

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第 a/ b 相医師主導治験

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上田 龍三

平成26(2014)年4月

# 目 次

## ．総括研究報告

- 研究代表者、治験調整委員長（治験名；進行又は再発固形がん患者に対する  
モガムリズマブの第 Ia/Ib 相多施設共同医師主導治験） . . . . . 1  
上田龍三（愛知医科大学）

## ．分担研究報告

- 1 . 液性免疫・細胞性免疫モニタリング . . . . . 2  
中山睿一（川崎医療福祉大学）
- 2 . 臨床治験管理、第 a/ b 相治験  
. . . . . 3  
土井俊彦（国立がん研究センター東病院）
- 3 . 抗体療法企画・管理 . . . . . 4  
飯田真介（名古屋市立大学）
- 4 . 第 Ia/Ib 相臨床治験の実施及び管理 . . . . . 5  
土岐祐一郎（大阪大学）
- 5 . 第 a/ b 相臨床治験 . . . . . 6  
岡三喜男（川崎医科大学）
- 6 . 第 Ib 相治験実施のための体制構築とがん患者における抑制性細胞の解析 . . . 7  
垣見和宏（東京大学）
- 7 . 日本人の悪性黒色腫患者における NY-ESO-1, XAGE など腫瘍抗原の発現と  
免疫に関する解析 . . . . . 8  
船越建（慶應義塾大学）
- 8 . 臨床治験 抗体療法モニタリング . . . . . 9  
石田高司（名古屋市立大学）
- 9 . 抗 CCR4 抗体投与と制御性 T 細胞の関連の解析 . . . . . 10  
西川博嘉（大阪大学）
- 10 . 液性免疫・細胞性免疫モニタリング . . . . . 11  
鵜殿平一郎（岡山大学）
- 11 . 治験症例がん組織での，CCR4 および腫瘍精巢抗原（NY-ESO-1, XAGE-1b）  
の発現検査 . . . . . 12  
佐藤永一（東京医科大学）

. 別添文書	13
1) 治験実施計画書 (改訂版)	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
. 研究成果の刊行物・別刷	15

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

研究代表者 上田 龍三 愛知医科大学 教授

研究要旨

ヒト化抗CCR4(C-C chemokine receptor type 4)モノクローナル抗体、Mogamulizumab (KW-0761)を用いた固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験を順調に実施している。Ia相治験を予定より半年早く終了させ、平成25年10月21日よりIb相治験の割り付け登録を開始した。Ia相治験において、安全性とTreg除去効果が確認され、Ib相治験においては、平成25年度までに14症例においてプロトコール治療を開始した。そして、附随研究により、がん患者末梢血中effector Treg比率の上昇と腫瘍局所におけるeffector Tregの著明な浸潤、並びに、抗CCR4モノクローナル抗体を用いたTreg除去による抗腫瘍免疫活性の亢進効果が明らかとなった。また、Tregアッセイの標準化を試みたところ、施設間でのTreg機能サブセットと測定結果の乖離が是正され、データの共有化が可能となった。

研究分担者

中山 睿一 川崎医療福祉大学医療福祉学部  
教授

土井 俊彦 国立がん研究センター東病院消化  
管内科 副科長

飯田 真介 名古屋市立大学大学院医学研究科  
腫瘍・免疫内科学 准教授

土岐 祐一郎 大阪大学大学院医学系研究科外  
科学講座・消化器外科学 教授

岡 三喜男 川崎医科大学呼吸器内科学 教授

垣見 和宏 東京大学医学部附属病院免疫細胞  
治療学講座 特任准教授

船越 建 慶應義塾大学医学部皮膚科学 助教

石田 高司 名古屋市立大学大学院医学研究科  
腫瘍・免疫内科学 准教授

西川 博嘉 大阪大学・免疫学フロンティア研  
究センター実験免疫学 特任准教授

鵜殿 平一郎 岡山大学大学院医歯薬学総合研  
究科免疫学分野 教授

佐藤 永一 東京医科大学臨床病理学 講師

A. 研究目的

制御性T細胞(Treg)は腫瘍局所に多数浸潤していることが多くのがん種で知られ、腫瘍免疫の抑制を通して、がんの発症、進展に強くかかわっていることが明らかとなってきている。世界各国で実施された腫瘍抗原ワクチン療法臨床試験において思わしい結果が得られていないことの原因として腫瘍局所で働くTregの強力な免疫抑制機構が重要であると考えられており、Tregの制御が、免疫治療法開発のキーポイントとなっている。最近、進行がんに対して劇的な治療効果がみられている免疫チェックポイント分子に対する抗体薬の腫瘍免疫亢進機序として、免疫抑制シグナルの阻害だけでなく、Tregへの作用も重要であることが見いだされ、益々、Tregを標的とすることの重要性が高まっている。TregはCD45RAとFOXP3の発現パターンによりeffector Treg;CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>hi</sup>,

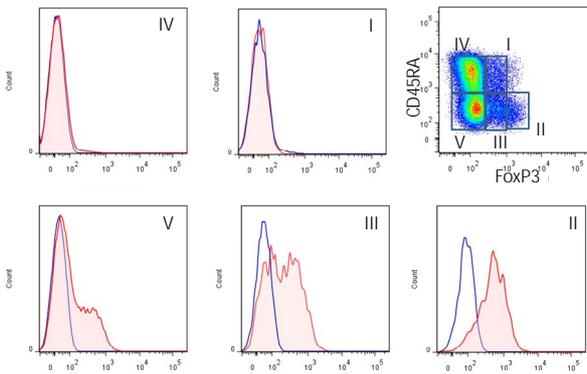


図1 TregにおけるCCR4の発現

I; naïve Treg, II; effector Treg

Red line; CCR4, Blue line; isotopic control

naïve Treg ; CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>lo</sup> に分類される(図1)。CCR4はeffector Treg分画に強く発現し、naïve Treg分画にはほとんど発現しないことから、Tregの標的分子となり得る。成人T細胞白血病(ATL)治療薬である、抗CCR4モノクローナル抗体、Mogamulizumab (KW-0761)は、ATL細胞以外に正常Tregも除去することが明らかにされており、同抗体は、Treg制御によるがん免疫治療薬として関心が高まっている。以上の経緯を踏まえ、本研究において、進行再発固形がん患者を対象に、Mogamulizumab/KW-0761の医師主導第Ia/Ib相治験を計画、実施する。第Ia相では、Mogamulizumabの安全性の確認および薬物動態を検討する。第Ib相では、安全性および制御性T細胞除去効果を検討し、第II相治験での推奨投与量を決定することを目的とする。さらに付随研究として、治療経過と免疫動態について検討し、治療効果との関連について明らかにする。

## B. 研究方法

### 1) 第Ia/Ib相治験

#### 「研究体制」

研究代表者の所属する愛知医科大学に多施設臨床治験事務局を設置して本治験を統括し、臨床Ia相治験は国立がん研究センター東病院、大阪大学、川崎医科大学、名古屋市立大学の4施設で行い、第Ib相治験には東京大学、および慶応大学を加えた6施設で実施する。これらの施設では、多施設共同研究および医師主導臨

床治験においても豊富な経験を持つ。第Ib相から治験に参加する東京大学、および慶応大学においては、それぞれ、平25.9/26、平25.11/12にIRB承認を得た。Tregおよび抗原特異的免疫反応の解析は大阪大学、岡山大学、川崎医科大学で行う。また、NY-ESO-1、XAGE1b及びCCR4の発現解析は、東京医科大学にて行う。尚、研究協力者として、大阪大学大学院消化器外科臨床登録医 和田 尚、愛知医科大学医学部腫瘍免疫寄附講座 准教授 鈴木 進、及び、愛知医科大学医学部臨床研究支援部門 教授 吉川和宏が、本研究を支援する。

