

Table 4 continued

Patient no. (HLA)	HLA matching peptides (Target HLA)	CTL response (spots/10 ⁵ × cells)			IgG Response (FIU)		
		Pre	3rd	6th	Pre	3rd	6th
10 (A11, A33)	Lck-90 (A33)	108	131	140	21	16	40
	SART3-302 (A2)	0	0	136	2,765	2,099	2,824
	SART3-734 (A33)	112	259	127	53	38	42
	WHSC2-103 (A2, A33)	79	168	109	35	30	37
	HNRPL-140 (A2)	0	0	184	16	17	24
	SART3-109 (A33)	89	101	90	10	0	10
	WHSC2-141 (A2)	0	0	96	0	0	0
	UBE2V-43 (A2)	0	0	0	30	25	46
	CypB-129 (A11, A33)	0	22	0	0	0	4,109
	Lck-449 (A11, A33)	17	0	46	0	0	0
	Lck-90 (A11, A33)	93	71	0	0	10	17
	SART3-734 (A11, A33)	53	43	53	64,000	52,180	6,140
	WHSC2-103 (A11, A33)	39	49	53	0	0	20
	SART3-109 (A11, A33)	40	40	0	0	0	23
Response rates (confidence intervals)		0.80 (0.2836–0.9949)			0.40 (0.0527–0.8534)		
<i>Arm C (60 mg/1.5 ml)</i>							
11 (A2, A26)	CypB-129 (A2)	0	0	0	0	0	1,707
	Lck-246 (A2)	0	134	281	0	0	0
	SART3-302 (A2)	0	50	0	6,110	5,797	95,650
	WHSC2-103 (A2)	45	0	0	0	0	45
	HNRPL-140 (A2)	49	0	0	0	0	16
	SART3-109 (A26)	0	0	0	0	0	0
	UBE2V-43 (A2)	0	0	41	14	10	10,287
	WHSC2-141 (A2)	60	0	0	0	0	0
12 (A24, A26)	EGFR-800 (A24)	0	0	0	0	0	102
	Lck-208 (A24)	0	0	0	11	10	79
	MRP3-1293 (A24)	0	0	0	0	0	10
	PSA-248 (A24)	0	0	0	331	7,724	8,167
	PTHrP-102 (A24)	0	0	0	38	34	37
	Lck-486 (A24)	0	0	0	11	12	6,358
	Lck-488 (A24)	0	29	0	17	15	76
	PSMA-624 (A24)	0	0	0	0	0	72
	PAP-213 (A24)	0	146	36	33	39	152,340
	SART3-109 (A24, A26)	0	0	0	0	0	195
	13 (A24, A11)	CypB-129 (A11)	0	25	0	0	0
EGFR-800 (A24)		0	0	0	0	0	0
Lck-208 (A24)		0	0	0	0	0	0
Lck-449 (A11)		16	34	0	0	0	0
Lck-90 (A11)		17	36	20	23	26	17
MRP3-1293 (A24)		0	0	0	0	0	0
PSA-248 (A24)		0	0	0	0	0	0
PTHrP-102 (A24)		0	0	0	0	0	0
SART3-734 (A11)		24	49	31	108	116	147
WHSC2-103 (A11)		0	29	30	85	159	172
Lck-486 (A24)		0	0	0	0	0	0
Lck-488 (A24)		0	0	0	14	15	0
PSMA-624 (A24)		0	0	0	0	0	0
PAP-213 (A24)		0	0	0	0	0	0

Table 4 continued

Patient no. (HLA)	HLA matching peptides (Target HLA)	CTL response (spots/10 ⁵ × cells)			IgG Response (FIU)		
		Pre	3rd	6th	Pre	3rd	6th
14 (A2, A33)	SART3-109 (A24, A11)	35	0	0	0	0	0
	CypB-129 (A2, A33)	0	0	0	0	0	42
	Lck-246 (A2)	0	285	181	0	10	0
	Lck-449 (A33)	0	29	39	17	18	19
	Lck-90 (A33)	44	28	24	45	63	102
	SART3-302 (A2)	0	0	0	20	20	21
	SART3-734 (A33)	77	28	24	13	13	10
	WHSC2-103 (A2, A33)	54	0	0	22	23	25
	HNRPL-140 (A2)	0	0	0	0	10	11
	SART3-109 (A33)	71	35	19	24	22	86
	WHSC2-141 (A2)	0	0	0	0	0	0
	UBE2V-43 (A2)	0	0	0	0	0	0
15 (A11)	CypB-129 (A11)	0	0	0	0	0	0
	Lck-449 (A11)	0	0	0	0	0	0
	Lck-90 (A11)	21	56	0	0	0	0
	SART3-734 (A11)	0	0	0	0	77	136
	WHSC2-103 (A11)	17	0	0	0	0	23
	SART3-109 (A11)	0	0	0	0	0	0
	Response rates (confidence intervals)	0.80 (0.2836–0.9949)			1.00 (0.4782–1.0000)		
	Total	0.60 (0.3229–0.8366)			0.73 (0.4490–0.9221)		

CTL cytotoxic T lymphocyte, FIU fluorescence intensity units, HLA human leukocyte antigen, IgG immunoglobulin G, Pre pretreatment
The values showing the increment are in bold

20 mg dose cohort. In addition, the frequency of MDSC in CTL-positive patients was lower than that in CTL-negative patients in the 20 mg dose cohort ($p = 0.019$, Wilcoxon signed rank test). The mean levels of plasma sCTLA-4 at pre-vaccination, and after the third and sixth vaccinations were 0.3, 0.2 and 0.3 ng/ml, respectively. These low levels of sCTLA-4 were similar when compared with those in healthy donors, as previously reported [22]. No difference in sCTLA-4 levels during vaccination was seen in any cohort.

Discussion

The toxicities related to the KRM-20 vaccine were limited to grade 1 or 2. The most common reported toxicity was grade 1 local injection site reactions, and a few cases experienced a grade 2 increase in liver enzymes or herpes zoster, in agreement with the results from our previously conducted personalized peptide vaccination [13, 18, 19].

