

201411032A

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）

小児の肉腫や脳腫瘍等に対する
がんペプチドワクチン単剤療法の開発
に関する研究

平成 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 中面 哲也

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 研究班構成員名簿 1
II. 平成 26 年度総括研究報告	
小児の肉腫や脳腫瘍等に対するがんペプチドワクチン単剤療法の開発 3
研究代表者 中面 哲也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表11
IV. 研究成果の刊行物・別刷13

I. 研究班構成員名簿

小児の肉腫や脳腫瘍等に対するがんペプチドワクチン単剤療法の開発
に関する研究班（平成26年度）

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	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
研究分担者	細野 亜古	国立がん研究センター東病院 小児腫瘍科 兼 中央病院 小児腫瘍科	医長
	金田 英秀	国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科	医員
	原 純一	大阪市立総合医療センター	副院長
	真部 淳	聖路加国際病院 小児科	医長
	木下 義晶	九州大学大学院医学研究院 小児外科学分野	准教授
	塩田 曜子	国立成育医療研究センター 小児がんセンター血液腫瘍科	医員
	孝橋 賢一	九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学	講師
	佐藤 暁洋	国立がん研究センター 研究支援センター 研究企画部	部長
研究協力者	河本 博	国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科	医長
	仁谷 千賀	大阪市立総合医療センター 小児血液腫瘍科	医長
	吉原 宏樹	聖路加国際病院 小児科	医員
	細谷 要介	聖路加国際病院 小児科	常勤嘱託医
	陳 基明	日本大学医学部 小児科学系小児科学分野	准教授
	小島 隆嗣	国立がん研究センター東病院 消化管内科	医員
	堀之内 秀仁	国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科	医長
	福谷 美紀	国立がん研究センター 研究支援センター 研究企画部	
	長谷川裕美	国立がん研究センター 研究支援センター 研究企画部	
	大角佳代子	国立がん研究センター 研究支援センター 研究企画部	
	野村 尚吾	国立がん研究センター 研究支援センター 研究企画部	
	森 正治	オンコセラピー・サイエンス株式会社	代表取締役
河合 裕子	塩野義製薬株式会社 グローバルプロジェクトマネジメント部	社長	

Ⅱ. 平成 26 年度総括研究報告

小児の肉腫や脳腫瘍等に対するがんペプチドワクチン単剤療法の開発

研究代表者 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 免疫療法開発分野長

研究要旨

小児がんの克服は国民的な課題である。集学的治療の発達により、その予後は劇的に改善してきた一方、発達途中の強力な治療による成長障害、二次がんなどの晩期合併症が問題視されている。また、依然3割程度は難治であり、現時点の治療開発は難治例の生存にあまり寄与していない。

本研究では、小児がんの中でも比較的对象も多く予後も不良な神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫を対象に、GCPに準じた臨床試験体制の下で、薬事承認につなげるためのペプチドワクチン療法の第I相の医師主導治験を実施した。神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫に高発現している3種類の抗原（KOC1、FOX1、KIF20A）由来のがんペプチドカクテルワクチン療法の医師主導治験を実施し科学的エビデンスを創出することを目的とし、当該ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請までの道りを一気に短縮することを目指した。

25年度内に計12例登録し、うちDLT評価対象の10例全例でDLT無が確認され、本治験の主要評価項目であるDLT評価の目的を達成して、症例登録が完了した。平成26年度は、最後の2例への投与を継続し1年間経過を追跡して、全患者への投与を終了した。有害事象については本治験薬と関連があるものとしては多くが注射部位反応であり、本治験薬の安全性については、特に問題なしと判断された。RECISTでの評価は、SD3例、NE2例、PD5例となっており、評価できた11例中10例に、KOC1、FOX1、KIF20A蛋白由来ペプチド3種類のうちのいずれか1種類以上のがん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果が認められた。KOC1、FOX1、KIF20A蛋白3種類の抗原の発現は、評価できた9例中6例、6例、7例で認められ、いずれか1種類以上の抗原の発現は9例全例において認められた。一方、HLA class Iの発現は9例中2例に認められた。無増悪生存期間、全生存期間については治験総括報告書に掲載する。最後の2例（横紋筋肉腫、骨肉腫）において、第2寛解以降で評価病変がない患者にはほぼ1年間再発がなく投与出来たことは今後の試験デザインの構築につながる結果と言える。一方で、かなり進行した患者には当該ペプチドワクチンの投与だけではなかなか満足のいく治療効果は得られないことも明らかとなった。

今後のペプチドワクチン単剤の第2相試験の対象としては、進行がんではなく、第2寛解以降の患者を対象に開発を進めるべきと考えられた。当該ペプチドワクチンを用いた臨床試験としては、脳腫瘍を対象とした2種類の試験を計画している。さらに、製薬企業で成人がんを対象に開発中の、KOC1（今回の3種類のペプチドのうちの1つ）を含む5種類のペプチドからなるカクテルワクチンの製剤の提供は可能との合意を得て、今回の対象の4つのがん種におけるこれら5種類の抗原の発現を調べた結果、骨肉腫以外の神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫には多くが発現することが明らかとなり、今後新たな研究費を取得して、この5種類のカクテルワクチンを用いた神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫等を対象とした臨床第1/2相試験の医師主導治験（2相部分は第2寛解以降の患者が対象）を計画すると同時に、骨肉腫を対象とした今回の3種類のカクテルワクチンを用いた第2寛解以降の患者を対象とした第2相試験も計画する方針とした。

研究分担者

細野 亜古	国立がん研究センター東病院 小児腫瘍科 医長	原 純一	大阪市立総合医療センター 副院長
	兼 国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科	真部 淳	聖路加国際病院 小児科 医長
		木下 義晶	九州大学大学院医学研究院 小児外科学分野 准教授
金田 英秀	国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科 医員	塩田 曜子	国立成育医療研究センター 小児がん センター血液腫瘍科 医員

孝橋 賢一 九州大学大学院医学研究院
形態機能病理学 講師

佐藤 暁洋 国立がん研究センター
研究支援センター研究企画部 部長

研究協力者

河本 博 国立がん研究センター中央病院
小児腫瘍科 医長

仁谷 千賀 大阪市立総合医療センター
小児血液腫瘍科 医長

吉原 宏樹 聖路加国際病院 小児科 医員

細谷 要介 聖路加国際病院 小児科 常勤嘱託医

陳 基明 日本大学医学部
小児科学系小児科学分野 准教授

小島 隆嗣 国立がん研究センター東病院
消化管内科 医員

堀之内秀仁 国立がん研究センター中央病院
呼吸器内科 医長

福谷 美紀 国立がん研究センター
研究支援センター 研究企画部

長谷川裕美 国立がん研究センター
研究支援センター 研究企画部

大角佳代子 国立がん研究センター
研究支援センター 研究企画部

野村 尚吾 国立がん研究センター
研究支援センター 研究企画部

森 正治 オンコセラピー・サイエンス株式会社
代表取締役社長

河合 裕子 塩野義製薬株式会社 グローバルプ
ロジェクトマネジメント部

A. 研究目的

集学的治療の発達により、小児がんの予後は劇的に改善してきた一方、発達途中の強力な治療による成長障害、二次がんなどの晩期合併症が問題視されている。また、依然3割程度は難治であり、現時点の治療開発は難治例の生存にあまり寄与していない。我々は成人肝細胞がんの第I相試験を終了した glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンを用いて、GPC3を発現する小児がんに対する第I相試験を実施しているが、小児がんにおけるGPC3発現率はそれほど高くないことを踏まえ、本研究では、比較的患者数が多く予後も不良な神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫を対象に、GPCに準じた臨床試験体制の下で薬事承認につなげるためのペプチドワクチン療法の第I相の医師主導臨床試験の実施を