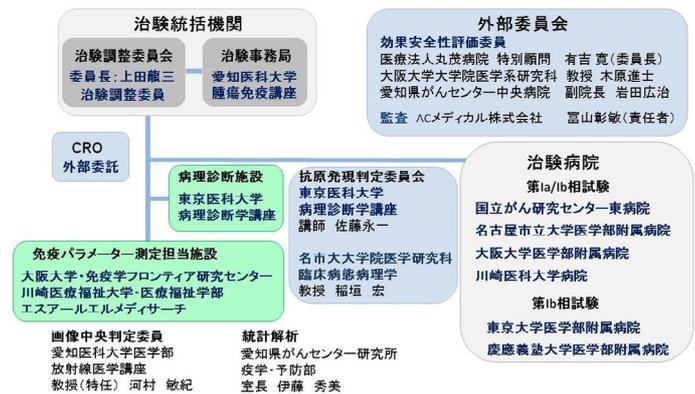


図2 治験組織図

### 「治験基本デザイン」

第Ia相:NY-ESO-1あるいはXAGE1b抗原陽性かつCCR4陰性で、標準治療抵抗性の進行・再発固形がんのうち、肺癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、悪性黒色腫患者を対象に、Mogamulizumabの投与量増量試験を行う。Mogamulizumabを毎週1回計8回投与し、安全性及び薬物動態の検討から、忍容性の認められる用量を決定する。0.1mg/kg投与群3例(最大6例)から開始し、0.5mg/kg投与群3例(最大6例)、1.0mg/kg投与群3例(最大6例)に移行する。安全性は、CTCAE v4.0日本語訳JCOG/JSCO版に準じて評価する。群間移行は、用量制限毒性の評価対象である第12週までのデータにて可能とする。尚、用量制限毒性(DLT)に相当するGrade3以上の非血液毒性が各群1例に見られた場合には、6例中2例までを許容する。また、CCR4陽性Treg細胞除去効果、NY-ESO-1あるいはXAGE1bに対する免疫応答増強効果についてそれぞれ解析すると

ともに、有効性についても検討する。

第 1b 相：忍容性の確認された投与群のうち高用量(20 例)及び 0.1mg/kg(20 例)の 2 群 (第 1a 相部で 0.5mg/kg が MTD の場合、0.1mg/kg 1 群) について Mogamulizumab を毎週 1 回計 8 回投与する。安全性と、末梢血中 Treg 除去効果を主要評価項目とし、副次目的として、有効性を評価する。第 1a/1b 相ともに有効性は RECIST にて評価するとともに、無増悪生存期間 (PFS)、全生存期間 (OS) を観察する。腫瘍抗原特異的液性反応は ELISA 法にて評価する。また附随研究として第 1a/1b 相ともに細胞性免疫反応を ELISPOT 法、サイトカイン捕捉法、細胞内サイトカイン染色法で解析するほか、Treg の機能活性についても検討する。さらに、モニタリングマーカーの探索についても実施する。

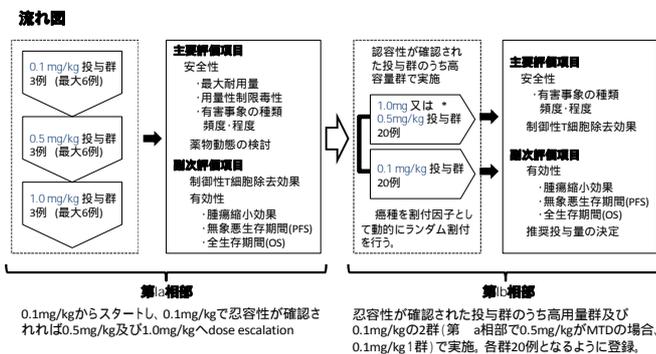


図3 治験計画の概要

## 2) 附随研究

治療と免疫動態との関連について明らかにするため、付随研究として、分担研究者により、治験と並行して、下記の研究が、実施されている。

抗 CCR4 抗体投与と制御性 T 細胞の関連の解析；大阪大学特任准教授 西川博嘉

Mogamulizumab 投与 ATL 患者における、Treg 及び特異的免疫の動態解析；名市大准教授 石田高司

XAGE-1b および NY-ESO-1 抗原特異的抗体反応および CD4、CD8 T 細胞反応の解析、T 細胞表面マーカー解析；川崎医療福祉大学教授 中山睿一

健常者、がん患者における PD-1、Tim-3 の発現解析；岡山大学教授 鵜殿平一郎

癌性胸膜炎/腹膜炎による胸水/腹水中の免疫環境の解析；東大附属病院特任准教授 垣見和宏

悪性黒色腫患者における NY-ESO-1, XAGE など腫瘍抗原の発現と免疫に関する解析；慶応大学助教 船越健

## 3) Treg アッセイ標準化

各施設で取得した Treg 測定データの共有化をはかるため、大阪大学特任教授 西川博嘉が中心となり、Treg 機能分画を適正に測定するための解析方法、測定方法について標準化、共有化を試みた。

(倫理面への配慮)

1. 本研究は多施設共同の医師主導治験として GCP に則り実施する。
2. 本臨床研究への参加はヘルシンキ宣言にのっとり、十分な説明のもと本人の書面による同意(インフォームド・コンセント)を得て実施される。
3. 検体の解析は院内 IRB の承認後関連する指針を遵守して実施する。本研究は本人の書面による同意を得て実施され、検体は匿名化され、情報は厳重に管理される。

## C. 研究結果

### 1) 第 1a 相治験

平成 24 年度状況

治験開始に向け、治験実施計画書等、治験関連書類を作成し、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) 対面助言を受けた。また平行して、治験実施体制の整備、各医療機関における IRB の承認、医薬品(モガムリズマブ)の供与に関する契約締結等、事務的手続きを完了させた。さらに技術面の準備として、制御性 T 細胞検査、抗原特異的抗体免疫反応検査に対するバリデーションを実施した。これら準備期間を経て、予定どおり平成 24 年 2 月末より、第 1a 相治験を開始した。登録状況を平成 25 年度と併せて、表 1 に示した。

**表1 第1a相治験患者登録状況**

投与量	登録	対象	施設名
0.1mg	A1-01	肺がん	川医大
	A1-02	肺がん	川医大
	A1-03	肺がん	名市大
0.5 mg	A2-01	肺がん	川医大
	A2-02	肺がん	名市大
	A2-03	食道がん	国がん東
1.0 mg	A3-01	食道がん	国がん東
	A3-02	肺がん	川医大
	A3-03	食道がん	阪大
	A3-04	肺がん	川医大

平成 25 年度状況

継続して第 1a 相治験を推し進め、半年前倒しで完遂させた。主要評価、及び副次評価結果について以下に示した。

主要評価項目

- ・安全性; DLT に該当する事象は認められなかった。1.0mg/kg 投与群まで DLT の発現が認められなかったことから、MTD は 1.0mg/kg を超える用量と推察できる。従って、1.0mg/kg を忍容性が確認された投与量とした。その他、有害事象の内容・発現率等に用量依存性は認められなかった。ATL 患者治療において、重篤な皮膚障害が報告されている。本第 1a 相治験 10 例においては、7 例に皮疹を認めたが、いずれもグレード 2 以下であった。
- ・薬物動態; 検討中。

副次評価項目

- ・制御性 T 細胞(Treg)除去効果; 検討し得た 6 症例全例において末梢血においてエフェクター-Treg 除去効果を確認した。
- ・有効性(RECIST 変法); SD 4 例、PD 3 例

2) 第 1b 相治験

第 1a 相治験の結果を踏まえ、効果安全性評価委員会において、DLT 発現が無かったことの確認と、忍容量を 1.0mg/kg とすることの承認を得た後、平成 25 年 10 月 21 日から、第 1b 相での患者登録が開始された。癌種を割り付け因

子として動的にランダム割り付けを行い、平成 25 年度内に合計 14 名の患者にプロトコール治療が開始された(表 2)。

**表 2 第 1b 相治験患者登録状況**

対象	登録No.	施設名
食道がん	B-01	国がん東
	B-08	国がん東
	B-09	大阪大学
	B-10	大阪大学
	B-11	名市大
悪性黒色腫	B-04	慶應大学
	B-05	慶應大学
	B-06	慶應大学
	B-07	名市大
	B-12	慶應大学
卵巣がん	B-02	大阪大学
	B-13	大阪大学
肺がん	B-03	川崎医大
胃がん	B-14	国がん東

3) 附随研究

附随研究成果の概略を以下に示した。詳細は各分担研究報告を参照されたい。

抗 CCR4 抗体投与と制御性 T 細胞の関連の解析

- 悪性黒色腫浸潤リンパ球における Treg 機能サブセットの解析を行ったところ、浸潤している Treg の大部分は CCR4 を強発現する effector T 細胞であった。
- 悪性黒色腫由来末梢血単核球から、抗 CCR4 モノクローナル抗体で CCR4 陽性細胞を除去したところ、effector Treg がほぼ 100%除去された。さらに、除去後、NY-ESO-1 に特異的な T 細胞の誘導を試みたところ、CD4+T, CD8+T ともに、特異的な反応が明らかに増強した。