The main objective of this phase I study was to determine the dose for subsequent efficacy trials through the study of immune dynamics, which was not well conducted in previous trials. Peptide vaccines with MART-1/Melan A or others were initially evaluated in a phase I setting, at doses ranging from 0.1 to 10 mg, and no toxicity was

encountered even at the highest doses [23, 24]. A correlation between peptide dose and the generation of specific T cell responses from the PBMC of vaccinated patients was also not reported. Thus, neither safety nor efficacy can be assessed in patients with a blunted immune response. Our past study also reported that the maximum tolerated dose was not reached in a phase I study of personalized peptide vaccination, using 0.3–5 mg/peptide, and then 3 mg/peptide times 4 peptides (12 mg/body) was recommended for further clinical trials because of its tolerability and immune responses [18, 19]. Therefore, in the current study, we set 0.3 mg/peptide times 20 peptides (6 mg/body), 1 (20 mg) and 3 mg/peptide (60 mg). The 20 peptides were mixed with incomplete Freund's adjuvant (Montanide ISA-51VG) and prepared for emulsion at three different dose levels. The Montanide ISA51VG was used as an adjuvant in the current study, since it is the most popular in clinical use to induce cellular immunity and has been employed in the majority of peptide vaccine trials globally [25]. Because PBMCs contain low frequencies of antigen-specific T cells even after vaccinations, the current CTL response (ELISPOT) assays have limited sensitivity to detect them directly ex vivo [26]. Therefore, in the current study, we stimulated and expanded antigen-specific T cells using in vitro cell culture with the specific antigens. Nevertheless, since in vitro-expanded cells do not necessarily give a better picture

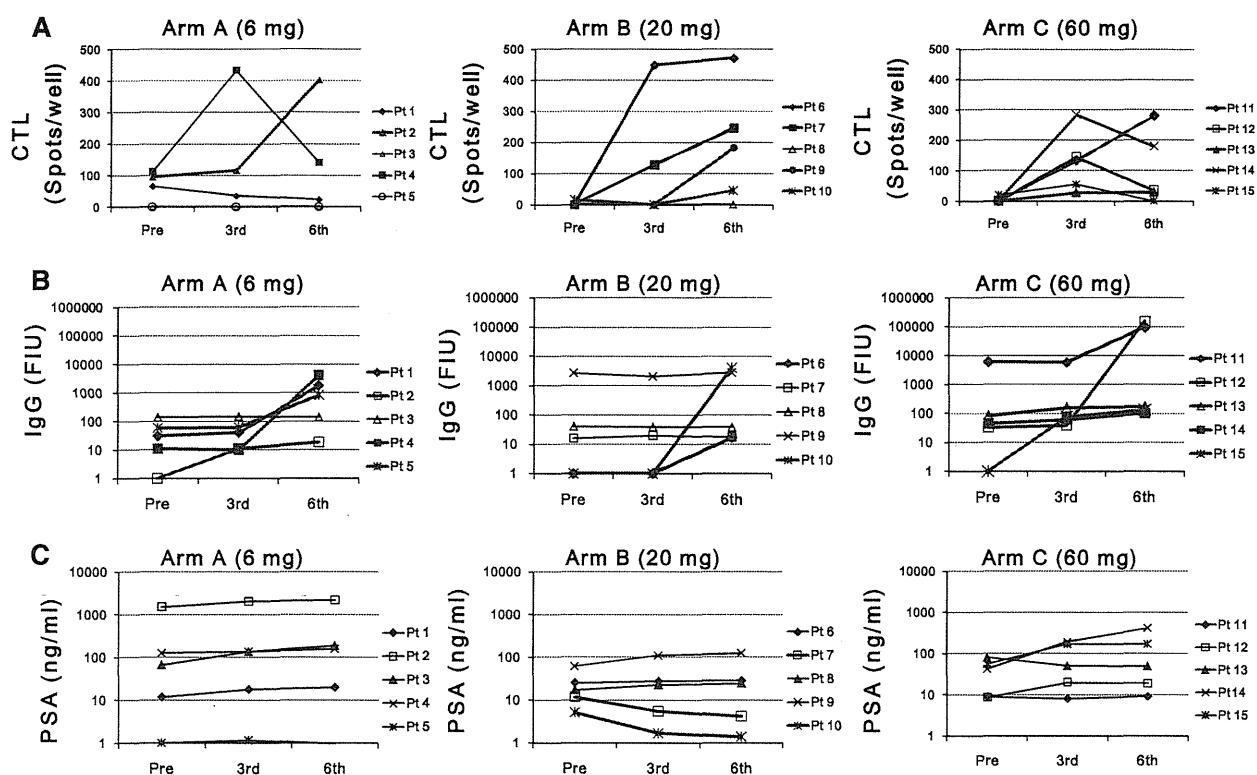


Fig. 1 Immune responses and PSA responses. HLA-matched best peptide-specific CTL (a) and IgG (b) responses, and PSA responses (c) in 15 patients divided by treatment dose (6, 20 or 60 mg) dur-

ing the vaccination. Positive responses are highlighted in blue. CTL, cytotoxic T lymphocyte; FIU, fluorescence intensity units; IgG, immunoglobulin G; Pre, pretreatment; PSA, prostate-specific antigen

of the T cell activity present in vivo, the development of novel assays for detecting and monitoring antigen-specific T cells directly ex vivo is anticipated. In contrast, the multiplex bead-based Luminex technology allows high-throughput screening of IgG responses specific to large numbers of short peptides with high accuracy [20]. Our previous studies suggested the clinical significance of peptide-specific IgG responses as a surrogate biomarker in monitoring vaccine-induced immune responses [30]. Therefore, we measured the peptide-specific IgG responses as well as peptide-specific CTL responses for detecting and monitoring immune responses after vaccination. As a result, in all HLA-matched peptides, the CTL response after the third vaccination was boosted for 3 of 61, 12 of 45 and 11 of 50 peptides tested in patients receiving 6, 20 and 60 mg of KRM-20, respectively. That after the sixth vaccination was 4 of 61, 10 of 45 and 6 of 50 peptides, respectively, indicating that CTL response after the sixth vaccination largely decreased in the 60 mg cohort. From a view of both preexisting and boosted CTL activity, CTL activity was boosted in patients with 20 mg cohort, but not the other groups. These results indicated that CTL activity was augmented as early as after the third vaccination in patients with 20

and 60 mg cohorts followed by continued activation in 20 mg cohort and decline in 60 mg cohort. In addition, the MIED of KRM-20 in CTL or IgG response calculated by logistic regression model was 16 mg (0.8 mg/peptide) or 1.6 mg (0.3 mg/peptide), respectively. PSA responses were better in the 20 mg group with two PR and one NC. All these results suggest that 20 mg of KRM-20 could be recommended for a phase II study primarily because of lower levels of vaccine-induced suppression to CTL activity and PSA responses. However, the design to select the MIED of KRM-20 in this study has several limitations, including small numbers of patients in each arm and four different HLA types. Therefore, it might be difficult to compare the immune response rates with a wide confidence interval in different dose groups with small numbers of patients who have different HLA alleles. These issues shall be addressed in further studies with large numbers of patients are needed.

