

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: 液性免疫・細胞性免疫モニタリング

研究分担者 中山 睿一 川崎医療福祉大学 教授

研究要旨

制御性T細胞のうち、特に活性化制御性T細胞が膜表面にCCR4を発現することから、抗CCR4抗体投与により活性化制御性T細胞分画を除去し臨床効果をもたらすことを期待して「固形がん患者に対する第Ia/Ib相医師主導治験」を開始した。本治験では、附随探索研究として、XAGE-1bおよびNY-ESO-1抗原特異的抗体反応およびCD4、CD8T細胞反応の解析を実施する。抗体反応はELISA法により、また、CD4、CD8T細胞反応は、IFN捕捉法および細胞内染色法によりモニタリング解析した。また、T細胞表面抑制性および活性化分子について解析した。

A. 研究目的

がん死亡は本邦の死因の第一位となり、新規のがん治療法の開発が急務である。免疫療法は、次世代のがん治療法として注目されている。また、近年、がん患者では、制御性T細胞が抗腫瘍免疫反応を抑制していることが明らかになった。制御性T細胞のうち、特に活性化制御性T細胞は膜表面にCCR4を発現することから、抗CCR4抗体投与により活性化制御性T細胞分画を除去して抗腫瘍免疫応答の増強をもたらす、これによる臨床効果を期待して固形がん患者に対する第Ia/Ib相医師主導治験を開始した。

本治験では、附随探索研究として、制御性T細胞除去効果、XAGE-1bおよびNY-ESO-1抗原特異的抗体反応、および抗原特異的CD4、CD8T細胞反応を解析する。また、骨髄由来抑制細胞(MDSC)分画の解析およびT細胞表面抑制性および活性化分子の解析を行った。制御性T細胞除去効果はSRL社でフローサイトメトリー法により解析し、抗体反応はELISA法、また、CD4、CD8T細胞反応は、IFN捕捉法および細胞内染色法を一次モニタリングに用いて解析した。

B. 研究方法

抗CCR4抗体投与による有効性の指標として、XAGE-1bおよびNY-ESO-1抗原に対する抗体反応を検討した。血液サンプルは、ベースライン、5週、9週、12週以降は可能な限り4週毎、維持投与時は9回目投与日より4週毎に採取した。血清中の抗体価は、ELISA法により、合成XAGE-1bタンパク及び組換えNY-ESO-1タンパクに対する反応を測定した。

今年度は、治験Ib相症例29例についてXAGE-1bおよびNY-ESO-1抗体価を測定した。また、Ia相10例のうち、XAGE-1bもしくはNY-ESO-1抗原陽性であった5例について、抗原特異的CD4およびCD8T細胞反応の解析を実施した。

Treg解析はベースライン、5週、9週に、また、MDSC、T細胞表面活性化および抑制性分子の解析については、ベースライン、7週、9週、12週以降は可能な限り4週毎にサンプルを採取し、フローサイトメトリー法を用いて実施した。Tregは抗CD4、CD8、CD25、CD45RA、Foxp3抗体で染色し、MDSCは抗CD3、CD11b、CD14、CD15、CD33、CD45抗体、HLA-DR

抗体で細胞表面を染色した。T細胞表面抑制性分子はPD-1、BTLA、TIM-3、LAG-3、活性化分子はICOS、OX-40、GITR、4-1BBについて、それらの発現を各々の抗体を用いてフローサイトメトリー法で経時的に解析した。

本医師主導治験は、川崎医大倫理委員会の承認を受け、本研究内容は付随研究として実施している。患者および家族の人権および利益の保護に十分配慮している。がん患者の組織および血液は担当医によるインフォームド・コンセントを得て提供を受け、匿名化して研究室に保存している。

### C. 研究結果

#### 1. XAGE-1b および NY-ESO-1 抗体反応解析

第1b相部症例29例（肺癌10例、食道癌6例、胃癌4例、悪性黒色腫6例、卵巣癌3例）についてXAGE-1bおよびNY-ESO-1抗体反応をELISA法で検討した（表1）。