計画した。それらのがんに高発現している3種類の抗原 (KOC1、FOXMI、KIF20A) 由来のがんペプチドカクテルワクチン療法の医師主導治験を実施して科学的エビデンスを創出し、当該ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請の早期実現を目指した。

本研究の特色、独創的な点は、対象の小児がんに最も効果が期待できる組み合わせとして、成人のがん患者に既に投与実績があり、企業が成人がんを対象に開発中である3種類の抗原ペプチドを選択して組み合わせたペプチドカクテルワクチンを用いる点であり、本治験で期待できる成果が得られた場合は、即座に企業治験に移行できる可能性が高い。

平成23年度は、当該臨床試験を治験で実施する手続きを進め、薬事戦略相談を行った。平成24年度は、追加を要求された非臨床試験の実施に時間がかかったものの、国立がん研究センターならびに大阪市立総合医療センターの治験審査委員会に24年12月末に承認を得た後、25年1月初めに治験開始届を提出して、25年3月に症例登録を開始した。平成25年度は、聖路加国際病院も実施施設として追加し、治験開始が遅れた分を取り戻せるよう、迅速な症例登録により早期の症例登録終了を目指した。25年度内に計12例登録し、うちDLT評価対象の10例全例でDLT無が確認され、本治験の主要評価項目であるDLT評価の目的を達成して、症例登録が完了した。治験開始が遅れた分を迅速な症例登録でなんとか挽回できたと言える。平成26年度は、2例には投与を継続しながら1年間経過を追跡するとともに、副次的評価項目である有害事象、病勢制御割合、無増悪生存期間、全生存期間と、Proof of principleとしての、がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果、抗原発現と有効性の相関についても検討して、終了時には臨床試験の経過観察まで含めた研究総括を行い、十分な成果を報告できるよう努めることとした。

B. 研究方法

難治性小児固形腫瘍患者を対象としたがんペプチドカクテルワクチン療法の第I相臨床試験医師主導治験 (H26年度) (中面、細野、金田、原、真部、木下、塩田、孝橋、佐藤)

25年度内に計12例が登録され、うちDLT評価対象の10例全例でDLT無が確認されて、本治験の主要評価項目であるDLT評価の目的を達成して、

症例登録が完了した。今年度は、2例には投与を継続しながら1年間経過を追跡するとともに、副次的評価項目である有害事象、病勢制御割合、無増悪生存期間、全生存期間と、Proof of principleとしての、がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果、抗原発現と有効性の相関についても検討して、終了時には臨床試験の経過観察まで含めた治験総括を行うこととした。

目的： 治癒の見込めない神経芽腫、Ewing肉腫ファミリー腫瘍、横紋筋肉腫、骨肉腫患者に対するがん抗原KOC1、FOXM1、KIF20A由来のがんペプチドカクテルワクチン（NCCV Cocktail-1）の有害事象を評価し、用量制限毒性（Dose limiting toxicity：DLT）発現割合から推奨用量を決定する。

ペプチドの選択： 免疫染色において、KOC1蛋白、FOXM1蛋白については、神経芽腫5例中5例、ユーイング肉腫5例中5例、横紋筋肉腫6例中6例、骨肉腫5例中5例、KIF20A蛋白については、神経芽腫5例中4例、ユーイング肉腫5例中5例、横紋筋肉腫6例中6例、骨肉腫5例中5例で発現を確認している。ほとんどの神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫にKOC1、FOXM1、KIF20A蛋白発現が確認されることから、これらの症例に対して上記3種類の抗原蛋白由来ペプチドワクチン療法開発が可能と判断した。

試験対象： 治癒の見込めない、再発神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫患者

主要評価項目： 週に1回で4回接種する期間の用量制限毒性（DLT）の発現

副次的評価項目： 有害事象、病勢制御割合、無増悪生存期間、全生存期間

Proof of principle： がん抗原ペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導効果、抗原発現と有効性の相関

投与量と試験デザイン：

用量レベル	体重 20kg 未満	体重 20kg 以上
レベル 1	0.5 ml	1 ml
レベル 0	0.25 ml	0.5 ml

（1 ml中に各ペプチドワクチンが2 mgずつ配合されている3ペプチド配合剤を使用する）

各ペプチド2 mgを基本とする体重調整投与量で開始して本用量での安全性及び実施可能性を評価

し、本用量で問題があると判断された場合に限り、1レベル下（用量レベル0）で、過小な量とされない範囲と考えられる各ペプチド1 mgを基本とする体重調整投与量での安全性及び実施可能性を評価する。

治療方法： NCCV Cocktail-1は7日（±1日）毎に投与し、「プロトコール治療中止規準」に該当しない限り、最大1年間投与を継続する。9週以降については、寛解維持されているもしくは寛解に入っている場合は14日（±2日）毎の投与を許容する。

試験実施施設と研究分担者の役割： 臨床試験： 国立がん研究センター東病院（細野）、国立がん研究センター中央病院（金田、研究協力者：河本）、大阪市立総合医療センター（原、研究協力者：仁谷）、聖路加国際病院（真部、研究協力者：吉原、細谷）の4施設で実施。九州大学病院（木下）、国立成育医療研究センター（塩田）は本臨床試験等に協力する。がん抗原の発現の検査：九州大学（孝橋）。製剤の作成・提供、非臨床試験、免疫学的解析：国立がん研究センター（中面）。症例数算定・試験デザイン、疫学・生物統計：国立がん研究センター（研究協力者：野村）。GCP試験の体制整備：国立がん研究センター（佐藤、研究協力者：福谷、長谷川、大角、野村）。

予定登録数と試験期間： 本臨床試験全体で10例ないし20例とする。登録期間1年、追跡期間1年。

[倫理面への配慮]

GCPの遵守

本治験は本治験実施計画書、薬事法第14条第3項および第80条の2の規定ならびに平成9年3月27日付厚生省令第28号、平成15年6月12日付厚生労働省令第106号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令」（改正GCP）、平成15年6月12日付医薬発第0612001号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令の施行について」および平成16年7月22日付薬食審査発第0722014号「医薬品の臨床試験の実施の基準の運用について」を遵守し、医師主導治験として実施する。実施に際しては、ヘルシンキ宣言の倫理的原則を遵守して、被験者の人権、福祉および安全を最大限に確保する。