It has been well documented that efficiently primed T cells often lose their responsiveness to tumor antigens. This may be explained by a variety of mechanisms, including down-regulation or loss of tumor antigens, immunosuppression by T_{reg} and MDSC cells, and T cell inhibition mediated by checkpoint molecules, such as CTLA-4 and PD-1 [16, 26,

27]. In our exploratory analysis to evaluate effect of KRM-20 vaccine on such inhibitory mechanisms, we measured the frequency of T_{reg} and MDSC in PBMCs and sCTLA-4 in plasma, but no obvious differences were observed in the frequency of T_{reg} and MDSC and the level of sCTLA-4 during the vaccination. However, frequency of MDSC in CTL-positive patients was lower than that in CTL-negative patients in 20 mg dose cohort, suggesting that MDSC could be responsible for inhibition of CTL activity augmented by vaccination. Vaccination with 20 mg of KRM-20 might be better than that with the others from this point of view, although further studies with large numbers of patients are needed.

In this study, we used 20 mixed peptides containing several HLA alleles for patients with different HLA types. After the vaccination of 20 mixed peptides, HLA-matched peptides would be recognized by CTLs, but peptides with different HLA alleles would theoretically be metabolized without a biological effect. There might be concern about the competition between peptides for binding to the same HLA restriction element in KRM-20. Although peptide competition was not directly evaluated here, we detected CTL response to two or more peptides (range 2–6 peptides), restricted to HLA-A2, A24, A3 supertype or A26 alleles. This is consistent with what has been reported for other multiple peptide vaccines suggesting that competition for binding to the same HLA molecule is not significant enough to limit immunogenicity [28, 29]. Thus, multiple peptides can be combined and administered as the same mixture to elicit CD8+ T cell responses.

Although we have not directly tested whether the 20 peptides used for vaccination were naturally processed or not, we employed a cDNA expression technique to identify genes encoding 7 of the 12 antigens shown above, indicating that at least some of the peptides could be presented to the T cell receptor of CTL used as indicator cells for cloning. In addition, we confirmed that the CTL specific to the 20 peptides employed could recognize cancer cells expressing both corresponding antigens and HLA, but not those lacking either of them, suggesting that these peptide epitopes are processed and presented naturally by cancer cells. We also tested the reactivity of peptides to CTL and IgG from pre-vaccination samples of cancer patients using more than 1,000 peptide candidates derived from the 12 antigens shown above. Thereafter, 31 peptide candidates were selected for clinical trials of personalized peptide vaccination [5, 13]. The 20 peptides were further chosen among the 31 peptides based upon the higher reactivity in order to obtain pre-vaccination samples of CRPC patients. Therefore, the 20 peptides might be naturally recognized by the immune system of pre-vaccination CRPC patients through natural presentation to peptide-reactive T cells.

In summary, this phase I study of KRM-20 consisting of 20 mixed peptides derived from twelve TAA for patients

with CRPC demonstrated the feasibility, safety, and rapid and high immune responses without changes of immunosuppressive cell subsets. Vaccination with 20 mg of KRM-20 could be recommended for further clinical trials based on tolerability and immune responses. With these encouraging results, a randomized, placebo-controlled, phase II study for CRPC is underway.

Acknowledgments This study was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (M. Noguchi), and Sendai Kousei Hospital (K. Itoh).

Conflict of interest K Itoh is a consultant/advisory board member in Green Peptide Co. A. Yamada is a part-time executive of Green Peptide Co. No potential conflict of interest is disclosed by other authors.

References

- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartztruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4:321–327
- Schwartztruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra KL, White RL, Gonzalez R, Kuzel TM, Curti B, Leming PD, Whitman ED, Balkissoon J, Reintgen DS, Kaufman H, Marincola FM, Merino MJ, Rosenberg SA, Choyke P, Vena D, Hwu P (2011) gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* 364:2119–2127
- Perez SA, Hofe E, Kallinteris NL, Gritzapis AD, Peoples GE, Papamichail M, Baxevanis C (2010) A new era in anticancer peptide vaccines. *Cancer* 116:2071–2080
- Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, Mellman I, Prindiville SA, Viner JL, Weiner LM, Matriasian LM (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15:5323–5337
- Sasada T, Komatsu N, Suekane S, Yamada A, Noguchi M, Itoh K (2010) Overcoming the hurdles of randomized clinical trials of therapeutic cancer vaccine. *Eur J Cancer* 46:1514–1519
- Correale P, Walmsley K, Zaremba S, Zhu M, Schlom J, Tsang KY (1998) Generation of human cytolytic T lymphocyte lines directed against prostate-specific antigen (PSA) employing a PSA oligopeptide. *J Immunol* 161:3186–3194
- Peshwa MV, Shi JD, Ruegg C, Laus R, van Schooten WC (1998) Induction of prostate tumor-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocytes in vitro using antigen-presenting cells pulsed with prostatic acid phosphatase peptide. *Prostate* 36:129–138
- Tjoa B, Boynton A, Kenny G, Ragde H, Misrock SL, Murphy G (1996) Presentation of prostate tumor antigens by dendritic cells stimulates T-cell proliferation and cytotoxicity. *Prostate* 28: 65–69
- Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Shepherd DL, Killion JJ, Fidler IJ (2003) Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res* 9:1200–1210
- Park SI, McCauley LK (2012) Nuclear localization of parathyroid hormone-related peptide confers resistance to anoikis in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 19:243–254

