

201411045A

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)

ヒト型抗CD4抗体の癌免疫細胞療法への
適応を目指した前臨床開発研究
(H25-実用化(がん)-一般-002)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松島 綱治

平成27(2015)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

ヒト型抗CD4抗体の癌免疫細胞療法への適応を目指した前臨床開発研究	1
松島 綱治	

II. 分担研究報告

1. ヒト型抗CD4抗体のGMP基準生産と前臨床開発研究	9
伊藤 哲	
2. ヒト型抗CD4抗体の癌免疫細胞療法への適応を目指した前臨床開発研究	12
上羽 悟史	
3. ヒト型抗CD4抗体の癌免疫細胞療法への適応を目指した前臨床開発研究	17
竹田 和由	
4. マウスモデルを用いた抗CD4抗体併用によるペプチドワクチンの増強効果の検討	21
中面 哲也	
5. 医師主導第I相臨床試験（医師主導治験）の計画、および、 臨床サンプルを用いた抗CD4抗体の効果の検証を目的とした前臨床研究	25
北野 滋久	
中面 哲也	
塚崎 邦弘	
佐藤 暁洋	
尾崎 雅彦	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

ヒト型抗 CD4 抗体の癌免疫細胞療法への適応を目指した前臨床開発研究

研究代表者 松島 綱治 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野 教授

研究分担者

伊藤 哲	IDAC セラノスティクス株式会社 代表取締役社長
上羽 悟史	東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野 講師
竹田 和由	順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター細胞機能研究室 准教授
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
北野 滋久	国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 先端医療科 医員
塚崎 邦弘	国立がん研究センター 東病院 血液腫瘍科 科長
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
尾崎 雅彦	国立がん研究センター 東病院 治験管理室 治験事務局

研究協力者

荻原 春	東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野 特任研究員
Krishant Chand	東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野 大学院生
石渡 義郎	IDAC セラノスティクス株式会社 研究員
横地 祥司	IDAC セラノスティクス株式会社 研究部長
八賀 康祐	IDAC セラノスティクス株式会社 研究員
藤浪 紀洋	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 特任研究補助員

研究要旨

新規ヒト型化抗 CD4 抗体は、同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) への適応のみならず種々の癌治療・免疫細胞療法との併用が期待される。本研究では GMP 基準抗体の生産とそれを使用した GLP 基準での安全性・毒性試験の実施計画立案と実施、固形癌患者における抗体単独投与による医師主導第 I 相臨床試験プロトコール作成および様々な癌治療への応用可能性を検証するための前臨床研究を主な目的とする。そのために本研究では、1) GMP 基準での製造は英国の Cobra Biologics 社に委託し順調に各 step を検証しながら進めている。平成 26 年度の重要な進捗として、Master Cell Bank (MCB) が樹立でき、安全性試験実施用 TOX-lot 製造が完了した。更に安全性試験プロトコール設計に必要な種々の条件について PMDA との対面助言を通して情報を得ることができた。PMDA の指示を反映した安全性試験を委託するために、国内外の候補先 4 社との折衝を行い、臨床治験で検討を予定している免疫系パラメータを詳細に検討できることを重要な判断基準とし、唯一対応可能な会社として英国の Huntingdon Life Science (HLS) 社を選択した。既に Tox-lot は HLS 社に渡し、種々のプロトコール設計、PK/PD 試験について研究が始まった。2) 国立がん研究センターでは臨床サンプル（がん患者由来血液検体）を用いた本抗体の *in vitro* での効果を検証するための前臨床研究を計画し、臨床研究計画書を作成、研究倫理審査委員会の承認を得た。健康人末梢血検体を用いた *in vitro* での ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) アッセイでの検討において、本抗体を投与することによって細胞表面に CD4 分子を強く発現している制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 細胞) のみならず、CD4 分子が弱く発現している単球系の MDSC (myeloid-derived suppressor cells) をも除去できることを確認し、広範に免疫抑制細胞の除去ができることを示すことができた。また、全体班会議において固形がんを対象とした第 I 相臨床試験 (医師主導治験) における対象疾患、投与スケジュールをはじめとする臨床試験のデザインについて議論を重ねた。平成 27 年度は、がん患者検体を用いた *in vitro* での解析を終了し、各担当者の研究成果をもとにし

て臨床試験デザインを確定し、国立がん研究センターで実施予定の第 I 相臨床試験（医師主導治験）のプロトコール、付随する IC 文書、SOP、治験薬概要書を完成させる。3) CD4(+) 免疫抑制性細胞制御による様々ながん免疫細胞治療への応用を検討するために、B16F10-C57BL/6、colon26-BALB/c、および LLC-C57BL/6 の皮下腫瘍モデルにおいて、抗 CD4 抗体単回投与、複数回投与、投与時期について検討し、既に単回よりも複数回（2 回）投与でより効果が高いこと、腫瘍の種類により投与時期に至適時期があることが判明している。本年度は、現在世界的に Immuno-checkpoint 阻害抗体の効果が注目されている中、それらとの併用について詳細に検討した結果、抗 PD-1/L1 抗体と抗 CD4 抗体併用において劇的な相乗効果があることが明らかになった。担がんマウスに於いて CD4+細胞を抗体にて除去することにより、がんの所属リンパ節において爆発的な抗原特異的 CTL の増殖、活性化 CTL の末梢血での増加、がん組織浸潤の増加が観られた。これは、所謂抗原非特異的な homeostatic proliferation とは異なる基礎免疫学的にも新しい現象の発見であり、国際誌に発表した。全ての研究はヘルシンキ宣言および各種法令、倫理指針などを遵守し遂行した。本研究を達成することで難治がん患者に対して抗 CD4 抗体により安全性を担保した GVL/T 効果を期待した allo-HSCT の施行、抗 CD4 抗体単独ならびに他の免疫細胞療法、化学療法・放射線療法などとの併用治療など斬新で有効な治療法を提供でき、医療上の大きなメリットがある。本抗体は知財、研究面いずれに於いても日本発のオリジナルであり、経済的波及効果も大きいと期待する。

A. 研究目的

新規ヒト型化抗 CD4 抗体は、GVL/T 効果を期待した安全な同種造血幹細胞移植（allo-HSCT）への適応のみならず種々のがん治療・免疫細胞療法などとの併用が期待される。本研究では GMP 基準抗体の生産とそれを使用した GLP 基準での安全性・毒性試験の実施計画立案と実施、固形がん患者における抗体単回投与による医師主導第 1 相臨床治験プロトコール作成および様々ながん治療への応用可能性を検証するための前臨床研究を主な目的とする。

B. 研究方法

GMP 製造委託会社選定：

GMP 委託製造を委託した英国 Cobra Biologics（Cobra）社の計画管理を行いながら、培養サイズの増大化、精製方法の検討と共に、重要な課程の一つである Master Cell Bank（MCB）の樹立を行う。感染性否定試験、安全性試験実施用 Tox-lot 製造終了後、安全性試験に移行する。

PMDA 対面助言：

臨床治験申請には PMDA の承認が必要であるが、戦略相談としてがん研究センター・東京大学・IDAC と共に対面助言を受け、安全性試験計画についての指示のもと、安全性試験委託会社の選定を実施する。

GLP 安全性試験委託会社選定：

国内外で委託候補として 4 社を対象に折衝を行い、要求事項を満たす技術・実績が確認できた委託先を選定する。特に重要な因子は、臨床治験で実施確認しようとしている免疫系パラメータの測定実績（validation の有無）である。

