 相部の主要評価項目である安全性の観察期間を終了し、目標症例集積数に達した。用量制限毒性の出現はなく、WT4869 の安全性が確認された。また免疫反応については 3mg 投与群 6 例中 4 例、6mg 投与群 6 例中 3 例で WT 1 特異的 CD8⁺T 細胞の増加が観察された。1 年無再発生存割合は 12 例中 10 例（83%）であった。2015 年 4 月時点で開始後 13 ヶ月から 22 ヶ月（中央値 17 ヶ月）を経過するが、全例生存している。現在無再発生存期間、全生存期間を現在追跡中である。第 I 相部分は平成 26 年度の厚生労働科学研究費補助金に採択されなかったため第 I 相部のみ施行した。

II 肺癌術後補助療法として WT1 ペプチドワクチンの適応に関する研究

1. 非小細胞肺癌再発例の患者背景は多様であり、外科切除を含めた集学的治療が検討されている場合も少なくない。

特に高齢者（75 歳以上）の標準化された術後補助療法は確立されておらず、今後の WT1 がんワクチンによる術後補助療法の確立のためには、高齢者の術後再発後の予後因子の解析が重要となる。高齢者における肺癌切除再発例の治療割合は 75 歳未満と差はなく、再発後の予後も 2 群間で有意差を認めなかった。多変量解析では EGFR status が独立した予後因子であったため、再発症例に対する EGFR 遺伝子変異の検索は必須と考えられた。高齢者肺癌切除症例に対する術後補助療法を検討する際にも、driver mutation の検索が必要と考えられる。

2. 胸部 CT で GGO を有する小型肺癌は予後良好であることが JCOG0201 試験の長期経過観察から明らかとなり、それらの 5 年生存割合は 90%前後が期待される。一方、これらの早期肺癌が肺野外套胸膜直下に存在し、胸膜浸潤を病理学的に示した場合、小型早期肺癌であっても病理病期は IB 期に Upgrade される事になる。IB 期非小細胞肺癌に対しては術後経口補助化学療法の有用性が確立しているが、術前画像で GGO を有する早期肺癌に対する胸膜浸潤の意義は明らかでない。
3. 腺癌の悪性度を評価する因子として組織学的脈管浸潤の有無が有用であることを報告してきた。今回は切除された腺癌症例を対象として、術前の CT 画像や幹細胞マーカーを用いて予後不良な症例の選別が可能かを研究した。胸部 CT 所見の解析では肺野条件画像における腫瘍径および充実部径は組織学的な浸潤部位の大きさと有意に相関した。また縦隔条件画像で計測した腫瘍径は予後と有意に相関し、組織学的腫瘍径よりも生物学的悪性度と関連があった。また幹細胞マーカーを用いた検討では腺癌の亜型分類と発現率に差を認めるとともに、腫瘍径、リンパ節転移、ALDH1A1 の低発現が予後不良因子

であった。これらの臨床病理学的因子を考慮することにより腺癌の悪性度評価がより正確に行い得ることが示唆された。

III WT1ペプチドワクチン療法の評価に関する研究

肺腫瘍は周囲をCT濃度が大きく異なる肺組織に囲まれているため、腫瘍の抽出(セグメンテーション)が容易であり、コンピュータ支援画像診断プログラムを用いることにより三次元的に体積を測定することができる。三次元的体積測定は、コンピュータを用いるため、測定者間の誤差が少なく、客観的に腫瘍全体の体積を測定できるため、腫瘍縮小効果の判定に大きく寄与できることが予想される。本研究では、非小細胞肺癌の治療効果判定に三次元的体積測定を応用し、RECISTと対比しながら、その有用性を検証する。この手法を確立し、WT1がんワクチンによる肺癌の治療効果判定に応用する。

IV WT1ペプチドワクチンの効果増強に関する研究

1. 癌を取り巻く間質や細胞は、腫瘍の微小環境に寄与し、腫瘍の進展に深く影響している。我々は、癌細胞とその微小環境との関わりを標的とした癌治療の開発を目的とした研究を進めてきた。中でも癌周囲の炎症に注目し、さまざまな炎症性サイトカインが肺癌腫瘍悪性度におよぼす影響を解析した。結果、炎症が癌進展を促進する可能性を示し、適切な抗炎症効果を持つ薬剤の使用を検討していく必要性が示された。
2. 肺癌術後補助療法としてのWT1ペプチド免疫療法におけるWT1免疫応答の解析のための解析基盤の確立を行った。また、担癌時の免疫状態を解析するため、特にマクロファージ系の制御についても検討を行っている。担癌状態においては、持続的な慢性炎症をいかにコントロールするかが大変重要である。