11. Minami T, Matsueda S, Takedatsu H, Tanaka M, Noguchi M, Uemura H, Itoh K, Harada M (2007) Identification of SART3-derived peptides having the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes from prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. *Cancer Immunol Immunother* 56:689–698
12. Gohara R, Imai N, Rikimaru T, Yamada A, Hida N, Ichiki M, Kawamoto M, Matsunaga K, Ashihara J, Yano S, Tamura M, Ohkouchi S, Yamana H, Oizumi K, Itoh K (2002) Phase I clinical study of cyclophilin B peptide vaccine for patients with lung cancer. *J Immunother* 25:439–444
13. Noguchi M, Sasada T, Itoh K (2013) Personalized peptide vaccination: a new approach for advanced cancer as therapeutic cancer vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 62:919–929
14. Wang J, Nemoto E, Dennert G (1996) Regulation of CTL by ectonucleoside adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein. *J Immunol* 156:2819–2827
15. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S (2011) Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 53:1206–1216
16. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366:2443–2454
17. Komatsu N, Matsueda S, Tashiro K, Itoji T, Shichijo S, Noguchi M, Yamada A, Suekane S, Doi A, Moriya F, Matsuoka K, Kuhara S, Itoh K, Sasada T (2012) Gene expression profiles in peripheral blood as a biomarker in cancer patients receiving peptide vaccination. *Cancer* 118:3208–3221
18. Noguchi M, Uemura H, Naito S, Akaza H, Yamada A, Itoh K (2011) A phase I study of personalized peptide vaccination using 14 kinds of vaccine in combination with low-dose estramustine in HLA-A24-positive patients with castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 71:470–479
19. Terasaki M, Shibui S, Narita Y, Fujimaki T, Aoki T, Kajiwaru K, Sawamura Y, Kurisu K, Mineta T, Yamada A, Itoh K (2011) Phase I trial of a personalized peptide vaccine for patients positive for human leukocyte antigen-A24 with recurrent or progressive glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 29:337–344
20. Komatsu N, Shichijo S, Nakagawa M, Itoh K (2004) New multiplexed flow cytometric assay to measure anti-peptide antibody: a novel tool for monitoring immune responses to peptides used for immunization. *Scand J Clin Lab Invest* 64:535–545
21. Scher HI, Halabi S, Tannoch I, Morris M, Stemberg CN, Carducci MA, Eisenberger MA, Higano C, Bubley GJ, Dreicer R, Petrylak D, Kantoff P, Basch E, Kelly WK, Figg WD, Small EJ, Beer TM, Wilding G, Martin A, Hussain M, Prostate Cancer Clinical Trials Working Group (2008) Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol* 26:1148–1159
22. Simone R, Tenca C, Fais F, Luciani M, De Rossi G, Pesce G, Bagnasco M, Saverino D (2012) A soluble form of CTLA-4 is present in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia and correlates with CD1d+ expression. *PLoS One* 7:e44654
23. Salgaller ML, Marincola F, Comier JN, Rosenberg SA (1996) Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res* 56:4749–4757
24. Cormier JN, Salgaller ML, Prevette T, Barracchini KC, Rivoltini L, Restifo NP, Rosenberg SA, Marincola FM (1997) Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am* 3:37–44
25. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V (2001) Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19:2666–2672
26. Anderson MJ, Shafer-Weaver K, Greenberg NM, Hurwitz AA (2007) Tolerization of tumor-specific T cells despite efficient initial priming in a primary murine model of prostate cancer. *J Immunol* 178:1268–1276
27. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565–1570
28. Slingluff CL Jr, Petroni GR, Chianese-Bullock KA, Smolkin ME, Hibbitts S, Murphy C, Johansen N, Grosh WW, Yamshchikov GV, Neese PY, Patterson JW, Fink R, Rehm PK (2007) Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multipptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting. *Clin Cancer Res* 13:6386–6395
29. Chianese-Bullock KA, Irvin WP Jr, Petroni GR, Murphy C, Smolkin M, Olson WC, Coleman E, Boerner SA, Nail CJ, Neese PY, Yuan A, Hogan KT, Slingluff CL Jr (2008) A multipptide vaccine is safe and elicits T-cell responses in participants with advanced stage ovarian cancer. *J Immunother* 31:420–430
30. Noguchi M, Mine T, Komatsu N, Suekane S, Moriya F, Matsuoka K, Yutani S, Shichijo S, Yamada A, Toh U, Kawano K, Azuma K, Uemura H, Okuno K, Matsumoto K, Yanagimoto H, Yamanaka R, Oka M, Todo S, Sasada T, Itoh K (2010) Assessment of immunological biomarkers in patients with advanced cancer treated by personalized peptide vaccination. *Cancer Biol Ther* 10:1266–1279

新しい治療展開

去勢抵抗性前立腺癌における免疫療法

久留米大学先端癌治療研究センター臨床研究部門 野口 正典

KEY WORDS

- 前立腺癌
- 免疫療法
- ペプチド
- がんワクチン

はじめに

近年、前立腺癌は、罹患率・死亡率ともに上昇している。現在、前立腺癌の標準治療法には、手術療法、放射線療法、ホルモン療法の3種類がある。これらの治療で治療抵抗性となった場合、最終的に去勢抵抗性前立腺癌(ホルモン不応性再燃前立腺癌)となり、多くの施設ではドセタキセルを用いた抗癌剤での治療が行われる。しかし抗癌剤は、根治療法ではなく延命効果を期待した治療法であり、副作用が強く、特に体力の衰えた高齢者は長期の治療継続が困難な症例も少なくない。このようななかで、第4の治療法として注目されるのが、がん免疫療法である。がん免疫療法は2010年頃より新地平がみえてきたといえる。2010年に去勢抵抗性前立腺癌に対して樹状がん関連抗原を発現させた樹状細胞療法(プロベンジ)、2011年には悪性黒色腫に対してT細胞活性化抑

制抗原に対する抗体(イピリムマブ)が米国食品医薬品局(food and drug administration ; FDA)の承認を得た。2012年にはがん局所でのT細胞活性化抑制抗原に対する抗PD-1および抗PD-L1抗体が肺癌などに有効であろうという結果が得られた。

本稿では、去勢抵抗性前立腺癌に対するがん免疫療法の開発経緯と今後の展望を、特にわれわれが開発に取り組んでいるテラーメイドがんペプチドワクチン療法について概説する。