治験審査委員会（IRB）

本治験は各実施医療機関が設置した治験審査

委員会において審査され、承認された後に実施する。また、本治験実施中においては、年に1回または治験審査委員会の求めに応じてそれ以上の頻度で、治験の継続の可否について審査を受ける。

治験計画の届け出

本治験においては、各実施医療機関の長が治験審査委員会の意見に基づいて治験の実施を了承した後に、薬事法第80条の2に基づき各実施医療機関の治験責任医師が“自ら治験を実施する者”として連名で厚生労働大臣に治験の計画を届け出た上で実施する。

被験者の同意

治験責任医師は、治験への参加の同意を得るために用いる同意・説明文書およびその他の説明文書を作成する。これらの文書の使用にあたっては、あらかじめ治験審査委員会の承認を得る。なお、原則として小児の被験者から法的に定められた同意を得ることはできないため、代諾者（親権者または後見人）より同意を得ることとするが、可能な限り被験者本人からもアセントを取得する。

被験者のプライバシー保護

被験者のプライバシー保護の観点から、本治験中は全てのデータを被験者識別コードのみで特定する。データは解析の全過程においても同様にマスクして処理する。尚、本治験への登録に際しては被験者識別コードにより症例を特定し、登録後は登録センターより割り振られた症例番号で特定する。

治験責任医師／治験分担医師は、原資料等の直接閲覧または治験成績の公表があること、および直接閲覧または治験成績の公表により被験者のプライバシーが侵されることはないことを、あらかじめ被験者または代諾者に説明し、同意を得る。

安全性情報の管理と提供

本治験に用いる全ての薬剤（ペプチド）の安全性等に関する新たな情報を得た場合、治験調整医師は必要に応じて他の実施医療機関の治験責任医師に文書にて報告する。必要な場合には、治験責任医師から当該実施医療機関の長にも文書にて報告する。国内および海外治験における安全性情報については、国立がん研究センター臨床試験支援室と治験実施企業とが密な連携をとり、迅速な情報共有を行う体制が構築済みである。

重篤な有害事象が発生した場合の措置

治験責任医師／治験分担医師は、有害事象を認めた場合、被験者のリスクを最低限にするよう、速やかに適切な診断と処置を行う。同時に下記に該当する重篤な有害事象と判断した場合には速やかに当該実施医療機関の長および治験調整医師に文書を用いて報告する。治験調整医師は情報入手後、すみやかに他の治験責任医師ならびに治験薬提供者に報告する。また、薬事法施行規則第273条に基づき、厚生労働大臣への報告の必要性を判断する。

当該治験責任医師／治験分担医師は、試験の継続等について当該実施機関の治験審査委員会の意見に基づき、当該実施医療機関の長の指示を受ける。また、発現した有害事象については可能な限り追跡調査を行い、必要な場合には追加報告書を治験調整医師に報告し、治験調整医師は初回報告と同様に扱う。

治験調整医師および各治験責任医師は、効果安全性評価委員会に対し、重篤な有害事象の報告を行うと共に、治療の継続、変更または中止について諮問できる。

健康被害に関する補償

本試験に起因して患者に健康被害が生じた場合には、実施医療機関は当該実施医療機関に法的責任がなくとも「健康被害の補償に関する手順書」に従って補償を行う。本試験における補償の内容は医療の提供とし、医療費、医療手当、補償金の支払いは行わない。補償原則は患者の損害賠償請求権の行使を妨げるものではない。健康被害が治験薬および治験目的のために実施計画書で使用することが定められた薬剤投与によるもの、または実施計画書に定められた臨床的介入、または手順によるものであり、患者が治験に参加していなければ起きなかったと判断されるものであれば、その蓋然性も考慮の上、補償する。

さらに動物実験に際しては、施設の動物実験指針を遵守し、動物愛護にも留意して研究を遂行するよう努める。

C. 研究結果

平成26年度は、2例には投与を継続しながら、1年間経過を追跡し、全登録患者へのペプチドワクチン投与を終了した。1月19日に班会議を行い、副次的評価項目でもある有害事象について協議し、本治

験薬と関連があるものとしては多くが注射部位反応であり、本治験薬の安全性については、特に問題なしと判断された。RECISTでの評価は、SD3例、NE2例、PD5例となっており、評価できた11例中10例に、KOC1、FOX1、KIF20A 蛋白由来ペプチド3種類のうちのいずれか1種類以上のがん抗原ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導効果が認められた。KOC1、FOX1、KIF20A 蛋白3種類の抗原の発現は、評価できた9例中6例、6例、7例で認められ、いずれか1種類以上の抗原の発現は9例全例において認められた。一方、HLA class I の発現は9例中2例に認められた。無増悪生存期間、全生存期間については治験総括報告書に掲載する。最後の2例（横紋筋肉腫、骨肉腫）において、第2寛解以降で評価病変がない患者にはほぼ1年間再発がなく投与出来たことは今後の試験デザインの構築につながる結果と言える。一方で、かなり進行した患者には当該ペプチドワクチンの投与だけではなかなか満足いく治療効果は得られないことも明らかとなった。今後のペプチドワクチン単剤の第2相試験の対象としては、進行がんではなく、第2寛解以降の患者を対象に開発を進めるべきと考えられた。

D. 考察

本研究の特色、独創的な点は、対象の小児がんにも最も効果が期待できる組み合わせとして、成人のがん患者に既に投与実績があり、企業が成人がんを対象に開発中である3種類の抗原ペプチドを選択して組み合わせたペプチドカクテルワクチンを用いる点であり、本治験で期待できる成果が得られた場合は、即座に企業治験に移行したいという希望があった。残念ながら即座に企業治験に移行できるほどの劇的な効果は得られなかったが、今回のカクテルワクチンの安全性は確立し、引き続き開発を進める方針となった。当該ペプチドワクチンを用いた臨床試験としては、日本医療研究開発機構研究費・革新的がん医療実用化研究事業「小児脳腫瘍に対する多施設共同研究による治療開発」原班において、大阪市立総合医療センターを中心とした、難治性小児中枢神経腫瘍を対象とした単剤の第2相試験と HLA class I の発現上昇も期待したインターフェロンβ併用の第1/2相試験の2種類の脳腫瘍を対象とした試験を計画している。さらに、製薬企業で成人がんを対象に開発中の、KOC1（今回の3種類のペプチドのうちの1つ）を含む5種類のペプチドからなるカ

クテルワクチンの製剤の提供は可能との合意を得て、今回の対象の4つのがん種におけるこれら5種類の抗原の発現を調べた結果、骨肉腫以外の神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫には多くが発現することが明らかとなり、今後新たな研究費を取得して、この5種類のカクテルワクチンを用いた神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫等を対象とした臨床第1/2相試験の医師主導治験（2相部分は第2寛解以降の患者が対象）を計画すると同時に、骨肉腫を対象とした今回の3種類のカクテルワクチンを用いた第2寛解以降の患者を対象とした第2相試験も計画する方針とした。