1b相部においてXAGE-1b抗原は29例中8例（肺癌5例、食道癌1例、胃癌1例、卵巣癌1例）で陽性、NY-ESO-1抗原は29例中7例（肺癌1例、食道癌2例、胃癌2例、悪性黒色腫1例、卵巣癌1例）で陽性であった。そのうち3例（食道癌1例、胃癌1例、卵巣癌1例）はXAGE-1bおよびNY-ESO-1共に陽性であった。

XAGE-1b抗体反応は、3例（肺癌3例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与9週時点で1例（肺癌）において抗体価の有意な上昇を認め、2例（肺癌）において有意な低下を認めた。NY-ESO-1抗体反応は、4例（肺癌1例、胃癌2例、卵巣癌1例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与9週時点で4例（肺癌1例、食道癌1例、胃癌2例）において抗体価の有意な上昇を認めた。治験薬投与9週時点で有意な抗体価の上昇を認めた4例のうち1例（食道癌）は、治験薬投与前の抗体価は陰性であった。

表1 1b相 検査結果まとめ

症例	がん腫	XAGE-1b			NY-ESO-1			
		抗原発現	投与前(抗体価)	増減	抗原発現	投与前(抗体価)	増減	
B-01	NCC-03	食道癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-02	OUH-04	卵巣癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-03	KMSH-07	肺癌	+	陽性 (x10561)	あり (x <sup>9231</sup> / <sub>x7503</sub> )	-	陰性	なし
B-04	KEI-01	悪性黒色腫	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-05	KEI-03	悪性黒色腫	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-06	KEI-02	悪性黒色腫	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-07	NCUH-08	悪性黒色腫	-	陰性	なし	+	陰性	なし
B-08	NCC-04	食道癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-09	OUH-05	食道癌	+	陰性	なし	+	陰性 (x533)	あり (x <sup>642</sup> / <sub>x742</sub> )
B-10	OUH-06	食道癌	-	陰性	なし	+	陰性	なし
B-12	KEI-04	悪性黒色腫	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-13	OUH-07	卵巣癌	+	陰性	なし	+	陽性 (x3164)	あり (x <sup>2376</sup> / <sub>x1878</sub> )
B-15	TK-03	肺癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-17	NCC-07	胃癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-18	KMSH-08	肺癌	+	陰性	なし	-	陰性	なし
B-19	KMSH-11	肺癌	-	陰性	なし	+	陰性	なし
B-20	NCUH-10	肺癌	-	陰性	なし	-	陽性 (x4120)	あり (x <sup>9662</sup> / <sub>x16371</sub> )
B-21	NCUH-11	悪性黒色腫	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-22	NCUH-12	卵巣癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-23	KMSH-12	肺癌	+	陰性	なし	-	陰性	なし
B-24	OUH-10	胃癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-25	KMSH-13	肺癌	+	陰性	なし	-	陰性	なし
B-26	OUH-11	胃癌	-	陰性	なし	+	陽性 (x1970)	あり (x2174)
B-27	NCC-09	食道癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-28	TK-04	肺癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-29	NCC-10	胃癌	+	陰性	なし	+	陽性 (x3855)	あり (x <sup>4526</sup> / <sub>x4873</sub> )
B-30	NCUH-13	食道癌	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-31	TK-05	肺癌	-	陽性 (x568)	あり (x <sup>532</sup> / <sub>x453</sub> )	-	陰性	なし
B-32	KMSH-14	肺癌	+	陽性 (x844)	あり (x <sup>1035</sup> / <sub>x1471</sub> )	-	陰性	なし