マウス皮下腫瘍モデル：

LLC(Lewis lung carcinoma), Colon 26 および B16F10 (melanoma)皮下腫瘍モデルを作成する。B16F10 モデルでは、目的に応じて melanoma 抗原 gp100 特異的 MHC class 1 拘束性 TCR (Pmel-1) を遺伝子導入した Tg マウス由来 CD8⁺ T 細胞を養子移入する。抗体投与は、腫瘍移植後 5 および 9 日目に抗 CD4 抗体を、抗 PD-1, PD-L1, CTLA4, LAG-3, TIM-3, BTLA, GITR 抗体は、腫瘍移植後 4, 8, 12, 16 日目に 200ug 腹腔内投与する。抗腫瘍効果は、腫瘍体積ならびに必要なに応じて生存解析を行い、評価する。

（倫理面への配慮）

本研究で使用した研究代表者の遺伝子組換え実験に関する二種申請は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「T/B リンパ球、樹状細胞におけるケモカイン/ケモカイン受容体の炎症・免疫疾患における役割の解析と新規治療法の開発（承認番号 20-2）」により東京大学・医学部

組換え DNA 実験安全委員会から承認されており、適切な拡散防止措置のもと研究を遂行した。

本研究で行った研究代表者の動物実験は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「炎症・免疫疾患における免疫担当細胞・組織細胞の動態制御(承認番号: 医-P12-35P2A)」により東京大学医学系研究科・医学部動物実験委員会から承認されており、法令および東京大学動物実験実施マニュアルに則って遂行した。

(研究分担者については分担報告書に記載)

C. 研究結果

GMP 製造 :

委託先英国の Cobra 社で順調に各 step が進行している。今年度の一番大きな進捗は Master Cell Bank (MCB) の樹立である。MCB の感染性否定試験も無事クリアした。培養サイズも 15mL、5L、50L、250L と順次サイズを上げ、各パラメータの調整を行いながら、希望している抗 CD4 抗体の製造を実施した。Tox-lot 製造も行ない、安全性試験遂行準備ができた。

PMDA 対面助言 :

対面助言に向けての事前相談を平成 25 年 12 月 26 日に受け、東京大学・がん研究センター・IDAC の担当者が相談しながら PMDA の対面助言に向け質問事項の整理を実施し、正式に平成 26 年 9 月 9 日に対面助言を受けた。正式な戦略相談記録を 10 月 9 日付で受け取った。前臨床試験で行うべき動物種は薬剤の交差反応性から、サルのみでよいこと、高濃度域についての設定などについて正式コメントを取得した。

GLP 安全性試験 :

安全性試験委託先会社として英国の Huntingdon Life Science (HLS) 社を選定した。抗体医薬品の FDA 対応等の実績が最も多く、又我々が必要としている免疫系パラメータ測定系の validation 済の系を最も整備した状態で提供できる事が選定における判断材料となった。既に HLS 社へ IDAC から技術移管できるものから移行している。また Cobra 社から HLS 社へ Tox-lot が引き渡されていて、PK/PD 試験が始まっている。

臨床検体を用いた前臨床研究ならびに治験プロトコル作製の準備 :

国立がん研究センターにおいて CCR4(-)CD4(+)白血球細胞の殺細胞効果、ならびに、進行がん患者で本抗体による CD4 陽性 T 細胞、単球 (CD4 弱陽性)、さらには、免疫抑制作用をもつ制御性 T 細胞や MDSC (Myeloid derived suppressor cells) の減少効果について臨床サンプルを用いた *in vitro* での検証を行うための臨床研究計画書を、国立がん研究センターの研究倫理審査委員会へ提出、承認を得る。国立がん研究センターにおける医師主導第 1 相臨床試験 (治験) のプロトコルを作成するために、この間試験デザインを基本的に決定しプロトコルおよび付随する IC 文書・SOP を準備し、治験薬概要書の作成が済み次第、施設の治験審査委員会に提出する。

抗 CD4 抗体の抗腫瘍効果 :

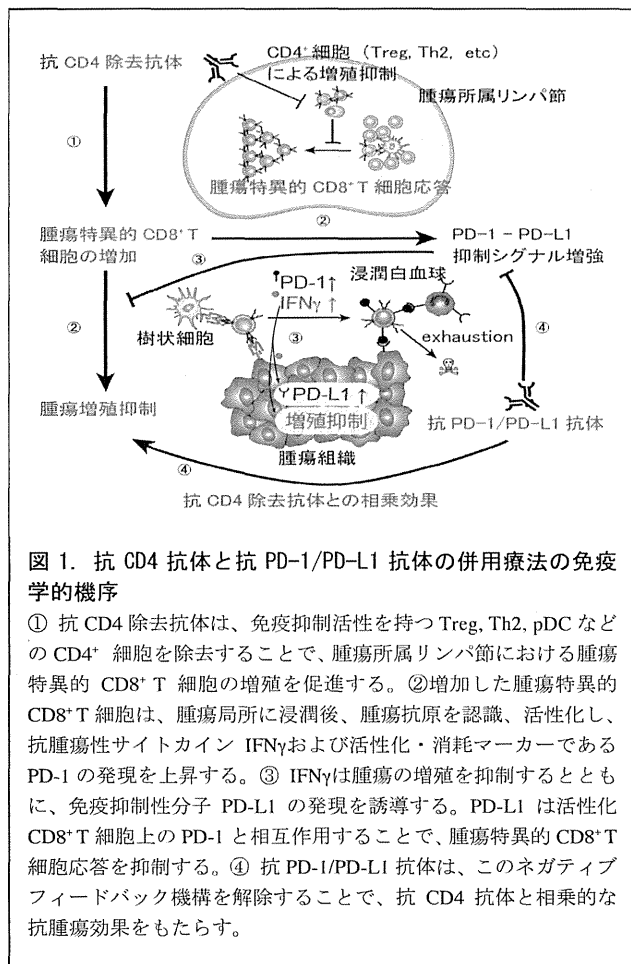
B16F10 皮下腫瘍モデルを用いて、抗 CD4 抗体および種々の抗 immune checkpoint 抗体の単剤としての抗腫瘍効果を評価した。抗 CD4 抗体投与群では、比較した全ての抗 immune checkpoint 抗体投与群を上回る腫瘍増殖抑制および生存延長を認めた。また、抗 CD8 抗体により CD8⁺T 細胞を除去することで抗 CD4 抗体の抗腫瘍作用が消失することから、抗 CD4 抗体の抗腫瘍作用には CD8⁺T 細胞が関与することが明らかになった。

B16F10 皮下腫瘍モデルでは、腫瘍移植 14 日目の腫瘍局所における CD8⁺T 細胞の浸潤が抗 CD4 抗体投与群において著明に増加しており、この増加した CD8⁺T 細胞は、PD-1⁺CD137⁺腫瘍反応性集団ならびに IFN γ ⁺細胞集団の割合が高く、LAG-3、Tim3、CTLA4 などの免疫チェックポイント分子を発現し、*ex vivo* で B16F10 と共培養すると高い殺腫瘍機能を示す腫瘍反応性 CD8⁺T 細胞であった。

抗 CD4 抗体により増加する CD8⁺T 細胞の抗原特異性 :

B16F10 担癌マウスに、抗原特異性が異なる 3 種類の CD8⁺T 細胞の同数混合懸濁液を、尾静脈から移入し、腫瘍所属リンパ節における増殖応答を比較した。未治療群においては、B16F10 に反応性を有する Pmel-1 CD8⁺T 細胞のみが腫瘍所属リンパ節において増殖応答を示し、この応答は抗 CD4 抗体投与群において増強された。一方、抗 CD4 抗体投与群においても B16F10 に対する反応性を持たない CD8⁺T 細胞の増殖応答は認めず、また非担がんマウスに抗 CD4 抗体を投与しても Pmel-1 CD8⁺T