本研究結果をベースにして、今後も引き続き質の高い臨床試験を遂行し、科学的エビデンスを創出することで、小児がんにおけるがんペプチドワクチンの迅速な創薬化を実現し、がん患者のQOL・予後の改善、医療費の削減など保健医療への多大な貢献につなげたい。

E. 結論

小児がんの中でも比較的对象も多く予後も不良な神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫を対象に、GCPに準じた臨床試験体制の下で、薬事承認につながるためのペプチドワクチン療法の第1相の医師主導治験を実施した。神経芽腫やユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫に高発現している3種類の抗原（KOC1、FOX1、KIF20A）由来のがんペプチドカクテルワクチン療法の医師主導治験を実施し科学的エビデンスを創出することを目的とし、当該ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請までの道のりを一気に短縮することを目指した。

計12例登録し、うちDLT評価対象の10例全例でDLT無が確認され、本治験の主要評価項目であるDLT評価の目的は達成した。最後の2例（横紋筋肉腫、骨肉腫）において、第2寛解以降で評価病変がない患者にはほぼ1年間再発がなく投与出来たことは今後の試験デザインの構築につながる結果と言える。一方で、かなり進行した患者には当該ペプチドワクチンの投与だけではなかなか満足いく治療効果は得られないことも明らかとなった。今後のペプチドワクチン単剤の第2相試験の対象としては、進行がんではなく、第2寛解以降の患者を対象に開発を進めるべきと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Maekawa R, Nakatsura T. Large-scale expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific cytotoxic T cells using zoledronate for adoptive immunotherapy. *Int. J. Oncol.* 45(5):1847-1856, 2014.
- 2) Ofuji K, Saito K, Yoshikawa T, Nakatsura T. Critical analysis of the potential of targeting GPC3 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma.* 1:35-42, 2014.
- 3) Sakaguchi S, Oda M, Shinkoda Y, Manabe A. Parent's perception of pediatric cancer centers in Japan. *Pediatr Int.* 56(2):196-199, 2014.
- 4) Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol.* 45(9):1900-1909, 2014.
- 5) Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y, Nakatsura T. A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 46(2):497-504, 2015.
- 6) Sawada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Iwama T, Endo I, Nakatsura T. Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Oncol.* 46(1):28-36, 2015.
- 7) Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Nakatsura T, Taguchi T. Glypican 3 Expression in Pediatric Malignant Solid Tumors. *Eur J Pediatr Surg.* 25(1):138-144, 2015.
- 8) Yonemoto T, Hosono A, Iwata S, Kamoda H, Hagiwara Y, Fujiwara T, Kawai A, Ishii T. The prognosis of osteosarcoma occurring as second malignancy of childhood cancers may be favorable: experience of two cancer centers in Japan. *Int J Clin*

Oncol. 2014 Jul 15.(Epub ahead of print)

2. 学会発表

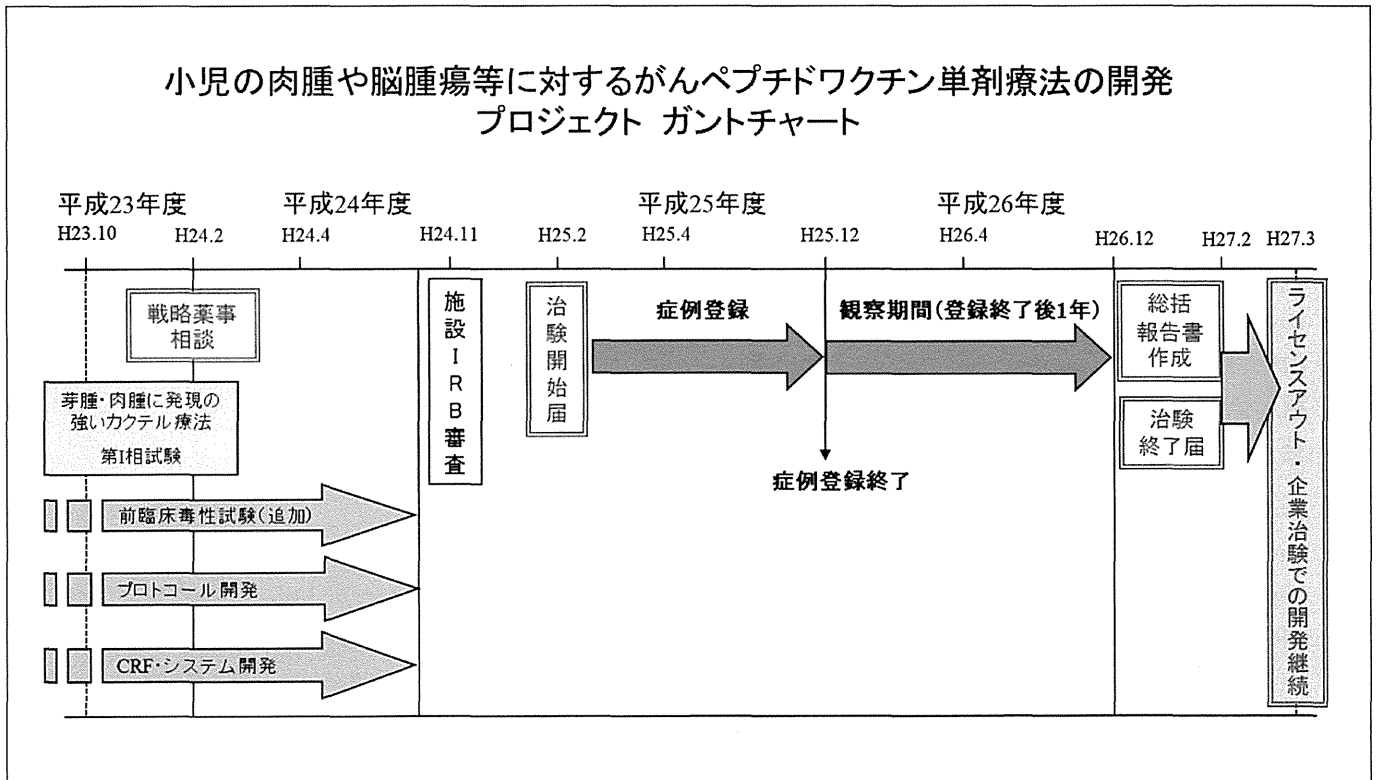
- 1) Phase I study of vaccine therapy with a cocktail of peptides for pediatric patients with refractory neuroblastoma, Ewing's sarcoma, rhabdomyosarcoma and osteosarcoma. Hosono A, Kaneda H, Hara J, Kinoshita Y, Kohashi K, Manabe A, Shioda Y, Nakatsura T. *Connective Tissue Oncology Society (Berlin)*, October 15-18, 2014
- 2) 難治性小児固形腫瘍に対するペプチドカクテルワクチン療法の第1相試験第一報、細野亜古、金田英秀、原純一、木下義晶、孝橋賢一、真部淳、塩田曜子、中面哲也 シンポジウム、第56回日本小児血液・がん学会学術総会（岡山）、2014年11月28日～30日
- 3) がん免疫療法の開発、中面哲也 プラクティカルセッション～明日から役立つ個別化医療、第18回国際個別化医療学会学術集会（札幌）、2014年6月14日
- 4) Glypican 3 expressions in pediatric malignant solid tumors. Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Nakatsura T, Taguchi T. 15th Congress of the European Paediatric Surgeons' Association (Dublin), June 18-21, 2014
- 5) がんワクチン開発の現状と課題、中面哲也 教育講演「がんワクチン開発の現状と課題」、第41回日本毒性学会学術年会（神戸）、2014年7月2日～4日
- 6) がんに対する免疫療法の基本、中面哲也 教育セミナー「がん専門CRCのためのアドバンスセミナー」、第12回日本臨床腫瘍学会学術集会（福岡）、2014年7月17日～19日
- 7) Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的CTLの解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、吉原宏樹、上野浩生、真部淳、細野亜古、植村靖史、中面哲也 第18回日本がん免疫学会総会（松山）、2014年7月30日～8月1日
- 8) Glypican-3由来エピトープペプチド結合リポソームのCTL誘導能の評価、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也 第18回日本