治験薬投与前に陽性であった4例のうち1例（卵巣癌）で有意な低下を認めた。また、治験薬投与前にNY-ESO-1抗体陽性患者の4例（肺癌1例、食道癌1例、胃癌2例）および治験薬投与後に陽性となった1例（食道癌）のうち1例（肺癌）は、NY-ESO-1抗原陰性であった。

## 2. 抗原特異的CD4、CD8 T細胞反応解析

Ia相部10例のうち、XAGE-1bもしくはNY-ESO-1抗原陽性であった肺癌症例5例（XAGE-1b抗原のみ陽性2例、NY-ESO-1抗原のみ陽性2例、XAGE-1bとNY-ESO-1陽性1例）について、抗原特異的CD4、CD8 T細胞反応を経時的に免疫モニタリングによって解析した。

XAGE-1b抗原陽性3例のうち、2例でベースライン、7週、12週の抗原特異的T細胞免疫応答を検討した結果、抗原特異的なT細胞免疫応答（TNF- $\alpha$ ）はCD4について2例全例で上昇し、CD8は1症例のみ上昇を認めた。この2症例のうち、XAGE-1b抗体について、1例は有意な上昇あり、1例は高値で横ばいであった。

NY-ESO-1抗原陽性3例で同様の検討を行い、抗原特異的なT細胞免疫応答（IFN $\gamma$ ）はCD4について3例全例で上昇、CD8は1症例のみ上昇を認めた。

## 3. TregおよびMDSC解析

Ia相部10例のうち、早期に治験中止となった1例を除く9症例について、ベースライン、5週、9週、以降4週毎における制御性T細胞

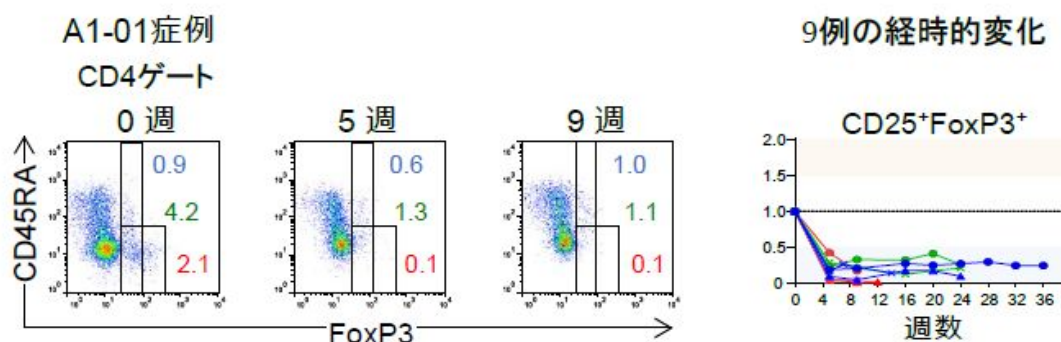
分画（CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>分画、CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>lo</sup> resting Treg分画、CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>hi</sup> activated Treg分画、CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>lo</sup> non Treg分画）をフローサイトメトリー法で解析した。その結果、9例すべてにおいて、ベースラインに比較して投与5週、9週においてCD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>、activated Treg、non Treg分画の減少を認めた（図1）。

MDSC分画の解析はIa相10例のうち、付随研究の検体を採取できた7例において実施した（図1）。MDSC分画は7週において7例中6例で増加し、7週で増加を認めなかった1例についても投与24週で増加を認めた。さらに、MDSC分画が7週時点でベースラインと比較し3倍以上に増加した3例は12週で全例PD、3倍未満であった4例は12週で全例SDであった。

## 4. T細胞表面抑制性および活性化分子解析

Ia相10例のうち、付随研究の検体を採取できた7例においてベースライン、7週、12週、以降12週毎におけるT細胞表面抑制性および活性化分子の発現を検討した。CD4表面の抑制性および活性化分子のうち、PD-1、TIM-3、LAG-3、ICOS、GITR分子発現は上昇傾向であり、特にICOSの上昇は顕著であった。BTLA、OX-40、4-1BB発現は低下傾向であった。CD8表面の抑制性および活性化分子のうち、PD-1、ICOS分子発現は上昇傾向であり、特にICOSの上昇は顕著であった。LAG-3、GITRは横ばいであった。TIM-3、BTLA、OX-40、4-1BBはほとんどの症例において低下傾向であった。