Mogamulizumab 投与 ATL 患者における、Treg 及び特異的免疫の動態解析

- Mogamulizumab を投与した ATL 患者末梢血中の Treg 機能サブセットを解析したところ、effector Treg の顕著な低下がみられ、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の誘導効率の著しい向上が認められた。
- 皮膚障害をはじめとする Mogamulizumab の

有害事象は effector Treg の低下による異常免疫の活性化が関与するものと考えられた。

XAGE-1b および NY-ESO-1 抗原特異的抗体反応および CD4、CD8 T 細胞反応の解析、T 細胞表面マーカー解析

a. 投薬前に XAGE-1b 抗体反応陽性であった 4 例中 3 例において、抗体反応の有意な上昇を認めた。投薬前に NY-ESO-1 抗体反応陽性であった 1 例においても有意な上昇を認めた。

b. 抗原特異的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞反応を解析したところ、XAGE-1b 抗原抗体陽性の 1 例で CD8<sup>+</sup>T 細胞の TNF $\alpha$  産生細胞の有意な上昇を認めた。

c. 投薬前後で末梢血中 M-MDSC の解析を行ったところ、検討した 3 例全例においてその増加を認めた。

健常者、がん患者における PD-1、Tim-3 の発現解析

CD8<sup>+</sup>T 細胞上 PD-1 の発現はがん患者において発現が低く、サイトカイン産生と正相関がみられた。Tim-3 については、がん患者において高く、サイトカイン産生と逆相関の関係にあり、免疫治療効果とも相関した。

癌性胸膜炎/腹膜炎による胸水/腹水中の免疫環境の解析

様々な癌種において、末梢血中 Treg 機能サブセット解析を行ったところ、いずれのがん種(肺癌、胆管癌、膵臓癌、胃癌、食道癌、大腸癌)においても健常人に比べて、effector Treg の値が高くなった。また、卵巣癌患者腹水中 Treg 機能サブセットについて解析したところ、effector Treg の比率が高値であった。さらに、腹水中のがん細胞は PD-L1 を高発現し、CD8<sup>+</sup>T 細胞は、PD-1 の発現が高かった。

悪性黒色腫患者における NY-ESO-1、XAGE など腫瘍抗原の発現と免疫に関する解析

NY-ESO-1 免疫染色を行った悪性黒色腫のうち、27 症例において予後の比較を行ったところ、統計学的有意差はみられなかったものの、NY-ESO-1 を発現している症例において予後の良い傾向がみられている。

#### 4) Treg アッセイ標準化

大阪大学免疫学フロンティア研究センター

(西川特任准教授)で測定したデータを本研究事業参加施設 10 施設に送付し、解析方法の標準化を実施した。第一回目の集計では、施設間でのばらつきが生じたが、同センターからの解析方法の指導により、改善された。次に、あらかじめ測定方法について、同センターのレクチャーにより共有化した上で、配布した凍結末梢血単核球の測定を実施したところ、施設間のばらつきは小さく、十分に測定法、解析法の標準化が達成された。

#### 5) プロトコール改訂

25 年度は以下に示したようにプロトコールの改訂を 3 度にわたり実施した。

a. 第 2.0 版 (平 25. 4/16)

HBV-DNA 検査を実施する条件、MTD の定義、並びに遺伝子解析方法の明確化

b. 第 3.0 版 (平 25. 8/20)

腫瘍ワクチン等の免疫療法の wash out 期間の変更、治験薬提供者による安全

c. 第 4.0 版 (平 26. 1/19)

サイトカイン療法の wash out 期間の変更、甲状腺機能検査の追加明確化

#### D. 考察

医師主導治験として順調に患者登録、プロトコール治療が進み、Ia 相については半年前倒しで完了し、Ib 相についても、25 年度内に 14 症例についてプロコール治療が開始された。Ia 相における、重要な評価項目である、安全性については効果安全性評価委員会において DLT 発現が無かったことの確認と、忍容量を 1.0mg/kg とすることの承認をもって担保された。また、Treg 除去効果については、全例において減少効果を認め、治験薬の標的に対する直接的効果が証明された。同時並行的に附随研究においては、Treg 除去による、抗腫瘍免疫活性の増強効果が明らかとなっている。大阪大学 西川特任准教授は、健常人、がん患者末梢血単核球を用いた *in vitro* 実験において、抗 CCR4 モノクローナル抗体による Treg の除去により、NY-ESO-1 に対する細胞性免疫の増強効果を報告している。また、名古屋市立大学 石田准教授は、

Mogamulizumab 治療を受けた ATL 患者において、effector Treg の顕著な低下と、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の誘導効率の著しい向上を報告している。さらに、川崎福祉医療大学 中山教授により、Mogamulizumab 治療後に、XAGE-1b, NY-ESO-1 に対する、液性免疫、細胞性免疫の増強を認めた症例が報告されている。これらの研究結果は、Mogamulizumab 投与を受けた、患者においては、Treg の減少のみでなく、抗腫瘍免疫活性が上昇していることが考えられ、Mogamulizumab の proof of concept の実証に近づいていることを期待させる。

Treg の患者末梢血における解析、腫瘍局所による解析も進められた。東京大学 垣見特任准教授からは、様々な癌種において、末梢血中 effector Treg 比率の上昇が報告された。卵巣癌患者腹水中においても高い値を示している。西川特任准教授からは悪性黒色腫において、CCR4 強発現 effector Treg の顕著な浸潤を認めることが報告された。これまでも、多くの論文において、がんの発症、進行における Treg の重要性が指摘されているが、改めて、Treg 除去による、免疫抑制環境の改善の重要性を認識した。

免疫治療効果のバイオマーカー検索についても若干の成果があった。CD8+T 細胞上 Tim-3 の発現ががん患者において高く、サイトカイン産生と逆相関し、治療効果も反映していることが岡山大学 鷗殿教授より報告された。表面マーカーによる免疫モニタリングは、検査コスト、労力の点でサイトカインの測定より、実用的であり、今後の展開が期待される。

一方で、*in vitro* ではあるが活性化 CTL 上に CCR4 が発現するという検討結果が研究協力者である愛知医科大学 鈴木准教授により得られている。抗腫瘍免疫活性を上昇させるはずの Mogamulizumab が、逆に低下させてしまう事態となることが憂慮されるため、現在、腫瘍局所における CD8+T 細胞上の CCR4 の発現について検討中である。これまでのところ CCR4 陽性 CD8+T 細胞はまれにみられるのみであり、治療効果への影響は限定的と考えている。

Treg アッセイ法の標準化を本研究事業参加施設 10 施設において実施した。西川特任准教

授主導の下、Treg 機能サブセットの解析、測定を共通プロトコール作成の下実施し、各施設間でのデータの乖離を縮小、標準化させることに成功した。このような取り組みはデータの施設間での共有につながり、非常に有用と考えられた。今後の全国的な広がりが期待される。

#### E. 結論

1) Ia 相治験を完了した。安全性と、Treg 除去効果が確認された。また、Ib 相治験を開始し、25 年度までに、14 症例についてプロトコール治療を開始した。

2) Treg 除去による、抗腫瘍免疫亢進効果が附随研究により明らかとなった。

3) Treg アッセイの標準化を実施した。施設間における測定結果の乖離が是正され、データの共有化が可能となった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 関連論文発表

英文

1. Ogura M, **Ishida T**, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, Fujimoto K, Yamamoto K, Miyamoto T, Uike N, Tanimoto M, Tsukasaki K, Ishizawa K, Suzumiya J, Inagaki H, Tamura K, Akinaga S, Tomonaga M, **Ueda R**. Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-CCR4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014 Apr 10;32(11):1157-63.
2. Narita T, **Ishida T**, Masaki A, Suzuki S, Ito A, Mori F, Yamada T, Masaki Ri, Kusumoto S, Komatsu H, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Niimi A, **Iida S**, **Ueda R**. HTLV-1 bZIP factor specific CD4 T cell responses in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol*. 2014 Feb 1;192:940-7.
3. Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, Honda H, Yamashita T, Nohara S, **Oka M**, Jimbow K, and

