

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

**ハイブリッドロングペプチドを用いた革新的次世代
がん治療用ワクチンの開発とその臨床効果**

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北村 秀光

平成26(2014)年 5月

目 次

・総括研究報告

ハイブリッドロングペプチドを用いた革新的次世代がん治療用ワクチンの開発と その臨床効果	-----	3
北村 秀光		

・分担研究報告

1 . ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療におけるがん抗原解析 および免疫モニタリングに関する研究	-----	12
北村 秀光・喜多 俊行		
2 . 進行・再発大腸癌に対するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン 治療に関する研究	-----	18
奥野 清隆・武富 紹信		
3 . 進行・再発乳癌に対するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療 に関する研究	-----	23
菰池 佳史・山下 啓子		

・研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27
-----------------	-------	----

・研究成果の刊行物・別刷	-----	31
--------------	-------	----

・ 総括研究報告

ハイブリッドロングペプチドを用いた革新的次世代がん治療用ワクチンの開発とその臨床効果

研究代表者 北村 秀光 北海道大学遺伝子病制御研究所 准教授

研究要旨：

本研究事業において、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化させるハイブリッドロングペプチドを用いたがん患者に対するがんペプチドワクチン臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを開発する。

これまで北海道大学病院、北海道大学遺伝子病制御研究所および近畿大学医学部倫理委員会において承認された自主臨床試験実施計画書に従い、昨年度に引き続き、腫瘍にSurvivinを発現している進行・再発大腸癌(UMIN000007506)あるいは乳癌(UMIN000007507)を対象に、ハイブリッドロングペプチドを用いた、がんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験を実施した。

平成25年度には、大腸癌10例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、9例に対してワクチン投与を実施した。乳癌では1例のエントリーがなされ、内1例にワクチンを投与した。ワクチン投与を行った被験者の免疫モニタリングを実施し、前年度までにエントリーした被験者も含め、大腸癌28例、乳癌2例について抗腫瘍免疫応答を評価した。その結果、ワクチン投与後、大腸癌27例、乳癌2例において、Survivinがん抗原特異的な抗体価の上昇、あるいはT細胞応答を認めた。さらに本探索的Ⅱ相臨床試験に付随して実施したバイオマーカー研究を実施し、被験者の血液検体を使用した抗原特異的抗体価のサブクラス解析とTh1/Th2免疫バランスを指標とした解析が有効であることを見出した。本試験の完遂20症例について抗腫瘍効果に関する中間評価および追跡調査を実施し、総合的に判定することとした。

最終的に、本臨床研究において得られたTh1型免疫応答を効率よく惹起する、ハイブリッドロングペプチドワクチンの投与による抗腫瘍効果・副作用の有無を精査することにより、患者のQOLを維持しつつ治療を行える日本発の安全かつ効果の高いがん免疫治療の医師主導型あるいは企業主導治験への橋渡しが可能と考える。

研究分担者

喜多 俊行 北海道大学遺伝子病制御研究所
免疫制御分野 助教
奥野 清隆 近畿大学医学部外科 教授
菰池 佳史 近畿大学医学部外科 教授
武富 紹信 北海道大学大学院医学研究科
消化器外科学分野Ⅰ 教授
山下 啓子 北海道大学大学院医学研究科
乳腺外科学分野 教授

Ⅱ相自主臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを高度医療評価制度あるいは医師主導治験へ橋渡しするためのエビデンスを得ることで、医薬品の早期製造承認へ結びつける。

がんは依然として我が国の死亡原因、第1位であり、既存の標準治療に加えて革新的次世代がん治療法の開発が望まれている。これまでにマウスがん治療モデルを駆使した前臨床試験により、担がん生体で免疫応答を惹起するためにはTh1細胞を基軸とした、Tc1細胞の持続的な活性化が必須であることを明らかにしてきた。この基盤的がん免疫研究成果をヒトへと臨床応用するために、ヘルパーT細胞と

A. 研究目的

本研究において、ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化するヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチドを用いた探索的Ⅱ

キラ T細胞を同時に活性化するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療を構築した。本事業に先行してMAGE-A4およびSurvivinがん抗原を標的として作成したハイブリッドロングペプチドを用いた探索的Ⅰ相自主臨床試験を実施した結果、ワクチンの安全性に加え、実際に、がん特異的なヘルパーT細胞、キラート細胞、および抗体価の上昇がワクチン投与後の早い段階で確認された。さらに、一部の症例においてはCT画像上のがん消失などの臨床効果例も認められたことから、キラート細胞のみを活性化させる従来型のショートペプチドのみならず、Th細胞を活性化させるヘルパーエпитープも含んだ新たなロングペプチドが革新的がんワクチン治療の開発に重要であることが示唆された。

本研究事業においては、ヘルパーT細胞とキラート細胞の両者を同時に活性化できるハイブリッドロングペプチドの臨床研究結果をもとに、がんワクチン投与による抗腫瘍効果を検証する探索的Ⅱ相臨床試験研究を実施し、世界の次世代がんワクチン開発研究に遅れをとらない日本発の革新的がん免疫治療用ワクチンを開発する。

B. 研究方法

1. がんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験におけるがん抗原解析および免疫モニタリングに関する研究

今年度において、研究代表者・分担者である北村・喜多を中心に、本臨床試験にエントリーした被験者検体を用いてがん抗原解析、がん抗原特異的免疫応答を評価する免疫モニタリングを実施する。

腫瘍組織におけるSurvivinの発現について、これまで整備した標準化免疫染色法による評価と組織標本より抽出した遺伝子の発現を定量PCR法により解析を行う。

ワクチン投与による抗腫瘍免疫応答について、被験者血液検体を用い、本研究事業で標準化されたELISA法による抗Survivin抗体価の測定、ELISA法およびELISPOT法によるSurvivin抗原特異的T細胞応答の解析を実施する。

また昨年度に引き続き、多施設共同による対象患者のSurvivinがん抗原発現解析、がん抗原特異的抗体価、およびT細胞応答評価についてセントラル化を行う。

2. 大腸癌および乳癌を対象とするハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験に関する研究

昨年度に引き続き、大腸癌、乳癌を対象にSurvivinを標的抗原としたハイブリッドロングペプチドを用いたがん免疫治療の探索的Ⅱ相臨床試験を北海道大学遺伝子病制御研究所、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院とで連携して実施する。

研究分担者である奥野・武富は大腸癌、菰池・山下は乳癌を対象としたワクチン治療臨床試験を北海道大学病院と近畿大学医学部附属病院において実施する。

これまで各IRBにおいて承認された自主臨床試験実施計画書に基づき、ワクチン投与による抗腫瘍効果を検証する進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象に、ヘルパー/キラートハイブリッドロングペプチドを用いた癌ワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験(大腸癌:UMIN000007506、乳癌:UMIN000007507)を実施する。

3. がんワクチン治療効果を予見・診断するバイオマーカー研究

本研究事業において、がんペプチドワクチンⅡ相臨床試験の付随研究として、抗腫瘍免疫に関連する制御因子を探索・同定するバイオマーカー研究を実施する。

臨床試験の過程で得られる被験者のがん組織、血清、および末梢血リンパ球を精査し、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となるような標的分子を探索・同定する。抗腫瘍免疫応答と臨床効果とが相関する因子の解析方法および評価体制を確立する。

臨床検体を用いた各種バイオマーカーの解析法の設定は、北村・喜多を中心に行い、得られた結果と臨床データとの相関を解析する項目、測定方法は奥野・菰池・武富・山下が連携して行う。

(倫理面への配慮)

がんワクチン治療臨床試験は、北海道大学遺伝子病制御研究所と連携し、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院で実施する。本臨床試験は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、臨床試験計画書、試験薬概要書、症例報告書、

手順書等を準備し、各大学、各施設倫理委員会の承認を得た上で実施している。

本研究に用いるヒト検体については、本研究の趣旨を十分に説明し、文書による同意を得た上で、提供される。検体の提供者、その家族、血縁者および関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分に配慮し、研究を遂行する。本研究は、各施設の倫理審査委員会の承認を得て実施している。

また、北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野に臨床試験研究事務局を置き、北海道臨床開発機構や北海道大学病院高度先進医療支援センターと連携しながら、健康危険情報を含む全ての情報について各施設の研究者と共有できるようにシステムを組んでいる。

C. 研究結果

昨年度に引き続き、北海道大学病院、北海道大学遺伝子病制御研究所および近畿大学医学部倫理委員会において承認された自主臨床試験実施計画書に従い、進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象に、ヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験を実施した。

今年度には、大腸癌10例について同意取得によるエントリーがあり、引き続きSurvivinがん抗原の発現解析、HLAタイプの解析、各種検査などを実施し、所定の基準を満たした、9例に対してワクチン投与を行った。乳癌では1例のエントリーがなされ、内1例にワクチンを投与した。

これまでエントリーした被験者において、Survivin抗原の発現の有無を確認したところ、解析を行った38例(大腸癌35例、乳癌3例)中、大腸癌34例、乳癌3例が陽性であった。また、HLA型の解析を実施したところ、大腸癌35例中34例、乳癌3例中、3例が適格であった。

今年度において、各参画施設よりワクチン投与後、直ちに試験を中止すべき重篤な有害事象(SAE)の報告はなかった。また、これまで重篤な有害事象は発生した際の対応として、すみやかに新規エントリーおよびすべてのワクチン治療を中断するとともに、新規エントリーの再開および試験全体の継続の可否については、効果・安全性評価委員による審議により決定するとしていたが、治療を担当する医師からの提案により、明らかに本治療と因果関係がないと担当医師が判断した場合、新規エントリーは中止するが、他に実施中のワクチン治療は継続し、

新規エントリーの再開および試験全体の継続の可否については、効果・安全性評価委員による審議により決定する、と修正した計画書類を自主臨床試験研究倫理審査委員会に提出し、審議の結果承認された。

Survivinハイブリッドロングペプチドワクチン治療を実施した、被験者の免疫モニタリングを行った。その結果、ワクチン投与後、大腸癌28例について抗腫瘍免疫応答を評価したところ、26例においてSurvivin抗原特異的な抗体価の上昇、25例において投与ペプチド特異的にIFN- γ を産生するTh1細胞応答、また10例においてTc1細胞応答を認めた。乳癌については2例中1例において、Survivin抗原ペプチド特異的な抗体価の上昇、2例においてTh1細胞応答、また1例においてTc1細胞応答が確認された。

本研究では、治療途中の症例を含め、大腸癌においては、1回ワクチン投与例4名、2回投与例3名、3回投与例1名、4回投与例10名、6回投与例2名、7回投与例1名、8回投与例2名、9回投与例1名、10回投与例1名、11回投与例2名、12回投与例1名、15回投与例1名を得た。今年度において、所定の実施計画書に従い、大腸癌1例について、12回目のワクチン投与終了後に、本人の自由意思、担当医の確認に基づき、任意による13回目以降のワクチン投与の可否について、効果・安全性評価委員による審議がなされた。その結果、試験の継続に関する承認が得られたことから、13回目以降のワクチン投与を実施した。また乳癌においては、1回ワクチン投与例1名、2回投与例1名を得た。

