

**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 ATL に対する樹状細胞ワクチン療法の開発

研究分担者：赤司 浩一 九州大学大学院 医学研究院 教授

研究要旨

我々は、九州大学イノベーションセンター、同医学研究院 病態修復内科学、同医学研究院 病態制御内科学、九州がんセンター血液内科、東京医科歯科大学 免疫治療学分野などの医療機関、研究機関と共同で、成人 T 細胞性白血病に対する樹状細胞療法の医師主導治験の基盤整備を独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との協議を進めながら行なった。特にイノベーションセンター細胞調整室(CPC)における GMP グレードの細胞調整を確立し、CPC 運用に加えて、本治験の樹状細胞製剤製造に特化した標準作業手順書を完成させた。さらに、実際の治療を想定した 3 名の健常人のアフェレーシスを行い、これらのアフェレーシス産物に由来する末梢血単核球を用いて、治験と同様のスケール、グレードで樹状細胞製剤の製造を行ない各工程の適切性の確認、その製剤を用いて品質の評価、安定性、毒性試験など前臨床の各種の試験を行った。その結果、最終製剤製造までの工程上の SOP は問題ないこと、最終製剤の安全性、安定性、品質など治験として問題なく行えることを確認し PMDA に報告した。そしてこれらの成果をもとに学内の治験審査委員会に「成人 T 細胞白血病の治癒を目指した病因ウイルス特異抗原を標的とする新規複合的ワクチン療法：抗 CCR4 抗体を併用した樹状細胞療法 第 I/II 相試験」として治験の承認申請をした。

A. 研究目的

これまでの成人 T 細胞白血病（ATL）に対する樹状細胞療法の臨床試験の経験及び基礎的検討をもとに、医師主導治験としての樹状細胞ワクチン療法の開発と細胞療法のための組織、ハード的な基盤を構築し、実際に治験を行なう上で必要な非臨床のデータを集積し、医師主導治験を行い樹状細胞療法の安全性を証明することが目的である。

B. 研究方法

医師主導治験に向けての基盤構築が主な研究内容である。特に、細胞加工製品としての治験薬である樹状細胞の非臨床安全性評価及び品質、安定性に関連した試験を行い、それらの結果に基づいた資料、ワクチン療法の具体的なプロトコールを作成し、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）への治験届け、治験審査委員会に必要な安定性、品質、毒性などの評価を目的とした前臨床の試験を行う。これらの試験は共同研究機関と協議しながら行う。これらの結果、考察から治験としての九州大学での樹状細胞製剤の製造を徐々に具体化、実現化

する。すなわち、医師主導治験でのGMP(Good Manufacturing Practice: 薬事法に基づく厚生労働大臣が定めた、医薬品等の品質管理基準)に準拠したCPCの運用の元での治験実施体制の構築を行う。さらに、前臨床段階の検証として、健常人ドナーからの末梢血単核球を用いて実際にCPCでGMPに準拠した治験と同一のプロセスで最終製品である樹状細胞製剤を製造することで、安全性、品質などを評価する。

（倫理面への配慮）

健常人ドナーからの末梢血単核球採取及び細胞培養、加工に関しては、九州大学学内の倫理委員会の承認を得ている。また、治験に関しても九州大学病院の治験倫理審査委員会に承認申請中である。

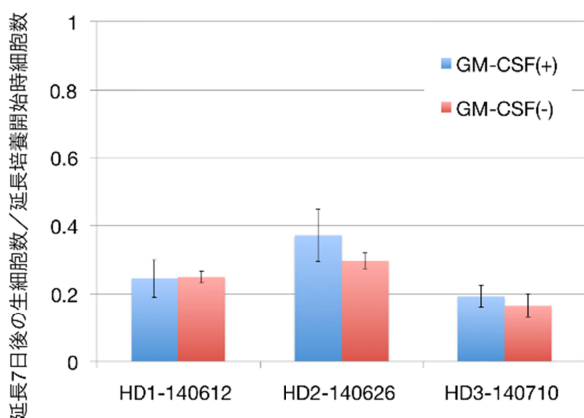
C. 研究結果

PMDA との協議の上、我々（九州大学を含む共同研究機関）が行うべき試験に関して、細胞製剤であるという特性を踏まえた上で、助言を頂いた。特に、九州大学では、造腫瘍性に関し