I. 腫瘍細胞ワクチン

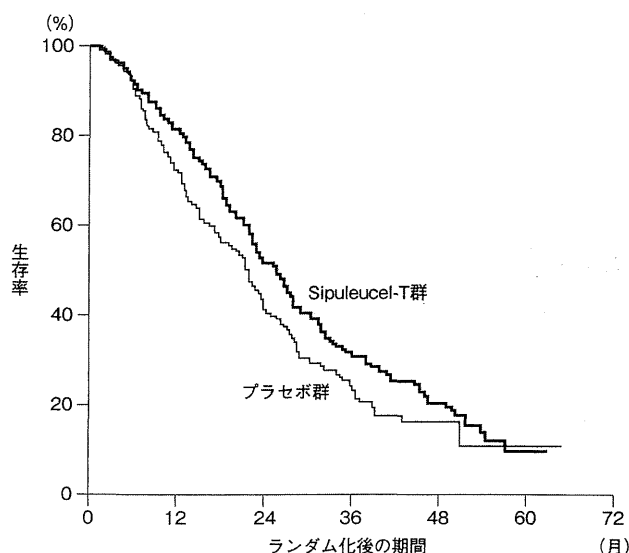
自己腫瘍細胞を用いたがんワクチン療法の臨床研究は、種々のがんにおいて以前より行われており、これらの初期臨床試験で効果を認めたもののうちいくつかは、第Ⅲ相臨床試験まで進んだものもある。去勢抵抗性前立腺癌に対して、培養がん細胞株であるLNCaPとPC-3を含む腫瘍細胞ワクチ

Immunotherapy for castration-resistant prostate cancer.
Masanori Noguchi (教授)

ンである GVAX の 2 つの無作為第Ⅲ相臨床試験が行われたが、いずれも中断を余儀なくされた。1 つは、有症状の転移性前立腺癌を対象に GVAX にドセタキセルを併用した群とドセタキセルにプレドニゾン併用した群との比較試験であるが、この臨床試験は対照群に比した GVAX 併用群の死亡率の高さより中止となっている¹⁾。残りの、無症状の転移性前立腺癌を対象とした GVAX 投与群とドセタキセルにプレドニゾン投与群との比較試験であるが、有効性が期待しがたいという理由で中止された¹⁾。このような腫瘍細胞ワクチンの失望される結果の原因の 1 つは、腫瘍細胞そのものの抗原の多さが不適切な免疫誘導をきたし、ある抗原に対しては免疫抑制に働いている可能性があるためと思われる。

Ⅱ. 樹状細胞を用いたペプチドワクチン療法

抗原提示細胞 (antigen presenting cell ; APC) である樹状細胞 (dendritic cell ; DC) を患者の体外で前立腺性酸性フォスファターゼ (prostatic acid phosphatase ; PAP), 前立腺特異抗原 (prostate specific antigen ; PSA) あるいは前立腺特異的膜抗原 (prostate specific membrane antigen ; PSMA) ペプチドなどで刺激して戻す DC-based ワクチン療法も行われている²³⁾。Dendreon 社 (Seattle, USA) の無症状な去勢抵抗性前立腺癌を対象とした DC-based ワクチン療法の第Ⅲ相臨床試験では、PAP と顆粒球単球コロニー刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor ; GM-CSF) で刺激した DC を輸注した群の生存率



リスク数	0	12	24	36	48	60	72
Sipuleucel-T群	341	274	129	49	14	1	
プラセボ群	171	123	55	19	4	1	

図 1. 去勢抵抗性前立腺癌に対する Sipuleucel-T (プロベンジ) とプラセボの生存期間の比較⁴⁾

Sipuleucel-T 投与群の生存期間中央値は 25.8 ヶ月、プラセボ群は 21.7 ヶ月と Sipuleucel-T 群が良好 (p=0.03) であった。

中央値 (median survival time ; MST) が 25.8 ヶ月であり、プラセボ投与群の MST は 21.7 ヶ月という良好な結果であった (図 1)⁴⁾。この結果により、2010 年 4 月には米国 FDA によって「がんワクチン」としてはじめて認可された。DC-based ワクチン療法は期待される去勢抵抗性前立腺癌治療の 1 つではあるものの、信頼できるバイオマーカーがないことや、ワクチンの標準化が困難、煩雑なプロトコール、時間やコストがかかりワクチン投与 (3 回) の治療費が 93,000 米国ドルときわめて高価なうえ、製造施設が未整備なため年間にわずか約 2,000 名しか治療できない課題も認められる。

Ⅲ. ウイルスを用いたワクチン療法

米国国立癌研究所 (National Cancer Institute ; NCI) と共同開発された PSA-TRICOM (Barvarian Nordic 社, 商品名 PROSTVAC) は、PSA を標的として共刺激分子 B7.1・ICAM-1・LFA-3 を搭載した 2 種類 (牛痘と鶏痘) のボックス (水疱瘡) ウイルスを用いて作られたワクチンである。Vaccinia-PSA-TRICOME (牛痘) と Fowlpox-PSA-TRICOME (鶏痘) を月 1 回ペースで順次皮下投与 (プライム・ブースト) することにより免疫反応を誘発して前立腺癌細胞を攻撃する。転移性前立腺癌 125 例を登録して実施された第Ⅱ相ランダム化比較試験で 3 年生存率が 44% 向上 (30% vs. 17%) し、全生存期間が

8.5ヵ月延長(25.1ヵ月 vs. 16.6ヵ月, $p=0.0061$) することが報告された(図2)⁵⁾。2010年4月には米国FDAより転移性去勢前立腺癌にファストトラック指定を受け, 2011年11月より米国を含めた世界20ヵ国以上の施設が参加して第Ⅲ相無作為比較試験が行われている。従来の治療薬に比べ, 少ない副作用で生存を延長することが期待されている。

IV. テーラーメイド ペプチドワクチン療法

がんワクチン療法の主体は, T細胞の1種の細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)を誘導することである。抗原提示細胞である樹状細胞に貪食された癌抗原は, 細胞内で8~10個のアミノ酸のペプチドにプロセッシングされ, HLA-クラスⅠ抗原上に提示される。それによって, CD8陽性リンパ球が刺激され, CTLを誘導し, 同じ抗原ペプチドを提示しているがん細胞を攻撃する¹⁾³⁾。CTLには, 現在ある自分のがん細胞に反応している活性化CTL(activated T cell)と, 以前反応していたCTL(memory T cell), そして, 反応可能であるがこれまでに反応したことがないCTL(naïve T cell)の3種類がある。このうちnaïve T cellを単一ペプチドで刺激しても免疫応答を得るのに時間がかかる。そこで, あらかじめmemory T cellに認識されたがん抗原をワクチン投与前に調べ, それらをペプチドワクチンとして投与するのがテーラーメイドペプチドワクチン療法である。これまでにHLA-A24陽性去勢抵抗性前立腺癌患者を対象に14種類の腫瘍抗原