- Nakayama E.** TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimid-dextran (NPCMD). *J Dermatol Sci*, 73(3): 209-215, 2014.
4. Mizote Y, Uenaka A, Isobe M, Wada H, **Kakimi K**, Saika T, Kita S, Koide Y, **Oka M**, and **Nakayama E.** Production of NY-ESO-1 peptide/DRB1\*08:03 tetramers and ex vivo detection of CD4 T-cell responses in vaccinated cancer patients. *Vaccine*, 32(8): 957-964, 2014.
  5. Wada H, Isobe M, **Kakimi K**, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, **Udono H**, Seto Y, Yamada K, **Nishikawa H**, Pan L, Venhaus R, **Oka M**, **Doki Y**, **Nakayama E.** Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother*, 37(2): 84-92, 2014.
  6. Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, **Ishida T**, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, Mizokami M, **Ueda R**, Utsunomiya A. Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepatol Res*. 2014 Mar;44(3):354-7.
  7. **Nishikawa H**, Sakaguchi S; Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. Jan 9;27:1-7 2014.
  8. Mori F, **Ishida T**, Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Yamada T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imada K, Takaori-Kondo A, Niimi A, **Ueda R**, Inagaki H, **Iida S**. Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. *Eur J Haematol*. 2014 Mar;92(3):219-28.
  9. Zwick C, Held G, Auth M, Bernal-Mizrachi L, Roback JD, Sunay S, **Iida S**, Kuroda Y, Sakai A, Ziepert M, **Ueda R**, Pfreundschuh M, Preuss K-D. Over one third of African-American MGUS and multiple myeloma patients are carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, an autosomal-dominantly inherited risk factor for MGUS/MM. *Int J Cancer* 2014; Jan 20 Epub ahead of print.
  10. Nishikawa S, Konno M., Hamabe A., Hasegawa S., Ogawa H., Kano Y., Fukusumi T., Ohta K., Noguchi Y, Ozaki M., Kudo T., Sakai D., Haraguchi N., Satoh T., **Doki Y.**, Mori M. and Ishii. Aldehyde dehydrogenasehigh gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy. *Int J Oncol* 2014; 42: 1437-1442
  11. Ogino T., Nishimura J., Barman S., Kayama H., Uematsu S., Okuzaki D., Osawa H., Haraguchi N., Uemura M., Hata T., Takemasa I., Mizushima T., Yamamoto H., Takeda K., **Doki Y.**, Mori M. Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterol* 2014;145 (6):1380-1391
  12. Wada I, Matsushita H, Noji S, Mori K, Yamashita H, Nomura S, Shimizu N, Seto Y, **Kakimi K**. Intraperitoneal injection of in vitro expanded Vγ9Vδ2 T cells together with zoledronate for the treatment of malignant ascites due to gastric cancer. *Cancer Med*. 2014 Apr;3(2):362-75.
  13. Ichimura T, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Matsushita H, **Kakimi K**, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M. Prognostic Significance of CD204-Positive Macrophages in Upper Urinary Tract Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014 Feb 4. [Epub ahead of print]
  14. Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, **Ishida T**, **Ueda R**, Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H. Prognostic impact of miR-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Human Pathol*, in press
  15. Sugiyama D, **Nishikawa H**, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E and Shakaguchi S; Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking anti-tumor immune responses in humans. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 110(44):17945-17950 2013.
  16. **Ishida T**, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Takatsuka Y, Eto T, Miyazaki Y, Hidaka M, Uike N, Miyamoto T, Tsudo M, Sakamaki H, Morishima Y, Suzuki R, Utsunomiya A. Impact of GVHD on allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma focusing on preconditioning regimens: nationwide retrospective study *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant.* . 2013;19:1731-9.
  17. Suzuki T, Kusumoto S, Yoshida T, Mori F, Ito A, Ri M, **Ishida T**, Komatsu H, Niimi A, **Iida S**. Successful salvage therapy using lenalidomide in a patient with relapsed multiple myeloma after

- allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2013;97:540-3.
18. Masaki A, **Ishida T**, Suzuki S, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Yamada T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, **Iida S**, **Ueda R**. Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOD/Shi-*scid*, IL-2R $\gamma^{\text{null}}$  mouse model. *J Immunol.* 2013;191(1):135-44.
  19. Sato F, **Ishida T**, Ito A, Mori F, Masaki A, Takino H, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Suzuki S, Komatsu H, Niimi A, **Ueda R**, Inagaki H, **Iida S**. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model. *Leuk Res.* 2013;37:21-7.
  20. Inagaki A, Tajima E, Uranishi M, Totani H, Asao Y, Ogura H, Masaki A, Yoshida T, Mori F, Ito A, Yano H, Ri M, Kayukawa S, Kataoka T, Kusumoto S, **Ishida T**, Hayami Y, Hanamura I, Komatsu H, Inagaki H, Matsuda Y, **Ueda R**, **Iida S**. Global real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detecting proto-oncogenes associated with 14q32 chromosomal translocation as a valuable marker for predicting survival in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2013;37:1648-55.
  21. Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, **Ishida T**, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood.* 2013 Jun 13;121(24):4894-901.
  22. Kato H, Saito C, Ito E, Furuhashi T, Nishida E, **Ishida T**, **Ueda R**, Inagaki H, Morita A. Bath-PUVA Therapy Decreases Infiltrating CCR4-Expressing Tumor Cells and Regulatory T Cells in Patients With Mycosis Fungoides. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013 Jun;13(3):273-80.
  23. **Ishida T**, Ito A, Sato F, Kusumoto S, **Iida S**, Inagaki H, Morita A, Akinaga S, **Ueda R**. Stevens-Johnson syndrome associated with mogamulizumab treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci* 2013; 104: 647-650.
  24. Takaki A, Yagi T, Yasunaka T, Sadamori H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Sato D, Nobuoka D, Utsumi M, Yasuda Y, **Nakayama E**, Miyake Y, Ikeda F, Shiraha H, Nouse K, Fujiwara T, and Yamamoto K. Which patients respond best to hepatitis B vaccination after a hepatitis B virus-related liver transplantation? *J Gastroenterol*, 48(12): 1373-1383, 2013.
  25. Pandey J, Namboodiri A, Ohue Y, **Oka M**, **Nakayama E**. Genetic variants of immunoglobulin and chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Exp Immunol*, 176(1): 78-83, 2013.
  26. Reis BS, Jungbluth AA, Frosina D, Holz M, Ritter E, **Nakayama E**, Ishida T, Obata Y, Carver B, Scher H, Scardino P, Slovin S, Subudhi SK, Reuter VE, Savage C, Allison JP, Melamed JM, Jager E, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S. Prostate cancer progression correlates with increased humoral immune response to a human endogenous retrovirus GAG protein. *Clin Cancer Res*, 19(22): 6112-6125, 2013.
  27. Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, **Nakayama E**, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, and Kamihira M. T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 8(6): 891-902, 2013.
  28. Muraoka D, **Nishikawa H**, Noguchi T, Wang L, Harada N, Guillaume P, Luescher I, Uenaka A, **Nakayama E**, Old LJ, Kato T, and Shiku H. Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8+ T cells. *Vaccine*, 31(17): 2110-2118, 2013.
  29. Jimbow K, Ishii-Osai Y, Ito S, Tamura Y, Ito A, Yoneta A, Kamiya T, Yamashita T, Honda H, Wakamatsu K, Murase K, Nohara S, **Nakayama E**, Hasegawa T, Yamamoto I, and Kobayashi T. Melanoma-targeted chemo-thermotherapy and in situ peptide immunotherapy through HSP production by using melanogenesis substrate, NPrCAP and magnetite nanoparticles. *J. Skin Cancer*, 2013: 742925, 2013.
  30. Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Fujita J, Hirao T, Makari Y, Shibata K, Iijima S, Jungbluth AA, Nakamura Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, **Nakayama E**, Mori M, and **Doki Y**. NY-ESO-1 antibody as a novel tumor marker of gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 108(5): 1119-1125,

2013.