- がん免疫学会総会（松山）、2014年7月30日～8月1日
- 9) 横紋筋肉腫におけるCXCR4、CXCR7、VEGFの発現と臨床病理学的検討、三好きな、久田正昭、孝橋賢一、山田裕一、山元英崇、岩本幸英、田口智章、小田義直 第11回日本病理学会カンファレンス（神戸）、2014年8月1日～2日
- 10) Analysis of glypican-3 specific CTLs in the tumor tissue and vaccination site after administration of GPC3 peptide. (Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的CTLの解析)、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、植村靖史、中面哲也 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25日～27日
- 11) Evaluation of peptide-specific CTL-inducible ability of glypican-3-derived peptide-coupled liposome vaccine. (Glypican-3由来ペプチドを結合したリポソームワクチンのペプチド特異的CTL誘導能評価)、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25日～27日
- 12) The enhancement of the CTL induction by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody (抗CD4抗体の併用投与は抗腫瘍ペプチドワクチン療法でのCTLプライミング効率を高める)、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、植村靖史、中面哲也 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25日～27日
- 13) EGFR T790M mutation-derived antigen provides the immunogenicity in NSCLC patients. (非小細胞肺癌におけるEGFR T790M変異由来抗原は免疫原性を与える)、大藤和也、吉川聡明、多田好孝、吉村麻友子、下村真菜美、中本安成、中面哲也 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25日～27日
- 14) Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的CTLの解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、植村靖史、中面哲也 第12回日本免疫治療学研究会学術集会（東京）、2015年2月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究の概要図



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Maekawa R, <u>Nakatsura T.</u>	Large-scale expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific cytotoxic T cells using zoledronate for adoptive immunotherapy.	Int. J. Oncol.	45(5)	1847-1856	2014
Ofuji K, Saito K, Yoshikawa T, <u>Nakatsura T.</u>	Critical analysis of the potential of targeting GPC3 in hepatocellular carcinoma.	Journal of Hepatocellular Carcinoma.	1	35-42	2014
Sakaguchi S, Oda M, Shinkoda Y, <u>Manabe A.</u>	Parent's perception of pediatric cancer centers in Japan.	Pediatr Int.	56(2)	196-199	2014
Miyoshi K, <u>Kohashi K.</u> , Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y.	Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma.	Hum Pathol.	45(9)	1900-1909	2014
Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y, <u>Nakatsura T.</u>	A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer.	Int. J. Oncol.	46(2)	497-504	2015
Sawada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Iwama T, Endo I, <u>Nakatsura T.</u>	Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes.	Int. J. Oncol.	46(1)	28-36	2015
<u>Kinoshita Y.</u> , Tanaka S, Souzaki R, Miyoshi K, <u>Kohashi K.</u> , Oda Y, <u>Nakatsura T.</u> , Taguchi T.	Glypican 3 Expression in Pediatric Malignant Solid Tumors.	Eur J Pediatr Surg.	25(1)	138-144	2015

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Large-scale expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific cytotoxic T cells using zoledronate for adoptive immunotherapy

TOSHIAKI YOSHIKAWA¹, MASASHI TAKAHARA², MAI TOMIYAMA², MIE NIEDA²,
RYUJI MAEKAWA² and TETSUYA NAKATSURA¹

¹Division of Cancer Immunotherapy, Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center, Kashiwa 277-8577; ²Medinet Medical Institute, Setagaya-ku, Tokyo 158-0096, Japan

Received June 11, 2014; Accepted July 24, 2014

DOI: 10.3892/ijo.2014.2634

Abstract. Specific cellular immunotherapy for cancer requires efficient generation and expansion of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) that recognize tumor-associated antigens. However, it is difficult to isolate and expand functionally active T-cells *ex vivo*. In this study, we investigated the efficacy of a new method to induce expansion of antigen-specific CTLs for adoptive immunotherapy. We used tumor-associated antigen glypican-3 (GPC3)-derived peptide and cytomegalovirus (CMV)-derived peptide as antigens. Treatment of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with zoledronate is a method that enables large-scale $\gamma\delta$ T-cell expansion. To induce expansion of $\gamma\delta$ T cells and antigen-specific CTLs, the PBMCs of healthy volunteers or patients vaccinated with GPC3 peptide were cultured with both peptide and zoledronate for 14 days. The expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific CTLs from a few PBMCs using zoledronate yields cell numbers sufficient for adoptive transfer. The rate of increase of GPC3-specific CTLs was approximately 24- to 170,000-fold. These CD8⁺ cells, including CTLs, showed GPC3-specific cytotoxicity against SK-Hep-1/hGPC3 and T2 pulsed with GPC3 peptide, but not against SK-Hep-1/vec and T2 pulsed with human immunodeficiency virus peptide. On the other hand, CD8⁻ cells, including $\gamma\delta$ T cells, showed cytotoxicity against SK-Hep-1/hGPC3 and SK-Hep-1/vec, but did not show GPC3 specificity. Furthermore, adoptive cell transfer of CD8⁺ cells, CD8⁻ cells, and total cells after expansion significantly inhibited tumor growth in an NOD/SCID mouse model. This study indicates that simultaneous expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific CTLs using zoledronate is useful for adoptive immunotherapy.

Introduction

Current therapeutic options for cancer treatment, including surgery, radiotherapy and chemotherapy, have made advancements in recent years and the survival rate of patients with cancer has gradually improved. However, these therapies remain far from satisfactory in most cancers (1,2). Therefore, the development of novel treatment modalities, including antigen-specific cancer immunotherapies with peptide vaccines, dendritic cell vaccines and adoptive cell transfer therapies, is critical for the further advancement of effective cancer treatments (3-5).