て延長培養試験（予定の期間を超えて培養した細胞の特性指標の検討）、軟寒天コロニー形成試験による「細胞の形質転換能」、「サイトカイン非依存性増殖能」、「足場非依存性増殖能獲得の有無」などの評価と製剤の凍結保管における安定性の評価について、健康成人由来白血球から製造した製剤を用いて行なうことになった。健康成人3例（HD1-140612、HD2-140626、HD3-140710）からの樹状細胞誘導は特に問題なく行うことができ、得られた製剤の表面マーカーはTable1に示している。

延長培養は、健康人末梢血に由来する製剤を製造後、引き続き培養を続けた場合に、細胞数の増加を評価することで形質転換や異常増殖がおこるかどうかを評価することを目的に行った。図1にあるように、樹状細胞を刺激するサイトカインである GM-CSF の有無に関わらず、細胞数の増加はまったく認めなかった。

図1. 予定の期間を超えて培養した細胞の特性



軟寒天コロニー形成試験も健康人末梢血に由来する樹状細胞製剤を用いて行った。健康人3人ともコロニーの増殖はなく細胞の形質転換、サイトカイン非依存性増殖、足場非依存性増殖能獲得はなかった。陰性コントロールとして細胞株 MRC-5、陽性コントロールとして HeLa を用いた。コロニー数の変化に関するグラフを図2に示す。

製剤の凍結後の安定性に関しては、細胞数、生細胞率として図3に示しているが、健康人3例のうち、1例は6ヶ月間の凍結保存においても生細胞率、細胞数ともに安定していた。

図2. 軟寒天コロニー形成確認試験

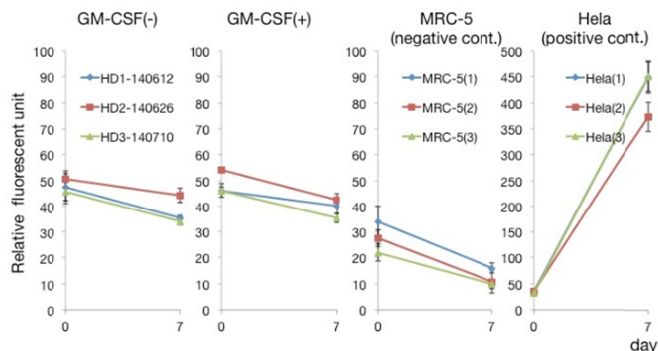
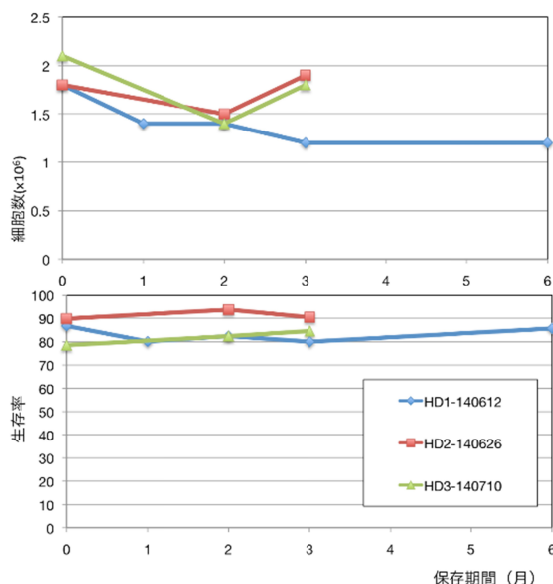


図3. 凍結後安定性試験（細胞数と生存率）



2例は、3ヶ月間までしか評価していないが安定していた。細胞の表面抗原に関してはフローサイトメトリー法で評価しているが、その陽性率は、Table.1に示しているが、いずれの場合も製剤の段階での陽性率、凍結融解後の陽性率に大きな違いはなかった。代表データとして、HD1-140612の製剤、3ヶ月間の凍結融解後サンプル、6ヶ月間の凍結融解後のサンプルについて、フローサイトメトリーの結果のヒストグラムを図4から6に示す。

Table1-1

HD1-140612	表面マーカー	製剤	凍結後1ヶ月	凍結後2ヶ月	凍結後3ヶ月	凍結後6ヶ月
樹状細胞誘導の表面マーカー (全体での割合 %)	CD11c	88.6	90.6	90.8	89.3	88.9
	CD14	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5
	HLA-DR	90.2	91.7	91.9	89.5	90.0
	CD40	31.0	20.6	13.9	45.2	58.5
	CD80	90.0	91.1	91.5	86.6	88.4
	CD83	90.2	91.7	91.9	89.5	90.0
	CD86	88.6	85.4	82.9	82	79.7
	CD11c+HLA-DR	89.8	91.7	91.1	89.4	89.4
リンパ球の表面マーカー (全体での割合 %)	CD3	2.9	3.4	4.2	4.2	4.1
	CD19	1.7	0.9	1.3	1.3	3.5
	CD56+CD3+	0.1	0.0	0.09	0.08	0.1
	CD4+CD25+	0.7	0.8	1.0	0.9	0.7