生物統計の専門家の指導のもと、大腸癌35例に対し、臨床評価として、最良総合効果(RECIST規準)による病勢コントロール率(CR+PR+SD)、乳癌においては40例を対象とし臨床的有用率(CR+PR+6ヶ月以上のSD)の評価を主要エンドポイントとして設定した。今年度、試験が終了した大腸癌20例に対して中間評価を開始するとともに、さらに全症例の追跡調査も実施した上で、総合評価として判定することとした。

今年度、がん患者の血液検体について抗腫瘍免疫応答に関係する解析を行った結果、血液検体を使用した解析が有効であること、Th1型免疫応答を惹起し、抗原特異的IgG1およびIgG3抗体の高値、かつIgG4抗体の低値例が良い指標と成り得る可能性が示唆された。

D. 考察

本研究事業において、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチドを用い、がんペプチドワクチン臨床試験を実施し、日本発の革新的な次世代がん免疫治療用ワクチンを開発することを目指している。

これまでに進行・再発大腸癌もしくは乳癌患者を対象にしたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的Ⅱ相臨床試験実施計画書類に基づき、前年度に引き続いて、北海道大学病院、近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携してワクチン治療を問題なく行えたことから、本体制による臨床試験は十分に遂行可能であると考えられた。

今年度末までに、大腸癌35例について同意取得によるエントリーがあり、引き続きSurvivinがん抗原の発現解析、HLAタイプの解析、各種検査などを行い、所定の基準を満たした、29例に対してワクチン投与を実施した。乳癌では3例のエントリーがなされ、内2例にワクチンを投与した。これまでに、ワクチン投与を行った被験者の免疫モニタリングを行った結果、ワクチン投与後、Survivin抗原特異的なTh1細胞依存的な抗体価の上昇およびペプチド刺激特異的にIFN- γ を産生するTh1あるいはTc1細胞応答を認めた症例も認められたことから、本ハイブリッドロングペプチドにより、実際に腫瘍抗原特異的なType1免疫応答を惹起できたものと考えられる。

大腸癌に比べ乳癌において、エントリー数が少ないが、これは、他の有効な制がん剤、ホルモン治療薬等による数多くの標準治療の存在の影響が考えられる。今後、参画した医師と協力・連携し、引き続き募集を継続するとともに、標準治療との併用などの必要性について検討を行っている。

本ハイブリッドロングペプチドワクチン治療については、原疾患の増悪による離脱が散見されるものの、これまで試験全体を中止すべき重篤な有害事象の発生はなく、一部の症例で、長期投与例も散見され、かつワクチンの安全性の再確認がなされていることから、今後の完遂例による抗腫瘍効果の判定も望まれる。

本研究では、ワクチン治療を実施した症例において、先行実施したⅠ相試験の結果と同様に、極めて早い段階でSurvivinペプチド特異的抗体価の上昇とTh1型免疫応答が惹起されていることから、今後、試験を終了した被験者につ

いても、長期追跡調査を実施するとともに、抗腫瘍効果の有無との相関解析を詳細に行なうことで、より精度・効果の高いワクチン治療法の開発に繋がるものと考えている。

また今年度において、臨床試験に登録し、ワクチン投与を行った患者サンプルを使用して、臨床効果を予見し得るバイオマーカーの探索も同時に開始した。その結果、血液検体を使用した解析が有効であること、Th1細胞およびTc1細胞の活性化を惹起し、さらにTh1型の抗原特異的IgG1およびIgG3抗体の高値かつTh2型のIgG4抗体の低値例が一つのバイオマーカーとして有望であると考えられた。

今後、本ペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果を検証するとともに、本ワクチン治療の完遂症例を抗腫瘍効果あるいは抗原特異的免疫応答の有無でグループ分けし、グループ間で見られる抗腫瘍免疫応答に関連する制御因子を詳細に解析し、その臨床効果を予見し得るバイオマーカーの探索・同定も行うことで、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発が可能と考えている。

本治療試験研究を引き続き推進することで、ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化させるハイブリッドロングペプチドワクチンによる、がん治療効果とその抗腫瘍免疫応答に関係する科学的エビデンスが証明できれば、将来的に患者のQOLを維持しつつ治療を行える日本発の革新的がん治療用ペプチドワクチンの医師主導型あるいは企業主導型試験への橋渡しが極めて有望といえる。

E. 結論

本研究において、進行・再発大腸癌あるいは乳癌患者を対象とする探索的Ⅱ相臨床試験が実施され、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化させるハイブリッドロングペプチドの抗腫瘍免疫賦活能および抗腫瘍効果の評価が可能となった。

また、ハイブリッドロングペプチドワクチンを投与した被験者において、安全性の再確認と、これまで整備した標準化免疫モニタリング法による抗腫瘍免疫応答の解析と評価ができた。さらに、多施設でエントリーした被験者の免疫モニタリングの結果、ワクチン投与後、極めて早い段階でのワクチンペプチド特異的抗体価の上昇とT細胞応答の惹起が確認された。がん患者の血液検体を使用したバイオマーカー研究により、被験者の血液検体

を使用した抗原特異的抗体価のサブクラス解析とTh1/Th2免疫バランスを指標とした解析が有効であることが示唆された。

今後、本試験の完遂症例について抗腫瘍効果に関する中間評価および追跡調査を実施し、より精度・効果の高いがんワクチン治療の開発に繋げる事が可能と考えられる。

F . 健康危険情報

本年度、当該研究での臨床試験において、本試験薬と因果関係の疑われる健康危険情報における事項はありません。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohtake J, Ohkuri T, Togashi Y, Kitamura H, Okuno K, Nishimura T. Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine. *Immunol Lett.* 161(1): 20-30, 2014
- 2) Shiohama Y, Ohtake J, Ohkuri T, Noguchi D, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T: Identification of a meiosis-specific protein, MEIOB, as a novel cancer/testis antigen and its augmented expression in demethylated cancer cells. *Immunol Lett.* 158(1-2): 175-182, 2014
- 3) Okuno K, Sugiura F, Inoue K, Sukegawa Y: Clinical trial of a 7-peptide cocktail vaccine with oral chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res.* in press.
- 4) Nakai T, Okuno K, Kitaguchi H, Ishikawa H, Yamasaki M: Unresectable colorectal liver metastases: the safety and efficacy of conversion therapy using hepatic arterial infusion immunochemotherapy with 5-fluorouracil and polyethylene glycol-interferon alfa-2a. *World J. Surg.* 37: 1919-1926, 2013.
- 5) Mizoo T, Taira N, Nishiyama K, Nogami T, Iwamoto T, Motoki T, Shien T, Matsuoka J, Doihara H, Ishihara S, Kawai H, Kawasaki K, Ishibe Y, Ogasawara Y, Komoike Y, Miyoshi S. Effects of lifestyle and single nucleotide polymorphisms on breast cancer risk: a case-control study in Japanese women. *BMC Cancer.* 13: 565, 2013
- 6) Okita Y, Narita Y, Suzuki T, Arita H, Yonemori K, Kinoshita T, Fujiwara Y, Tsuda H, Komoike Y, Nakagawa H, Tamaki Y, Tomita Y, Shibui S, Maruno M. Extended trastuzumab therapy improves the survival of HER2-positive breast cancer patients following surgery and radiotherapy for brain metastases. *Mol Clin Oncol.* 1(6): 995-1001, 2013
- 7) Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int.* 29(11): 1147-52, 2013
- 8) Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura S, Todo S. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology.* 57(6): 2314-25, 2013
- 9) Endo Y, Toyama T, Takahashi S, Yoshimoto N, Iwasa M, Asano T, Fujii Y, Yamashita H. MiR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor α -positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 20(1): 91-102, 2013
- 10) Ohno S, Chow LWC, Sato N, Masuda N, Sasano H, Takahashi F, Bando H, Iwata H, Morimoto T, Kamigaki S, Nakayama T, Nakamura S, Kuroi K, Aogi K, Kashiwaba M, Yamashita H, Hisamatsu K, Ito Y, Yamamoto Y, Ueno T, Fakhrejahani E, Yoshida N, Toi M: Randomized trial of preoperative docetaxel with or without capecitabine after 4 cycles of 5-fluoracil-epirubicin-cyclophosphamide (FEC) in early stage breast cancer: Exploratory analyses identify Ki67 as a predictive biomarker for response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 142(1): 69-80, 2013
- 11) 北村秀光、富樫裕二、西村孝司：革新的癌ワクチン、helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)の開発とその作用, *日本臨牀 増刊号*, 72: 303-308, 2014
- 12) 寺田聖、喜多俊行、北村秀光、西村孝司：IL-17の各種疾病における役割と樹状細胞を介した新たな免疫抑制機構, *臨床免疫・アレルギー科*, 59: 746-756, 2013
- 13) 奥野清隆：13. 大腸癌 c. 直腸進行癌. *消化器疾患最新の治療2013-2014 (編) 菅野健太郎、上西紀夫、井廻道夫、南江堂*, p.232-235, 2013
- 14) 奥野清隆：がん効く薬. *がん医療の今. 第3集. 旬報社. 監修、西尾正道*, p.114-119, 2013
- 15) 奥野清隆、杉浦史哲、助川 寧、井上啓介：