We found that glypican-3 (GPC3), which is an oncofetal antigen that is overexpressed in human hepatocellular carcinoma (HCC), was shown to be a useful target antigen for immunotherapy in several studies (6-10). Based on results obtained from preclinical studies, we conducted a phase I clinical trial using a GPC3-derived peptide vaccine in 33 patients with advanced HCC. In almost all vaccinated patients, the frequency of GPC3 peptide-specific CTLs increased after vaccination. Furthermore, this was the first study to show that the frequency of peptide-specific CTLs was correlated with overall survival in patients with HCC receiving peptide vaccines (11,12). Although the peptide vaccine is a potentially attractive treatment modality, the antitumor effects of the peptide vaccine alone are not dramatic in patients with advanced HCC. Therefore, the establishment of an innovative strategy to enhance the power of antigen-specific cancer immunotherapy is urgently required.

Cellular immunotherapy of solid and hematopoietic malignancies is regarded as a promising approach to treat relapse after or resistance to conventional treatments. The adoptive transfer of autologous tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) results in objective cancer regression in 49 to 72% of patients with metastatic melanoma (13). However, due to the scarcity of TILs, this therapy is only possible for a limited number of patients. It is difficult to isolate and expand functionally active T cells. Development of a new method of CTL expansion may be useful in addressing this problem.

It was recently reported that $\gamma\delta$ T cells are attractive mediators of cancer immunotherapy (14). Several clinical studies that included manipulation of $\gamma\delta$ T cells by amino-bisphosphonate administration or adoptive transfer of $\gamma\delta$

Correspondence to: Dr Tetsuya Nakatsura, Division of Cancer Immunotherapy, Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa 277-8577, Japan
E-mail: tnakatsu@east.ncc.go.jp

Key words: adoptive cell transfer, cytotoxic T lymphocyte, $\gamma\delta$ T cell, glypican-3, hepatocellular carcinoma

T cells were performed (15-17). $\gamma\delta$ T cells recognize their targets independently of major histocompatibility complex (MHC)-mediated antigen presentation (18-21). Human $\gamma\delta$ T cells kill a vast repertoire of tumor cell lines and primary samples *in vitro*, including leukemia, lymphoma, melanoma, neuroblastoma and multiple types of carcinomas (22-25). In addition, human $\gamma\delta$ T cells mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (26,27). On the other hand, activated human $\gamma\delta$ T cells produce large amounts of interferon- γ (28,29), a central cytokine in antitumor immune responses. Moreover, it has been reported that zoledronate stimulates proliferation of $\gamma\delta$ T cells, which then stimulate CTLs as antigen-presenting cells (APCs) (30-33). Therefore, we have attempted to use $\gamma\delta$ T cells as both effector cells and APCs.

We report on the development of a more effective adoptive immunotherapy. We investigated a new method to induce expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific CTLs using zoledronate.

Materials and methods

Patient samples. Patient blood samples were obtained during the performance of clinical trials at National Cancer Center Hospital East. We carried out two clinical trials involving GPC3-derived peptide vaccine. The phase I trial was carried out among 33 patients with advanced or metastatic HCC from February, 2007 to November, 2009 (11,12). The trial was registered with the University Hospital Medical Information Network Clinical Trials Registry (UMIN-CTR no. 000001395). We subsequently conducted a phase II trial involving the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for patients with HCC. Forty patients with initial HCC who had undergone surgery or radiofrequency ablation were enrolled in this phase II trial (UMIN-CTR no. 000002614). These patients were enrolled after providing a written informed consent. Patients were intradermally injected with HLA-A24-restricted GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) or HLA-A2-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) peptide vaccine emulsified with incomplete Freund's adjuvant (IFA, Montanide ISA-51VG; SEPPIC, Paris, France). This study was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Center and conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

PBMCs. Peripheral blood (30 ml) was obtained from healthy volunteers or patients at the times designated in the protocol (before the first vaccination and 2 weeks after each vaccination). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by standard Ficoll density gradient centrifugation from buffy coats. In this study, we used the remaining PBMCs after immunological monitoring in the clinical trials.

Cell lines. The human liver cancer cell lines SK-Hep-1 (GPC3⁻, HLA-A*02:01/A*24:02) and SK-Hep-1/hGPC3 (GPC3⁺, HLA-A*02:01/A*24:02) were used as target cells. SK-Hep-1/hGPC3 is an established stable GPC3-expressing cell line transfected with a human GPC3 gene, and SK-Hep-1/vec is an established counterpart cell line in which an empty vector was transfected. T2 (HLA-A*02:01, TAP⁻) and T2A24 (HLA-A*02:01/A*24:02, TAP⁺) cells were pulsed with GPC3 peptide or human immunodeficiency (HIV) peptide at room

temperature for 1 h. They were conserved in our laboratory. Cells were cultured at 37°C in RPMI-1640 or DMEM medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Synthetic peptides. The peptides used in this study were as follows: HLA-A*02:01-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) peptide (American Peptide Company, Sunnyvale, CA), HLA-A*24:02-restricted GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) peptide (American Peptide Company), HLA-A*02:01-restricted cytomegalovirus (CMV)₃₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV) peptide (ProImmune, Rhinebeck, NY, USA), HLA-A*24:02-restricted CMV₃₄₁₋₃₄₉ (QYDPVAALF) peptide (ProImmune), and HLA-A*02:01-restricted HIV₇₇₋₈₅ (SLYNTYATL) peptide (ProImmune). The peptides were dissolved and diluted in 7% NaHCO₃ or dimethyl sulfoxide.

Large-scale expansion using zoledronate. PBMCs were cultured (2x10⁶ cells/well) with zoledronate (5 μ M) (Novartis Pharma, Basel, Switzerland) and CMV or GPC3 peptide (10 μ M) in AIM-V medium (Gibco) supplemented with 10% human AB serum (Sigma) and recombinant human interleukin (IL)-2 (1,000 IU/ml) (Novartis Pharma) for 14 days. The stimulation procedure was performed at 37°C and 5% CO₂. Scale-up of cells was performed in accordance with their growth.

Expansion of peptide-specific CTLs in the absence of zoledronate. To obtain zoledronate-activated $\gamma\delta$ T cells, PBMCs were stimulated with zoledronate and IL-2 for 7 days. On day 7, zoledronate-activated $\gamma\delta$ T cells were sorted using FACSaria II. CD8⁺ cells and $\gamma\delta$ T cells without zoledronate activation were sorted from non-cultured PBMCs using microbeads and FACSaria II, respectively. Dendritic cells (DCs) were induced from CD14⁺ cells using GM-CSF and IL-4. On day 5, DCs were stimulated with TNF- α for 2 days. We used $\gamma\delta$ T cells with or without zoledronate activation and TNF- α -stimulated DCs as stimulator cells. Stimulator cells were pulsed with CMV peptide (10 μ M) for 1 h at room temperature. After washing out the peptide, stimulator cells were co-cultured for 2 weeks with responder CD8⁺ cells and the addition of IL-2 in the absence of zoledronate. We compared the percentages of CMV peptide-specific CTLs in responder CD8⁺ cells using dextramer assays.