図1 治験Ia相 Treg除去効果



#### D. 考察

Ib 相部において XAGE-1b 抗原は 29 例中 8 例（肺癌 5 例、食道癌 1 例、胃癌 1 例、卵巣癌 1 例）で陽性、NY-ESO-1 抗原は 29 例中 7 例（肺癌 1 例、食道癌 2 例、胃癌 2 例、悪性黒色腫 1 例、卵巣癌 1 例）で陽性であった。そのうち 3 例（食道癌 1 例、胃癌 1 例、卵巣癌 1 例）は XAGE-1b および NY-ESO-1 共に陽性であった。

XAGE-1b 抗体反応は、3 例（肺癌 3 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で 1 例（肺癌）において抗体価の有意な上昇を認め、2 例（肺癌）において有意な低下を認めた。NY-ESO-1 抗体反応は、4 例（肺癌 1 例、胃癌 2 例、卵巣癌 1 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で 4 例（肺癌 1 例、食道癌 1 例、胃癌 2 例）において抗体価の有意な上昇を認めた。治験薬投与 9 週時点で有意な抗体価の上昇を認めた 4 例のうち 1 例（食道癌）は、治験薬投与前の抗体価は陰性であった。治験薬投与前に陽性であった 4 例のうちの 1 例（卵巣癌）で有意な低下を認めた。また、治験薬投与前に NY-ESO-1 抗体陽性患者の 4 例（肺癌 1 例、食道癌 1 例、胃癌 2 例）および治験薬投与後に陽性となった 1 例（食道癌）のうち 1 例（肺癌）は、NY-ESO-1 抗原陰性であった。

Ia 相部において XAGE-1b 抗原陽性 3 例のうち、2 例で経時的に抗原特異的 T 細胞免疫応答を検討した結果、CD4 について 2 例全例で上昇し、CD8 は 1 症例のみ上昇を認めた。NY-ESO-1 抗原陽性 3 例で経時的に抗原特異的 T 細胞免疫応答を検討した結果、CD4 について 3 例全例で上昇、CD8 は 1 症例のみ上昇を認めた。

Treg 分画の解析では、9 例中 9 例すべてにおいて、CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>、activated Treg、non Treg 分画の減少を認めた。一方、MDSC 分画は治験薬投与 7 週において 7 例中 6 例で増加を認めた。さらに 7 週時点でベースラインと比較し 3 倍以上に増加した 3 例は 12 週で全例 PD、3 倍未満であった 4 例は 12 週で全例 SD であり、MDSC 分画の変動が治療効果のバイオマーカーとなる可能性がある。

T 細胞表面抑制性および活性化分子の解析では、CD4、CD8 表面上の ICOS 分子の発現が

顕著に上昇した。

#### E. 結論

Mogamulizumab 投与による末梢血中の Treg 除去効果が全例で確認された。また CD4、CD8 表面の活性化分子である ICOS の顕著な上昇が確認され、Treg 除去により T 細胞が活性化したものと考えられる。さらに、一部の症例においては、抗原特異的な液性および細胞性免疫が誘導されていることが確認できた。しかしながら免疫抑制細胞である MDSC の上昇を認め、Mogamulizumab 投与によって Treg が除去されても、免疫活性化が抑制されている可能性がある。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 英文