分担研究者の熊ノ郷は栄養センサーとして知られるmTORの制御が慢性炎症における主要な炎症細胞であるマクロファージの分化制御に重要であることを見出した。熊ノ郷の解析により、アミノ酸センサーでありリソソーム膜に局在する蛋白p18/Lamtor1が、M1(炎症性)、M2(制御性)マクロファージの分化制御に必須で、p18/Lamtor1欠損下ではM2マクロファージは完全に欠損し、LPS静注モデルにおいて著明な高サイトカイン血症と敗血症死を引き起こすとの知見を得た。

IV 試験デザインに関する研究

肺癌に対するWT1ペプチド免疫療法の開発にあたり、臨床試験の役割とくに臨床統計解析の果たす役割について検討した。最終検証ステージであるランダム化第III相試験の試験デザインおよびデータ解析方法について検討・評価を行った。

D. 考察

WT1ペプチドワクチン(WT4869)3mg、6mg皮下投与は安全でかつWT1特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導ができる事が示された。WT4869 3mgと6mgいずれかの有意性は安全面、免疫反応の誘導の面では確認できなかった。全生存期間については同一病期を対象としたmeta-analysisと比較して良好で期待できる結果と思われた。しかし1年以内の再発例があり、誘導されたWT1特異的CTLの誘導効率は想定より低いものであったため、WT1ヘルパーペプチドとの併用や免疫アジュバントの種類の変更を検討する必要がある。

E. 結論

第I相医師主導治験により、WT4869は安全かつWT1特異的CTLの誘導ができる事が示された。今後の展開については効果増強法を含め計画を検討中である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koido S, Homma S, Okamoto M, Takakura K, Mori M, Yoshizaki S, Tsukinaga S, Odahara S, Koyama S, Imazu H, Uchiyama K, Kajihara M, Arakawa H, Misawa T, Toyama Y, Yanagisawa S, Ikegami M, Kan S, Hayashi K, Komita H, Kamata Y, Ito M, Ishidao T, Yusa SI, Shimodaira S, Gong J, Sugiyama H, Ohkusa T, Tajiri H. Treatment with Chemotherapy and Dendritic Cells Pulsed with Multiple Wilms' Tumor 1 (WT1)-Specific MHC Class I/II-Restricted Epitopes for Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*, 20: 4228-39, 2014 Aug.
2. Oji Y, Tatsumi N, Kobayashi J, Fukuda M, Ueda T, Nakano E, Saito C, Shibata S, Sumikawa M, Fukushima H, Saito A, Hojo N, Suzuki, Hoshikawa T, Shimura T, Morii E, Oka Y, Hosen N, Komatsu K, Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1 promotes homologous recombination-mediated DNA damage repair. *Mol Carcinog*, 2014 Nov 21.
3. Koido S, Kan S, Yoshida K, Yoshizaki S, Takakura K, Namiki Y, Tsukinaga S, Odahara S, Kajihara M, Okamoto M, Ito M, Yusa SI, Gong J, Sugiyama H, Ohkusa T, Homma S, Tajiri H. Immunogenic Modulation of Cholangiocarcinoma Cells by Chemoimmunotherapy. *Anticancer Res*, 34: 6353-61, 2014 Nov.
4. Takakura K, Koido S, Kan S, Yoshida K, Mori M, Hirano Y, Ito Z, Kobayashi H, Takami S, Matsumoto Y, Kajihara M, Misawa T, Okamoto M, Sugiyama H, Homma S, Ohkusa T, Tajiri H. Prognostic Markers for Patient Outcome Following Vaccination with Multiple MHC Class I/II-restricted WT1 Peptide-pulsed Dendritic Cells Plus Chemotherapy for Pancreatic Cancer. *Anticancer Res*, 35:555-62, 2015 Jan.
5. Katsuhara K, Fujiki F, Aoyama N, Tanii S, Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Nakajima H, Kondo K, Tatsumi N, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Nishida S, Hosen N, Sogo S, Oji Y, Sugiyama H. Transduction of R Novel HLA-DRB1*04:05-restricted, WT1-specific TCO Gene into Human CD4⁺ P Cells Confers Killing Activity Against Human Leukemic Cells. *Anticancer Res*, 35: 1251-1262, 2015.
6. Saito S, Yanagisawa R, Yoshikawa K, Higuchi Y, Koya T, Yoshizawa K, Tanaka M, Sakashita K, Kobayashi T, Kurata T, Hirabayashi K, Nakazawa Y, Shiohara M, Yonemitsu Y, Okamoto M, Sugiyama H, Koike K, Shimodaira S. Safety and tolerability of allogeneic dendritic cell vaccination with induction of Wilms tumor 1-specific T cells in a pediatric donor and pediatric patient with relapsed leukemia: a case report and review of the literature. *Cytotherapy*, 17: 330-5, 2015 (Mar). Epub 2014 Dec.
7. Hashimoto N, Tsuboi A, Kagawa N, Chiba Y, Izumoto S, Kinoshita M, Kijima N, Oka Y, Morimoto S, Nakajima H, Morita S, Sakamoto J, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Arita N, Yoshimine T, Sugiyama H. Wilms tumor 1 peptide vaccination combined with temozolomide against newly diagnosed glioblastoma: safety and impact on immunological response. *Cancer Immunol Immunother*, 2015 Mar 14.
8. Koido S, Homma S, Okamoto M, Takakura K, Gong J, Sugiyama H, Ohkusa T, Tajiri H. Chemoimmunotherapy targeting Wilms' tumor 1 (WT1)-specific cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses for patients with pancreatic cancer. *Onco Immunology*, in press.