Table.1-2

HD1-140626	表面マーカー	製剤	凍結後 2ヶ月	凍結後 3ヶ月
樹状細胞由来の 表面マーカー (%)	CD11c	93.9	95.5	95.9
	CD14	0.0	0.0	0.0
	HLA-DR	95.3	96.9	97.1
	CD40	57.3	71.1	72.4
	CD80	95.2	96.6	97.1
	CD83	95.3	96.9	97.1
リンパ球の表面 マーカー (%)	CD86	84.1	98.6	96.4
	CD11c+HLA-DR	95.4	96.1	96.4
	CD3	1.0	1.7	1.3
	CD19	0.4	0.3	0.6
CD86+CD3	0.1	0.1	0.5	
	CD4+CD25	0.2	0.3	0.2

Table.1-3

HD1-140710	表面マーカー	製剤	凍結後 2ヶ月	凍結後 3ヶ月
樹状細胞由来の表 面マーカー (全等 体の割合 %)	CD11c	70.4	70.4	70.8
	CD14	0.1	0.2	0.2
	HLA-DR	76.9	77.1	76.3
	CD40	26.9	30.9	18.9
	CD80	75.0	75.5	76.2
	CD83	76.9	77.1	76.3
リンパ球の表面 マーカー (全等 体の割合 %)	CD86	74.8	71.2	71.8
	CD11c+HLA-DR	72.7	72.5	72.6
	CD3	8.5	11.5	11.0
	CD19	6.2	5.6	5.9
CD86+CD3	1.2	0.7	0.8	
	CD4+CD25	1.3	1.5	1.4

図 4. HD1-140612 の製剤の表面抗原

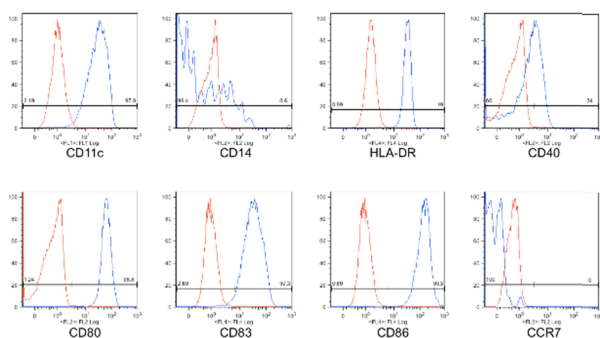


図 5. HD1-140612 の凍結 3 ヶ月後融解した細胞の表面抗原

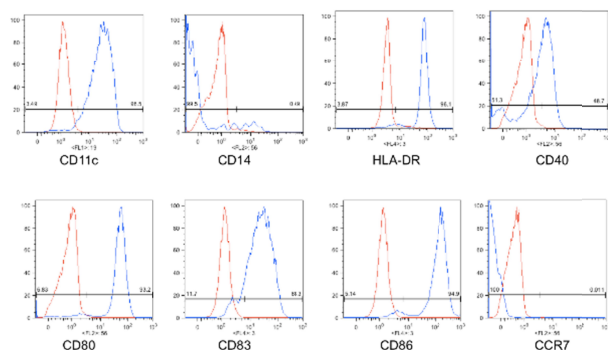
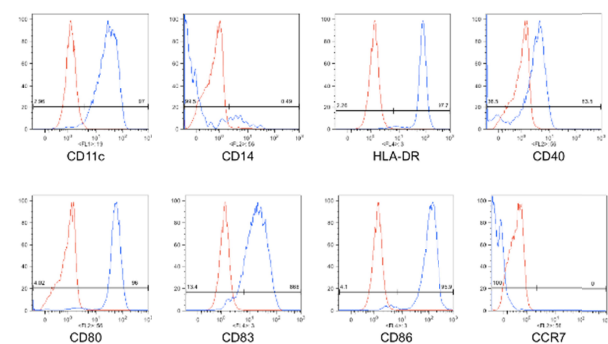