- (1) Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E and Udono H. Immune-mediated anti-tumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(6): 1809-1814, 2015.
- (2) Kurose K, Ohue Y, Sato E, Yamauchi A, Eikawa S, Isobe M, Nishio Y, Uenaka A, Oka M and Nakayama E. Increase in activated Treg in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Treg by ADCC using an anti-human CCR4 mAb (KM2760). *Journal of Thoracic Oncology*, 10(1): 74-83, 2014.
- (3) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto H, Nishio Y, Isobe M, Fukuda M, Uenaka A, Oka M and Nakayama E. Prolongation of overall survival in advanced lung adenocarcinoma patients with the XAGE1 (GAGED2a) antibody. *Clin. Cancer Res.*, Oct 1, 20(19): 5052-63, 2014.
- (4) Ohue Y, Wada H, Oka M and Nakayama E. Antibody response to cancer/testis (CT) antigens: A prognostic marker in

cancer patients. *OncoImmunology*, 3:11, e970032; December 1, 2014.

- (5) Pandey, J, Namboodiri, A, Ohue, Y, Oka, M, Nakayama, E. Genetic variants of immunoglobulin  $\gamma$  and  $\kappa$  chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Exp Immunol*, 176(1): 78-83, 2014.

#### 和文

- (6) 黒瀬浩史、岡 三喜男、中山睿一、基礎：抗 CCR4 抗体への制御性 T 細胞への影響と臨床応用の可能性、最新医学、70(3): 393-398, 2014.
- (7) 岡 三喜男、大植祥弘、黒瀬浩史、中山睿二、がん精巢抗原に対する免疫応答とその臨床的意義、*BIO Clinica*、30(3): 31-35, 2014.

#### 2. 学会発表

- (8) 大植祥弘、黒瀬浩史、溝手 雄、松本博文、磯辺みどり、上中明子、福田 実、中山睿二、岡 三喜男、Prolonged overall survival in XAGE-1b (GAGED2a) antibody positive NSCLC patients. (口頭) 大阪府大阪市 (第 54 回日本呼吸器学会学術講演会) 2014 年 4 月 25 日
- (9) 黒瀬浩史、大植祥弘、西尾祐美、磯辺みどり、上中明子、岡 三喜男、中山睿一、Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb. (口頭) 大阪府大阪市 (第 54 回日本呼吸器学会学術講演会) 2014 年 4 月 25 日
- (10) Yoshihiro Ohue, Koji Kurose, Yu Mizote, Hirofumi Matsumoto, Yumi Nishio, Midori Isobe, Minoru Fukuda, Akiko Uenaka, Mikio Oka, Eiichi Nakayama, Clinical effect of XAGE-1 (GAGED2a) antigen expression and antibody response in EGFR mutated and wild-type

advanced lung adenocarcinoma. (口頭) 愛媛県松山市 (第 18 回日本がん免疫学会総会) 2014 年 7 月 30 日

- (11) 黒瀬浩史、大植祥弘、柴川伸吾、西尾祐美、磯辺みどり、上中明子、岡 三喜男、中山睿一、Increase of activated Tregs in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Tregs by ADCC using anti-human CCR4 mAb (KM2760). (口頭) 愛媛県松山市 (第 18 回日本がん免疫学会総会) 2014 年 7 月 31 日
- (12) 長瀬博次、和田 尚、西川博嘉、鈴木 進、平家勇司、小嶋隆嗣、垣見和宏、船越 健、飯田真介、石田高司、佐藤永一、鶴殿平一郎、岡 三喜男、中山睿一、土岐祐一郎、上田龍三、制御性 T 細胞解析方法の標準化に向けた多施設共同研究 (口頭) 愛媛県松山市 (第 18 回日本がん免疫学会総会) 2014 年 7 月 31 日
- (13) Yoshihiro Ohue, Koji Kurose, Hirofumi Matsumoto, Yu Mizote, Yumi Nishio, Midori Isobe, Minoru Fukuda, Akiko Uenaka, Mikio Oka, Eiichi Nakayama Clinical effect of XAGE1 immune response in EGFR mutated and wild-type advanced lung adenocarcinoma. (口頭) 神奈川県横浜市 (第 73 回日本癌学会学術集会) 2014 年 9 月 25 日
- (14) Mikio Oka, Koji Kurose, Yoshihiro Ohue, Eiichi Nakayama Targeted immunotherapy strategy for non-small cell lung cancer. (口頭) 神奈川県横浜市 (第 73 回日本癌学会学術集会) 2014 年 9 月 25 日
- (15) Mami Negawa, Shingo Eikawa, Takenori Uehara, Yuki Kunisada, Yoshihiro Ohue, Koji Kurose, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Eiichi Nakayama, Heiichiro Udonon Monitoring multifunctionality of exhausted CD8 T-cells in cancer patients. (ポスター) 神奈川県横浜市 (第 73 回日本癌学会学術集会) 2014 年 9 月 25 日