細胞の増殖応答は認めなかった。これらの結果から、抗 CD4 抗体による CD8⁺ T 細胞応答の増強は、抗原非特異的な“homeostatic proliferation”ではなく、抗原特異的の反応であることが明らかになった。



健康人ボランティア末梢血検体を用いた *in vitro* での ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) アッセイ：
抗 CD4 抗体が血液中の各種免疫担当細胞にどのような影響を及ぼすか、CD4 陽性細胞を除去できるかどうかを検討した。抗 CD4 抗体を投与することによって CD4 陽性細胞 (Th1, Th2, Th17, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T 細胞) を除去できることを確認した。さらに、細胞表面上に CD4 分子が弱く発現している単球系の MDSC (myeloid-derived suppressor cells) についても除去できることも確認できた。

臨床試験のデザイン：
班会議で議論を重ねた。平成 25 年度は First in human (FIH) 臨床試験の対象疾患として、抗 CD4 抗体投与前後において腫瘍局所での免疫解析を

行い proof of concept (POC) を確認するために、治療経過中に生検ができる可能性が高い腫瘍を対象とすることが決定された。平成 26 年度は、CD4 陽性細胞除去による感染症の合併の可能性とその対処法、CD4 陽性細胞に含まれる免疫抑制細胞の除去により自己免疫疾患が誘発される可能性など、主に安全性について議論された。

D. 考察

本研究により、抗 CD4 抗体が単剤として他の immune checkpoint 抗体と比較し、強い抗腫瘍効果を持つことが明らかになった。この抗腫瘍効果は CD8⁺ T 細胞依存的であり、抗 CD4 抗体投与群では、腫瘍所属リンパ節における腫瘍抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の増殖が選択的に亢進していた。腫瘍所属リンパ節における CD4⁺ 細胞による CD8⁺ T 細胞応答の抑制を解除することが、腫瘍特異的な CD8⁺ T 細胞応答の増強に繋がっているものと考えられる。この CD4⁺ 細胞による CD8⁺ T 細胞応答の抑制機序について、制御性 T 細胞の関与ならびに分子機序のさらなる深化が必要と考えられる。抗 CD4 抗体は、抗 PD-1/PD-L1 抗体との併用により、相乗的に強力な抗腫瘍効果を示した。現在想定している抗 CD4 抗体と抗 PD-1/PD-L1 抗体の併用療法の免疫学的機序について図 1 に記載する。

E. 結論

抗体の GMP 生産は、委託先英国の Cobra 社にて順調に各 step が進行している。今年度の一番大きな進捗は Master Cell Bank (MCB) の樹立である。Tox-lot 製造も行ない、安全性試験遂行準備ができた。安全性試験委託先会社として英国の Huntingdon Life Science (HLS) 社を選定した。既に HLS 社へ IDAC から技術移管できるものから移行している。また Cobra 社から HLS 社へ Tox-lot が引き渡されていて、PK/PD 試験が始まっている。現在世界的に Immuno-checkpoint 阻害抗体の効果が注目されているので、それらとの併用について詳細に検討した結果、抗 PD-1/L1 抗体と抗 CD4 抗体併用において劇的な相乗効果があることが明らかにした。担がんマウスに於いて CD4⁺細胞を抗体にて除去することによりがんの所属リンパ節において爆発的な、抗原特異的 CTL の増殖、活性化 CTL の末梢血での増加、がん組織浸潤の増加が観られた。これは、所謂抗原非特異的な homeostatic proliferation とは異なる基礎免疫

学的にも新しい現象の発見であり、国際誌に発表した。今後の臨床開発プロトコールに反映させる。ヒトでは本抗体により広範に免疫抑制細胞の除去ができる可能性が示唆された。ひきつづき、各種がん患者検体を用いて同様の検討を進めるとともに、ADCC 効果によって直接の抗腫瘍効果が期待される CD4 陽性造血器腫瘍への殺細胞効果についても検証をすすめていく。

抗腫瘍効果を最大限に発揮する抗 CD4 抗体の至適投与回数・間隔についてはマウスでの *in vivo* のデータをそのままヒトに当てはめることは事実上困難であるため、FIH 試験では安全性を確保できるように、投与量、投与回数、投与間隔については、PMDA とともに議論していきながら慎重にプロトコールを策定する方針が確認された。また、FIH 試験において綿密な患者免疫モニタリングを行えるような治験計画書を作成していく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueha S, Yokochi S, Ishiwata Y, Ogiwara H, Chand K, Nakajima T, Hachiga K, Shichino S, Terashima Y, Toda E, Shand FH, Kakimi K, Ito S, Matsushima K. Robust anti-tumor effects of combined anti-CD4 depleting antibody and anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibody treatment in mice. *Cancer Immunol Res.* in press, 2015.
2. Matsushita H, Hosoi A, Ueha S, Abe J, Fujieda N, Tomura M, Maekawa R, Matsushima K, Ohara O, Kakimi K. Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN γ -dependent cell-cycle arrest. *Cancer Immunol Res.* 3(1):26-36, 2015.
3. Shand FH, Ueha S, Otsuji M, Koid SS, Shichino S, Tsukui T, Kosugi-Kanaya M, Abe J, Tomura M, Ziogas J, Matsushima K. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(21):7771-6,

2014.

4. Iinuma H, Fukushima R, Inaba T, Tamura T, Inoue T, Horikawa M, Ogawa E, Ikeda Y, Matsutani N, Takeda K, Yoshida K, Tsunoda T, Ikeda T, Nakamura Y, Okinaga K. Phase I clinical study of multiple epitope peptide vaccine combined with chemoradiation therapy in esophageal cancer patients. *J Transl Med.* 12(1):84, 2014.
5. Ferrari de Andrade L, Ngiow SF, Stannard K, Rusakiewicz S, Kalimutho M, Khanna KK, Tey SK, Takeda K, Zitvogel L, Martinet L, Smyth MJ. Natural killer cell are essential for the ability of BRAF inhibitor to control BRAFV600E-mutant metastatic melanoma. *Cancer Res.* 74(24): 7298-7308, 2014
6. Munakata S, Tashio Y, Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahi D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B, Hattori K. Inhibition of plasmin protects against colitis in mice by suppressing matrix metalloproteinase 9-mediated cytokine release from myeloid cells. *Gastroenterology.* 148 (3): 565-578, 2015.
7. Hata R-I, Izukuri K, Kato Y, Sasaki S, Mukaida N, Maehata Y, Miyamoto C, Akasaka T, Yang X, Nagashima Y, Takeda K, Kiyono T, Taniguchi M. Suppressed rate of carcinogenesis and decreases in tumour volume and lung metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. *Scientific Reports.* 5:9083, 2015.
8. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Young A, Mittal D, Martinet L, Bruedigam C, Takeda K, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Hill GR, Smyth MJ. NK cells require IL-28R for optimal *in vivo* activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112 (8): E2376 -E2384, 2015.
9. Guillerey C, Chow MT, Miles K, Olver