- 大腸癌における免疫療法. 臨床外科68(8): 934-940, 2013
- 16) 裕 彰一、岡 正朗、奥野清隆：Oncoantigenを用いたがんワクチン療法の現状と課題. 腫瘍免疫学とがん免疫療法. 実験医学(増刊) 31(12)：1975-1978, 2013
 - 17) 菰池佳史：小川道雄 監修 新癌についての質問に答える 第2章 □ 乳腺の癌へるす出版 東京 p.316, 317, 370, 371, 2013
 - 18) 菰池佳史：木下貴之、戸井雅和 編集 オンコロジークリニカルガイド 乳癌薬物療法 第□章 乳癌薬物療法の実際 転移・再発乳癌に対する薬物療法 5-2 ビノレルピン 南山堂 東京 p.206-211, 2013
 - 19) 武富紹信：DAAによる治療困難例への挑戦 HCV 肝移植前後の抗ウイルス療法 肝・胆・膵 67(6): 1021-1028, 2013
 - 20) 折茂達也、神山俊哉、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、武富紹信：肝細胞癌に対する治療法. 北海道外科雑誌 58(1):2-6, 2013
 - 21) 下國達志、高橋典彦、皆川のぞみ、本間重紀、崎浜秀康、西田睦、武富紹信：虫垂炎の診断 病理・画像診断 外科 75(6): 576-584, 2013
 - 22) 武富紹信：肝癌の治療 肝切除. 臨床と研究 90(2): 204-208, 2013
 - 23) 山下啓子：術後内分泌療法 7. 効果予測因子「オンコロジークリニカルガイド 乳癌薬物療法」木下貴之、戸井雅和編、南山堂 p157-162, 2013
 - 24) 山下啓子：晩期再発を意識した補助ホルモン療法の至適投与期間 癌と化学療法 40(13): 2514-2517, 2013
2. 学会発表
- 1) 大野陽介、大竹淳矢、高橋典彦、北村秀光、西村孝司、武富紹信：Enhancement mechanism for immune response of cancer antigen-specific T cells induced by inovative cancer vaccine, H/K-HELP: helper/killer-hybrid epitope long peptide 「革新的癌ワクチンH/K-HELPロングペプチドによる癌特異的T細胞免疫応答の増強機構 第113回 日本外科学会定期学術集会 福岡 2013年4月
 - 2) 北村秀光、大竹淳矢、大野陽介、岸川拓斗、増子和尚、角田健太郎、喜多俊行、西村孝司：人工ロングペプチド、H/K-HELPを用いた革新的がんワクチン治療におけるバイオマーカー研究 第17回 日本がん免疫学会 宇部 2013年7月
 - 3) 喜多俊行、角田健太郎、寺田聖、金海俊、増子和尚、大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：人工ロングペプチドH/K-HELPの樹状細胞におけるクロスプレゼンテーション機構の解明 第17回 日本がん免疫学会 宇部 2013年7月
 - 4) 増子和尚、金海俊、寺田聖、角田健太郎、喜多俊行、北村秀光、西村孝司：H/K-HELP癌ワクチンの抗腫瘍メカニズム：H/K-HELPとshort peptideおよびlong peptideの癌ワクチン効果の比較検討 第17回 日本がん免疫学会 宇部 2013年7月
 - 5) 金海俊、増子和尚、寺田聖、角田健太郎、大竹淳矢、喜多俊行、兵藤守、早川芳宏、北村秀光、西村孝司：新規アジュバントc-di-GMPによるH/K-HELPがんワクチン治療の増強効果機構の解明 第17回 日本がん免疫学会 宇部 2013年7月
 - 6) Hidemitsu Kitamura, Junya Ohtake, Yosuke Ohno, Takuto Kishikawa, Tomomi Kita, Yuji Togashi, Toshiyuki Kita, Takashi Nishimura：Evaluation of Th1/Th2 immune balance as a biomarker in cancer vaccine therapy with H/K-HELP 「H/K-HELPを用いたがんワクチン治療におけるバイオマーカーとしてのTh1/Th2免疫バランス評価」 第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
 - 7) Yasuo Shiohama, Junya Ohtake, Takuto Kishikawa, Yosuke Ohno, Tomomi Kita, Yuji Togashi, Toshiyuki Kita, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura：Augmented induction of a novel cancer/testis antigen, HP15 in demethylated cancer cells 「脱メチル化されたがん細胞株で増強発現される新規癌精巢抗原HP15の同定」 第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
 - 8) Kazutaka Masuko, Shun Kaneumi, Satoshi Terada, Toshiyuki Kita, Kentaro Sumida, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura：The superior antitumor vaccine efficacy of H/K-HELP compared with short peptide and the synthetic long peptide 「H/K-HELPはショートペプチドやSLPロングペプチドに比べ優れた抗腫瘍ワクチン効果を示す」 第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月

- 9) Junya Ohtake, Takuto Kishikawa, Yosuke Ohno, Tomomi Kita, Yuji Togashi, Toshiyuki Kita, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura : The advantages of H/K-HELP as an innovative human cancer vaccine to activate antitumor T cell immunity 「抗腫瘍免疫得を活性化する革新的癌ワクチン、H/K-HELPの優位性」第72回日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
- 10) Shun Kaneumi, Kazutaka Masuko, Satoshi Terada, Kentaro Sumida, Junya Ohtake, Toshiyuki Kita, Mamoru Hyoudou, Yoshihiro Hayakawa, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura : The cyclic-di-guanosine monophosphate (c-di-GMP) is a superior adjuvant for H/K-HELP cancer vaccine therapy 「c-di-GMPはH/K-HELP癌ワクチン治療を増強する革新的アジュバントである」第72回日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
- 11) 北村秀光：癌微小環境における免疫抑制機構とその打破による新たな癌免疫治療 第75回日本血液学術集会 札幌 2013年10月
- 12) 北村秀光、西村孝司：ハイブリッド型ロングペプチド(H/K-HELP)を用いた次世代型がんワクチン・細胞治療法の開発 第26回日本バイオセラピー学会学術総会 盛岡 2013年12月
- 13) 大竹淳矢、岸川拓斗、大野陽介、増子和尚、角田健太郎、寺田聖、金海俊、喜多俊行、北村秀光、西村孝司：ヒトがん抗原特異的Th1およびTc1細胞を効率的に誘導するH/K-HELPの作用機序解明 第26回日本バイオセラピー学会学術総会 盛岡 2013年12月
- 14) Hidemitsu Kitamura, Junya Ohtake, Yosuke Ohno, Takuto Kishikawa, Kazutaka Masuko, Kentaro Sumida, Satoshi Terada, Shun Kaneumi, Toshiyuki Kita, and Takashi Nishimura : Th1/Th2 immune balance in cancer patients treated with cancer vaccine therapy using helper/killer-hybrid epitope long peptide 第42回日本免疫学会学術総会・学術集会 千葉 2013年12月
- 15) Junya Ohtake, Hidemitsu Kitamura, Yosuke Ohno, Takuto Kishikawa, Kazutaka Masuko, Kentaro Sumida, Satoshi Terada, Shun Kaneumi, Toshiyuki Kita, and Takashi Nishimura : Efficacy of helper/killer-hybrid epitope long peptide as an innovative cancer immunotherapy to induce anti-tumor immunity 第42回日本免疫学会学術総会・学術集会 千葉 2013年12月
- 16) Kazutaka Masuko, Shun Kaneumi, Satoshi Terada, Kentaro Sumida, Takuto Kishikawa, Junya Ohtake, Yosuke Ohno, Toshiyuki Kita, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura : Vaccination with Helper/killer-hybrid epitope long peptide remarkably induced antitumor T-cell immune responses in tumor-bearing host 第42回日本免疫学会学術総会・学術集会 千葉 2013年12月
- 17) 奥野清隆、中居卓也、北口博士、山崎満夫、所忠男、肥田仁一：切除不能大腸癌肝転移に対するバイオセラピー肝動注と肝切除併用の長期予後 第113回日本外科学会定期学術集会 福岡市 2013年4月
- 18) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川寧、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔：シンポジウム「がんペプチドワクチンの現状と展望」：多種カクテルによる標準療法抵抗性の進行再発大腸癌に対するペプチドワクチン療法 第38回日本外科系連合学会 東京 2013年6月
- 19) 奥野清隆、中居卓也、北口博士、山崎満夫、所忠男、肥田仁一、上田和毅、大東弘治：シンポジウム「大腸癌肝転移の集学的治療」：切除不能大腸癌肝転移に対するconversion therapyとしてのバイオセラピー肝動注の意義と集学的治療デザイン 第68回日本消化器外科学会総会 宮崎 2013年7月
- 20) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川寧：Core Symposium “Recent Advances and Clinical Application of Cancer Peptide Vaccine”: Phase I/II clinical trial of a peptide vaccine in combination with UFT/LV for refractory metastatic colorectal cancer. 第72回日本癌学会学術総会 横浜市 2013年10月
- 21) 奥野清隆、杉浦史哲、助川寧、井上啓介、小北晃弘、裕彰一、所忠男、肥田仁一：がんペプチドワクチン + UFT/LVによるStage III大腸癌の術後補助療法 第51回日本癌治療学会学術集会 京都市 2013年10月
- 22) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、吉岡康多、小北晃弘、吉藤竹仁、所忠男、肥田仁一：標準的治療に抵抗性となった再発大腸癌に対するペプチドワクチン療法 名古屋 2013年11月

- 23) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川 寧、大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：シンポジウム「がんワクチンの新規工夫」、ヘルパー/キラーハイブリッド型ロングペプチド(H/K HELP)ワクチン投与による抗腫瘍免疫誘導とその臨床効果 第26回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 盛岡 2013年12月
- 24) 菰池佳史、橋本幸彦、安積達也、藤島成、濱田美佳、乾浩己、北条敏也 片側乳癌術後患者における対側乳癌の検討 第21回 日本乳癌学会学術総会 浜松 2013年7月
- 25) 菰池佳史、濱田美佳、新崎亘、安積達也、橋本幸彦、奥野清隆、石飛真人、稲治英生 乳房内再発治療に際して考慮すべき因子 第75回 日本臨床外科学会総会 名古屋 2013年11月
- 26) 武富紹信：肝細胞癌に対する分子標的治療と外科治療 第113回 日本外科学会定期学術集会 福岡 2013年4月
- 27) 武富紹信：大腸癌肝転移症例に対する肝切除の適応とタイミング 第25回 日本肝胆膵外科学会 宇都宮 2013年6月
- 28) Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara, Yoshihiko Maehara. Symposium. Role of IL28B polymorphism in living donor liver transplant patients with chronic hepatitis C. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST), Kyoto, Sep, 2013
- 29) 武富紹信：肝臓外科専門医からみた大腸癌肝転移に対する治療戦略 第14回 西さっぽろ癌談話会 札幌 2013年9月
- 30) 武富紹信：Stage IV大腸癌の根治を目指して 第1回 道東外科集談会 釧路 2013年10月19日、
- 31) Yamashita H, Toyama T, Yoshimoto N, Endo Y, Takahashi S: MicroRNAs associated with characteristics of estrogen receptor-positive breast cancer. 第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
- 32) 山下啓子、遠山竜也、吉本信保、遠藤友美、田口和典、細田充主、山本 貢：エストロゲンレセプター陽性乳癌の発症メカニズムと生物学的特性の解明に関する研究 第113回 日本外科学会定期学術集会 福岡 2013年4月

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

. 分担研究報告

ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療におけるがん抗原解析 および免疫モニタリングに関する研究

研究代表者 北村 秀光 北海道大学遺伝子病制御研究所 准教授
研究分担者 喜多 俊行 北海道大学遺伝子病制御研究所 助教

研究要旨：

Survivinがん抗原を標的とするハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験の実施に伴い、これまでに各施設の倫理審査委員会で承認されたエントリー基準となるSurvivinがん抗原発現およびHLA型の解析について同意取得の得られた大腸癌35例、乳癌3例に対して行った。その結果、大腸癌34例、乳癌3例での腫瘍組織についてSurvivin抗原の発現を認めた。またHLA型については、大腸癌35例中34例、乳癌3例中、3例が適格であった。

所定の適格基準をすべて満たし、実際にワクチンの投与を行った大腸癌28例について抗腫瘍免疫応答を評価したところ、26例においてSurvivin抗原特異的な抗体価(Total IgG, IgG1, IgG3など)の上昇、25例において投与ペプチド特異的にIFN- γ を産生するTh1細胞応答、また10例においてTc1細胞応答を認めた。乳癌については2例中1例において、Survivin抗原ペプチド特異的な抗体価の上昇、2例においてTh1細胞応答、また1例においてTc1細胞応答が確認された。

また、がん患者の血液検体を使用して抗腫瘍免疫応答に関係するバイオマーカー研究を実施した。その結果、Th1型免疫応答を惹起し、抗原特異的IgG1およびIgG3抗体の高値、かつIgG4抗体の低値例が良い指標となり、抗原特異的な抗体価のサブクラス解析とTh1/Th2免疫バランスを指標とした解析が有効であることが示唆された。

