

**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）**

分担研究報告書

プロトコール作成細胞製剤の調製、免疫解析

研究分担者：神奈木真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する治療には、即効性のある導入療法とともに長期間有効な寛解維持療法が必要である。現時点では、同種造血幹細胞移植療法が長期寛解を得る治療法として認知されているが同時に重篤な副作用の危険がある。我々は ATL に対する幹細胞移植療法に関して 12 年間の臨床-基礎共同研究を行い、移植後の ATL 症例から Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の主要認識エピトープを同定し、CTL エピトープ部位の Tax ペプチドを用いた抗腫瘍ワクチン療法の開発を行った。本年度は 2012 年に開始した臨床研究「成人 T 細胞白血病(ATL)に対する HTLV-1 Tax 特異的 T 細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法第 I 相試験」に参加した ATL 患者 3 症例の経過および免疫応答の追跡を行うとともに、抗 CCR4 抗体医薬モガリズマブと Tax ペプチドパルス樹状細胞ワクチンを併用した新規複合的ワクチン療法「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法」の実用化を目指し医師主導臨床治験の第 Ia/Ib 相試験実施の手続きを進めた。この際 PMDA の指導を仰ぐため頻回の事前面談を経て対面助言を受け、本臨床治験の実施にあたり明確にしておく必要のあった Tax ペプチドパルス樹状細胞の品質安定性について追加検討を行い、さらに今後多施設での治験実施を可能にするため、製品運搬による品質安定性について健常者アフエーシス検体を用いて検討した。これらの結果を踏まえ試験実施計画書を作成提出し治験準備が整った。

A. 研究目的

ATL 患者に対する Tax 特異的 CTL 応答の強化を意図した、CTL エピトープ部位のペプチドを付加した自家樹状細胞 (DC) 免疫ワクチン療法の確立を目的とする。本年度は、新規にモガムリズマブとワクチンの併用療法の実用化を目指した臨床治験に向けて、Tax ペプチドパルス樹状細胞の保存や運搬による品質安定性を検討した。

B. 研究方法

1. Tax ペプチドパルス DC 免疫ワクチン療法施行後の ATL 患者の免疫解析

末梢血単核球の細胞表面抗原、HLA/Tax ペプチドテトラマー染色による CTL 頻度の解析、Tax 抗原および CMV に対する応答性をフローサイトメトリーで評価した。

2. 新規「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法第 Ia/Ib 相試験」に向けての準備

医師主導臨床治験の承認を受けるため、申請に必要なプロトコール作成、安全性試験、品質試

験に関する班員による打ち合わせを九州または東京で頻回に行い、複数回の PMDA への事前面談・対面助言を経て、申請書類の作成を行った。

3. 健常者アフエーシス検体を用いた Tax ペプチドパルス樹状細胞の長期保存・搬送による品質安定性に関する試験

- i) 凍結された Tax ペプチドパルス樹状細胞を解凍してワクチンに供されるため、一定期間 (0, 2, 3 ヶ月) 凍結後の製品の品質について、アロ CD4+T 細胞刺激能 (MLR) を指標に評価した。
- ii) 一定期間 (0, 2, 3 ヶ月) 凍結された Tax ペプチドパルス樹状細胞を九州大学より当大学へドライシッパーを用いて搬送し、解凍後の製品の品質について、生細胞数、DC の細胞表面形質 (CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR) を指標に評価した。

(倫理面への配慮)

「成人 T 細胞白血病(ATL)に対する HTLV-1 Tax 特異的 T 細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法第 I 相臨床試験」

は、九州大学と東京医科歯科大学の倫理審査委員会により承認済みである。新規の治験計画「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法第 1a/1b 相試験」については、九州がんセンターの倫理審査委員会で承認され、現在東京医科歯科大学に申請中である。