- S, Sceneay J, Takeda K, Moller A, Smyth MJ. Toll-Like Receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis. *OncoImmunology*. in press, 2015.
10. Yoshimura M, Tada Y, Ofuzi K, Yamamoto M, Nakatsura T. Identification of a novel HLA-A* 02:01-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope derived from the EML4-ALK fusion gene. *Oncol Rep*. 32(1): 33-39, 2014.
 11. 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.
 12. Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Maekawa R, Nakatsura T. Large-scale expansion of γ δ T cells and peptide-specific cytotoxic T cells using zoledronate for adoptive immunotherapy. *Int J Oncol*. 45: 1847-1856, 2014.
 13. 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: 28-36, 2015.
 14. 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: 497-504, 2015.
 15. Ito A, Kondo S, Tada K, Kitano S. Clinical development of immune checkpoint inhibitors. *BioMed Research International*. BioMed Research International. in press, 2015.
 16. Kitano S, Postow MA, Ziegler CG, Kuk D, Panageas K, Cortez C, Rasalan TS, Adamow M, Yuan J, Wong P, Altan-Bonnet G, Wolchok JD, Lesokhin AM. Computational Algorithm Driven Evaluation of Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cell Frequency For Prediction of Clinical Outcomes. *Cancer Immunol Res*. 2(8): 812-821, 2014.
 17. Tsukasaki K, Tobinai K. Human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia-lymphoma. *Clin Cancer Res*. 20(20): 5217-25, 2014.
 18. Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Ohshima K, Seto M. Molecular Characterization of Chronic-type Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Cancer Res*. 74(21): 6129-38, 2014.
 19. Fukushima T, Nomura S, Shimoyama M, Shibata T, Imaizumi Y, Moriuchi Y, Tomoyose T, Uozumi K, Kobayashi Y, Fukushima N, Utsunomiya A, Tara M, Nosaka K, Hidaka M, Uike N, Yoshida S, Tamura K, Ishitsuka K, Kurosawa M, Nakata M, Fukuda H, Hotta T, Tobinai K, Tsukasaki K. Japan Clinical Oncology Group prognostic index and characterization of long-term survivors of aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma (JCOG0902A). *Br J Haematol*. 166(5): 739-48, 2014.
2. 学会発表
1. Tracking of inter-tissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. Satoshi Ueha, Francis Shand, Mikiya Otsuji, Shigeyuki Shichino, Tatsuya Tsukui, Mizuha Kosugi, Jun Abe, Michio Tomura, Kouji Matsushima. The 22th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages(神戸).

- 2014年6月2-3日.
2. 担癌マウスにおける腫瘍浸潤マクロファージの起源：脾臓および骨髄由来単球の動態. 上羽悟史、Francis Shand、津久井達也、七野成之、戸村道夫、松島綱治. 第35回日本炎症・再生医学会(沖縄). 2014年7月1-4日.
 3. Synergistic anti-tumor effect of CD4 depleting antibody with anti-immune checkpoint antibodies in murine tumor models. Yoshiro Ishiwata, Shoji Yokochi, Kazuhiro Kakimi, Satoshi Ueha, Satoru Ito, Kouji Matsushima. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
 4. Administration of anti-CD4 depleting antibody together with anti-PD-1/anti-PD-L1 antibody shows dramatic anti-tumor effects in mice. Yoshiro Ishiwata, Shoji Yokochi, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Satoshi Ueha, Kouji Matsushima. 第43回日本免疫学会学術集会(京都). 2014年12月10-12日.
 5. Carcinoma-associated fibroblasts convert barely metastatic human breast cancer cells to highly metastatic cancer cells. 癌内線維芽細胞は弱転移性ヒト乳癌細胞を強転移性の乳癌細胞に変換する. 松村優子、伊藤恭彦、Nadila Wali、折櫛薫、寺尾泰久、竹田省、奥村康、竹田和由、樋野興夫、折茂彰. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
 6. Immune activation by the exopolysaccharide in yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. Seiya Makino, Hiroshi Kano, Yukio Asami, Kazuyoshi Takeda, Ko Okumura, Hiroyuki Itoh. 第43回日本免疫学会学術総会(京都). 2014年12月10-12日.
 7. 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.
 8. 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2-4日.
 9. 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17-19日.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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25-27日.
 13. Evaluation of peptide-specific CTL-inducibility 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25-27日.
 14. 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25-27日.
15. 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25-27日.
 16. 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.
 17. Novel function of the BAPI nuclear deubiquitinase in the non-homologous end joining (NHEJ) pathway of double strand DNA repair. Ito T, Kitano S, Erdjument-Bromage H, Ladanyi M. AACR Annual Meeting 2014(San Diego). April 5-9, 2014.
 18. International session : Antibody therapy. 進行メラノーマ患者における抗CTLA-4抗体療法後のがん抗原特異的細胞障害性CD4陽性T細胞反応の増強. 北野滋久. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
 19. A nationwide survey of patients with adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: 2010-2011. 野坂生郷、岩永正子、石澤賢一、石田陽治、内丸薫、石塚賢治、天野正宏、石田高司、今泉芳孝、鵜池直邦、宇都宮與、大島孝一、河井一浩、田中淳司、戸倉新樹、飛内賢正、渡邊俊樹、塚崎邦弘. 第76回日本血液学会(大阪). 2014年10月31日-11月2日.
- 発明人：伊藤哲、横地祥司、松島綱治、上羽悟史、石渡義郎
出願人：IDACセラノステイクス株式会社、国立大学法人東京大学
2. 特願2014-12030「固形がんの治療剤」、国内優先権出願 平成26年6月11日、特願2014-178953「固形がんの治療剤」、国内優先権出願 平成26年9月3日 新規PCT出願PCT/JP2015/053569「固形がんの治療剤」
 3. 発明の名称：「抗CD4抗体を有効成分とする抗がん剤の治療効果を判定する方法」
出願国：日本
出願番号：特願 2014-243858
出願日：平成 26 年 12 月 2 日
発明人：松島綱治、上羽悟史、伊藤哲、横地祥司、石橋義郎
出願人：国立大学法人東京大学、IDAC セラノステイクス株式会社

2. 実用新案登録 なし

3. その他

1. がん免疫療法開発のガイダンス2015
早期臨床試験の考え方 ～安全で効果的な開発を目指して～ 厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業 ガイダンス作成のための検討委員会 報告書 平成27年1月30日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称：「免疫チェックポイント制御剤の副作用低減方法」
出願国：日本
出願番号：特願2014-120245
出願日：2014年9月3日

分担研究報告書

ヒト型抗 CD4 抗体の GMP 基準生産と前臨床開発研究

研究分担者 伊藤 哲 IDAC セラノスティクス株式会社 代表取締役社長

研究要旨

ヒト型化抗 CD4 抗体を GMP 基準で製造し、GLP 基準での安全性を検証する事を主たる分担研究課題としている。GMP 基準での製造に関しては、委託先として選定した英国の Cobra Biologics 社にて IDAC セラノスティクス社 (IDAC) の指示のもと、順調に各 step を検証しながら進めている。平成 26 年度での重要な step としては、Master Cell Bank (MCB) が樹立でき、安全性試験実施用 TOX-lot 製造が完了した。更に安全性試験プロトコール設計に必要な種々条件について PMDA と対面助言を実施する事ができた。PMDA からの指示を反映した安全性試験を委託するために、国内外の候補先 4 社との折衝を行った。臨床治験で検討を予定している免疫系パラメータを詳細に検討できる事を重要な判断基準として設定。対応可能な会社として英国の Huntingdon Life Science (HLS) 社を選択した。既に Tox-lot は HLS 社に渡し、種々のプロトコール設計、PK/PD 試験についても研究が始まった。

A. 研究目的

主目的は、ADCC 活性を賦与したヒト型化抗 CD4 抗体の GMP 製造に向けて必要な各 step の方法論の検証 (validation) を行いながら、GMP 製造を遂行する事、また臨床治験のための GLP 基準に基づく安全性試験実施の計画立案・実施をする事である。安全性試験内容については PMDA との対面助言を反映した計画・設計を行う。

B. 研究方法

GMP 製造：

GMP 委託製造を委託した英国 Cobra Biologics (Cobra) 社の計画管理を行いながら、培養サイズの増大化、精製方法の検討と共に、重要な課程の一つである Master Cell Bank (MCB) の樹立を行う。その感染性否定試験も実施する。また安全性試験実施用 Tox-lot 製造も行い、安全性試験に移行する。