In vitro stimulation of GPC3 peptide-specific CTL clones. GPC3 peptide-specific CTL clones were previously generated by single cell sorting using a GPC3-dextramer or CD107a antibody. CTL clones were stimulated as described previously (34).

Dextramer staining and flow cytometry analysis. The PBMCs were stained with CMV, GPC3 or HIV Dextramer-RPE (Immudex, Copenhagen, Denmark) for 10 min at room temperature and with anti-CD8-FITC (ProImmune) or anti-CD8-APC (BioLegend, San Diego, CA), anti-CD45RA-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and anti-CCR7-PerCP/Cy5.5 (BioLegend) for 20 min at 4°C. To detect $\gamma\delta$ T cells, PBMCs were stained with anti-TCR-V γ 9-FITC (Beckman Coulter, Erembodegem,

Table I. Rate of increase in the number of cells in 16 patients with HCC.

Sample	HLA-A	Total			$\gamma\delta$			GPC3 specific CTLs		
		Day 0	Day 14	The rate of increase	Day 0	Day 14	The rate of increase	Day 0 ^a	Day 14 ^b	The rate of increase
1	02:01	2.0x10 ⁶	1.7x10 ⁸	85	1.2x10 ⁴	2.8x10 ⁷	2.3x10 ³	2.0x10 ³	6.1x10 ⁷	3.1x10 ⁴
2	02:01	2.0x10 ⁶	5.4x10 ⁸	2.7x10 ²	2.8x10 ⁴	3.1x10 ⁸	1.1x10 ⁴	1.6x10 ²	2.7x10 ⁷	1.7x10 ⁵
3	02:01	2.0x10 ⁶	1.7x10 ⁸	85	8.8x10 ³	7.8x10 ⁷	8.9x10 ³	92	1.0x10 ⁶	1.1x10 ⁴
4	02:01	2.0x10 ⁶	1.7x10 ⁸	85	2.4x10 ⁴	9.5x10 ⁷	4.0x10 ³	1.3x10 ³	1.9x10 ⁷	1.5x10 ⁴
5	02:01	2.0x10 ⁶	7.4x10 ⁷	37	9.4x10 ³	5.2x10 ⁷	5.5x10 ³	92	1.8x10 ⁵	2.0x10 ³
6	02:01	2.0x10 ⁶	2.5x10 ⁷	13	2.0x10 ⁴	1.2x10 ⁷	6.0x10 ²	1.0x10 ³	1.9x10 ⁶	1.9x10 ³
7	02:01	2.0x10 ⁶	1.6x10 ⁸	80	1.1x10 ⁴	7.4x10 ⁷	6.7x10 ³	2.1x10 ²	4.4x10 ⁶	2.1x10 ⁴
8	02:01	2.0x10 ⁶	4.0x10 ⁸	2.0x10 ²	1.2x10 ⁴	1.3x10 ⁸	1.1x10 ⁴	4.0x10 ²	2.6x10 ⁷	6.5x10 ⁴
9	02:01	2.0x10 ⁶	4.0x10 ⁷	20	8.0x10 ³	4.4x10 ⁶	5.5x10 ²	8.4x10 ²	5.9x10 ⁶	7.0x10 ³
10	02:01	2.0x10 ⁶	2.2x10 ⁶	1.1	2.0x10 ³	4.5x10 ⁴	23	92	2.2x10 ³	24
11	02:01	2.0x10 ⁶	1.5x10 ⁸	75	6.0x10 ³	4.8x10 ⁷	8.0x10 ³	3.0x10 ²	2.0x10 ⁷	6.7x10 ⁴
12	02:01	2.0x10 ⁶	1.1x10 ⁸	55	6.0x10 ³	1.2x10 ⁷	2.0x10 ³	1.2x10 ³	3.5x10 ⁷	2.9x10 ⁴
13	24:02	2.0x10 ⁶	5.8x10 ⁶	2.9	1.8x10 ⁴	3.8x10 ⁶	2.1x10 ²	1.3x10 ²	6.3x10 ⁴	4.9x10 ²
14	24:02	2.0x10 ⁶	4.0x10 ⁶	2	2.2x10 ⁴	2.6x10 ⁶	1.2x10 ²	1.0x10 ²	3.1x10 ⁴	3.1x10 ²
15	24:02	2.0x10 ⁶	9.9x10 ⁷	50	3.8x10 ³	3.8x10 ⁷	1.0x10 ⁴	1.8x10 ²	1.2x10 ⁶	6.7x10 ³
16	24:02	2.0x10 ⁶	4.0x10 ⁷	20	9.8x10 ³	5.6x10 ⁶	5.7x10 ²	1.4x10 ²	1.4x10 ⁵	1.0x10 ³

^aFrequency of GPC3-specific CTLs of 2x10⁶ PBMCs was measured by *ex vivo* IFN- γ ELISPOT assay. ^bGPC3-specific CTLs after cell culture were measured by flow cytometry.

Belgium) and anti-CD3-PC5 (BioLegend) for 20 min at 4°C. $\gamma\delta$ T cells, with or without zoledronate activation, and TNF-DCs were stained with anti-HLA-class I-FITC, anti-CD80-FITC, anti-CD83-FITC and anti-CD86-PE (BD Biosciences) antibodies for 20 min at 4°C. Flow cytometry analysis was carried out using FACSCanto II (BD Biosciences).

Cytotoxicity assay. Cytotoxic activity against target cells was analyzed using the Terascan VPC system (Minerva Tech, Tokyo, Japan) as described previously (34). Target cells were labeled with calcein AM (Dojindo, Kumamoto, Japan) solution for 30 min at 37°C. The labeled cells were then incubated with effector cells for 4 to 6 h. As effector cells, CD8⁺ and CD8⁻ T cells were isolated using human CD8 microbeads (BD Bioscience) from PBMCs stimulated for 14 days. Assays were conducted in duplicate.

Transfer of effector cells to NOD/SCID mice implanted with the GPC3⁺ or GPC3⁻ cell line. Female NOD/SCID (6-8 weeks old) were purchased from Japan Charles River Laboratories (Yokohama, Japan). All animal procedures were performed according to the guidelines for the Animal Research Committee of the National Cancer Center, Japan. We inoculated SK-Hep-1/hGPC3 or SK-Hep-1/vec cells subcutaneously into the right flank of NOD/SCID mice. We intravenously injected the CD8⁺ cells, CD8⁻ cells, or both, as effector cells. We injected PBS as a negative control. Before adoptive transfer, we examined the percentage of CD8⁺ cells in expanded cells using flow cytometry. The percentage of CD8⁺ cells after expansion was ~25% of all

cells. We injected immune cells at this ratio. We injected 5x10⁶ cells per mouse for the CD8⁺-cell-treatment group. We injected 1.5x10⁷ cells per mouse for the CD8⁻ cell treatment group and 2.0x10⁷ cells per mouse for the all cells treatment group. We performed adoptive cell transfer of expanded cells using five mice per group. The tumor volume was monitored and calculated using the following formula: tumor volume (mm³) = a x b² x 0.5, where a is the longest diameter, b is the shortest diameter, and 0.5 is a constant to calculate the volume of an ellipsoid.