9. Kohno M, Okamoto T, Suda K, Shimokawa M, Kitahara H, Shimamatsu S, Konishi H, Yoshida T, Takenoyama M, Yano T, Maehara Y. :Prognostic and therapeutic implications of aromatase expression in lung adenocarcinomas with EGFR mutations. : Clin Cancer Res. ;20(13):3613-22, 2014.
10. Saji H, Matsubayashi J, Akata S, Shimada Y, Kato Y, Kudo Y, Nagao T, Park J, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Correlation between whole tumor size and solid component size on high-resolution computed tomography in the prediction of the degree of pathologic malignancy and the prognostic outcome in primary lung adenocarcinoma. Acta Radiol, in press , 2014
11. Yanagawa M, Gyobu T, Leung AN, Kawai M, Kawata Y, Sumikawa H, Honda O, Tomiyama N. Ultra-low-dose CT of the Lung: Effect of Iterative Reconstruction Techniques on Image Quality. Acad Radiol. 21: 695-703, 2014
12. Yanagawa M, Tanaka Y, Leung AN, Morii E, Kusumoto M, Watanabe S, Watanabe H, Inoue M, Okumura M, Gyobu T, Ueda K, Honda O, Sumikawa H, Johkoh T, Tomiyama N. Prognostic Importance of Volumetric Measurements in Stage I Lung Adenocarcinoma. Radiology. 272: 557-67, 2014.
2. 学会発表
 1. Haruo Sugiyama, Akihiro Tsuboi, Yusuke Oji, Naoki Hosen, Keiko Hashii, Yoshihiro Oka : WT1 Peptide Vaccine for AML, CML and MDS, The 5th JSH International Symposium 2014 in HAMAMATSU, 静岡, 2014年5月24日(国際学会)
 2. Nakajima H, Oji Y, Murakami Y, Morii E, Akao T, Odajima S, Tatsumi N, Fukuda M, Machitani T, Iwai M, Hojo N, Oka Y, Sugiyama H: Induction of anti-tumor CTL responses targeting eukaryotic elongation factor eEF2 in vivo, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Kanagawa, Sep. 25, 2014.
 3. Tsuboi A, Hashimoto N, Kagawa N, Izumoto S, Oka Y, Oji Y, Hosen N, Nishida S, Morimoto S, Yoshimine T, Sugiyama H: WT1 peptide-based immunotherapy combined with Temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Kanagawa, Sep. 25, 2014.
 4. Koido S, Homma S, Okamoto M, Ishida T, Shimodaira S, Kan S, Ito M, Sugiyama H, Ohkusa T, Tajiri H: Treatment with dendritic cells pulsed with multiple WT1-specific MHC class I / II -epitopes for advanced pancreatic cancer, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Kanagawa, Sep. 25, 2014.
 5. 辰巳直也、北條望、森口奈保子、保仙直毅、杉山治夫、尾路祐介 : WT1 を標的とする microRNA-125a 欠損マウスは骨髄増殖性疾患を発症する, 第 19 回造血器腫瘍研究会, 佐賀, 2015 年 1 月 24 日.
 6. 坪井 昭博、新谷 康、舟木 壮一郎、奥村 明之進、松村 晃秀、東山 聖彦、杉山 治夫: 肺癌完全切除例に対する WT 1 ペプチドワクチン (WT 4869) 医師主導治験 (第 I 相)、第 18 回 WT 1 ペプチド癌免疫療法研究会、