今後、本ペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果の判定結果とがん抗原特異的な免疫応答を詳細に検証するとともに、その臨床効果を予見し得るバイオマーカーをより詳細に検証することで、精度・効果の高い次世代がんワクチン開発に繋ぐことが可能と考えられる。

A. 研究目的

ヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験の多施設での実施に伴い、実際にエントリー基準となるSurvivinがん抗原の解析法、評価項目となる免疫モニタリングを整備する必要がある。そこで、これまでに標準化およびセントラル化されたSurvivinがん抗原発現解析、がん抗原特異的な抗体価およびT細胞応答評価を、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院で実際に治療を受けた被験者検体を使用し、北海道大学遺伝子病制御研究所にて検証する。

また本研究においてワクチン治療による抗腫瘍効果とSurvivin抗原特異的な免疫応答との

相関を明らかとするために、がん患者の腫瘍組織や治療の過程で得られる血液検体について抗腫瘍免疫応答に関係する制御因子・バイオマーカーの解析を実施する。

がんワクチン治療による抗腫瘍効果と抗原特異的な免疫応答の相関について精査するとともに、治療効果を予見できるバイオマーカーを探索・同定することで、最終的に、より精度・効果の高い革新的次世代型のがんワクチン治療の開発に繋ぐことを目指す。

B. 研究方法

1. ペプチドワクチン被験者腫瘍組織検体を用いたSurvivinがん抗原の解析
ハイブリッドロングペプチドを用いたがん

ワクチン治療試験において、同意を得た被験者の Survivin がん抗原の発現を確認する。

参画施設の各倫理審査委員会にて承認された標準化 Survivin がん抗原解析法に従い、昨年度に引き続き、本試験にエントリーした大腸癌あるいは乳癌患者のがん組織標本スライドを用いて、加熱処理による賦活化、ブロッキングの後、抗 Survivin 抗体を使用して抗原発現の解析を行う。

腫瘍組織における Survivin 抗原の発現レベル、細胞内での局在について、前述の標準化免疫染色法により解析し、がん抗原の発現・局在とワクチン治療による抗腫瘍免疫応答の誘導効果や抗腫瘍効果に関する検討を行う。

2. ワクチン治療患者検体を用いた Survivin 抗原特異的免疫応答の解析

昨年度に引き続き、ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチンの投与前後における被験者末梢血検体を使用して、ワクチン投与による Survivin 抗原特異的抗体価および T 細胞応答性の上昇の有無について、標準化免疫モニタリング法により解析・評価する。

抗 Survivin 抗体価の解析では、ワクチン治療の際に提供される血清検体を使用して、まずはじめに ELISA 法により、抗原ペプチド特異的トータル IgG および IgM 値を測定する。この際に、健常人検体を使用して得たベースラインとの比較検討も行う。ワクチン投与後、抗体価の上昇が認められた各症例における抗 Survivin 抗体の各 IgG サブクラス (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) も評価する。さらに産生誘導された抗体の反応エピトープ領域についても検討を行う。

Survivin 抗原ペプチド特異的 T 細胞応答について、まずはじめにフローサイトメトリーにより被験者血液検体より得られる PBMC 中の免疫担当細胞の数的、機能的動態について解析を行う。また非付着性細胞をハイブリッドロングペプチドを用いて試験管内にて刺激し、一定期間培養を行う。培養後、ワクチンペプチドあるいはコントロールペプチドを用いて再刺激を行う。その後、抗原ペプチド特異的に産生される IFN- γ を含む各種サイトカインについて、細胞内染色によるフローサイトメトリー、ELISA 法あるいは ELISPOT 法により解析を行う。これらの解析結果を検証し、抗原特異的 T 細胞応答を判定する。

3. 抗腫瘍免疫応答に関連するバイオマーカー

一の探索・同定に向けた解析

がん患者の腫瘍組織、血清、および末梢血リンパ球を用いて、高い抗腫瘍免疫応答を誘導するための鍵となるような核酸(遺伝子)・蛋白質・脂質・糖質をバイオマーカーとして探索、同定する。

北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携して、被験者の診療情報および臨床効果と前述のバイオマーカーとの相関性について検討を行う。

(倫理面への配慮)

本臨床研究は、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院と北海道大学遺伝子病制御研究所と連携して実施する。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、臨床試験計画書等を準備し、各大学、各施設倫理委員会の承認を得た上で実施している。

本研究に用いるヒト検体については、本研究の趣旨を十分に説明し、文書による同意を得た上で、提供される。検体の提供者、その家族、血縁者および関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分に配慮し、研究を遂行する。

C. 研究結果

本年度末までに、進行・再発大腸癌あるいは乳癌を対象としたがんワクチン臨床試験にエントリーした大腸癌 35 例、乳癌 3 例について適格基準の一つとなる Survivin がん抗原発現の解析を行った。その結果、大腸癌 34 例、乳癌 3 例について、腫瘍組織のがん細胞において陰性コントロールとなる正常部位の組織あるいは、正常細胞には認められない、Survivin 抗原に由来する染色像を確認した。また前年度と同様に提供された腫瘍組織におけるがん細胞の細胞質および核内での Survivin 抗原の発現局在について、症例ごとに違いがあることを確認した。

ワクチン投与前後におけるがん抗原特異的免疫応答を評価する免疫モニタリングにおいて、被験者の血清検体を用いた標準化 ELISA 法による抗 Survivin 抗体価の解析を実施した。その結果、ワクチンの投与を行った大腸癌 29 例(北大 20 例、近畿大:9 例)中、投与後のサンプルの提供があった 28 例について評価したところ、

ワクチン投与後、26例において抗原特異的な抗体価の上昇を認めた。乳癌のワクチン投与2例については、うち1例に抗体価の上昇を認めた。

また抗体価の上昇の認められた大腸癌26症例について、IgGの各種サブクラス、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4を解析したところ、21例でIgG1あるいはIgG3が産生誘導されていることも確認した。さらにハイブリッドロングペプチドを構成する天然型のペプチド、Survivin-2B₉₉₋₁₁₇ (Su18)およびSurvivin-2B₁₂₄₋₁₃₅ (Su22)を固相に用いて、抗体の反応領域を同定したところ、ワクチン投与後、11例にてSu18領域に反応する抗体が、さらに3例にて、Su18とSu22領域に反応する抗体が誘導されていたことが分かった。また、抗体価の上昇の認められた乳癌1例について、IgG1およびIgG3が産生誘導されていることを確認した。

T細胞応答性については、本試験の被験者の血液検体よりPBMCを分離し、CD4陽性ヘルパーT細胞、CD8陽性キラーT細胞を含む免疫担当細胞の数的動態、機能性について、標準化したフローサイトメトリー、ELISA法およびELISPOT法による解析を行った。PBMC由来の非付着性細胞および付着性細胞から誘導した樹状細胞を用い、ハイブリッドロングペプチド存在下で、7-14日間、培養を行った。培養後、ワクチンペプチドあるいはコントロールとなるペプチドを用いて再刺激を行った。その結果、これまでCD4陽性ヘルパーT細胞について、解析を行った大腸癌28例中25例について抗原ペプチド特異的IFN- γ の産生、すなわちTh1細胞応答が確認され、またCD8陽性キラーT細胞については、28例中10例にて抗原ペプチド特異的IFN- γ の産生、すなわちTc1細胞応答が確認された。一方、評価を行った乳癌被験者2例中、2例についてTh1細胞応答が確認されるとともに、1例についてTc1細胞応答が確認された。

がん患者腫瘍組織、血清、および末梢血リンパ球を使用し、諸因子(バイオマーカー)の解析を行うとともに、被験者の診療情報および臨床効果と前述の抗腫瘍免疫応答を効率よく誘導するための鍵となるようなバイオマーカーとの関係について担当医師と連携して検討を行った。

D. 考察

本研究において、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチドを用いたがんペプチ

ドワクチン臨床試験を、昨年度に引き続いて行い、実際に被験者の腫瘍組織のSurvivinがん抗原の評価、抗原特異的な抗体価およびT細胞応答の解析が進められたことから、本臨床試験研究の実施体制が十分に整備できたと考えられる。

Survivin がん抗原の腫瘍組織におけるがん細胞内の局在を検証したところ、前年度の検証と同様に、本試験にエントリーした被験者によって細胞質あるいは核内での存在が異なることが明らかとなった。これまで、複数の研究グループによりSurvivinがん抗原の細胞内局在とがん患者の生命予後に関する報告がなされていることから、本研究で明らかになったSurvivin抗原の被験者ががん細胞内での局在の違いに加え、免疫担当細胞群の浸潤について、免疫染色法により解析し、ワクチン治療による抗原特異的な免疫応答の惹起や臨床効果との相関を詳細に検討することにより、がん免疫治療の抗腫瘍効果を予見する新たな知見を得る可能性が考えられる。

昨年度に引き続き、ワクチン治療前後の血清サンプルを用いて、Survivin 抗原特異的抗体価の解析を実施した。その結果、先行実施した第1相試験の研究成果と同様に、ワクチン投与後、極めて早期に、Survivin 抗体価の上昇が認められた。また、誘導されたIgGのサブクラスを解析したところ、多数の被験者においてTh1依存的な補体結合性の強いIgG1やIgG3が産生誘導されていることが明らかとなった。従って、本臨床試験において、Th1細胞を基軸とした抗原特異的免疫応答が、ハイブリッドロングペプチドの投与により、実際にがん患者生体内に誘導できると考えられる。

さらにワクチン投与後に産生誘導された抗体の反応領域を調べたところ、天然型のアミノ酸配列であるSurvivin-2B₉₉₋₁₁₇およびSurvivin-2B₁₂₄₋₁₃₅を認識する抗体の誘導が確認された。そこで、がん患者生体内におけるSurvivin抗原に対しても免疫応答が成立する可能性を示唆するものと考えている。

Survivin抗原特異的ヘルパーT細胞およびキラーT細胞の応答性について被験者の血液検体より回収したPBMC由来の非付着性細胞および付着性細胞から誘導した樹状細胞を用いて検討した。その結果、CD4陽性ヘルパーT細胞あるいはCD8陽性キラーT細胞について、抗原ペプチド特異的IFN- γ の産生が、ワクチン投与を行った多数の大腸癌および乳癌被験者において確

認された。従って、本研究結果により実際にSurvivinハイブリッドロングペプチドワクチンの投与により、がん患者生体内にがん抗原特異的Th1細胞およびTc1細胞の誘導がなされることが示唆された。

昨年に引き続き、今年度においてもSurvivin特異的Tc1、キラーT細胞が誘導された症例のHLAクラスIの型を精査したところ、これまでにSurvivin抗原のクラスIエピトープのHLAとして報告されていたHLA-A24以外の被験者も多数存在したことから、本試験で使用したハイブリッドロングペプチドには未知のクラスI拘束性エピトープが存在することが考えられる。従って、本ペプチドワクチンが既存のHLAのみならず、数多くの患者に幅広く適応し、様々なエピトープを持つ抗腫瘍キラーT細胞を誘導可能と期待できる。今後、被験者生体内に誘導された抗原特異的ヘルパーT細胞、キラーT細胞のエピトープ、およびそれらのHLA拘束性を同定することにより、更なる適応の拡大が望めるものと考えている。