図 6. HD1-14061 の凍結 6 ヶ月後融解した細胞の表面抗原



D. 考察

製剤の承認申請に必要な試験としては、品質及び安全性に関する試験と非臨床安全性に関する

る試験を、品質及び安全性に関しては、原薬及び製剤についてそれぞれ製造方法、規格及び試験方法、並びに安定性試験に関する資料の提出を、非臨床安全性に関しては、薬理試験（効力を裏付ける試験、吸収、分布、代謝、排泄などの薬物動態試験）、動物実験による毒性試験を行う必要がある。本治験製剤が細胞製剤という特殊性を加味すると、従来の化学物質の製剤に求められる安全性試験、非臨床試験は困難なものがあ。そこで PMDA との治験についての協議を経た上で、造腫瘍性に関して延長培養試験（予定の期間を超えて培養した細胞の特性指標の検討）、軟寒天コロニー形成試験による「細胞の形質転換能」、「サイトカイン非依存性増殖能」、「足場非依存性増殖能獲得の有無」などの評価と製剤の凍結保管における安定性の評価について、健康成人由来白血球から製造した製剤を用いて行なうことになった。また、延長培養試験を行うことで、製剤製造後、引き続き培養を続けた場合に、細胞数の増加を評価することで形質転換や異常増殖がおこるかどうかを評価した。動物実験による毒性試験、安定性試験については行なっているが、現在解析中である。

以上の結果、健康人由来製剤では、安全性、凍結後の安定性に関して問題ないことがほぼ証明された。今後は、実際の患者からのサンプルを用いて評価することが必要になる可能性があり、これは治験を行ないながら慎重に確認していく。

E. 結論

本治験で用いる予定の製剤である健康人末梢血由来の樹状細胞製剤に、造腫瘍性は認められず、安定性も確認でき、実際の患者から製造した樹状細胞製剤を患者に投与する治験を行うことに関しては妥当であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yuda J, Kato K, Kikushige Y, Ohkusu K, Kiyosuke M, Sakamoto K, Oku S, Miyake N, Kadowaki M, Iino T, Tanimoto K, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Shimono N, Teshima T, Akashi K. Successful treatment of invasive zygomycosis based on a prompt diagnosis using molecular methods in a patient with acute myelogenous leukemia. Intern Med 53: 1087-1091, 2014

2. Takashima S, Miyamoto T, Kadowaki M, Ito Y, Aoki T, Takase K, Shima T, Yoshimoto G, Kato K, Muta T, Shiratsuchi M, Takenaka K, Iwasaki H, Teshima T, Kamimura T, Akashi K. Combination of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as a consolidation therapy after autologous stem cell transplantation for symptomatic multiple myeloma in Japanese patients. *Int J Hematol* 100: 159-164, 2014
3. Takashima S, Eto T, Shiratsuchi M, Hidaka M, Mori Y, Kato K, Kamezaki K, Oku S, Henzan H, Takase K, Matsushima T, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T. The use of oral beclomethasone dipropionate in the treatment of gastrointestinal graft-versus-host disease: the experience of the Fukuoka blood and marrow transplantation (BMT) group. *Intern Med* 53: 1315-1320, 2014
4. Takenaka K, Akashi K. [New approaches to target leukemia stem cells]. *Nihon Rinsho* 72: 1018-1025, 2014
5. Kato K, Choi I, Wake A, Uike N, Taniguchi S, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Nakamae H, Oku E, Murata M, Eto T, Akashi K, Sakamaki H, Kato K, Suzuki R, Yamanaka T, Utsunomiya A. Treatment of Patients with Adult T Cell Leukemia/Lymphoma with Cord Blood Transplantation: A Japanese Nationwide Retrospective Survey. *Biol Blood Marrow Transplant* 20:1968-74,2014

賞講演) 2014年11月2日、大阪(大阪国際会議場)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

2. 学会発表

1. 『Cancer Stem Cell』 赤司浩一、第87回日本内分泌学会学術総会(教育講演)2014年4月24日、福岡(福岡国際センター)
2. 『造血器腫瘍幹細胞』 赤司浩一、第3回日本血液学会東海地方会(共催セミナー)2014年4月26日、名古屋(名古屋大学医学部附属病院)
3. 『TIM-3, as a Target for Eradication of Cancer Stem Cells』 The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014年6月17日、東京(ハイアットリージェンシー東京)
4. 『造血器腫瘍幹細胞』 赤司浩一、第101回近畿血液学地方会(特別講演)2014年6月28日、大阪(テイジンホール)
5. 『白血病幹細胞研究のすゝめ』 赤司浩一 第76回日本血液学会学術集会(学会賞受