大阪、2015年3月28日

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

II. 分担研究報告

肺癌に対する WT1 ペプチド免疫療法の開発

研究分担者 奥村 明之進 大阪大学 教授

研究要旨

癌を取り巻く間質や細胞は、腫瘍の微小環境に寄与し、腫瘍の進展に深く影響している。我々は、癌細胞とその微小環境との関わりを標的とした癌治療の開発を目的とした研究を進めてきた。中でも癌周囲の炎症に注目し、さまざまな炎症性サイトカインが肺癌腫瘍悪性度におよぼす影響を解析した。結果、炎症が癌進展を促進する可能性を示し、適切な抗炎症効果を持つ薬剤の使用を検討していく必要性が示された。

A. 研究目的

上皮間葉移行 EMT シグナルを制御することで肺癌を dormant な状態に維持することができれば、外科治療や放射線治療といった局所制御、全身治療である抗癌剤に加える有用な癌治療法になると考えられる。本研究の目的は、癌微小環境を調節する EMT の関連シグナル分子を明らかにし、癌細胞の EMT を制御することであり、新たな癌治療の開発につながると考えている。とくに、これまでの研究から、癌周囲の炎症性サイトカインを中心とした微小環境の変化が癌悪性に関連していると考えられ、免疫療法との組み合わせ方を議論する必要がある。

B. 研究方法

肺癌周囲の間質 tumor stroma を形成する微小環境に注目し、癌細胞と周囲の間質細胞や細胞外基質のクロストークを解析する。中でも、癌細胞の EMT 誘導・癌幹細胞様形質転換における線維芽細胞(Cancer associated fibroblast: CAF)の役割を明らかにし、炎症関連のシグナル伝達経路を制御することで癌細胞の悪性を抑制できるか検討する。

また、本年度は、炎症で使用されているさまざまな抗炎症剤を用いて、CAF の活性化の抑制を行えるかを検討した。

(倫理面への配慮) 術前に Informed Consent を得られた症例の肺癌切除標本から肺癌細胞、間質細胞を採取し、実験材料を得る。間質細胞を不死化して研究に用いることを院内で承認されており(当院臨床研究委員会へ「呼吸器外科手術で得られた新鮮切除標本を用いた不死化細胞株樹立」)、実際に蓄積しつつある。さらに市販の肺由来正常線維芽細胞を購入し、

実験に用いた。

C. 研究結果

①肺癌細胞は、肺癌関連線維芽細胞株 CAF や肺由来正常線維芽細胞との共培養によって、EMT が誘導され、また薬剤耐性などの癌幹細胞形成を獲得することが明らかになった(平成 25 年度までの結果)。

②癌細胞との共培養によって肺線維芽細胞は活性化し、IL-6、TGF- β の遺伝子発現を促進し、実際に培養上清への産生を高めた(RT-PCR、ELISA にて証明)。これらのシグナルを、各阻害剤によって抑制することで、線維芽細胞の活性化を抑制、さらに癌細胞における EMT、癌幹細胞形成獲得を部分的に抑制した。動物共移植モデルでは、肺線維芽細胞の存在により、腫瘍増大速度の上昇、血管新生促進、抗癌剤耐性化、幹細胞マーカー高発現を認め、これらは IL-6、TGF- β シグナル阻害によって抑制された。また、実際の臨床検体を用いた検討では、放射線化学療法後に肺切除を施行した症例では、残存腫瘍内で線維芽細胞が増生し、IL-6 発現が増加している症例の予後が不良であった。また、このような症例における腫瘍内の EMT マーカーや癌幹細胞マーカーの上昇が認められた。若年者肺癌で予後解析を行ったところ、集学的治療に抵抗性がある症例が存在し、切除標本を精査したところ炎症マーカーが高く、同様に EMT マーカーや癌幹細胞マーカーの上昇が認められた。