本研究において、昨年度に引き続き、多施設共同による被験者の適格基準、評価に関するがん抗原発現解析ならびにがん抗原特異的抗体価、T細胞応答評価、データ解析のセントラル化を行った。実際に各施設での血液検体サンプルの保管・凍結保存後のリンパ球を用いたT細胞応答性について検証した結果、Survivinがん抗原の解析、抗原特異的抗体価の評価、T細胞応答性の解析については、本体制により、十分に実施可能であることを確認した。

本ペプチドワクチン治療試験に付随して、実際に被験者の血清サイトカインレベル、PBMC中の免疫担当細胞群の細胞表面マーカー、腫瘍組織の各種がん抗原の解析なども実施可能であることが分かった。また各施設の医師・研究者と連携し、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうな因子(バイオマーカー)を探索した結果、Th1型免疫応答を惹起し、抗原特異的IgG1およびIgG3抗体の高値、かつIgG4抗体の低値例が良い指標となり、抗原特異的抗体価のサブクラス解析とTh1/Th2免疫バランスを指標とした解析が有効であると考えられた。

今後、大腸癌の完遂20例について、中間評価を実施するが、その際に抗腫瘍効果と相関する新規バイオマーカーを検証することで、より効果の高い患者の選定が可能になると考

えている。従って、引き続きワクチン治療と解析・評価を遂行し、症例数の集積と抗腫瘍効果の判定を実施するとともに、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうな候補因子を同定することで、より効果の高い革新的次世代がんワクチン開発に繋ぐことができると考えている。

E. 結論

本年度において、大腸癌あるいは乳癌患者を対象にした、ハイブリッドロングペプチドワクチン治療を評価する探索的第II相臨床試験の実施に伴い、エントリー基準となるSurvivinがん抗原解析法、評価項目となる免疫モニタリングを行った。実際にエントリーした患者についてSurvivin抗原の評価がなされ、ワクチン治療前後において、Survivin抗原特異的抗体価の上昇やT細胞応答の解析・評価がなされたことから、ワクチン治療および免疫モニタリングの実施体制は整った。

またTh1型免疫応答を惹起し、抗原特異的抗体価のサブクラス解析とTh1/Th2免疫バランスを指標とした解析が有効であると考えられた。

今後、本研究を推進し、ハイブリッドロングペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果および抗腫瘍免疫応答性を検証するとともに、治療効果を予見し得るバイオマーカーを同定することにより、より精度・効果の高い次世代がんワクチン開発が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohtake J, Ohkuri T, Togashi Y, Kitamura H, Okuno K, Nishimura T: Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine. *Immunol Lett.* 161(1): 20-30, 2014
- 2) Shiohama Y, Ohtake J, Ohkuri T, Noguchi D, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T: Identification of a meiosis-specific protein, MEIOB, as a novel cancer/testis antigen and its augmented expression in demethylated cancer cells. *Immunol Lett.* 158(1-2): 175-182, 2014
- 3) 北村秀光、富樫裕二、西村孝司：革新的癌ワクチン，helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)の開発とその作用，日本臨牀 増刊号，72: 303-308, 2014
- 4) 寺田聖、喜多俊行、北村秀光、西村孝司：

IL-17の各種疾病における役割と樹状細胞を介した新たな免疫抑制機構, 臨床免疫・アレルギー科, 59: 746-756, 2013

2. 学会発表

- 1) 大野陽介、大竹淳矢、高橋典彦、北村秀光、西村孝司、武富紹信：Enhancement mechanism for immune response of cancer antigen-specific T cells induced by inovative cancer vaccine, H/K-HELP: helper/killer-hybrid epitope long peptide 「革新的癌ワクチンH/K-HELPロングペプチドによる癌特異的T細胞免疫応答の増強機構」第113回 日本外科学会定期学術集会 福岡 2013年4月
- 2) 北村秀光、大竹淳矢、大野陽介、岸川拓斗、増子和尚、角田健太郎、喜多俊行、西村孝司：人工ロングペプチド、H/K-HELPを用いた革新的がんワクチン治療におけるバイオマーカー研究 第17回 日本がん免疫学会 宇部 2013年7月
- 3) 喜多俊行、角田健太郎、寺田聖、金海俊、増子和尚、大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：人工ロングペプチドH/K-HELPの樹状細胞におけるクロスプレゼンテーション機構の解明 第17回 日本がん免疫学会 宇部 2013年7月
- 4) 増子和尚、金海俊、寺田聖、角田健太郎、喜多俊行、北村秀光、西村孝司：H/K-HELP癌ワクチンの抗腫瘍メカニズム：H/K-HELPとshort peptideおよびlong peptideの癌ワクチン効果の比較検討 第17回 日本がん免疫学会 宇部 2013年7月
- 5) 金海俊、増子和尚、寺田聖、角田健太郎、大竹淳矢、喜多俊行、兵藤守、早川芳宏、北村秀光、西村孝司：新規アジュバントc-di-GMPによるH/K-HELPがんワクチン治療の増強効果機構の解明 第17回 日本がん免疫学会 宇部 2013年7月
- 6) Hidemitsu Kitamura, Junya Ohtake, Yosuke Ohno, Takuto Kishikawa, Tomomi Kita, Yuji Togashi, Toshiyuki Kita, Takashi Nishimura：Evaluation of Th1/Th2 immune balance as a biomarker in cancer vaccine therapy with H/K-HELP 「H/K-HELPを用いたがんワクチン治療におけるバイオマーカーとしてのTh1/Th2免疫バランス評価」第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
- 7) Yasuo Shiohama, Junya Ohtake, Takuto Kishikawa, Yosuke Ohno, Tomomi Kita, Yuji Togashi, Toshiyuki Kita, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura：Augmented induction of a novel cancer/testis antigen, HP15 in demethylated cancer cells 「脱メチル化されたがん細胞株で増強発現される新規癌精巢抗原HP15の同定」第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
- 8) Kazutaka Masuko, Shun Kaneumi, Satoshi Terada, Toshiyuki Kita, Kentaro Sumida, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura：The superior antitumor vaccine efficacy of H/K-HELP compared with short peptide and the synthetic long peptide 「H/K-HELPはショートペプチドやSLPロングペプチドに比べ優れた抗腫瘍ワクチン効果を示す」第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
- 9) Junya Ohtake, Takuto Kishikawa, Yosuke Ohno, Tomomi Kita, Yuji Togashi, Toshiyuki Kita, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura：The advantages of H/K-HELP as an innovative human cancer vaccine to activate antitumor T cell immunity 「抗腫瘍免疫得を活性化する革新的癌ワクチン、H/K-HELPの優位性」第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
- 10) Shun Kaneumi, Kazutaka Masuko, Satoshi Terada, Kentaro Sumida, Junya Ohtake, Toshiyuki Kita, Mamoru Hyoudou, Yoshihiro Hayakawa, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura：The cyclic-di-guanosine monophosphate (c-di-GMP) is a superior adjuvant for H/K-HELP cancer vaccine therapy 「c-di-GMPはH/K-HELP癌ワクチン治療を増強する革新的アジュバントである」第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月
- 11) 北村秀光：癌微小環境における免疫抑制機構とその打破による新たな癌免疫治療 第75回 日本血液学術集会 札幌 2013年10月
- 12) 北村秀光、西村孝司：ハイブリッド型ロングペプチド(H/K-HELP)を用いた次世代型がんワクチン・細胞治療法の開発 第26回日本バイオセラピー学会学術総会 盛岡 2013年12月
- 13) 大竹淳矢、岸川拓斗、大野陽介、増子和尚、角田健太郎、寺田聖、金海俊、喜多俊行、北村秀光、西村孝司：ヒトがん抗原特異的Th1およびTc1細胞を効率的に誘導する

H/K-HELPの作用機序解明 第26回日本バイオセラピー学会学術総会 盛岡 2013年12月

- 14)奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川 寧、大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：シンポジウム「がんワクチンの新規工夫」、ヘルパー/キラーハイブリッド型ロングペプチド(H/K HELP)ワクチン投与による抗腫瘍免疫誘導とその臨床効果 第26回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 盛岡 2013年12月
- 15)Hidemitsu Kitamura, Junya Ohtake, Yosuke Ohno, Takuto Kishikawa, Kazutaka Masuko, Kentaro Sumida, Satoshi Terada, Shun Kaneumi, Toshiyuki Kita, and Takashi Nishimura : Th1/Th2 immune balance in cancer patients treated with cancer vaccine therapy using helper/killer-hybrid epitope long peptide 第42回 日本免疫学会学術総会・学術集会 千葉 2013年12月
- 16)Junya Ohtake, Hidemitsu Kitamura, Yosuke Ohno, Takuto Kishikawa, Kazutaka Masuko, Kentaro Sumida, Satoshi Terada, Shun

Kaneumi, Toshiyuki Kita, and Takashi Nishimura : Efficacy of helper/killer-hybrid epitope long peptide as an innovative cancer immunotherapy to induce anti-tumor immunity 第42回 日本免疫学会学術総会・学術集会 千葉 2013年12月

- 17)Kazutaka Masuko, Shun Kaneumi, Satoshi Terada, Kentaro Sumida, Takuto Kishikawa, Junya Ohtake, Yosuke Ohno, Toshiyuki Kita, Hidemitsu Kitamura, Takashi Nishimura : Vaccination with Helper/killer-hybrid epitope long peptide remarkably induced antitumor T-cell immune responses in tumor-bearing host 第42回 日本免疫学会学術総会・学術集会 千葉 2013年12月

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

進行・再発大腸癌に対するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療に関する研究

研究分担者 奥野 清隆 近畿大学医学部外科 教授

研究分担者 武富 紹信 北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野I 教授

研究要旨

ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化することのできるハイブリッドロングペプチドを用いた革新的がんワクチン治療法の開発を目指し、探索的の第II相臨床試験を実施する。本試験では、Survivinがん抗原を発現している進行・再発大腸癌(腺癌)35例を対象にがんペプチドワクチン試験薬を腫瘍近傍皮下に反復投与し、最良総合効果による病勢コントロール率(CR+PR+SD)の評価を主要エンドポイントとする。また副次目的として安全性の再確認、抗腫瘍免疫応答の評価を行うとともに、抗腫瘍効果と免疫応答性との相関を確認する。

本研究では、前年度に引き続き、各施設で承認された自主臨床試験計画に従い、大腸癌患者のエントリーおよびワクチン治療を実施した。平成25年度において、大腸癌10例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、9例に対してワクチン投与を開始した。今年度末までには、合計35例のエントリーがあり、29例に対してワクチン治療を行った。また共同研究施設と連携し、実際に被験者の免疫モニタリングを行い、ワクチン投与後に、がん抗原特異的な抗体価の上昇およびヘルパーT細胞およびキラーT細胞応答を確認した。また本臨床試験の付随研究として、ワクチン治療の過程で得られる被験者のがん組織、血液検体を使用し、抗腫瘍免疫応答および治療効果と関連するバイオマーカーの探索を開始した。本試験の完遂20症例について抗腫瘍効果に関する中間評価を開始し、さらに追跡調査を行なうことで、本治療試験における抗腫瘍効果について総合的に判定することとした。