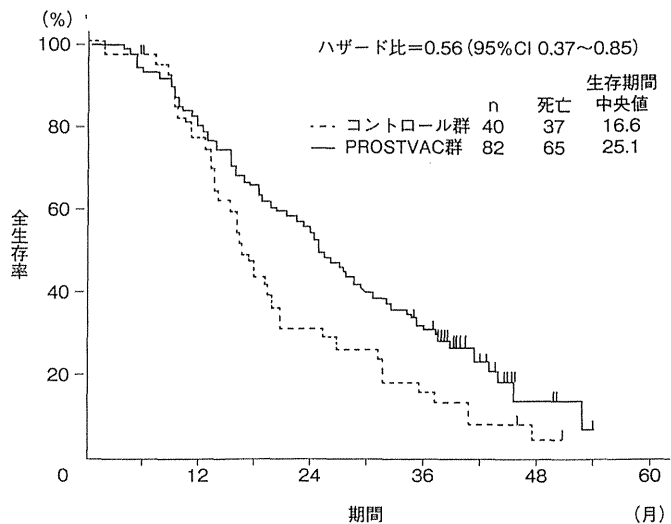


図2. 去勢抵抗性前立腺癌に対するPROSTVACとコントロールの生存期間の比較⁵⁾
PROSTVAC投与群の生存期間中央値は25.1ヵ月, コントロール群は16.6ヵ月とPROSTVAC群が良好($p=0.0061$)であった。

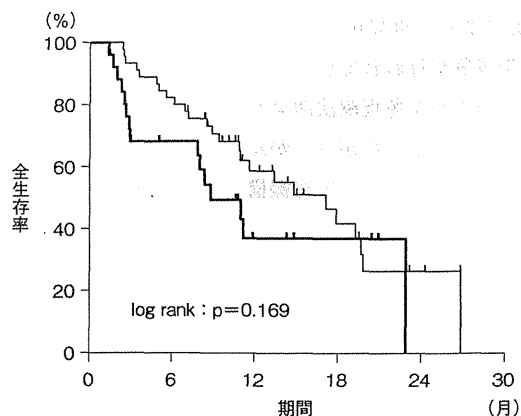


図3. ドセタキセル不応去勢抵抗性前立腺癌に対するテーラーメイドペプチドワクチンとヒストリカルコントロールの生存期間の比較
ワクチン群(—)の生存期間中央値は17.1ヵ月であり, コントロール群(---)の8.8ヵ月より良好な傾向($p=0.169$)であった。

リスク数					
ワクチン群(+)	45	37	17	10	5
コントロール群(-)	26	16	5	4	—

由来のペプチドを用いてテーラーメイドがんワクチン療法の第Ⅰ相治験ならびに継続投与試験を行い, 安全性に問題がないことと, 3mg/peptideの至適投与量を決定し, 継続投与試験では従来の治療より長期の生存期間が得ら

れた⁶⁾。去勢抵抗性前立腺癌を対象とした第Ⅱ相臨床試験におけるドセタキセル抵抗性患者の解析⁷⁾では, ドセタキセル投与後増悪したときの全生存期間中央値は, ワクチン投与群17.1ヵ月に対して共同研究施設での同様の

ヒストリカルコントロールの8.8ヵ月より生命予後の延長が示唆された(図3)。これらの結果より、科学振興機構のA-STEP制度を用いて2013年8月より、HLA-A24陽性ドセタキセル不応去勢抵抗性前立腺癌患者を対象に生存期間をエンドポイントとしたテラーメイドペプチドワクチン療法の第Ⅲ相無作為比較試験が企業により開始され、結果が期待されている。

おわりに

がん免疫療法は長い間、その実用化が疑問視されてきたが、去勢抵抗性前立腺癌に対するプロベンジや悪性黒色腫に対する抗CTLA-4抗体の米国FDAの承認により、世界中でがん免疫療法の開発競争が行われており、近い将来に日本発のがん免疫療法開発も可能と思われる。しかしながら、がん細胞はさまざまな方法で免疫監視機構

から逃れ、がん細胞を完全に排除できないという課題もある。免疫逃避機構としては、がん抗原の脱落、HLAの消失、接着分子の消失、免疫抑制因子の産生、また、免疫疲弊としてのT-Cell Check pointの解明もされるようになってきており、さらに有効ながん免疫療法の開発のためには、これらの機序のさらなる解明と克服が必要と思われる。

文 献

- 1) <http://www.drugs.com/news/cell-genesys-halts-vital-2-gvax-trial-advanced-prostate-cancer-13371.html>
- 2) Fong L, Brockstedt D, Benike C, et al : Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol* 167 : 7150-7156, 2001
- 3) Barrou B, Benoit G, Ouldakaci M, et al : Vaccination of prostatectomized prostate cancer patients in biochemical relapse, with autologous dendritic cells pulsed with recombinant human PSA. *Cancer Immunol Immunother* 53 : 453-460, 2004
- 4) Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al : IMPACT Study Investigators : Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363 : 411-422, 2010
- 5) Kantoff PW, Schuetz TJ, Blumenstein BA, et al : Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 28 : 1099-1105, 2010
- 6) Noguchi M, Uemura H, Naito S, et al : A phase I study of personalized peptide vaccination using 14 kinds of vaccine in combination with low-dose estramustine in HLA-A24-positive patients with castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 71 : 470-479, 2011
- 7) Noguchi M, Moriya F, Suekane S, et al : Phase II study of personalized peptide vaccination for castration-resistant prostate cancer patients who failed in docetaxel-based chemotherapy. *Prostate* 72 : 834-845, 2012