③活性化した肺癌関連線維芽細胞の増殖や活性化を抑制するために、抗線維化剤ピルフェニドンや血糖降下剤ピオグリタゾン、心不全治療薬カルペリチドによる効果を、細胞レベル、動物モデルで検討した。いずれの薬剤も線維芽細胞の活性化を抑制する経路を通して、抗

炎症効果をもち、また EMT マーカーや癌幹細胞マーカーの上昇を抑制することが示された。抗炎症効果をもつ薬剤が抗癌作用を持つことが判明した。

D. 考察

本研究によって、癌微小環境の変化による治療抵抗性のメカニズムの一部が示された。WT1 ペプチドなどの癌ワクチンによっても、癌進展を促進する炎症が惹起される可能性があり、ワクチンで誘発される抗癌作用における炎症の役割を明らかにする必要がある。免疫によって惹起される炎症が、EMT や癌幹細胞形成獲得に関与する可能性もあり、この EMT メカニズムを追求・制御することで、癌ワクチンの効果を高める経路を明らかにすることが期待できる。

E. 結論

手術や化学療法によって癌微小環境が変化し、炎症が癌の治療抵抗性を誘導する可能性がある。癌ワクチン療法において、癌周囲の炎症をいかに制御していくかが重要であり、免疫効果との関連を明らかにしていく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Sawabata N,Kanzaki R, Sakamoto T, Kusumoto H, Kimura T, Nojiri T, Kawamura T, Susaki Y, Funaki S, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M. "Clinical predictor of pre- or minimally invasive pulmonary adenocarcinoma: possibility of sub-classification of clinical T1a." Eur J Cardiothorac Surg. 2014; 45(2)(256-61).
2. Inoue M, Okumura M, Sawabata N, Miyaoka E, Asamura H, Yoshino I, Tada H, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Kobayashi H, Yokoi K. Clinicopathological characteristics and surgical results of lung cancer patients aged up to 50 years: The Japanese Lung Cancer Registry Study 2004. Lung Cancer 82(2): 246-251, 2014.
3. Nakagiri T,Sawabata N, Morii E, Inoue M, Shintani Y, Funaki S, Okumura M. Evaluation of the new IASLC/ATS/ERS proposed classification of adenocarcinoma based on lepidic pattern in patients with pathological stage IA pulmonary

adenocarcinoma. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2014;62(11) (671-7).

2. 学会発表

1. 新谷康、井上匡美、木村亨、川村知裕、中桐伴行、澤端章好、南正人、奥村明之進。外科切除標本を用いた個別化治療実現のための予後・治療効果予測因子の解析と展望。第 114 回日本外科学会総会 2014/4/4
2. 新谷康。癌微小環境を標的とした肺癌治療の開発。第 31 回日本呼吸器外科総会 2014/5/15
3. 野尻崇,細田洋司,徳留健,三浦浩一,木村亨,井上匡美,新谷康,南正人,澤端章好,竹内幸康,前田元,宮里幹也,望月直樹,奥村明之進,寒川賢治。心房性ナトリウム利尿ペプチドの血管保護作用による癌転移予防効果—機序解明に向けて—第 52 回日本癌治療学会学術集会 2014/8/29