最終的に、本研究成果を基に、ハイブリッドロングペプチドワクチン治療の有効性を証明し、抗腫瘍免疫応答および臨床効果を予見し得るバイオマーカーを同定することで、より精度・効果の高いがんワクチン治療の開発に繋げることが可能と考えられる。

A. 研究目的

本プロジェクトでは、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチドを用いた臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンの開発を目指す。

本臨床試験において、Survivin抗原を発現する大腸癌患者に対して、がんペプチドワクチンを腫瘍組織の近傍皮下に反復投与した後、CT画像診断によりRECIST規準で最良総合効果を判定し、がんワクチン治療の有効性を評価する。またワクチンの投与による有害事象の確認、Survivin特異的免疫応答性の評価、および抗腫瘍効果と免疫応答性との相関を検証する。さら

に本臨床試験に伴い、全ての完遂症例について、抗原特異的免疫応答あるいは抗腫瘍効果の有無で二つにグループ分けし、グループ間で差異の見られる標的分子を探索するバイオマーカー研究も実施する。

最終的に、本ペプチドワクチンの臨床効果を判定するとともに、抗腫瘍効果と関連する抗腫瘍免疫応答の精査と治療効果を予見し得るバイオマーカーを同定することで、より精度・効果の高いがんワクチン治療法の開発に繋ぐ。

B. 研究方法

各施設の倫理審査委員会にて承認された研究計画に基づき、Survivinを腫瘍に発現する

進行・再発大腸癌を対象に、ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験を北海道大学遺伝子病制御研究所と連携して行なう。

本臨床試験において、同意の得られた被験者に対し、Survivin がん抗原、HLA タイプなど所定の適格基準を確認した後、ハイブリッドロングペプチド（1 mg）、ピシバニール（OK-432：0.02KE）、モンタナイド（Montanide™ ISA51VG オイルアジュバント）の混和物を試験薬とし、腫瘍近傍皮下に2週間隔で8回（治療期間1および2）、4週間隔で4回（治療期間3）投与する。

本臨床試験では、治療期間1におけるワクチン4回投与後の画像診断による抗腫瘍効果あるいは抗原特異的免疫応答の結果をもとに、次のワクチン治療（治療期間2）を実施するか否かを判定し、さらに2週間隔で4回腫瘍近傍皮下に投与する。治療期間2の終了時点で再度、腫瘍効果と抗原特異的免疫応答を解析し、適格と判定されれば、4週間隔で4回腫瘍近傍皮下に投与する。

本臨床試験の実施中に重篤な副作用（有害事象）を示した場合、効果・安全性評価委員会の審議により本試験の中止か継続の判断を行なう。

がんワクチン試験薬の投与による抗腫瘍効果について、RECIST 基準で最良総合効果による病勢コントロール率（CR+PR+SD）を評価する。

さらに本臨床試験における付随研究として、被験者の腫瘍組織を用いたがん抗原発現解析、治療の過程で得られる血液検体を使用し、抗腫瘍免疫応答に関係するバイオマーカーの解析を実施する。

（倫理面への配慮）

がんワクチン治療臨床試験は、北海道大学遺伝子病制御研究所と連携し、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院で実施する。本臨床試験は「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、臨床試験計画書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を準備し、各大学、各施設倫理委員会の承認を得た上で実施している。

本研究に用いるヒト検体については、本研究の趣旨を十分に説明し、文書による同意を

得た上で、提供される。検体の提供者、その家族、血縁者および関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分に配慮し、研究を遂行する。本研究は、各施設の倫理審査委員会の承認を得て実施している。

また、北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野に臨床試験研究事務局を置き、北海道臨床開発機構や北海道大学病院高度先進医療支援センターと連携しながら、健康危険情報を含む全ての情報について各施設の研究者と共有できるシステムを組んでいる。

C. 研究結果

昨年度に引き続き、進行・再発大腸癌を対象にした、ヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的Ⅱ相臨床試験を北海道大学遺伝子病制御研究所と連携して行った。平成25年度において、大腸癌10例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、9例に対してワクチン投与を開始した。今年度末までに、大腸癌35例のエントリーがあり、内所定の適格基準を満たした、29例に対してワクチン投与を行った。治療途中の症例を含め、1回ワクチン投与例4名、2回投与例3名、3回投与例1名、4回投与例10名、6回投与例2名、7回投与例1名、8回投与例2名、9回投与例1名、10回投与例1名、11回投与例2名、12回投与例1名、15回投与例1名を得た。

今年度、治療期間1から治療期間3において12回のワクチン投与を実施した1症例について、本人の自由意思、担当医の確認に基づき、任意による13回目以降のワクチン投与の可否について、効果・安全性評価委員による審議がなされた。その結果、試験の継続に関する承認が得られたことから、13回目以降のワクチン投与を開始した。

本試験において、ワクチン投与と因果関係が「明確に」と定義される有害事象として、ワクチン投与後、注射部位反応が散見されたが、ワクチンの投与により、直ちに試験全体を中止する必要のあるCTCAEv4.0においてグレード3以上の非血液学的毒性もしくはグレード4の血液学的毒性などの重篤な有害事象の発生は認められなかった。

また今年度において、各参画施設よりワクチン投与後、直ちに試験を中止すべき重篤な有害事象(SAE)の報告はなかった。また、これまで重篤な有害事象は発生した際の対応として、す

みやかに新規エントリーおよびすべてのワクチン治療を中断するとともに、新規エントリーの再開および試験全体の継続の可否については、効果・安全性評価委員による審議により決定するとしていたが、治療を担当する医師からの提案により、明らかに本治療と因果関係がないと担当医師が判断した場合、新規エントリーは中止するが、他に実施中のワクチン治療は継続し、新規エントリーの再開および試験全体の継続の可否については、効果・安全性評価委員による審議により決定する、と修正した計画書類を自主臨床試験研究倫理審査委員会に提出し、審議の結果承認された。

がんワクチン治療を実施した、被験者の免疫モニタリングを行った。その結果、ワクチン投与後、大腸癌28例について抗腫瘍免疫応答を評価したところ、26例においてSurvivin抗原特異的な抗体価の上昇、25例において投与ペプチド特異的にIFN- γ を産生するTh1細胞応答、また10例においてTc1細胞応答を認めた。

ペプチドワクチン臨床試験の付随研究として、北海道大学遺伝子病制御研究所と連携し、被験者の腫瘍組織、治療の過程で得られる血液検体について抗腫瘍免疫応答に関係する血清サイトカインレベルや免疫担当細胞の細胞表面マーカーなど各種候補バイオマーカーの解析を行なうとともに、各被験者の診療情報との比較検討を実施した。

D. 考察

本研究において、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチドを用いた第II相臨床試験を実施し、革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを開発することを目指している。

前年度に引き続き、北海道大学病院、北海道大学遺伝子病制御研究所、および近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携し、実際に各被験者についてSurvivinがん抗原の解析、抗Survivin抗体価、抗原特異的T細胞応答、RECIST基準による画像解析および腫瘍マーカー測定が可能であったことから、本体制による臨床研究の実施が十分に可能であると考えている。

ワクチン投与により、投与部位における皮膚応答が散見されたことは、本ワクチンが強い反応性を有することを示唆するものと考えている。実際に、被験者の免疫モニタリングの結果から、ワクチン投与後、非常に早期に抗原ペプチド特異的抗体価の上昇とT細胞応答が認めら

れ、今後のワクチン投与と治療効果との相関について解析が望まれる。

本ワクチン治療については、原疾患の増悪による離脱が散見されるものの、これまで試験全体を中止すべき重篤な有害事象の発生はなく、一部の症例で、長期投与例も散見され、かつワクチンの安全性の再確認がなされていることから、今後の完遂例による抗腫瘍効果の判定も望まれる。

本試験デザインは非対照・非盲検・探索的第II相臨床試験であり、本試験全体で対象被験者は合計35症例としたが、今年度末までに20症例を完遂し、効果・安全性評価委員会による中間審査を行っている。最終的に、本試験薬の有効性の有無を判断する予定である。

そこで今後、全ての完遂症例を抗腫瘍効果の有無で二つにグループ分けし、グループ間で見られる遺伝子、タンパク質等の発現の違いから、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうな因子(バイオマーカー)を同定することで、日本発のハイブリッドロングペプチドを用いた革新的次世代がん免疫治療用ワクチンの開発に繋がると考えている。

E. 結論

進行・再発大腸癌を対象に、ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的第II相臨床試験の実施体制が整った。本年度末までに35例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、29例に対してワクチン投与を行った。

ワクチン投与後、大腸癌28例中26例においてSurvivin抗原特異的な抗体価の上昇、25例において投与ペプチド特異的にIFN- γ を産生するTh1細胞応答、また10例においてTc1細胞応答を確認した。

本ワクチン治療については、原疾患の増悪による離脱が散見されるものの、これまで試験全体を中止すべき重篤な有害事象の発生はなく、一部の症例で、長期投与例も散見され、かつワクチンの安全性の再確認がなされていることから、完遂例による抗腫瘍効果の判定も期待される。

今後、本試験の完遂症例について抗腫瘍効果に関する中間評価および追跡調査を実施し、より精度・効果の高いがんワクチン治療の開発に繋げる事が可能と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohtake J, Ohkuri T, Togashi Y, Kitamura H, Okuno K, Nishimura T. Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine. *Immunol Lett.* 161(1): 20-30, 2014
- 2) Okuno K, Sugiura F, Inoue K, Sukegawa Y: Clinical trial of a 7-peptide cocktail vaccine with oral chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res.* in press.
- 3) Nakai T, Okuno K, Kitaguchi H, Ishikawa H, Yamasaki M: Unresectable colorectal liver metastases: the safety and efficacy of conversion therapy using hepatic arterial infusion immunochemotherapy with 5-fluorouracil and polyethylene glycol-interferon alfa-2a. *World J. Surg.* 37(8): 1919-1926, 2013.
- 4) Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int.* 29(11): 1147-52, 2013
- 5) Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura S, Todo S. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology.* 57(6): 2314-25, 2013
- 6) 奥野清隆: 13. 大腸癌 c. 直腸進行癌. 消化器疾患最新の治療2013-2014 (編) 菅野健太郎、上西紀夫、井廻道夫、南江堂、p.232-235, 2013
- 7) 奥野清隆: がんに効く薬. がん医療の今. 第3集. 旬報社. 監修、西尾正道、p.114-119, 2013
- 8) 奥野清隆、杉浦史哲、助川 寧、井上啓介: 大腸癌における免疫療法 臨床外科 68(8): 934-940, 2013
- 9) 裕 彰一、岡 正朗、奥野清隆: Oncoantigenを用いたがんワクチン療法の現状と課題. 腫瘍免疫学とがん免疫療法 実験医学(増刊) 31(12): 1975-1978, 2013
- 10) 武富紹信: DAA による治療困難例への挑戦 HCV 肝移植前後の抗ウイルス療法 肝・胆・膵 67(6): 1021-1028, 2013
- 11) 折茂達也, 神山俊哉, 横尾英樹, 柿坂達彦, 若山顕治, 敦賀陽介, 蒲池浩文, 武富紹信:

肝細胞癌に対する治療法. 北海道外科雑誌 58(1): 2-6, 2013

- 12) 下國達志, 高橋典彦, 皆川のぞみ, 本間重紀, 崎浜秀康, 西田睦, 武富紹信: 虫垂炎の診断 病理・画像診断 外科 75(6): 576-584, 2013
- 13) 武富紹信: 肝癌の治療 肝切除 臨牀と研究 90(2): 204-208, 2013

2. 学会発表

- 1) 奥野清隆、中居卓也、北口博士、山崎満夫、所 忠男、肥田仁一: 切除不能大腸癌肝転移に対するバイオセラピー肝動注と肝切除併用の長期予後. 第113回日本外科学会定期学術集会 福岡市 2013年4月
- 2) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川 寧、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔: シンポジウム「がんペプチドワクチンの現状と展望」: 多種カクテルによる標準療法抵抗性の進行再発大腸癌に対するペプチドワクチン療法 第38回 日本外科系連合学会 東京 2013年6月
- 3) 奥野清隆、中居卓也、北口博士、山崎満夫、所 忠男、肥田仁一、上田和毅、大東弘治: シンポジウム「大腸癌肝転移の集学的治療」: 切除不能大腸癌肝転移に対するconversion therapyとしてのバイオセラピー肝動注の意義と集学的治療デザイン 第68回 日本消化器外科学会総会 宮崎 2013年7月
- 4) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川 寧: Core Symposium “Recent Advances and Clinical Application of Cancer Peptide Vaccine”: Phase I/II clinical trial of a peptide vaccine in combination with UFT/LV for refractory metastatic colorectal cancer. 第72回日本癌学会学術総会 横浜市 2013年10月
- 5) 奥野清隆、杉浦史哲、助川 寧、井上啓介、小北晃弘、裕 彰一、所 忠男、肥田仁一: がんペプチドワクチン + UFT/LVによるStage III大腸癌の術後補助療法. 第51回 日本癌治療学会学術集会 京都市 2013年10月
- 6) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、吉岡康多、小北晃弘、吉藤竹仁、所 忠男、肥田仁一: 標準的治療に抵抗性となった再発大腸癌に対するペプチドワクチン療法 名古屋 2013年11月
- 7) 奥野清隆、杉浦史哲、井上啓介、助川 寧、

- 大竹淳矢、北村秀光、西村孝司：シンポジウム「がんワクチンの新規工夫」、ヘルパー/キラーハイブリッド型ロングペプチド(H/K HELP)ワクチン投与による抗腫瘍免疫誘導とその臨床効果 第26回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 盛岡 2013年12月
- 8) 武富紹信：肝細胞癌に対する分子標的治療と外科治療 第113回 日本外科学会定期学術集会 福岡 2013年4月
- 9) 武富紹信：大腸癌肝転移症例に対する肝切除の適応とタイミング 第25回日本肝胆膵外科学会 宇都宮 2013年6月
- 10) Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara, Yoshihiko Maehara. Symposium. Role of IL28B polymorphism in living donor liver transplant patients with chronic hepatitis C. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST), Kyoto, Sep, 2013
- 11) 武富紹信：肝臓外科専門医からみた大腸癌肝転移に対する治療戦略 第14回 西さっぽろ癌談話会 札幌 2013年9月
- 12) 武富紹信：Stage IV大腸癌の根治を目指して 第1回 道東外科集談会 釧路 2013年10月19日、

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

進行・再発乳癌に対するハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療に関する研究

研究分担者 菰池 佳史 近畿大学医学部外科 教授

研究分担者 山下 啓子 北海道大学大学院医学研究科乳腺外科学分野 教授

研究要旨

ヘルパーT細胞とキラーT細胞を同時に活性化することのできるハイブリッドロングペプチドを用いた革新的がんワクチン治療法の開発を目指し、探索的の第II相臨床試験を実施する。本試験では、Survivinがん抗原を発現している進行・再発乳癌40例を対象にがんワクチン試験薬を腫瘍近傍皮下に反復投与し、臨床的有用率（CR+PR+6ヶ月以上のSD）の評価を主要エンドポイントとする。また副次的目的として安全性の再確認、抗腫瘍免疫応答の評価を行うとともに、抗腫瘍効果と免疫応答性との相関を確認する。

前年度までに整備した試験計画について各施設での倫理審査委員会承認後、乳癌被験者の募集を開始した。平成25年度末までに、3例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、2例に対してワクチン投与を行った。共同研究施設と連携し、実際にワクチン投与を行った症例の免疫モニタリングを開始し、ワクチン投与後、がん抗原特異的な抗体価の上昇を1例、Th1細胞応答を2例、またTc1細胞応答を1例にて確認した。また本臨床試験の付随研究として、ワクチン治療の過程で得られる被験者のがん組織、血液検体を使用し、抗腫瘍免疫応答および治療効果と関連するバイオマーカーの探索を行った。

最終的に、本治療試験において抗腫瘍効果を判定し、抗腫瘍免疫応答および臨床効果を予見し得るバイオマーカーを同定することで、より精度・効果の高いがんワクチン治療の開発に繋げる。

A. 研究目的

本プロジェクトでは、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチドを用いた臨床試験を実施し、日本発の革新的次世代がん免疫治療用ワクチンの開発を目指している。

本臨床試験において、Survivin抗原を発現する乳癌患者に対して、ワクチンを腫瘍組織の近傍皮下に反復投与した後、CT画像診断によりRECIST規準で最良総合効果を判定し、がんワクチン治療の有効性を評価する。またワクチンの投与による有害事象の確認、Survivin特異的免疫応答性の評価、および抗腫瘍効果と免疫応答性との相関を検証する。さらに本臨床試験に伴い、全ての完遂症例について、抗原特異的免疫応答あるいは抗腫瘍効果の有無で二つにグループ分けし、グループ間で差異の見られる標的分子を探索するバイオマーカー研究も実施する。

最終的に、本ペプチドワクチンの臨床効果を

判定するとともに、抗腫瘍効果と関連する抗腫瘍免疫応答の精査と治療効果を予見し得るバイオマーカーを同定することで、より精度・効果の高いがんワクチン治療法の開発に繋ぐ。

B. 研究方法

前年度までに整備し、各施設の倫理審査委員会にて承認された研究計画に基づき、進行・再発乳癌を対象に、ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的の第II相臨床試験を北海道大学遺伝子病制御研究所と連携して行う。

本臨床試験において、同意の得られた被験者に対し、Survivinがん抗原、HLAタイプなど適格基準を確認した後、ハイブリッドロングペプチド（1mg）、ピンバニール（OK-432：0.02KE）、モンタナイド（Montanide™ ISA51VG オイルアジュバント）の混和物を試験薬とし、腫瘍近傍皮下に2週間隔で8回（治療期間1および2）、4週間隔で4回（治療期間3）投与す

る。

今回の臨床試験では、まず治療期間 1 におけるワクチン 4 回投与後の画像診断および抗原特異的免疫応答の結果をもとに、次のワクチン治療(治療期間 2)を実施するか否かを判定し、さらに 2 週間間隔で 4 回腫瘍近傍皮下に投与する。治療期間 2 の終了時点で再度、腫瘍効果と抗原特異的免疫応答を解析し、適格と判定されれば、4 週間間隔で 4 回腫瘍近傍皮下に投与する。

本臨床試験の実施中に重篤な副作用(有害事象)を示した場合、効果・安全性評価委員会の審議により本試験の中止か継続の判断を行なう。

ハイブリッドロングペプチドワクチン試験薬の投与による抗腫瘍効果について、RECIST 基準で最良総合効果による臨床的有用率(CR+PR+6 ヶ月以上の SD)を評価する。

さらに本臨床試験における付随研究として、被験者の腫瘍組織を用いたがん抗原発現解析、治療の過程で得られる血液検体を使用し、抗腫瘍免疫応答に関係するバイオマーカーの解析を実施する。

(倫理面への配慮)

がんワクチン治療臨床試験は、北海道大学遺伝子病制御研究所と連携し、北海道大学病院および近畿大学医学部附属病院で実施する。本臨床試験は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、患者説明文書、試験参加同意書、さらに倫理委員会申請書、臨床試験計画書、試験薬概要書、症例報告書、手順書等を準備し、各大学、各施設倫理委員会の承認を得た上で実施している。

本研究に用いるヒト検体については、本研究の趣旨を十分に説明し、文書による同意を得た上で、提供される。検体の提供者、その家族、血縁者および関係者の人権および利益の保護の取り扱いに十分に配慮し、研究を遂行する。本研究は、各施設の倫理審査委員会の承認を得て実施している。

また、北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野に臨床試験研究事務局を置き、北海道臨床開発機構や北海道大学病院高度先進医療支援センターと連携しながら、健康危険情報を含む全ての情報について各施設の研究者と共有できるシステムを組んでいる。

C. 研究結果

前年度に引き続き、進行・再発乳癌を対象にした、ヘルパー/キラーハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療の探索的第 II 相臨床試験を北海道大学遺伝子病制御研究所と連携して行った。今年度末までに、乳癌 3 例のエントリーがあり、内所定の適格基準を満たした、2 例に対してワクチンの投与を行った。今年度、新たにエントリーした被験者 1 例については、CT 画像検査の結果、多発肝転移(新規病変)が確認されたため、本試験より離脱した。最終的に、1 回ワクチン投与例 1 名、2 回投与例 1 名を得た。

これまでワクチンの投与により、直ちに試験全体を中止する必要があるCTCAEv4.0においてグレード3度以上の非血液学的毒性もしくはグレード4の血液学的毒性などの重篤な有害事象の発生は認められなかった。

また、これまで重篤な有害事象は発生した際の対応として、すみやかに新規エントリーおよびすべてのワクチン治療を中断するとともに、新規エントリーの再開および試験全体の継続の可否については、効果・安全性評価委員による審議により決定するとしていたが、治療を担当する医師からの提案により、明らかに本治療と因果関係がないと担当医師が判断した場合、新規エントリーは中止するが、他に実施中のワクチン治療は継続し、新規エントリーの再開および試験全体の継続の可否については、効果・安全性評価委員による審議により決定する、と修正した計画書類を自主臨床試験研究倫理審査委員会に提出し、審議の結果承認された。

ワクチン治療を実施した、被験者2例の免疫モニタリングを行った結果、うち1例にTh1型の抗体価(IgG1およびIgG3)の上昇を認めた。またワクチン投与後、乳癌2例についてSurvivin抗原ペプチド特異的なIFN- γ の産生によるTh1細胞応答が確認され、1例にTc1細胞応答が確認された。

本ペプチドワクチン臨床試験の付随研究として、北海道大学遺伝子病制御研究所と連携し、被験者の腫瘍組織、治療の過程で得られる血液検体について抗腫瘍免疫応答に関係する血清サイトカインレベルや免疫担当細胞の細胞表面マーカーなど各種候補バイオマーカーの解析を実施するとともに、各被験者の診療情報との比較検討を行った。

D. 考察

本研究において、がん抗原特異的ヘルパーT細胞とキラーT細胞の両者を活性化させるハイブリッドロングペプチドを用いた第II相臨床試験を実施し、革新的次世代がん免疫治療用ワクチンを開発することを目指している。