C. 研究結果

1. 既に実施された Tax ペプチド添加 DC ワクチン療法第 I 相試験に参加した ATL 患者の免疫応答追跡

現在、九州がんセンター病院でフォローアップされている第 I 相臨床試験参加 ATL 患者 3 名の T 細胞応答解析を行った。3 例のうち 2 例は部分寛解となりワクチン接種後現在まで（それぞれ 2 年と 1 年半）無治療で経過しており、1 例は病状が安定していたが徐々に進行し 14 ヶ月目から別の治療が加えられた。3 症例とも DC 接種開始から 16-20 週目の末梢血検体で、培養中に Tax 特異的 CTL の増殖が観察された。しかし、末梢血 CD8+T 細胞中の Tax 特異的テトラマー陽性 CTL の機能（増殖能、IFN γ 産生能）は、部分寛解の症例で、ワクチン接種開始から 6 ヶ月以降しだいに低くなった。病状の進行が見られた症例では Tax 特異的 CTL の機能は保たれていたが、リンパ節生検で腫瘍細胞の Tax 発現能が乏しい事が分かった。

2. 一定期間（0, 2, 3 ヶ月）凍結保存後の Tax ペプチドパルス樹状細胞製品の品質評価

各期間凍結保存後に解凍した樹状細胞をアロ CD4+T 細胞と 4 日間共培養したところ、試験したすべての樹状細胞がアロ CD4+T 細胞刺激能を有していることがわかった。

3. 凍結 Tax ペプチドパルス樹状細胞運搬後の製品の品質評価

運搬された凍結細胞の生細胞数・細胞表面形質について、運搬による大きな影響は認められなかった。

D. 考察

既に実施した Tax ペプチド添加樹状細胞療法の第 I 相臨床試験に参加した ATL 症例では、ワクチン接種後 1 年以上の無治療期間が得られ、免疫解析では Tax 特異的 CTL の活性が検出された。このことから、ATL に対する腫瘍ワクチン療法は安全で今後有望な治療方法と考えられる。しかし、時間経過とともに CTL 機能の低

下が認められ、免疫抑制に抗する工夫が必要と考えられた。

これまでの研究成果を踏まえ、現在準備を進めているモガムリズマブと Tax ペプチドパルス DC ワクチンの併用療法「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法」では、モガムリズマブにより CCR4 陽性の ATL 細胞とともに制御性 T 細胞の減少が期待され、ATL 患者における免疫抑制が軽減される可能性がある。

抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法」を新規医師主導臨床治験として実施するため行った、健常者のアフェレーシス検体を用いた製品（Tax ペプチドパルス樹状細胞）の長期凍結保存・運搬後の品質安定性試験では、長期保存や運搬による品質への影響は大きくないことが確認された。この結果から、Tax ペプチドパルス樹状細胞を用いた臨床治験は品質の面では、実施可能であるとともに、運搬による他施設実施も可能であると考えられた。

E. 結論

新規の医師主導臨床治験「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法」の治験実施に向けて、治験製品の保存・運搬による製品の品質安定性が確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Matsuoka M, Takamori A, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, Fukuda T, Miura O, Takaishi S, Teshima T, Akashi K, Kannagi M, Uike N, Okamura J. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T-cell leukaemia/lymphoma in a pilot study. *British journal of haematology*, (2015). doi: 10.1111/bjh.13302
2. Kinpara S, Ito S, Takahata T, Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T. & Kannagi M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and antisense viral RNA in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia*, (2015). doi: 10.1038/leu.2015.1
3. Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J,

- Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*, (2014).
4. Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama A, Fujii H, Hasegawa A, Kannagi M, Ansari A. A, Saito M, Elimination of human T cell leukemia virus type-1-infected cells by neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity-inducing antibodies against human T cell leukemia virus type-1 envelope gp46. *AIDS Res Hum Retroviruses* **30**, 542-552 (2014).
 5. 神奈木真理, 長谷川温彦, 金原秀一, 末廣陽子. 成人 T 細胞白血病に対する免疫療法 (AZT/IFN- α , 骨髄移植, 樹状細胞ワクチンなど). *血液フロンティア*, 医薬ジャーナル社 24: 1631-8, 2014