PMDA 対面助言：

臨床治験申請には PMDA の承認が必要であるが、戦略相談としてがん研究センター・東京大学と共に対面助言を受ける。安全性試験計画についての指示のもと、安全性試験委託会社の選定、実施する。

GLP 安全性試験委託会社選定：

国内外で委託候補として 4 社を対象に折衝を行う。抗体医薬品の FDA 対応等の実績、我々が必要

としている免疫系パラメータ測定系の validation 済の系を提供できることが選定における主な判断材料となる。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した遺伝子組換え実験に関する申請は、研究代表者の東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「T/B リンパ球、樹状細胞におけるケモカイン/ケモカイン受容体の炎症・免疫疾患における役割の解析と新規治療法の開発 (承認番号20-2)」により東京大学・医学部組換えDNA実験安全委員会から承認されており、適切な拡散防止措置のもと研究を遂行した。本研究で行った動物実験は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「炎症・免疫疾患における免疫担当細胞・組織細胞の動態制御 (承認番号：医-P12-35P2A)」により東京大学医学系研究科・医学部動物実験委員会から承認されており、法令および東京大学動物実験実施マニュアルに則って遂行した。

C. 研究結果

GMP 製造：

委託先英国の Cobra 社で順調に各 step が進行している。今年度の一番大きな step は Master Cell Bank (MCB) の樹立である。MCB の感染性否定試験も無事クリアしている。培養サイズも 15mL、5L、

50L、250L と順次サイズを上げ、各パラメータの調整を行いながら、希望している抗 CD4 抗体の製造を実施した。Tox-lot 製造も行ない、安全性試験遂行準備ができた。

PMDA 対面助言：

対面助言に向けての事前相談を非正 2 5 年 12 月 26 日に受け、東京大学・がん研究センター・IDAC の担当者が相談しながら PMDA の対面助言に向け質問事項の整理を実施し、正式に平成 2 6 年 9 月 9 日に対面助言を受けた。正式な戦略相談記録を 10 月 9 日付で受け取った。前臨床試験で行うべき動物種は薬剤の交差反応性から、サルのみでよいこと、高濃度域についての設定などについて正式コメントを取得した。

GLP 安全性試験：

候補 4 社の内、臨床治験で実施確認しようとしている免疫系パラメータの測定実績 (validation の有無) で安全性試験委託先会社として要求事項を満たす技術・実績が確認できた英国の Huntingdon Life Science (HLS) を選定した。既に HLS 社へ IDAC から技術移管できるものから移行している。また Cobra 社から HLS 社へ Tox-lot が引き渡されていて、PK/PD 試験が始まっている。PK/PD 試験データ取得から順次設計・実施に移行している。

抗 CD4 抗体性能：

研究代表者らと 3 種の固形がんを対象に、単剤・併用という投与条件下での抗腫瘍効果・生存率への影響を検討し、抗 CD4 抗体と免疫チェックポイントの中でも特に抗 PD-1/PD-L1 抗体との併用で抗腫瘍効果が高い事が確認できた。またその際に、免疫チェックポイント抗体単剤が示す副作用を抗 CD4 抗体が軽減できることも確認し、特許出願した。

臨床現場で求められているコンパニオン診断という Biomarker 検索であるが、CD4 陽性細胞をターゲットとする今回の抗 CD4 抗体薬剤については、患者は全て CD4 陽性細胞を有している為に、コンパニオン診断というカテゴリーは当てはまらない。しかし治療効果を反映する biomarker という概念では、モニタリングに最適な血液を対象として、その効果を判定できる biomarker の組み合わせを見出し、特許出願に至っている。

D. 考察

本研究により、GMP 製造に係る重要な step である Master Cell Bank (MCB) 樹立できた。更に TOX-LOT も製造し、安全性試験実施に移行した。安全性試験についても、PK/PD 試験が開始され、着実に PMDA へ治験プロトコル作成用の基本的データが取得できる態勢ができた。また、抗 CD4 抗体が有する種々未知の機能についても明らかにされつつある。

E. 結論

マウスモデルで抗 CD4 抗体単独ならびに Immune Checkpoint 抗体併用投与による強力な腫瘍抑制効果が認められた。First-in-Human を実現するための必須条件であるヒト型化抗 CD4 抗体の GMP 製造・GLP 安全性試験が順調に進捗しており、PMDA への治験プロトコル申請にむけいよいよ現実的なスケジュール設定が可能になってきた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueha S, Yokochi S, Ishiwata Y, Ogiwara H, Chand K, Nakajima T, Hachiga K, Shichino S, Terashima Y, Toda E, Shand FH, Kakimi K, Ito S, Matsushima K. Robust anti-tumor effects of combined anti-CD4 depleting antibody and anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibody treatment in mice. *Cancer Immunol Res.* in press, 2015.

2. 学会発表

1. Synergistic anti-tumor effect of CD4 depleting antibody with anti-immune checkpoint antibodies in murine tumor models. Yoshiro Ishiwata, Shoji Yokochi, Kazuhiro Kakimi, Satoshi Ueha, Satoru Ito, Kouji Matsushima. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
2. Administration of anti-CD4 depleting antibody together with

anti-PD-1/anti-PD-L1 antibody shows dramatic anti-tumor effects in mice. Yoshiro Ishiwata, Shoji Yokochi, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Satoshi Ueha, Kouji Matsushima. 第43回日本免疫学会学術集会(京都). 2014年12月10-12日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称:「免疫チェックポイント制御剤の副作用低減方法」
出願国: 日本
出願番号: 特願 2014-120245
出願日: 2014年9月3日
発明人: 伊藤哲、横地祥司、松島綱治、上羽悟史、石渡義郎
出願人: IDACセラノステイクス株式会社、国立大学法人東京大学
2. 特願2014-12030「固形がんの治療剤」、国内優先権出願 平成26年6月11日、特願 2014-178953「固形がんの治療剤」、国内優先権出願 平成26年9月3日
新規 PCT 出願 PCT/JP2015/053569「固形がんの治療剤」
3. 発明の名称:「抗CD4抗体を有効成分とする抗がん剤の治療効果を判定する方法」
出願国: 日本
出願番号: 特願 2014-243858
出願日: 平成26年12月2日
発明人: 松島綱治、上羽悟史、伊藤哲、横地祥司、石橋義郎
出願人: 国立大学法人東京大学、IDACセラノステイクス株式会社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト型抗 CD4 抗体の癌免疫細胞療法への適応を目指した前臨床開発研究

研究分担者	上羽 悟史	東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野	講師
研究協力者	荻原 春	東京大学大学院医学系研究科分子予防医学分野	特任研究員
研究協力者	石渡 義郎	IDAC セラノステイクス株式会社	研究員
研究協力者	横地 祥司	IDAC セラノステイクス株式会社	臨床開発部長
研究協力者	八賀 康祐	IDAC セラノステイクス株式会社	研究員