31. Atarashi K, Tanoue T, Suda W, Oshima K, Nagano Y, **Nishikawa H**, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M and Honda K; Treg induction by a rationally selected Clostridia cocktail from the human microbiota. *Nature*. 500 (7461):232-236 2013
32. Hirayama M, **Nishikawa H**, Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnjatich S, and Shiku H.; Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of *Streptococcus pyogenes*. *Eur J Immunol*. 43 (4):989-1000 2013
33. Adeegbe DO, **Nishikawa H**; Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Frontiers in Immunology*. 4:190 2013
34. Noguchi T, Ritter G, **Nishikawa H**; Antibody-based therapy in colorectal cancer. *Immunotherapy*. 5 (5):533-545 2013
35. Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, **Nishikawa H**, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N.; Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol*. 41(4):367-376 2013
36. Suzuki T, Kusumoto S, **Iida S**, Tada T, Mori F. Amelanotic malignant melanoma of unknown primary origin metastasizing to the bone marrow: case report and review of the literature. *Int Med*. 2013;53: 325-328.
37. Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino SH, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osako M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, **Doki Y**, Shiku H. Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients. *J Transl Med*. 2013 11:246
38. Takahashi T, Serada S., Ako M., Fujimoto M., Miyazaki Y., Nakatsuka R., Ikezoe T., Yokoyama A., Taguchi T., Shimada K., Kurokawa Y., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Takiguchi S., Mori M., **Doki Y.**, Naka T., Nishida T. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. *Int J Cancer* 2013;133(11):2737-2743
39. Suzuki R., Yamamoto H., Ngan CY., Ohtsuka M., Kitani K., Uemura M., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Sekimoto M., Minamoto T., **Doki Y.**, Mori M. Inhibition of angiopoietin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels in vivo. *Int J Oncol* 2013;43(5):1447-1455
40. Nagano H., Tomimaru Y., Eguchi H., Hama N., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S., Mori M., **Doki Y.** MicroRNA-29a induces resistance to gemcitabine through the Wnt/ -catenin signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2013;43(4):1066-1072
41. Tsujinaka T. Yamamoto K., Fujita J., Endo S., Kawada J., Nakahira S., Shimokawa T., Kobayashi S., Yamasaki M., Akamaru Y., Miyamoto A., Mizushima T., Shimizu J., Umeshita K., Ito T., **Doki Y.**, Mori M.; Clinical Study Group of Osaka University on Section of Risk Management. Subcuticular sutures versus staples for skin closure after open gastrointestinal surgery: a phase 3, multicentre, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2013;382(9898); 1105-1112
42. Iwagami Y., Eguchi H., Nagano H., Akita H., Hama N., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S., Tomokuni A., Tomimaru Y., Mori M., **Doki Y.** miR-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via SMARCC1. *Br J Cancer* 2013; 109(2):502-511
43. Eikawa S, **Kakimi K**, Isobe M, Kazushima K, Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, **Nishikawa H**, **Udono H**, **Oka M**, **Nakayama E**. Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. *Int J Cancer* 132(2):345-54, 2013

#### 和文

1. 和田 尚, **中山書一**, 免疫バイオマーカーと抗腫瘍効果, 実験医学 増刊 腫瘍免疫学とがん免疫療法, 羊土社, 31(12): 204 - 208, 2013.
2. 和田 尚, **中山書一**, 「がん患者における免疫モニタリング 評価法と国際標準化」, 週

刊 医学のあゆみ がんの免疫制御 研究  
と臨床の最前線、医歯薬出版株式会社、  
244(9): 871-877, 2013.

3. 前田優香、西川博嘉：成人 T 細胞白血病・リンパ腫における免疫応答 臨床免疫・アレルギー科, 59:367-376 2013
4. 杉山大介、西川博嘉：免疫抑制の克服による抗腫瘍免疫応答増強の可能性 医学のあゆみ, 244:800-807 2013
5. 西塔拓郎、西川博嘉：Tregs 制御による抗腫瘍免疫応答増強の可能性 医学のあゆみ, 246: 913-920 2013
6. 西岡めぐみ、西川博嘉：制御性 T 細胞による抗腫瘍免疫抑制 そのコントロールによる効果的ながん免疫療法の可能性 実験医学 31, 1864-1872 2013

## 2. 学会発表 (総括研究者のみ)

### 海外

1. Tatsuro Jo, **Takashi Ishida**, Shigeki Takemoto, Hitoshi Suzushima, Kimiharu Uozumi, Kazuhito Yamamoto, Naokuni Uike, Yoshio Saburi, Kisato Nosaka, Atae Utsunomiya, Kensei Tobinai, Hiroshi Fujiwara, Kenji Ishitsuka, Shinichiro Yoshida, Naoya Taira, Yukiyo Moriuchi, Kazunori Imada, Toshihiro Miyamoto, Masao Tomonaga, **Ryuzo Ueda**. Randomized phase II study of mogamulizumab (KW-0761) plus VCAP-AMP-VECP (mLSG15) versus mLSG15 alone for newly diagnosed aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL). 2013 ASCO Annual Meeting, Oral Abstract Session, J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 8506)
2. **Ryuzo Ueda**, Michinori Ogura, **Takashi Ishida**, Kiyohiko Hatake, Masafumi Taniwaki, Kiyohiko Ando, Kensei Tobinai, Katsuya Fujimoto, Kazuhito Yamamoto, Toshihiro Miyamoto, Naokuni Uike, Mitsune Tanimoto, Kunihiro Tsukasaki, Kenichi Ishizawa, Junji Suzumiya, Hiroshi Inagaki, Kazuo Tamura, Shiro Akinaga, Masao Tomonaga. The Efficacy and Safety of Mogamulizumab (KW-0761) in Multicenter Phase II Study for Patients with Relapsed Peripheral or Cutaneous T-Cell Lymphoma (oral) (abs 041) 12th International Conference on Malignant Lymphoma. 19-22 June 2013. Lugano, Switzerland.
3. Shigeki Takemoto, **Takashi Ishida**, Tatsuro Jo, Kimiharu Uozumi, Hitoshi Suzushima, Kazuhito Yamamoto, Naokuni Uike, Yoshio Saburi, Kisato Nosaka, Atae Utsunomiya, Kensei Tobinai, Hiroshi Fujiwara, Kenji Ishitsuka, Shinichiro Yoshida, Naoya Taira, Yukiyo Moriuchi, Kazunori Imada, Toshihiro Miyamoto, Kunihiro Tsukasaki, Masao Tomonaga, **Ryuzo Ueda**. Combination of Mogamulizumab (KW-0761) with VCAP-AMP-VECP (mLSG15) is Well Tolerated and Effective as an Initial Therapy for Aggressive Adult T-Cell Leukaemia-Lymphoma (ATL) (oral) (abs 154) 12th International Conference on Malignant Lymphoma. 19-22 June 2013. Lugano, Switzerland.

### 国内

1. 鈴木 進、**石田高司**、森 芙美子、伊藤 旭、楠本 茂、小松弘和、吉川和宏、**中山豊一**、飯田真介、新実彰男、**上田龍三**、ホジキンリンパ腫における NY-ESO-1 に対する液性および細胞性免疫応答 (ポスター)、横浜 (第 72 回日本癌学会学術総会)、2013 年 10 月 5 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
XAGE-1b 特異的免疫反応を誘導するペプチドおよびその利用 (国際特許出願中 : OP00570/PCT/US)
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。



固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題：液性免疫・細胞性免疫モニタリング

研究分担者 中山 睿一 川崎医療福祉大学 教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

抗CCR4抗体投与による有効性の指標として、XAGE-1bおよびNY-ESO-1抗原に対する抗体反応を検討した。血液サンプルは、ベースライン、7週、12週、12週以降は可能な限り4週毎、維持投与時は9回目投与日より4週毎に採取した。血漿又は血清中の抗体価は、ELISA法により、合成XAGE-1bタンパク及び組換えNY-ESO-1タンパクに対する反応を測定した。昨年度は、健常人における血漿又は血清を用いて、ELISA法および機器のバリデーションを行った。バリデーション項目は、1. ELISA法プロトコールの作成、2. 日差変動試験、3. 抗体陽性・陰性のカットオフ値の設定およびノーマライゼーションファクターの算出、4. 日内変動試験、5. 凍結融解試験、6. 保存試験、7. 機器の精度管理である。この他、ワークシートも作成した。

今年度は、治験症例16例(Ia相9例、Ib相7例)についてXAGE-1bおよびNY-ESO-1抗体価を測定し、このうち3例については抗原特異的CD4およびCD8T細胞反応の解析を実施した。

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

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

本医師主導治験は、川崎医大倫理委員会の承認を受け、本研究内容は付随研究として実施している。患者および家族の人権および利益の

保護に十分配慮している。がん患者の組織および血液は担当医によるインフォームド・コンセントを得て提供を受け、匿名化して研究室に保存している。

### C. 研究結果

#### 1. XAGE-1b および NY-ESO-1 抗体反応解析

第 Ia 相部症例 9 例 (肺癌 7 例、食道癌 2 例)、第 Ib 相部症例 7 例 (肺癌 1 例、食道癌 2 例、悪性黒色腫 3 例、卵巣癌 1 例) について XAGE-1b および NY-ESO-1 抗体反応を ELISA 法で検討した (表 1 および 2)。