3. 去勢抵抗性前立腺がんにおけるペプチドワクチン療法

野口 正典

久留米大学先端癌治療研究センター臨床研究部門*

はじめに

近年、前立腺癌は、罹患率・死亡率ともに上昇している。現在、前立腺癌の標準治療法には、手術療法、放射線療法、ホルモン療法の3種類がある。これらの治療で治療抵抗性となった場合、最終的に去勢抵抗性前立腺癌となり、多くの施設ではドセタキセルを用いた抗がん剤での治療が行われる。しかし抗がん剤は、根治療法ではなく延命効果を期待した治療法であり、副作用が強く、特に体力の衰えた高齢者は長期の治療継続が困難な症例も少なくない。このような中で、第4の治療法として注目されるのが、がん免疫療法である。がん免疫療法は2010年頃より新地平が見えてきたと言える。2010年に去勢抵抗性前立腺癌に対して樹状がん関連抗原を発現させた樹状細胞療法(プロベンジ)、2011年には悪性黒色腫に対してT細胞活性化抑制抗原に対する抗体(イピリミマブ)が米国FDA承認を得た。2012年にはがん局所でのT細胞活性化抑制抗原に対する抗PD-1および抗PD-L1抗体が肺がん等に有効であろうという結果がえられた。

本稿では、去勢抵抗性前立腺癌に対するがん免疫療法の開発経緯と今後の展望を、特にわれわれが開発に取り組んでいるテラーメイドがんペプチドワクチン療法について概説する。

Peptide vaccination for patients with castration-resistant prostate cancer
Masanori Noguchi
Research Center for Innovative Cancer Therapy, Clinical Research Division, Kurume University

key words : 前立腺がん, 去勢抵抗性前立腺がん, ペプチドワクチン療法

* 久留米市旭町 67 (0942-31-7989) 〒 830-0011

I テラーメイドペプチドワクチン療法

がんワクチン療法の主体は、T細胞の1種のCTL (cytotoxic T lymphocyte) を誘導することである。抗原提示細胞である樹状細胞に貪食された癌抗原は、細胞内で8~10個のアミノ酸のペプチドにプロセッシングされ、HLA-クラスI抗原上に提示される。それによって、CD8陽性リンパ球が刺激され、CTLを誘導し、同じ抗原ペプチドを提示している癌細胞を攻撃する¹⁾。CTLには、現在ある自分のがん細胞に反応している活性化CTL (activated T cell) と、以前反応していたCTL (memory T cell), そして、反応可能であるがこれまでに反応したことがないCTL (naïve T cell) の3種類がある。このうちnaïve T cellを単一ペプチドで刺激しても免疫応答を得るのに時間がかかる。そこで、あらかじめmemory T cellに認識されたがん抗原をワクチン投与前に調べ、それらをペプチドワクチンとして投与するのがテラーメイドペプチドワクチン療法である。われわれは前立腺がん根治手術前の症例を対象に、個々人に適切なペプチドを活用したペプチドワクチン投与の第II相臨床試験を実施した。その結果、術前のペプチドワクチン投与群では非投与群に比べて、がん局所に2次免疫を担当する活性化Tリンパ球の優位な浸潤を認めた。これによりペプチドワクチンは、がん局所の2次免疫を賦活化することが示唆されたといえる²⁾。われわれが行っているテラーメイドペプチドワクチン療法のコンセプトを図1に示す。

II ペプチドワクチン投与の実際

現在、われわれが準備しているペプチドは、これまでの研究結果より有効性が高いと考えられる

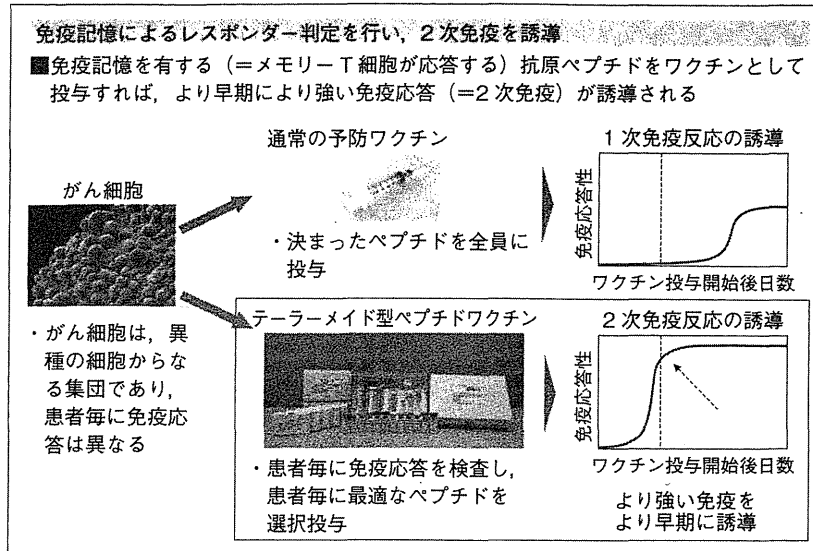


図1 テラーメイド型がんワクチンの開発コンセプト

表1 がんワクチン候補ペプチド一覧

HLA-A2 陽性患者用 (12 種類)
CypB-129, Lck-246, Lck-422, ppMAPkkk-432, WHSC2-103, HNRPL-501, UBE2V-43, UBE2V-85, WHSC2-141, HNRPL-140, SART3-302, SART3-309
HLA-A24 陽性患者用 (14 種類)
SART2-93, SART3-109, Lck-208, PAP-213, PSA-248, EGF-R-800, MRP3-503, MRP3-1293, SART2-161L, Lck-486, Lck-488, PSMA-624, EZH2-735, PTHrP-102
HLA-A3 supertype 陽性患者用 (9 種類)
SART3-109, SART3-511, SART3-734, Lck-90, Lck-449, PAP-248, Lck-422, CypB-129, WHSC2-103
HLA-A26 陽性患者用 (4 種類)
SART3-109, ppMAPkkk-432, HNRPL-501, WHSC2-103

31 種類 (HLA-A24 陽性患者に対して 14 種類, HLA-A2 陽性患者に対して 12 種類, HLA-A26 陽性患者に対して 4 種類, HLA-A3, -A11, -A31, -A33 陽性患者に対して 9 種類) である (表 1)。まず、ワクチン投与前に患者の末梢血を採血し、抗ペプチド抗体価 (IgG) を測定し、抗体価の高い上位 4 種を候補ペプチドから選択して投与している。

1 クールのペプチドワクチン投与回数は、臨床試験によって異なるが、概ね 6 回から 8 回である。1 クール終了する度に、末梢血中の抗ペプチド抗体価を測定し、免疫賦活の程度を確認する。そして次クールに投与するペプチドは、前クールで反応のあったペプチドを再選択する。これまでの経験から、患者の免疫能をあげるためには、最低 2 クール (約 4 ヶ月間) が必要と考えている。ペプ