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（がん対策推進総合研究事業）
分担研究報告書

高齢者肺がんにおける術後補助療法に関する研究

研究分担者 坪井 正博

独立行政法人国立がん研究センター東病院・呼吸器外科 科長

研究要旨 近年高齢化社会の到来により、70歳以上の高齢者、特に80歳以上の肺癌に対する手術例が急増しており、肺癌切除例の約半数を占めるに至っている。一方で、この集団に対する術後補助化学療法の報告は少ない。横浜市大外科治療学・呼吸器外科グループ関連施設内で集積したデータを用いて高齢者におけるI期術後補助療法の現状を調べるとともに、従来の臨床試験の成績と合わせて検討した。2005年から2007年の間に行われた肺癌完全切除例981例のうち、70歳以上のT1bN0, T2aN0、I期の高齢者は153例あり、テガフル・ウラシル配合剤(UFT)による術後化学療法実施率は26例(17%)であった。化学療法施行例のうち、1年以上の内服期間が得られた症例は、12例(治療例の46%)であり、食欲不振、体重減少を機に中止されていた。過去に報告されたUFTのI期肺腺癌に対する術後化学療法の臨床試験でも70歳以上の高齢者のコンプライアンスは有意に悪かった。70歳以上の高齢者の術後補助療法は、当該病期の予後を考慮すれば、毒性の面からUFTよりもペプチドワクチンなどによる免疫療法の介入、確立が期待される。

A. 研究目的

近年高齢化社会の到来により、70歳以上の高齢者、特に80歳以上の肺癌に対する手術例が急増している。日本胸部外科学会による2010年の集計では、肺癌手術例32801例のうち70歳以上の切除例が半数を占め、80歳以上の症例は全切除例の11.1%(3646例)と報告されている。しかし、高齢者の手術が増えている一方で、この集団に対する術後補助療法の報告は少ない。本研究では、70歳以上の高齢者I期非小細胞肺癌における術後補助化学療法の状況をretrospectiveに解析、検討する。

B. 研究方法

対象：2005年から2007年までの2年間で横浜市大外科治療学・呼

吸器外科グループ関連施設内8施設で行った原発性肺癌切除例981例中、肺葉切除以上の根治切除を施行し病理学的に完全切除が確認されたT1bN0, T2aN0のI期非小細胞肺癌の153例。

方法：術後化学療法施行群と非施行群を比較して、その予後、治療状況について検討を行った。

観察期間、統計分析：

すべての検討において、観察期間は再発症例では手術日から再発日までとし、無再発症例では最終無再発確認日までとした。再発日は画像上再発が確認された時点とした。統計学的検討はSPSSを使用した。生存率はKaplan-Meier法にて検討し、log-rank検定を使用した。さらに多変量解析では

Cox proportional-hazards モデルを使用した。P 値は 0.05 未満をもって有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究のプロトコールは施設の IRB 及び医療機関の長の承認を得た上で、実施した。

なお、本試験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言及び臨床研究に関する倫理指針に従って本試験を実施する。

C. 研究結果

平均年齢 75.6 歳。観察期間中央値は 68 ヶ月。組織型は腺癌 86 例、扁平上皮癌 49 例、大細胞癌 7 例、その他 11 例。T1b 58 例、T2a 92 例、不明 3 例であった。術後 5 年全生存割合 (OS) は、術後補助化学療法なし群の 66.8% に対し、化学療法あり群は 61.0% で、統計学的に有意差は認めなかった ($p=0.619$)。術後 5 年無再発生存割合 (DFS) は、化学療法なし群 55.8% に対し、化学療法あり群は 52.4% で、統計学的に有意差は認めなかった ($p=0.696$)。

D. 考察

ガイドラインでは、本研究の対象である T1bN0, T2aN0 の I 期非小細胞肺癌完全切除例に対して、UFT を推奨するあるいはやることを否定しない形で表記があるが、術後補助化学療法の実施率は、17% と低かった。病期本来の予後

と毒性のバランスから、UFT による術後補助療法が実臨床においては必ずしも積極的に受けいられていない現状を反映していると思われる。予後に関する解析結果については、本研究は症例数が少なく、補助療法の適応が必ずしも一定でないことから、議論するに値しない。そこで、I 期肺腺がん完全切除例に対する UFT の術後補助化学療法の臨床試験 (JLCRG study) の 70 歳未満と 70 歳以上の年齢別サブ解析に注目した。この研究では、UFT 治療群の全生存割合のハザード比は 70 歳未満で 0.77 (95% 信頼区間: 0.52-1.13) であるのに対し、70 歳以上の高齢者では 0.63 (95% 信頼区間: 0.35-1.10) とやや良好な結果であるものの統計学的有意差はなかったと報告されていた。本研究と同様、統計学的に有意差がないことから、70 歳以上の高齢者における UFT の術後化学療法の有用性は controversy と考えられる。一方、UFT 治療群の治療コンプライアンスについては、治療開始後 1 年、2 年のそれは、70 歳未満で 77.1%、64.1% であるのに対し、70 歳以上では 61.1%、49.4% であり、高齢者で有意に低かったことが報告され、本研究の解析同様、食欲不振などの毒性が治療継続に影響する可能性が示唆された。