Ia 相部において XAGE-1b 抗原は 9 例中 (肺癌 7 例、食道癌 2 例) 3 例 (肺癌 3 例) で陽性、NY-ESO-1 抗原も同じく 9 例中 3 例 (肺癌 3 例) で陽性であった。そのうち 1 例 (肺癌) は XAGE-1b および NY-ESO-1 共に陽性であった。

表 1 治験 Ia 相

症例	XAGE-1b			NY-ESO-1		
	抗原発現	投与前抗体価	抗体価増減	抗原発現	投与前抗体価	抗体価増減
A1-01: KMSH-01	-	陰性	なし	+	陽性(OV: x45516)	なし
A1-02: KMSH-02	-	陰性	なし	+	陰性	なし
A1-03: NCUH-01 投与中止8W(6)	-	陰性	なし	-	陽性(OV: x1151)	なし
A2-01: KMSH-03	+	陽性(OV: x4491)	あり <sup>5W: x6323</sup> ( <sup>9W: x4923</sup> )	+	陽性(OV: x2185)	あり <sup>5W: x2983</sup> ( <sup>9W: x4525</sup> )
A2-02: NCUH-02 投与中止7W	-	陰性	なし	-	陰性	なし
A2-03: NCC-01	-	陰性	なし	-	陰性	なし
A3-01: NCC-02	-	陰性	なし	-	陰性	なし
A3-02: KMSH-04 投与中止8W(7)	+	陽性(OV: x128240)	なし	-	陰性	なし
A3-04: KMSH-05	+	陽性(OV: x1512)	あり <sup>5W: x1534</sup> ( <sup>9W: x1839</sup> )	-	陰性	なし

表 2 治験 Ib 相

症例	XAGE-1b			NY-ESO-1		
	抗原発現	投与前抗体価	抗体価増減	抗原発現	投与前抗体価	抗体価増減
B-01 NCC-03 投与中止8W(6)	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-02 OUH-04	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-03 KMSH-07 投与中止10W(8)	+	陽性(OV: x10561)	あり <sup>5W: x9231</sup> ( <sup>9W: x7503</sup> )	-	陰性	なし
B-04 KEI-01	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-05 KEI-03 投与中止6W(5)	-	陰性	なし	-	陰性	なし
B-07 NCUH-08	-	陰性	なし	+	陰性	なし
B-08 NCC-04 投与中止5W(2)	-	陰性	なし	-	陰性	なし

XAGE-1b 抗体反応は、3 例（肺癌 3 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で 2 例（肺癌 2 例）において抗体価の有意な上昇を認めた。NY-ESO-1 抗体反応は、3 例（肺癌 3 例：抗原陽性抗体陽性 2 例、抗原陰性抗体陽性 1 例）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で 1 例（肺癌）において抗体価の有意な上昇を認めた。

Ib 相部においては、XAGE-1b 抗原は 7 例中（肺癌 1 例、食道癌 2 例、悪性黒色腫 3 例、卵巣癌 1 例）1 例（肺癌）で陽性、NY-ESO-1 抗原も 7 例中 1 例（悪性黒色腫）で陽性であった。

XAGE-1b 抗体反応は、1 例（肺癌）で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与 9 週時点で抗体価の有意な低下を認めた。NY-ESO-1 抗体反応は、1 例（悪性黒色腫）で治験薬投与前に陰性で、治験薬投与 9 週時点で抗体価の上昇は認めなかった。

## 2. 抗原特異的 CD4、CD8 T 細胞反応解析

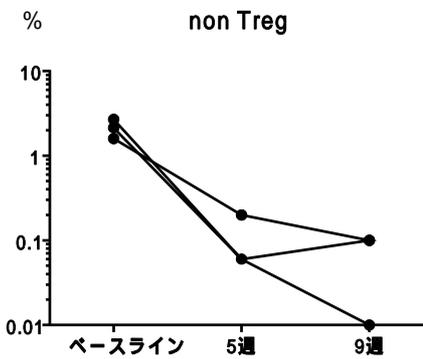
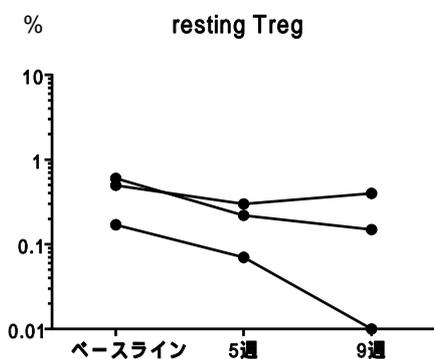
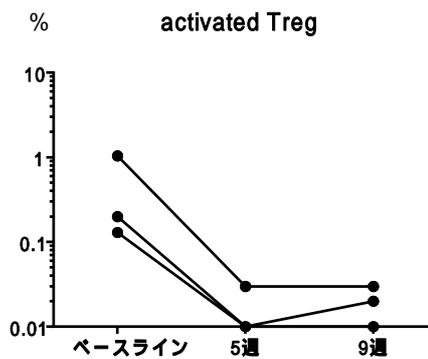
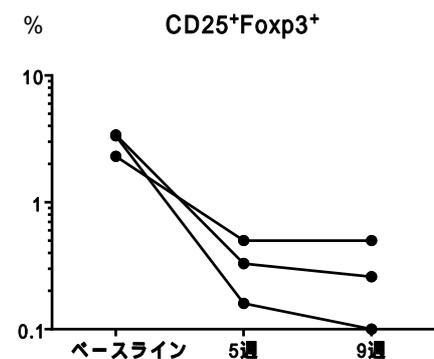
Ia 相部において川崎医科大学で登録した肺癌症例 5 例のうち 3 例について、抗原特異的 CD4、CD8 T 細胞反応を経時的に免疫モニタリングによって解析した。

XAGE-1b 抗原抗体陽性 1 例でベースライン、7 週、12 週の抗原特異的 T 細胞免疫応答を検討した結果、12 週時点で CD8 T 細胞の TNF 産生細胞の有意な上昇を認めた。本症例では、XAGE-1b 抗体についても有意な上昇を認めている。

NY-ESO-1 抗原抗体陽性 1 例、抗原のみ陽性 1 例で同様の検討を行ったが、抗原特異的な T 細胞免疫応答の上昇は認めなかった。

## 3. Treg および MDSC 解析

Ia 相部において川崎医科大学で登録した肺癌症例 5 例のうち 3 例について、ベースライン、5 週、9 週における制御性 T 細胞分画（CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>分画、CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>lo</sup> resting Treg 分画、CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>hi</sup> activated Treg 分画、CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>lo</sup> non Treg 分画）および MDSC 分画をフローサイトメトリー法で解析した。その結果、3 例すべてにおいて、ベースラインに比較して投与 5 週、9 週において CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>、Activated Treg、non Treg 分画の減少を認めた（図 1）。Resting Treg 分画は 3 例中 1 例で低下傾向であったが、2 例は横ばいであった。



MDSC 分画の解析においては、M-MDSC 分画は 3 例中 1 例で著明な増加を認め、2 例で緩やかな増加を認めた。

#### 4. T 細胞表面活性化分子および抑制性分子解析

ベースライン、7 週、12 週における T 細胞表面活性化分子および抑制性分子の発現を検討した。CD4 表面上の ICOS 分子の発現が 3 例全例において上昇傾向であった。CD8 における ICOS 発現は 1 例において上昇傾向であったが、2 例は横ばいであった。CD4 表面上の PD-1 分子の発現は、2 例において上昇傾向であった。一方、CD8 における PD-1 分子の発現は 3 例において緩やかな上昇を認めた。

#### D. 考察

第 Ia/Ib 相部登録症例 16 例(肺癌 8 例、食道癌 4 例、悪性黒色腫 3 例、卵巣癌 1 例)のうち、XAGE-1b 抗原については 4 例(肺癌 4 例)が陽性、NY-ESO-1 抗原についても 4 例(肺癌 3 例、悪性黒色腫 1 例)が陽性であった。そのうち 1 例(肺癌)は XAGE-1b と NY-ESO-1 抗原共に陽性であった。