チドワクチン自体は、おのおのを油性アジュバンドにけん濁して投与する。こうすることにより、ペプチドが長期間皮下に留まる。有害事象として最も多くみられるのは、注射部位の発赤や腫脹であるが、そのほとんどが、Grade 2 までであり、ワクチン投与に関する重篤な有害事象は認めず、ワクチン投与は全例外来通院にて施行している。

III 臨床試験

久留米大学では、現在までに前立腺がん、膀胱がん、肺がん、肝がん、膵臓がん、乳がん、婦人科がん、脳腫瘍など、様々ながん種と様々な病期のがん患者 1,000 例以上に対して臨床試験としてペプチドワクチンを投与している³⁾。その中でも前立腺がんが最も臨床試験が進んでいる。これま

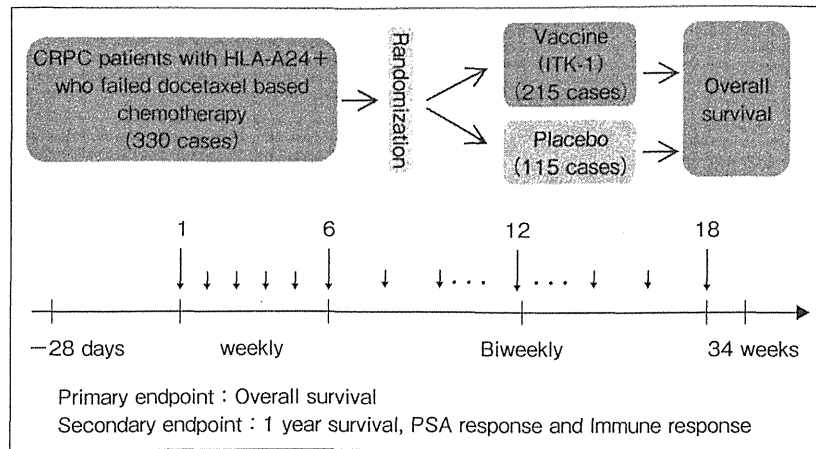


図2 Phase III placebo controlled randomized study for advanced prostate cancer

でに前立腺がんに対してテーラーメイドペプチドワクチン療法の第I相、第I/II相、第II相比較試験、第I相治験ならびに継続投与試験を含めて300例以上に臨床試験を行っており、その安全性、高い免疫賦活ならびに生命予後の延長を報告している^{4~10)}。これらの結果により、2010年6月には一部の前立腺がんに対しては、厚労省の高度医療（現在の先進医療B）に採択され、第II相臨床試験を行っている。これは、厚労省において安全性と有効性が期待できると判断された結果である。また、これまでの臨床研究でドセタキセル不応の去勢抵抗性前立腺がんに対しペプチドワクチン療法が予後の改善に寄与できる可能性が示され¹¹⁾、2013年8月より、科学振興機構の研究成果最適展開支援プログラム A-STEP を用いて、HLA-A24陽性ドセタキセル不応去勢抵抗性前立腺がん患者を対象に生存期間をエンドポイントとしたテーラーメイドペプチドワクチン療法の第III相無作為比較試験（図2）が企業により開始され結果が期待されている。

おわりに

がん免疫療法は長い間、その実用化が疑問視されてきたが、去勢抵抗性前立腺癌に対するプロベンジや悪性黒色腫に対する抗CTLA-4抗体の米国FDAの承認により、世界中でがん免疫療法の開発競争が行われており、近い将来に日本発のがん免疫療法開発も可能と思われる。しかしながら、がん細胞は様々な方法で免疫監視機構から逃れがん細胞を完全に排除できないという課題もある。免疫逃避機構としては、がん抗原の脱落、HLA

の消失、接着分子の消失、免疫抑制因子の産生、また、免疫疲弊としてのT-Cell Check pointの解明もされるようになってきており、さらに有効ながん免疫療法の開発のためには、これらの機序のさらなる解明と克服が必要と思われる。

文 献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez, Lurquin C, et al: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647, 1991
- 2) Noguchi M, Yao A, Harada M, et al: Immunological evaluation of neoadjuvant peptide vaccination before radical prostatectomy for patients with localized prostate cancer. *Prostate* 67: 933-942, 2007
- 3) Noguchi M, Sasada T and Itoh K: Personalized peptide vaccination: a new approach for advanced cancer as therapeutic cancer vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 62: 919-929, 2013
- 4) Kobayashi K, Noguchi M, Itoh K, et al: Identification of a prostate-specific membrane antigen-derived peptide capable of eliciting both cellular and humoral immune responses in HLA-A24⁺ prostate cancer patients. *Cancer Sci* 94: 622-627, 2003
- 5) Noguchi M, Itoh K, Suekane S, et al: Immunological monitoring during combination of patient-oriented peptide vaccination and estramustine phosphate in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 60: 32-45, 2004
- 6) Noguchi M, Itoh K, Suekane S, et al: Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2 positive patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Cancer Sci* 95: 77-84, 2004
- 7) Noguchi M, Itoh K, Yao A, et al: Immunological evaluation of individualized peptide vaccination with low dose of estramustine for HLA-A24⁺ HRPC patients. *Prostate* 63: 1-12, 2005

- 8) Noguchi M, Mine T, Yamada A, et al : Combination therapy of personalized peptide vaccination and low-dose estramustine phosphate for metastatic hormone refractory prostate cancer patients : An analysis of prognostic factors in the treatment. *Oncol Res* **16**: 341-349, 2007
- 9) Noguchi M, Kakuma T, Uemura H, et al : A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine plus low dose estramustine phosphate (EMP) versus standard dose EMP in patients with castration resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* **59**: 1001-1009, 2010
- 10) Noguchi M, Uemura H, Naito S, et al : A phase I study of personalized peptide vaccination using 14 kinds of vaccine in combination with low-dose estramustine in HLA-A24-positive patients with castration-resistant prostate cancer. *Prostate* **71**: 470-479, 2011
- 11) Noguchi M, Moriya F, Suekane S, et al : Phase II study of personalized peptide vaccination for castration-resistant prostate cancer patients who failed in docetaxel-based chemotherapy. *Prostate* **71**: 470-479, 2011