研究要旨

昨年度までに、担癌宿主に抗 CD 4 除去抗体投与により得られる抗腫瘍効果の免疫学的機序として、CD4⁺免疫抑制性の細胞集団の除去による腫瘍特異的 CD8⁺ T 細胞応答の増強を明らかにした。今年度は、治療効果のモニタリング指標の確立を目的として、抗 CD4 抗体投与で増加する CD8⁺ T 細胞の特性解析を行うとともに、既に臨床開発が進んでいる種々の免疫チェックポイント抗体と抗 CD4 抗体の併用療法の可能性を検討した。LLC, B16F10 および Colon 26 皮下腫瘍モデルにおいて、CD8⁺ T 細胞の免疫表現系を解析したところ、抗 CD4 抗体投与群では末梢血において PD-1⁺ CD8⁺ T 細胞が増加しており、また腫瘍局所では LAG-3, Tim3, CTLA4 などの免疫チェックポイント分子陽性画分の増加を認め、これらの免疫チェックポイント分子を発現する CD8⁺ T 細胞の増加が抗 CD4 抗体療法の治療効果に相関する可能性が示唆された。また抗原特異性の異なる種々の CD8⁺ T 細胞を用いた養子移入実験により、抗 CD4 抗体療法により増加する CD8⁺ T 細胞は腫瘍抗原に特異的であり、非特異的な応答ではないことが明らかになった。腫瘍増殖ならびに生存延長を指標に、抗 CD4 抗体と PD-1, PD-L1, CTLA4, LAG-3, TIM-3, BTLA, GITR などの免疫チェックポイント分子に対する中和抗体との併用効果を解析したところ、抗 CD4 抗体は抗 PD-L1 抗体との併用により極めて強力な抗腫瘍効果を示した。抗 CD4 抗体と抗 PD-L1 抗体の併用治療群では、末梢血において CD44^{hi} PD-1⁺ 活性化 CD8⁺ T 細胞の増加を認め、PD-1/PD-L1 相互作用を阻害することで抗 CD4 抗体投与により増加した腫瘍反応性 CD8⁺ T 細胞が腫瘍局所における消耗から保護されていることが示唆された。

今後、抗 CD4 抗体投与による腫瘍特異的 CD8⁺ T 細胞応答増強の細胞・分子機序を解析するとともに、transcriptome、proteome 解析による治療応答マーカーの探索を行う予定である。

A. 研究目的

これまでに、抗 CD4 抗体投与により CD4⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞をはじめとする免疫抑制性の細胞集団を除去することで、抗腫瘍 CD8⁺ T 細胞応答が増強され、強力な抗腫瘍効果が得られることを示してきた。今年度は、治療効果のモニタリング指標の確立を目的として、抗 CD4 抗体投与で増加する CD8⁺ T 細胞の特性解析を行うとともに、既に臨床開発が進んでいる種々の免疫チェックポイント抗体と抗 CD4 抗体の併用療法の可能性を検討した。

B. 研究方法

マウス皮下腫瘍モデル： LLC (Lewis lung carcinoma), Colon 26 および B16F10 (melanoma) 皮下腫瘍モデルを作成した。B16F10 モデルでは、目的に応じて melanoma 抗原 gp100 特異的 MHC class

1 拘束性 TCR (Pmel-1) を遺伝子導入した Tg マウス由来 CD8⁺ T 細胞を養子移入した。抗体投与は、腫瘍移植後 5 および 9 日目に抗 CD4 抗体を、抗 PD-1, PD-L1, CTLA4, LAG-3, TIM-3, BTLA, GITR 抗体は、腫瘍移植後 4, 8, 12, 16 日目に 200ug 腹腔内投与した。抗腫瘍効果は、腫瘍体積ならびに必要に応じて生存解析を行い、評価した。

養子移入実験： B16F10 皮下接種 6 日目に、Pmel-1 CD8⁺ T 細胞、OT-1 CD8⁺ T 細胞 (卵白アルブミン反応性)、ポリクローナル CD8⁺ T 細胞を同数混ぜ、Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) で蛍光標識した細胞懸濁液を養子移入し、移入後 3 日目に CFSE の蛍光シグナルの減衰を指標として、細胞分裂を評価した。

免疫学的解析：末梢血、脾臓、所属リンパ節、非所属リンパ節、腫瘍から細胞懸濁液を調整し、種々の表面マーカーを用いたフローサイトメトリーにより免疫担当細胞集団を同定し、細胞数および免疫表現系を解析した。

遺伝子発現解析：抗体投与後、2, 4, 8 日目の腫瘍組織より RNA を調整し、RT-qPCR を行った。

[倫理面への配慮]

本研究で使用した遺伝子組換え実験に関する二種申請は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「T/B リンパ球、樹状細胞におけるケモカイン/ケモカイン受容体の炎症・免疫疾患における役割の解析と新規治療法の開発（承認番号20-2）」により東京大学・医学部組換えDNA実験安全委員会から承認されており、適切な拡散防止措置のもと研究を遂行した。

本研究で行った動物実験は、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「炎症・免疫疾患における免疫担当細胞・組織細胞の動態制御(承認番号：医-P12-35P2A)」により東京大学医学系研究科・医学部動物実験委員会から承認されており、法令および東京大学動物実験実施マニュアルに則って遂行した。

C. 研究結果

抗 CD4 抗体の抗腫瘍効果：

B16F10 皮下腫瘍モデルを用いて、抗 CD4 抗体および種々の抗 immune checkpoint 抗体の単剤としての抗腫瘍効果を評価した。抗 CD4 抗体投与群では、比較

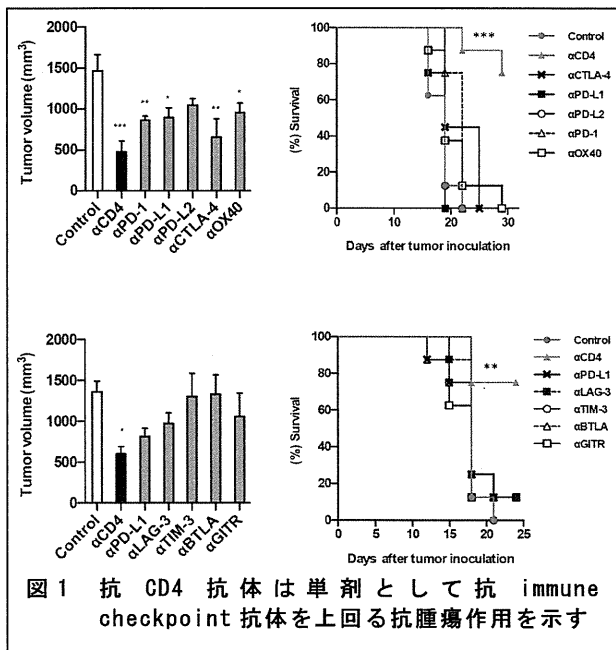


図1 抗 CD4 抗体は単剤として抗 immune checkpoint 抗体を上回る抗腫瘍作用を示す

した全ての抗 immune checkpoint 抗体投与群を上回る腫瘍増殖抑制および生存延長を認めた (図1)。また、抗 CD4 抗体により CD8⁺T 細胞を除去することで抗 CD4 抗体の抗腫瘍作用が消失することから、抗 CD4 抗体の抗腫瘍作用には CD8⁺T 細胞が関与することが明らかになった (図2)。一方、抗 CD25 抗体により CD25⁺制御性 T 細胞を除去しても抗 CD4 抗体と同等の抗腫瘍作用が得られないことが明らかになった (図2)。

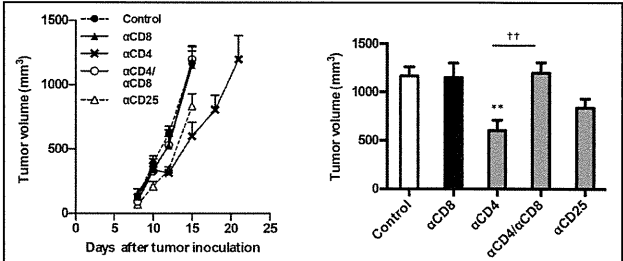


図2 抗 CD4 抗体の抗腫瘍作用は CD8⁺T 細胞に依存する

抗 CD4 抗体による抗腫瘍 CD8⁺T 細胞応答の増強：

B16F10 皮下腫瘍モデルでは、腫瘍移植 14 日目の腫瘍局所における CD8⁺T 細胞の浸潤が抗 CD4 抗体投与群において著明に増加しており (図3)、この増加した CD8⁺T 細胞は、PD-1⁺CD137⁺腫瘍反応性集団ならびに IFNγ⁺細胞集団の割合が高く、LAG-3, Tim3, CTLA4 などの免疫チェックポイント分子を発現し、*ex vivo*で B16F10 と共培養すると高い殺腫瘍機能を示す機能的な腫瘍反応性 CD8⁺T 細胞であった (図3)。