2. 学会発表 《国際学会》

1. Kannagi M, Kinpara S, Hasegawa A. Impact of interferon response in HTLV-1 infection: a molecular mechanism of AZT/IFN- α therapy for ATL (Invited speaker). IVth Carcinogenic Spiral International Meeting, February 10-11, 2014, Sapporo.
9. Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, Takatsuka N, Maeda Y, Masuda T, Kannagi M. CTL epitope peptide-pulsed dendritic cell vaccine has the potential to restore HTLV-1-specific CTLs to eliminate infected cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都
10. Murakami Y, Ando S, Tanaka Y, Tanaka R, Masuda T, Kannagi M, Hasegawa A. Evaluation of anti-gp46 neutralizing monoclonal antibody vaccine against primary HTLV-1 infection to rats. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都
11. Kinpara S, Saitoh Y, Hasegawa A, Nakamura M, Yamaoka S, Matsuoka M, Masuda T, Kannagi M. A link between HTLV-1 leukemogenesis and innate immunity; involvement of PKR in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都市

《国内学会》

1. 神奈木真理. HTLV-I 感染の免疫学, 日本 HTLV-1 学会設立記念シンポジウム. 2014 年 2 月, 東京
2. Kannagi M. Immune control of the retrovirus-induced adult T-cell leukemia: fighting with invisible enemy. 第 73 回日本癌学会総会シンポジウム 2014 年 9 月, 横浜
3. Kinpara S, Saitoh Y, Hasegawa A, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, Kannagi M. Involvement of PKR and anti-sense HTLV-1 transcripts in the constitutive activation of NF κ B in ATL cells. 第 73 回日本癌学会 9/25-27/2014 横浜
4. Kannagi M, Hasegawa A, Kinpara S, Suehiro Y. The roles of acquired and innate immunity in HTLV-1 infection: Implication for therapy and pathogenesis. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム (S06 ウイルス感染に対する免疫応答) 2014 年 11 月 10-12 日、横浜

5. 神奈木真理. 成人 T 細胞白血病の基礎免疫研究から発予防・治療ワクチンへ」第 18 回日本がん免疫学会モーニングレクチャー (2) 臨床 2014 年 8 月

6. 金原秀一、斉藤愛記、長谷川温彦、宇都宮與、増田昌人、宮崎泰司、松岡雅雄、中村正孝、山岡昇司、増田貴夫、神奈木真理. ATL 細胞内 NF- κ B 経路活性化に対する PKR 分子と HTLV-I LTR 領域由来転写産物の寄与. 2014 HTLV-1 学会 8/23-24/2014

7. 伊藤さやか、金原秀一、金井秀美、野上開、Sawada L, 永野佳子、長谷川温彦、神奈木真理. HTLV-1 感染細胞における自然免疫応答の検討. 2014 HTLV-1 学会 8/23-24/2014

8. 安藤聡美、長谷川温彦、村上悠二、神奈木真理. CTL エピトープペプチドパルス樹状細胞によるウイルス特異的 T 細胞の誘導および感染細胞の制御. 血液疾患免疫療法学会 京都 9/5-6, 2014.

9. Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, Takatsuka N, Maeda Y, Masuda T, Kannagi M. CTL epitope peptide-pulsed dendritic cell vaccine has the potential to restore HTLV-1-specific CTLs to eliminate infected cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都

10. Murakami Y, Ando S, Tanaka Y, Tanaka R, Masuda T, Kannagi M, Hasegawa A. Evaluation of anti-gp46 neutralizing monoclonal antibody vaccine against primary HTLV-1 infection to rats. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都

11. Kinpara S, Saitoh Y, Hasegawa A, Nakamura M, Yamaoka S, Matsuoka M, Masuda T, Kannagi M. A link between HTLV-1 leukemogenesis and innate immunity; involvement of PKR in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 玉井洋太郎、長谷川温彦、神奈木真理、田野崎隆二. HLA-DR1 拘束性 HTLV-1 Tax 特異的 CD4+T 細胞エピトープ. 平成 25 年 1 月 9 日出願 (特願 2013-002127、東京医科歯科大学)
2. 原嶋奈々江、神奈木真理、田野崎隆二. 「HLA-A11 拘束性 Tax 特異的抗腫瘍エピトープ」平成 25 年 1 月 18 日特許取得 (国内特許第 5176099 号、東京医科歯科大学)