今年度、北海道大学病院、北海道大学遺伝子病制御研究所、および近畿大学医学部附属病院の医師・研究者と連携し、実際に各被験者についてSurvivinがん抗原の解析、抗Survivin抗体価、抗原特異的T細胞応答を解析・評価できたことから、多施設による本臨床研究の推進が十分に可能であると考えている。

本試験デザインは非対照・非盲検・探索的第II相臨床試験であり、本試験全体で対象被験者は合計40症例としたが、20症例を完遂し、各評価が終わった段階で、効果・安全性評価委員会による中間審査を行い、有効性の有無を判断することとした。

大腸癌に比べ乳癌において、エントリー数が少ないが、これは、他の有効な制がん剤、ホルモン治療薬等による数多くの標準治療の存在の影響が考えられる。今後、参画した医師と協力・連携し、引き続き募集を継続するとともに、エントリー基準や標準治療との併用などの必要性について検討を行っている。

今後、全ての完遂症例を追跡調査するとともに、抗腫瘍効果の有無で二つにグループ分けし、グループ間で見られる遺伝子、タンパク質等の発現の違いから、高い抗腫瘍効果を誘導するための鍵となりそうな因子(バイオマーカー)を同定することで、エントリー基準の再検討とともに、より精度・効果の高い日本発のハイブリッドロングペプチドを用いた革新的次世代がん免疫治療用ワクチンの開発に繋がるものと期待される。

E. 結論

進行・再発乳癌を対象に、ハイブリッドロングペプチドを用いたがんワクチン治療による抗腫瘍効果を評価する探索的第II相臨床試験を開始した。本年度末までに3例のエントリーがあり、内所定の基準を満たした、2例に対してワクチン投与を行うことができ、実施体制が整った。

ワクチン投与を行なった被験者の免疫モニタリングを開始し、ワクチン投与後、がん抗原特異的な抗体価の上昇を1例、Th1細胞応答を2例、またTc1細胞応答を1例にて確認した。

引き続き、完遂症例数を蓄積し、ハイブリッ

ドロングペプチドワクチン投与による抗腫瘍効果および抗腫瘍免疫応答性を評価するとともに、新規バイオマーカーの同定により、より精度・効果の高い革新的がんワクチンの開発が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizoo T, Taira N, Nishiyama K, Nogami T, Iwamoto T, Motoki T, Shien T, Matsuoka J, Doihara H, Ishihara S, Kawai H, Kawasaki K, Ishibe Y, Ogasawara Y, Komoike Y, Miyoshi S. Effects of lifestyle and single nucleotide polymorphisms on breast cancer risk: a case-control study in Japanese women. *BMC Cancer* 13: 565, 2013
- 2) Okita Y, Narita Y, Suzuki T, Arita H, Yonemori K, Kinoshita T, Fujiwara Y, Tsuda H, Komoike Y, Nakagawa H, Tamaki Y, Tomita Y, Shibui S, Maruno M. Extended trastuzumab therapy improves the survival of HER2-positive breast cancer patients following surgery and radiotherapy for brain metastases. *Mol Clin Oncol* 1(6): 995-1001, 2013
- 3) Endo Y, Toyama T, Takahashi S, Yoshimoto N, Iwasa M, Asano T, Fujii Y, Yamashita H. MiR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor α -positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 20(1): 91-102, 2013
- 4) Ohno S, Chow LWC, Sato N, Masuda N, Sasano H, Takahashi F, Bando H, Iwata H, Morimoto T, Kamigaki S, Nakayama T, Nakamura S, Kuroi K, Aogi K, Kashiwaba M, Yamashita H, Hisamatsu K, Ito Y, Yamamoto Y, Ueno T, Fakhrejahani E, Yoshida N, Toi M: Randomized trial of preoperative docetaxel with or without capecitabine after 4 cycles of 5-fluoracil-epirubicin-cyclophosphamide (FEC) in early stage breast cancer: Exploratory analyses identify Ki67 as a predictive biomarker for response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 142(1): 69-80, 2013
- 5) 菰池佳史：小川道雄 監修 新癌についての質問に答える 第2章 □ 乳腺の癌へるす出版 東京 p.316, 317, 370, 371, 2013
- 6) 菰池佳史：木下貴之 戸井雅和 編集 オンコロジークリニカルガイド 乳癌薬物療法 第□章 乳癌薬物療法の実際 転移・再発乳癌に対する薬物療法 5-2 ビノレルピン 南山堂 東京 p.206-211, 2013

- 7) 山下啓子：術後内分泌療法 7. 効果予測因子「オンコロジークリニカルガイド 乳癌薬物療法」木下貴之、戸井雅和編、南山堂 p157-162, 2013
 - 8) 山下啓子：晩期再発を意識した補助ホルモン療法の至適投与期間．癌と化学療法 40(13): 2514-2517, 2013
2. 学会発表
- 1) 菰池佳史，橋本幸彦，安積達也，藤島成，濱田美佳，乾浩己，北条敏也 片側乳癌術後患者における対側乳癌の検討 第 21 回日本乳癌学会学術総会 浜松 2013 年 7 月
 - 2) 菰池佳史，濱田美佳，新崎亘，安積達也，橋本幸彦，奥野清隆，石飛真人，稲治英生 乳房内再発治療に際して考慮すべき因子 第 75 回 日本臨床外科学会総会 名古屋 2013 年 11 月
 - 3) Yamashita H, Toyama T, Yoshimoto N, Endo Y, Takahashi S: MicroRNAs associated with characteristics of estrogen receptor-positive breast cancer. 第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年 10月
 - 4) 山下啓子、遠山竜也、吉本信保、遠藤友美、田口和典、細田充主、山本 貢：エストロゲンレセプター陽性乳癌の発症メカニズムと生物学的特性の解明に関する研究 .第113回日本外科学会定期学術集会 福岡 2013年 4月

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし

・研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
奥野清隆	13. 大腸癌 c. 直腸進行癌.	菅野健太郎、上西紀夫、井廻道夫	消化器疾患最新の治療2013-2014	南江堂	東京	2013	232-235
奥野清隆	がんに効く薬	監修：西尾正道	がん医療の今第3集	旬報社	東京	2013	114-119
菰池佳史	乳腺の癌	小川道雄監修	新癌についての質問に答える第2章 □	へるす出版	東京	2013	316, 317, 370, 371
菰池佳史	第□章 乳癌薬物療法の実際 転移・再発乳癌に対する薬物療法 5-2 ビノレルビン	木下貴之、戸井雅和	オンコロジークリニカルガイド 乳癌薬物療法	南江堂	東京	2013	206-211
山下啓子	術後内分泌療法 7. 効果予測因子	木下貴之、戸井雅和	オンコロジークリニカルガイド 乳癌薬物療法	南江堂	東京	2013	157-162

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻(号)	ページ	出版年
Ohtake J, Ohkuri T, Togashi Y, Kitamura H, Okuno K, Nishimura T	Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine.	Immunol Lett	161(1)	20-30	2014
Shiohama Y, Ohtake J, Ohkuri T, Noguchi D, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T	Identification of a meiosis-specific protein, MEIOB, as a novel cancer/testis antigen and its augmented expression in demethylated cancer cells.	Immunol Lett	158(1-2)	175-182	2014
Okuno K, Sugiura F, Inoue K, Sukegawa Y	Clinical trial of a 7-peptide cocktail vaccine with oral chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancer.	Anticancer Res			2014 in press
Nakai T, Okuno K, Kitaguchi H, Ishikawa H., Yamasaki M	Unresectable colorectal liver metastases: the safety and efficacy of conversion therapy using hepatic arterial infusion immunochemotherapy with 5-fluorouracil and polyethylene glycol-interferon alfa-2a	World J. Surg	37(8)	1919-1926	2013

Mizoo T, Taira N, Nishiyama K, Nogami T, Iwamoto T, Motoki T, Shien T, Matsuoka J, Doihara H, Ishihara S, Kawai H, Kawasaki K, Ishibe Y, Ogasawara Y, Komoi ke Y, Miyoshi S	Effects of lifestyle and single nucleotide polymorphisms on breast cancer risk: a case-control study in Japanese women.	BMC Cancer	13	565	2013
Okita Y, Narita Y, Suzuki T, Arita H, Yonemori K, Kinoshita T, Fujiwara Y, Tsuda H, Komoike Y, Nakagawa H, Tamaki Y, Tomita Y, Shibui S, Maruno M	Extended trastuzumab therapy improves the survival of HER2-positive breast cancer patients following surgery and radiotherapy for brain metastases.	Mol Clin Oncol	1(6)	995-1001	2013
Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatana ka KC, Hiyama E, Kami jo T, Okada T, Taketomi A	RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients	Pediatr Surg Int	29(11)	1147-1152	2013
Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura S, Todo S	Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis.	Hepatology	57(6)	2314-2325	2013
Endo Y, Toyama T, Takahashi S, Yoshimoto N, Iwasa M, Asano T, Fujii Y, Yamashita H	MiR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor α -positive breast cancer.	Endocr Relat Cancer	20(1)	91-102	2013
Ohno S, Chow LWC, Sato N, Masuda N, Sasano H, Takahashi F, Bando H, Iwata H, Morimoto T, Kamigaki S, Nakayama T, Nakamura S, Kuroi K, Aogi K, Kashiwaba M, Yamashita H, Hisamatsu K, Ito Y, Yamamoto Y, Ueno T, Fakhrejahani E, Yoshida N, Toi M	Randomized trial of preoperative docetaxel with or without capecitabine after 4 cycles of 5-fluoracil-epirubicin-cyclophosphamide (FEC) in early stage breast cancer: Exploratory analyses identify Ki67 as a predictive biomarker for response to neoadjuvant chemotherapy.	Breast Cancer Res Treat	142(1)	69-80	2013
北村秀光、富樫裕二、西村孝司	革新的癌ワクチン, helper/killer-hybrid epitope long peptide (H/K-HELP)の開発とその作用	日本臨床増刊号2	72	303-308	2014
寺田 聖、喜多俊行、北村秀光、西村孝司	IL-17の各種疾病における役割と樹状細胞を介した新たな免疫抑制機構	臨床免疫・アレルギー科	59(6)	746-756	2013
奥野清隆、杉浦史哲、助川 寧、井上啓介	大腸癌における免疫療法	臨床外科	68(8)	934-940	2013
碓 彰一、岡 正朗、奥野清隆	Oncoantigenを用いたがんワクチン療法の現状と課題。腫瘍免疫学とがん免疫療法。	実験医学(増刊)	31(12)	1975-1978	2013

武富紹信	DAAによる治療困難例への挑戦 HCV肝移植前後の抗ウイルス療法	肝・胆・膵	67(6)	1021-1028	2013
折茂達也、神山俊哉、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、武富紹信	肝細胞癌に対する治療法	北海道外科雑誌	58(1)	2-6	2013
下國達志、高橋典彦、皆川のぞみ、本間重紀、崎浜秀康、西田 睦、武富紹信	虫垂炎の診断 病理・画像診断	外科	75(6)	576-584	2013
武富紹信	肝癌の治療 肝切除・臨床と研究	臨床と研究	90(2)	204-208	2012
山下啓子	晩期再発を意識した補助ホルモン療法の至適投与期間	癌と化学療法	40(13)	2514-2517	2013