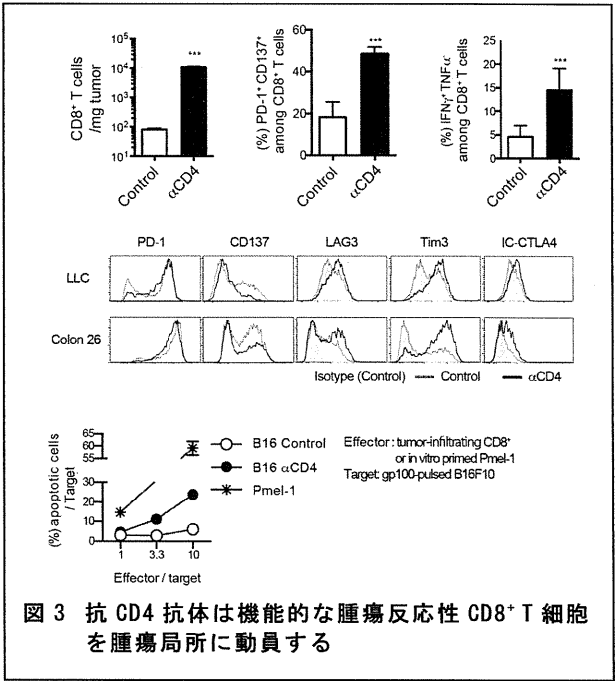


図3 抗 CD4 抗体は機能的な腫瘍反応性 CD8⁺T 細胞を腫瘍局所に動員する

抗 CD4 抗体により増加する CD8⁺T 細胞の抗原特異性:

B16F10 担癌マウスに、抗原特異性が異なる 3 種類の CD8⁺T 細胞の同数混合懸濁液を、尾静脈から移入し、腫瘍所属リンパ節における増殖応答を比較した。未治療群においては、B16F10 に反応性を有する Pmel-1 CD8⁺T 細胞のみが腫瘍所属リンパ節において増殖応答を示し、この応答は抗 CD4 抗体投与群において増強された (図 4)。一方、抗 CD4 抗体投与群においても B16F10 に対する反応性を持たない CD8⁺T 細胞の増殖応答は認めず、また非担癌マウスに抗 CD4 抗体を投与しても Pmel-1 CD8⁺T 細胞の増殖応答は認めなかった (図 4)。これらの結果から、抗 CD4 抗体による CD8⁺T 細胞応答の増強は、抗原非特異的な “homeostatic proliferation” ではなく、抗原特異的の反応であることが明らかになった。

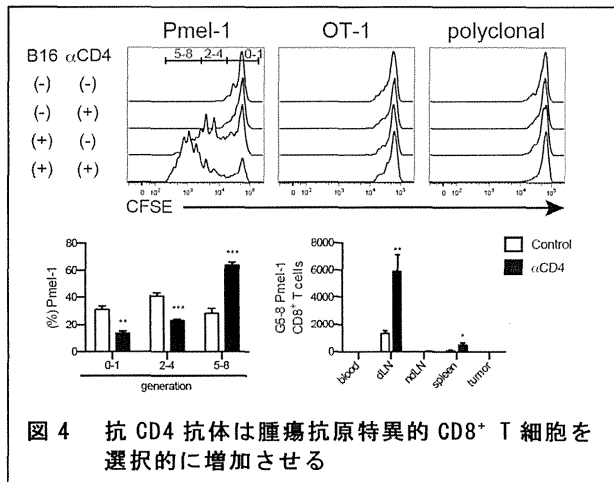


図 4 抗 CD4 抗体は腫瘍抗原特異的 CD8⁺T 細胞を選択的に増加させる

抗 CD4 抗体と抗 PD-1/PD-L1 抗体の併用による抗腫瘍効果:

B16F10 皮下腫瘍モデルにおいて、抗 CD4 抗体と種々の抗 immune checkpoint 抗体の併用効果を検証したところ、抗 CD4 抗体は抗 PD-1 抗体および抗 PD-L1 抗体と併用することで極めて強力な腫瘍増殖抑制ならびに生存延長効果を示した (図 5)。

Colon26 皮下腫瘍モデルにおいても一部のマウスで完全寛解が得られるなど、強力な併用効果を認め、さらに寛解個体へ同腫瘍株を再移植すると即時に拒絶されたことから、同併用療法により長期的な抗腫瘍免疫記憶が得られることが明らかになった (図 6)。なお、寛解個体に再移植するがん細胞株として、Colon26 の代わりに乳がん細胞株 4T1 を皮下移植した場合には、4T1 細胞は順調に増殖して排除さ

れなかったことから、腫瘍株抗原特異的な免疫が成立していることが明らかになった。

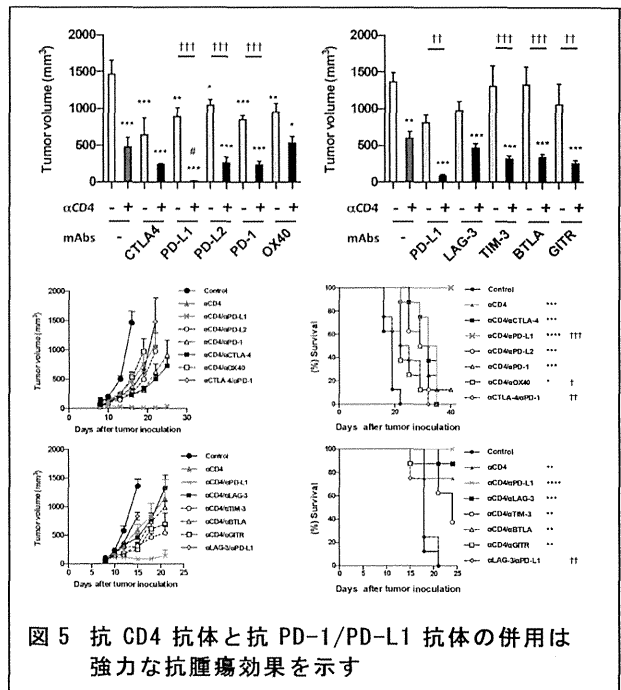


図 5 抗 CD4 抗体と抗 PD-1/PD-L1 抗体の併用は強力な抗腫瘍効果を示す

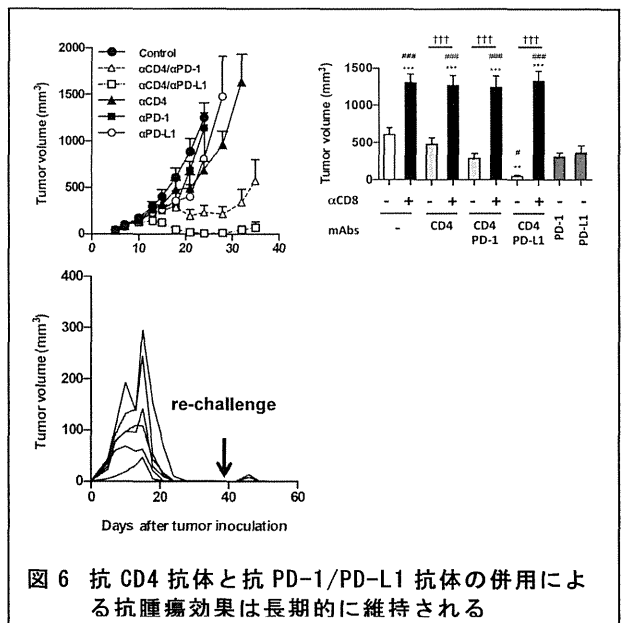


図 6 抗 CD4 抗体と抗 PD-1/PD-L1 抗体の併用による抗腫瘍効果は長期的に維持される

抗 CD4 抗体と抗 PD-L1 抗体の併用による抗腫瘍 CD8⁺T 細胞応答の増強:

B16F10 皮下腫瘍モデルにおいて、抗 CD4 抗体および抗 PD-L1 抗体の単独投与または併用群における CD8⁺T 細胞応答を解析した。腫瘍浸潤画分において、抗 CD4 抗体単独群と併用群の間に CD8⁺T 細胞数および PD-1 の発現に有意な差を認めなかったが、末梢血画分では、併用群において CD44^{hi} PD-1⁺または PD-1⁺ CD137⁺ 集団の著明な増加を認めた (図 7)。

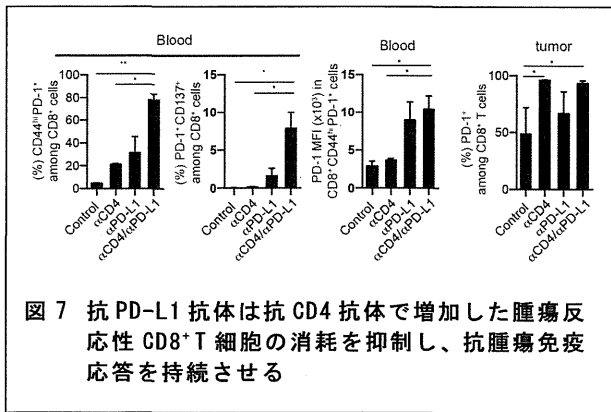


図7 抗PD-L1抗体は抗CD4抗体で増加した腫瘍反応性CD8⁺T細胞の消耗を抑制し、抗腫瘍免疫応答を持続させる

D. 考察

本研究により、抗CD4抗体が単剤として他のimmune checkpoint抗体ならびに抗CD25抗体に比較し、強い抗腫瘍効果を持つことが明らかになった。この抗腫瘍効果はCD8⁺T細胞依存的であり、抗CD4抗体投与群では、腫瘍所属リンパ節における腫瘍抗原特異的CD8⁺T細胞の増殖が選択的に亢進していた。腫瘍所属リンパ節におけるCD4⁺細胞によるCD8⁺T細胞応答の抑制を解除することが、腫瘍特異的なCD8⁺T細胞応答の増強に繋がっているものと考えられる。このCD4⁺細胞によるCD8⁺T細胞応答の抑制機序について、制御性T細胞の関与ならびに分子機序のさらなる深化が必要と考えられる。

抗CD4抗体は、抗PD-1/PD-L1抗体との併用により、相乗的に強力な抗腫瘍効果を示した。抗CD4抗体投与群ではPD-1⁺CD137⁺活性化腫瘍反応性CD8⁺T細胞の腫瘍浸潤増加に伴い、腫瘍局所におけるIFN γ ならびにIFN γ 応答性遺伝子の一つであるPD-L1発現が亢進しており、PD-1/PD-L1シグナルによる抗腫瘍CD8⁺T細胞応答に負のフィードバックがかかっていると推察される。抗CD4抗体と抗PD-1/PD-L1抗体の併用は、この負のフィードバックを抑制することで、抗CD4抗体で増加した腫瘍反応性CD8⁺T細胞の消耗を防ぎ、抗腫瘍免疫応答を持続させていると考えられる。併用群の末梢血におけるPD-1⁺CD137⁺腫瘍反応性CD8⁺T細胞の著明な増加は、腫瘍局所における消耗を回避した腫瘍反応性CD8⁺T細胞が再循環したものと考えられる。臨床的にも、がん患者の末梢血におけるPD-1⁺CD137⁺CD8⁺T細胞が腫瘍反応性をもつことが報告されており、同細胞集団の増加が、抗CD4抗体・抗PD-L1抗体併用療法の免疫学的評価指標になりうると思われる。

E. 結論

抗CD4抗体が、腫瘍特異的CD8⁺T細胞応答を増強す

ることで、抗腫瘍効果をもたらすこと、また抗PD-1/PD-L1抗体との併用により極めて強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueha S, Yokochi S, Ishiwata Y, Ogiwara H, Chand K, Nakajima T, Hachiga K, Shichino S, Terashima Y, Toda E, Shand FH, Kakimi K, Ito S, Matsushima K. Robust anti-tumor effects of combined anti-CD4 depleting antibody and anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibody treatment in mice. *Cancer Immunol Res.* in press, 2015.
2. Matsushita H, Hosoi A, Ueha S, Abe J, Fujieda N, Tomura M, Maekawa R, Matsushima K, Ohara O, Kakimi K. Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN γ -dependent cell-cycle arrest. *Cancer Immunol Res.* 3(1):26-36, 2015.
3. Shand FH, Ueha S, Otsuji M, Koid SS, Shichino S, Tsukui T, Kosugi-Kanaya M, Abe J, Tomura M, Ziogas J, Matsushima K. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(21):7771-6, 2014.

2. 学会発表

1. Tracking of inter-tissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. Satoshi Ueha, Francis Shand, Mikiya Otsuji, Shigeyuki Shichino, Tatsuya Tsukui, Mizuha Kosugi, Jun Abe, Michio Tomura, Kouji Matsushima. The 22th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages(神戸). 2014年6月2-3日.
2. 担癌マウスにおける腫瘍浸潤マクロファ

ージの起源：脾臓および骨髄由来単球の動態. 上羽悟史、Francis Shand、津久井達也、七野成之、戸村道夫、松島綱治. 第35回日本炎症・再生医学会(沖縄). 2014年7月1-4日.

3. Synergistic anti-tumor effect of CD4 depleting antibody with anti-immune checkpoint antibodies in murine tumor models. Yoshiro Ishiwata, Shoji Yokochi, Kazuhiro Kakimi, Satoshi Ueha, Satoru Ito, Kouji Matsushima. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
4. Administration of anti-CD4 depleting antibody together with anti-PD-1/anti-PD-L1 antibody shows dramatic anti-tumor effects in mice. Yoshiro Ishiwata, Shoji Yokochi, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Satoshi Ueha, Kouji Matsushima. 第43回日本免疫学会学術集会(京都). 2014年12月10-12日.

出願人：国立大学法人東京大学、IDACセラノステイクス株式会社

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称：「免疫チェックポイント制御剤の副作用低減方法」
出願国：日本
出願番号：特願 2014-120245
出願日：2014年9月3日
発明人：伊藤哲、横地祥司、松島綱治、上羽悟史、石渡義郎
出願人：IDACセラノステイクス株式会社、国立大学法人東京大学
2. 特願2014-12030「固形がんの治療剤」、国内優先権出願 平成26年6月11日、特願 2014-178953「固形がんの治療剤」、国内優先権出願 平成26年9月3日
新規PCT出願 PCT/JP2015/053569「固形がんの治療剤」
3. 発明の名称：「抗CD4抗体を有効成分とする抗がん剤の治療効果を判定する方法」
出願国：日本
出願番号：特願 2014-243858
出願日：平成26年12月2日
発明人：松島綱治、上羽悟史、伊藤哲、横地祥司、石橋義郎