XAGE-1b 抗体反応は、4 例(肺癌 4 例)で治験薬投与前に陽性であり、治験薬投与により 3 例(肺癌 3 例)で抗体価の有意な上昇を認めた。

NY-ESO-1 抗体反応は、4 例(肺癌 3 例、悪性黒色腫 1 例)で治験薬投与前に陽性であり、1 例(肺癌)で抗体価の有意な上昇を認めた。

肺癌症例 5 例のうち、3 例について経時的に抗原特異的 CD4、CD8 T 細胞反応を免疫モニタリングにより解析し、XAGE-1b 抗原抗体陽性例の 1 例で CD8 T 細胞の TNF 産生細胞の有意な上昇を認めた。一方、NY-ESO-1 抗原陽性例 3 例では抗原特異的な T 細胞免疫応答の上昇は認めなかった。

Treg 分画の解析では、3 例すべてにおいて、CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>、Activated Treg、non Treg 分画の減少を認めた。一方、M-MDSC 分画は 3 例で増加を認めた。

T 細胞表面活性化分子および抑制性分子解析では、CD4 表面上の ICOS 分子の発現が上昇し

た。

#### E. 結論

Mogamulizumab 投与によって、末梢血中の Treg は除去された。CD4 上の活性化分子である ICOS の誘導が確認されたが、Treg 除去によるものと考えられる。さらに、一部の症例においては、抗原特異的な液性および細胞性免疫が誘導されていることが確認できた。しかしながら免疫抑制細胞である M-MDSC の上昇を認め、Mogamulizumab 投与によって Treg が除去されても、免疫活性化が抑制されている可能性がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表 英文

- (1) Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, Honda H, Yamashita T, Nohara S, Oka M, Jimbow K, and Nakayama E. TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimid-dextran (NPCMD). *J Dermatol Sci*, 73(3): 209-215, 2014.
- (2) Mizote Y, Uenaka A, Isobe M, Wada H, Kakimi K, Saika T, Kita S, Koide Y, Oka M, and Nakayama E. Production of NY-ESO-1 peptide/DRB1\*08:03 tetramers and ex vivo detection of CD4 T-cell responses in vaccinated cancer patients. *Vaccine*, 32(8): 957-964, 2014.
- (3) Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Udono H, Seto Y, Yamada K, Nishikawa H, Pan L, Venhaus R, Oka M, Doki Y, Nakayama E. Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with

- cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother*, 37(2): 84-92, 2014.
- (4) Takaki A, Yagi T, Yasunaka T, Sadamori H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Sato D, Nobuoka D, Utsumi M, Yasuda Y, Nakayama E, Miyake Y, Ikeda F, Shiraha H, Nouse K, Fujiwara T, and Yamamoto K. Which patients respond best to hepatitis B vaccination after a hepatitis B virus-related liver transplantation? *J Gastroenterol*, 48(12): 1373-1383, 2013.
- (5) Pandey J, Namboodiri A, Ohue Y, Oka M, Nakayama E. Genetic variants of immunoglobulin  $\gamma$  and  $\kappa$  chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Exp Immunol*, 176(1): 78-83, 2013.
- (6) Reis BS, Jungbluth AA, Frosina D, Holz M, Ritter E, Nakayama E, Ishida T, Obata Y, Carver B, Scher H, Scardino P, Slovin S, Subudhi SK, Reuter VE, Savage C, Allison JP, Melamed JM, Jäger E, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S. Prostate cancer progression correlates with increased humoral immune response to a human endogenous retrovirus GAG protein. *Clin Cancer Res*, 19(22): 6112-6125, 2013.
- (7) Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, Nakayama E, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, and Kamihira M. T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 8(6): 891-902, 2013.
- (8) Muraoka D, Nishikawa H, Noguchi T, Wang L, Harada N, Guillaume P, Luescher I, Uenaka A, Nakayama E, Old LJ, Kato T, and Shiku H. Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Vaccine*, 31(17): 2110-2118, 2013.
- (9) Jimbow K, Ishii-Osai Y, Ito S, Tamura Y, Ito A, Yoneta A, Kamiya T, Yamashita T, Honda H, Wakamatsu K, Murase K, Nohara S, Nakayama E, Hasegawa T, Yamamoto I, and Kobayashi T. Melanoma-targeted chemo-thermotherapy and in situ peptide immunotherapy through HSP production by using melanogenesis substrate, NPrCAP and magnetite nanoparticles. *J. Skin Cancer*, 2013: 742925, 2013.
- (10) Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Fujita J, Hirao T, Makari Y, Shibata K, Iijima S, Jungbluth AA, Nakamura Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Nakayama E, Mori M, and Doki Y. NY-ESO-1 antibody as a novel tumor marker of gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 108(5): 1119-1125, 2013.
- 和文
- (11) 和田 尚、中山睿一、免疫バイオマーカーと抗腫瘍効果、*実験医学 増刊 腫瘍免疫学とがん免疫療法*、羊土社、31(12): 204 - 208, 2013.
- (12) 和田 尚、中山睿一、「がん患者における免疫モニタリング 評価法と国際標準化」、*週刊 医学のあゆみ がんの免疫制御 研究と臨床の最前線*、医歯薬出版株式会社、244(9): 871-877, 2013.
2. 学会発表
- (13) Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Ohue Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E, Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb. (ポスター) Washington, DC, USA

- ( 104th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR) ) 2013 年 4 月 6 日
- (14) Ohue Y, Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Matsumoto H, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Nakayama E, Oka M, Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance.( ポスター ) Washington, DC, USA ( 104th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR) ) 2013 年 4 月 6 日
- (15) 黒瀬浩史, 松本博文, 大植祥弘, 阿部公亮, 榮川伸吾, 溝手 雄, 磯辺みどり, 上中明子, 永安 武, 中山睿一, 岡 三喜男、非小細胞肺癌患者における癌精巢抗原 XAGE-1d に対する免疫応答 ( 口頭 ) 東京 ( 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 ) 2013 年 4 月 19 日
- (16) 大植祥弘, 橋高 誠, 黒瀬浩史, 池田征樹, 阿部公亮, 清水大樹, 毛利圭二, 加藤茂樹, 尾長谷 靖, 小橋吉博, 福田 実, 中山睿一, 岡 三喜男、がん精巢抗原 XAGE-1b を標的にしたがん免疫療法の開発 ( ポスター ) 東京 ( 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 ) 2013 年 4 月 19 日
- (17) Isobe M, Eikawa S, Kakimi K, Wada H, Mizote Y, Ohue Y, Kurose K, Uenaka A, Oka M, Nakayama E, phase I study of vaccination with 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. ( 口頭 ) 山口 ( 第 17 回日本がん免疫学会総会 ) 2013 年 7 月 3 日
- (18) Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Ohue Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E, Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb. ( 口頭 ) 山口 ( 第 17 回日本がん免疫学会総会 ) 2013 年 7 月 3 日
- (19) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto Y, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Oka M, Nakayama E, Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance.( 口頭 ) 山口 ( 第 17 回日本がん免疫学会総会 ) 2013 年 7 月 3 日
- (20) 溝手 雄, 若松一雅, 伊藤祥輔, 上中明子, 黒瀬浩史, 大植祥弘, 西尾祐美, 岡 三喜男, 神保孝一, 中山睿一、新規製剤 N-propionyl cysteaminyphenol-maleimid-dextran(NP-CMD)による免疫応答賦活効果 ( 口頭 ) 山口 ( 第 17 回日本がん免疫学会総会 ) 2013 年 7 月 3 日
- (21) Kurose K, Ohue Y, Mizote Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E, Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb. ( ポスター ) 仙台 ( 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 ) 2013 年 8 月 29 日
- (22) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto Y, Isobe M, Fukuda M, Uenaka A, Nakayama E, Oka M, Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance.( 口頭 ) 仙台 ( 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 ) 2013 年 8 月 29 日
- (23) Kurose K, Ohue Y, Mizote Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E, Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb. ( ポスター ) New York, USA ( 21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium ) 2013 年 9 月 30 日
- (24) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto H, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Oka M, Nakayama E, Prolonged overall survival in XAGE-1b(GAGED2a) antibody positive NSCLC patients. ( ポスター ) New York, USA ( 21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium ) 2013 年 9 月 30 日
- (25) 西塔拓郎, 和田 尚, 磯辺みどり, 垣見和宏, 榮川伸吾, 大植祥弘, 西川博嘉, 岡 三喜男, 森 正樹, 土岐祐一郎, 中山睿一,