(16) Koji Kurose, Yoshihiro Ohue, Shingo Eikawa, Yumi Nishio, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Mikio Oka, Eiichi Nakayama  
Increase of activated Tregs in TIL in Lung cancer and in vitro depletion of Tregs by ADCC using anti-human CCR4 mAb. (ポスター) 神奈川県横浜市 (第73回日本癌学会学術集会) 2014年9月27日

(17) Yoshihiro Ohue, Koji Kurose, Yu Mizote, Hirofumi Matsumoto, Yumi Nishio, Midori Isobe, Minoru Fukuda, Akiko Uenaka, Mikio Oka, and Eiichi Nakayama. Clinical effect of XAGE1 (GAGED2a) antigen expression and antibody response in EGFR mutated and wild-type advanced lung adenocarcinoma. (ポスター) New York, USA (22nd Annual International Cancer Immunotherapy Symposium), 2014年10月5日

(18) Koji Kurose, Yoshihiro Ohue, Shingo Eikawa, Yumi Nishio, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Mikio Oka, and Eiichi Nakayama. Increase of activated Tregs in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Tregs by ADCC using anti-human CCR4 mAb (KM2760). (ポスター) New York, USA (22nd Annual International Cancer Immunotherapy Symposium), 2014年10月5日

(19) 大植祥弘, Janardan Pandey, Aryan Namboodiri, 中山睿一, 岡三喜男、非小細胞肺癌患者で、免疫グロブリン鎖および鎖の遺伝的変異がXAGE1免疫に及ぼす影響 (ポスター) 京都府京都市 (第55回日本肺癌学会学術集会) 2014年11月14日

(20) 大植祥弘, 黒瀬浩史, 溝手雄, 松本博文, 西尾祐美, 磯辺みどり, 上中明子, 福田実, 中山睿一, 岡三喜男、非小細胞肺癌におけるXAGE1

免疫の予後延長効果 (ポスター) 京都府京都市 (第55回日本肺癌学会学術集会) 2014年11月14日

(21) 黒瀬浩史, 大植祥弘, 西尾祐美, 磯辺みどり, 堅田洋佑, 阿部公亮, 上中明子, 中山睿一, 岡三喜男、Increase of activated Tregs in TIL in lung cancer and depletion of Tregs using anti-human CCR4 mAb. (ポスター) 京都府京都市 (第55回日本肺癌学会学術集会) 2014年11月14日

(22) 大植祥弘, 黒瀬浩史, 岡三喜男, 中山睿一、進行期肺腺癌におけるXAGE1 (GAGED2a) 免疫と予後 (口頭) 東京都文京区 (第12回日本免疫治療学研究会学術集会) 2015年2月28日  
大植祥弘, 黒瀬浩史, 岡三喜男, 中山睿一、Clinical effect of XAGE1(GAGED2a) immunity in advanced lung adenocarcinoma. (ポスター) 東京都文京区 (第12回日本免疫治療学研究会学術集会) 2015年2月28日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

XAGE-1b特異的免疫反応を誘導するペプチドおよびその利用 (特許第5709108号)

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他