E. 結論

I 期 (T1bN0, T2aN0) 非小細胞肺癌完全切除例に対しては、UFT による術後化学療法が推奨されているが、70 歳以上の高齢者においては、その有用性については十分に証明されたとは言い難い。一方、高齢者においては若年層に比べると毒性などから治療コンプライアンスが良好ではないことから、毒性を改善する方策もしくは毒性の少ない治療の開発が望まれる。毒性の面から UFT よりもペプチドワクチンなどによる免疫療法の介入は治療選択肢のひとつとして期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究に関する論文は、現在作成中である。

2. 学会発表

本研究の成果は、発表準備中である。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

1. 特許取得；なし

2. 実用新案登録；なし

3. その他

特記すべき事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（がん対策推進総合研究事業）
分担研究報告書

肺腺癌における悪性度評価に関する研究：画像・病理・幹細胞マーカーによる検討

研究分担者 池田 徳彦 東京医科大学 主任教授

研究要旨

腺癌の悪性度を評価する因子として組織学的脈管浸潤の有無が有用であることを報告してきた。今回は切除された腺癌症例を対象として、術前の CT 画像や幹細胞マーカーを用いて予後不良な症例の選別が可能かを研究した。胸部 CT 所見の解析では肺野条件画像における腫瘍径および充実部径は組織学的な浸潤部位の大きさと有意に相関した。また縦隔条件画像で計測した腫瘍径は予後と有意に相関し、組織学的腫瘍径よりも生物学的悪性度と関連があった。また幹細胞マーカーを用いた検討では腺癌の亜型分類と発現率に差を認めるとともに、腫瘍径、リンパ節転移、ALDH1A1 の低発現が予後不良因子であった。これらの臨床病理学的因子を考慮することにより腺癌の悪性度評価がより正確に行い得ることが示唆された。

A. 研究目的

肺腺癌の予後因子として病期分類以外に組織学的な脈管浸潤の有無が有用であることを明らかにしてきた。近年、術前の胸部 CT 所見や各種マーカーによる悪性度評価の試みがなされている。当院での腺癌切除例を解析し、CT 所見と組織学的な癌浸潤の程度との関連や幹細胞の発現頻度と予後との関連などの研究を行った。現行の TNM 分類には反映されていない因子が予後にどのような影響を与えるのかを評価するとともに、追加治療の必要性の情報となることを研究目的とした。

B. 研究方法

2005～2007 年に、当院で完全切除された肺腺癌 277 例を対象とし、術前の腫瘍部の CT 画像と病理所見の関係を評価した。CT における肺野条件での腫瘍径、充実部径、縦隔条件での腫瘍径を評価項目とした。

また、1999～2002 年に切除された腺癌標本 103 例を用いて AL1A1、AK1A1、AK1C3 の免疫組織染色を行った。病理所見は IASLC/ATS/ERS 分類に基づき predominant subtype に分類した。上記のがん幹細胞マーカー蛋白発現、IASLC/ATS/ERS 分類と臨床病

理学的因子との関連について解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は後ろ向きの研究であり、研究対象に何ら侵襲や負担をかけるものではない。包括同意の範疇にあると考える。

C. 研究結果

CT 所見（肺野条件）における腫瘍径および充実部径は組織学的な浸潤部位の大きさと有意に相関した。また肺野条件画像での充実部径と縦隔条件画像での腫瘍径は無病生存や全生存期間と有意に相関したが、多変量解析では縦隔条件画像の腫瘍径のみが悪性度評価因子として有用であった。

一方、幹細胞マーカーに関する研究では対象症例(103 例)において AL1A1 陽性は 66%、AK1C1 陽性は 63%、AK1C3 陽性は 86%であった。AL1A1 発現は組織亜型の Solid pattern に対して Papillary pattern で高値であり、AK1C1 発現は papillary pattern に対して Solid pattern、AIS/MIA で高値であった。AL1A1 発現は腫瘍径、リンパ節転移の有無と並び予後に強い影響を及ぼすことが示された。