Statistical analysis. The correlation between the number of GPC3-specific CTLs and $\gamma\delta$ T cells at days 0 and 14 was analyzed using the Spearman's rank correlation coefficient. Comparisons of tumor volume at the last time point were performed using the Mann-Whitney U test. Differences were considered significant at P<0.05.

Results

Zoledronate induces expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific CTLs from PBMCs. To assess whether this new culture method can induce the expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific CTLs, PBMCs were stimulated once with zoledronate and an antigen-derived peptide. Fig. 1A shows the representative data using PBMCs from a healthy volunteer. The number of total cells increased 3.2x10²-fold after 14 days (from 2.0x10⁶ to 6.4x10⁸). In flow cytometry analysis, $\gamma\delta$ T cells increased 8.0x10³-fold after 14 days [from 5.6x10⁴ (2.8%) to 4.5x10⁸ (70%)]. Simultaneously with $\gamma\delta$ T cells, CMV

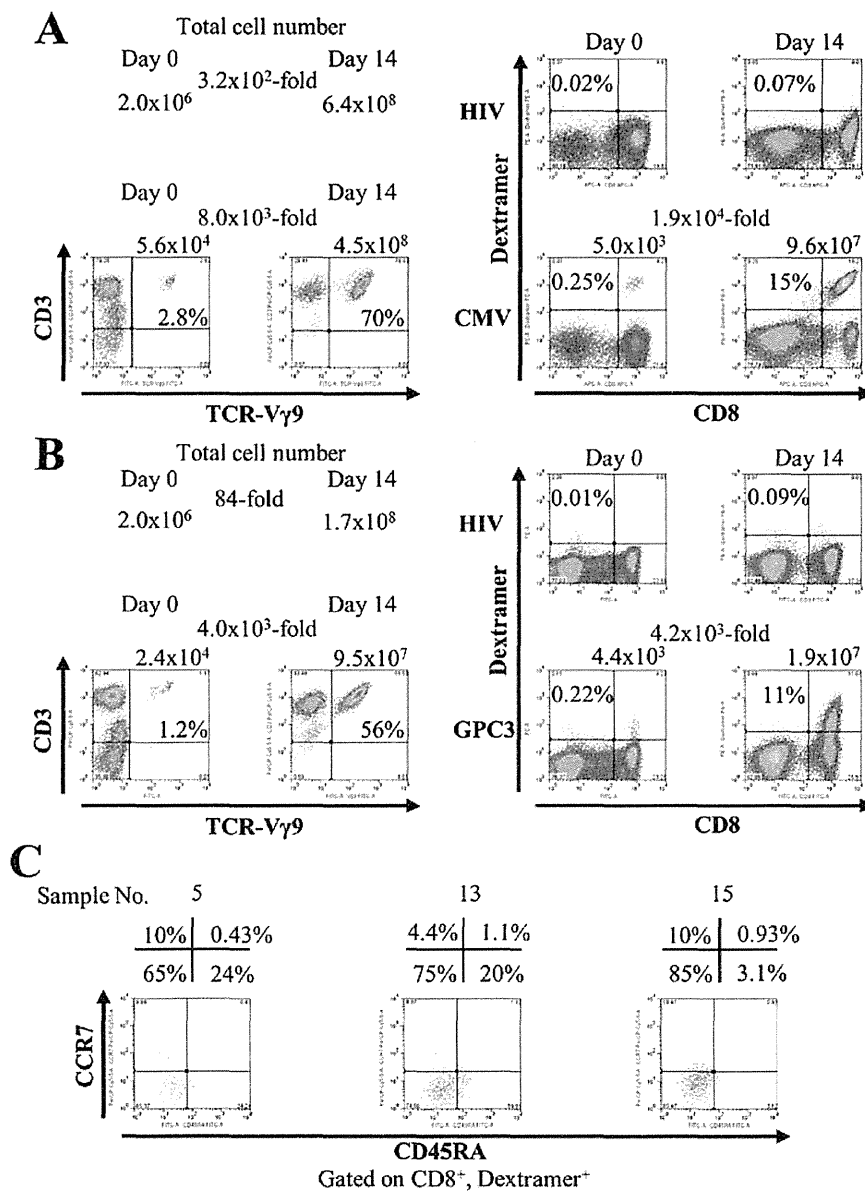


Figure 1. Zoledronate induces expansion of $\gamma\delta$ T cells and peptide-specific CTLs. We performed flow cytometry analysis before (day 0) and after (day 14) cell culture. Representative data are shown. (A) PBMCs from a healthy volunteer were stimulated with CMV-derived peptide and zoledronate. (B) PBMCs from a patient vaccinated with GPC3 peptide were stimulated with GPC3-derived peptide and zoledronate. The number indicates the number of cells. The presence of TCR-V γ 9⁺, CD3⁺ cells indicated $\gamma\delta$ T cells. The presence of CD8⁺, dextramer⁺ cells indicated antigen-specific CTLs. HIV-dextramer was used as a negative control. (C) Analysis of the phenotype of CD8⁺, GPC3-dextramer⁺ cells at day 14. The CD45RA⁺, CCR7⁻ phenotype indicated the effector memory phenotype.

peptide-specific CTLs increased 1.9×10^4 -fold after 14 days [from 5.0×10^3 (0.25%) to 9.6×10^7 (15%)]. Similar results were obtained from three healthy subjects (data not shown).

Next, we investigated the capacity of this culture method to induce expansion of CTLs specific for peptides derived from the weakly immunogenic tumor-associated self-antigen GPC3. PBMCs from vaccinated patients were stimulated once with zoledronate and a GPC3-derived peptide. In Fig. 1B, the number of total cells increased 84-fold after 14 days (from 2.0×10^6 to 1.7×10^8). $\gamma\delta$ T cells increased 4.0×10^3 -fold after 14 days [from 2.4×10^4 (1.2%) to 9.5×10^7 (56%)]. GPC3 peptide-specific CTLs increased 4.2×10^3 -fold after 14 days

[from 4.4×10^3 (0.22%) to 1.9×10^7 (11%)]. In addition, during expansion, GPC3 peptide-specific CTLs acquired mainly an effector memory phenotype (CD45RA⁺, CCR7⁻) (Fig. 1C). One of the features of this culture method is the rate of increase in the number of cells. Table I shows the rate of increase in the number of cells in 16 patients with HCC. We found that the total cell number increased (range, 1.1-270-fold), $\gamma\delta$ T cells increased (range, 23- 1.1×10^4 -fold), and GPC3 peptide-specific CTLs increased (range, 24- 1.7×10^5 -fold) after 14 days. These results suggest that peptide-specific CTLs were successfully expanded with the proliferation of $\gamma\delta$ T cells from PBMCs by this new culture method.