NY-ESO-1 重複長ペプチドを用いたがんワクチン第 相臨床試験(口頭) 横浜(第 72 回日本癌学会学術総会) 2013 年 10 月 4 日

(26) 榮川伸吾、垣見和宏、磯辺みどり、和田 尚、上中明子、葛島清隆、西川博嘉、鶴殿平一郎、岡 三喜男、中山睿一、NY-ESO-1(NY-ESO-1 91-110)ペプチドワクチンによる抗体 CD4・CD8 T 細胞免疫応答の誘導(口頭) 横浜(第 72 回日本癌学会学術総会) 2013 年 10 月 4 日

(27) 溝手 雄、若松一雅、伊藤祥輔、上中明子、黒瀬浩史、大植祥弘、西尾祐美、岡 三喜男、神保孝一、中山睿一、新規製剤 NPCMD による TLR4、NLRP3 の活性化と T 細胞免疫応答の賦活化(ポスター) 横浜(第 72 回日本癌学会学術総会) 2013 年 10 月 4 日

(28) 鈴木 進、石田高司、森 芙美子、伊藤 旭、楠本 茂、小松弘和、吉川和宏、中山睿一、飯田真介、新実彰男、上田龍三、ホジキンリンパ腫における NY-ESO-1 に対する液性および細胞性免疫応答(ポスター) 横浜(第 72 回日本癌学会学術総会) 2013 年 10 月 5 日

(29) 黒瀬浩史、大植祥弘、堅田洋佑、阿部公亮、磯辺みどり、松本博文、上中明子、中山睿一、

岡 三喜男、Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb.(ポスター) 東京(第 54 回日本肺癌学会総会) 2013 年 11 月 21 日

(30) 大植祥弘、黒瀬浩史、松本博文、阿部公亮、堅田洋佑、磯辺みどり、上中明子、福田実、中山睿一、岡 三喜男、Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance.(口頭) 東京(第 54 回日本肺癌学会総会) 2013 年 11 月 21 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

XAGE-1b特異的免疫反応を誘導するペプチドおよびその利用(国際特許出願中: OP00570/PCT/US)

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野))  
分担研究報告書(平成25年度)

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: 臨床治験管理、第 a/ b相治験

研究分担者 土井俊彦 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 先端医療科長

研究要旨

進行再発がん患者に対して Mogamulizumab(抗CCR4抗体)を週1回反復投与した際の安全性及び薬物動態を検討すること(第a相部)及び週1回反復投与した際の安全性及び制御性T細胞除去効果を検討すること(第b相部)を目的として多施設共同試験を計画し、研究を継続している。平成24年2月より登録が開始され、目標症例数は第Ia相部9例(最大18例)、第Ib相部40例である。平成26年3月31日現在、全施設で第Ia相部9例、第Ib相部12例の新規症例登録が登録された。

A. 研究目的

進行再発がん患者に対して Mogamulizumab(抗CCR4抗体)を週1回反復投与した際の安全性及び薬物動態を検討すること(第a相部)及び週1回反復投与した際の安全性及び制御性T細胞除去効果を検討すること(第b相部)を目的とする。

B. 研究方法

多施設共同研究としてプロトコル作成、共通プロトコルでの症例集積および試験治療を実施している。

(倫理面への配慮)

本試験は、ヘルシンキ宣言に則った試験実施計画書に基づいて計画され、参加全施設の倫理審査の承認と患者本人からの文書での同意を得てから登録を行う。また、個人情報等の保護も十分に配慮して試験を遂行する。

C. 研究結果

本試験は、平成25年2月より登録が開始。平成26年3月31日現在、全施設で第Ia相部9例、第Ib相部12例の新規症例登録が登録された。

D. 考察

がん患者では、制御性T細胞が抗腫瘍免疫反応を抑制していることが知られている。制御性T細胞のうち、特に活性化制御性T細胞は膜表面にCCR4を発現することから、Mogamulizumab投与により活性化制御性T細胞分画を除去し臨床効果をもたらされることが評価されれば、進行再発がんの治療成績の向上が期待される。

E. 結論

進行再発がん患者に対して Mogamulizumab(抗CCR4抗体)を週1回反復投与した際の安全性及び薬物動態を検討すること(第a相部)、及び週1回反復投与した際の安全性及び制御性T細胞除去効果を検討すること(第b相部)を目的として多施設共同試験を計画し、研究を継続している。平成24年2月より登録が開始され、目標症例数は第Ia相部9例(最大18例)、第Ib相部40例である。平成26年3月31日現在、全施設で第Ia相部9例、第Ib相部12例の新規症例登録が登録された。目標症例数の達成まで試験を継続する。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: 抗体療法企画・管理

研究分担者 飯田 真介 公立大学法人名古屋市立大学 准教授

研究要旨

活性化制御性T細胞(Treg)表面に発現するケモカイン受容体であるCCR4分子を標的としたヒト化ポテリジェント抗体、Mogamulizumab(KW-0761)を用いて、進行・再発固形がん患者における抗腫瘍免疫増強効果を狙った第Ia/Ib相医師主導治験を実施した。第Ia相においては0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kgの3コホートでの安全性と薬物動態の検討を行った。当院では5名の患者から同意を取得し、肺癌患者2名に対して0.1mg/kgおよび0.5mg/kg群に登録して治験治療を実施した。いずれの患者においても用量制限毒性(DLT)は認められず、治療開始後にTreg減少効果を認めた。第Ia相には、全施設で計10名が登録されたが、DLTは認められなかった。第Ia相の結果を受けて、平成25年10月21日から開始された第Ib相では、安全性とTreg除去効果を主要評価項目として、0.1mg/kgと1.0mg/kgのランダム化試験が行われることとなった。当院では平成25年度に、悪性黒色腫および食道がん患者各1名に対して治験治療を開始した。

A. 研究目的

進行再発固形がん患者を対象に、ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体(Mogamulizumab/KW-0761)の医師主導第Ia/Ib相治験を計画し実施する。第Ia相では、Mogamulizumabを週1回反復投与した際の安全性および薬物動態を検討する。第Ib相では、週1回投与した際の安全性および制御性T細胞除去効果を検討し、第II相部での推奨投与量を決定することを目的とする。

B. 研究方法

主要評価項目:

- 1) 第Ia相 安全性: 最大耐用量(MTD)、用量制限毒性(DLT)、有害事象の種類・頻度・程度、薬物動態の検討
- 2) 第Ib相 安全性: 有害事象の種類・頻度・程度、制御性T細胞除去効果

3) 対象患者:

進行又は再発固形がん患者で、登録時に以下の規準を満たす場合に適格とする: 1) 腫瘍細胞のCCR4発現が陰性であり、且つ病理組織診断で肺癌、胃癌、食道癌、悪性黒色腫、卵巣癌の悪性腫瘍の診断が確定している、2) 標準治療に不応・不耐性の患者、適切な治療法がない患者、又は標準治療を拒否した患者、3) performance status(ECOG基準)が0、1、2、4) 主要臓器(骨髄、心、肺、肝、腎等)に高度な障害がなく臨床検査値(登録前2週間以内)が以下の基準を満たす、5) 好中球数 1,500/ $\mu$ L以上、ヘモグロビン値 8.0g/dL以上、血小板数 75,000/ $\mu$ L以上、血清総ビリルビン値 2.0mg/dL以下、AST/ALT値 施設上限値 x 2.5倍以下、血清クレアチニン 1.5mg/dL以下、動脈血酸素飽和度 93%以上、心電図上治療を要する異常を認めない、左心駆出率 50%以上、6) 同意取得時から治験薬投与終了後24週まで避妊に同意、7) 本人が書面で同意している、

8) Mogamulizumab 初回投与から翌日までの入院が可能、9) RECIST ver1.1 における測定可能病変を有する、10) 3ヶ月以上の生存が期待できること。ただし下記の除外規準を満たさないこと：1) HIV 抗体陽性、2) HCV 抗体陽性、3) 自己免疫疾患あり、4) HBs 抗原が陽性もしくは HBV-DNA が陽性、5) 抗体製剤の投与により重篤な過敏症の既往歴を有する、6) 重複がんを有する、7) 前治療から治験薬投与開始予定日まで 4 週以上経過していない、8) 妊娠中、授乳中、あるいは妊娠の可能性がある、9) 活動性の感染症を合併している、10) 精神障害又は認知症患者、11) 全身性のステロイド剤投与による治療の継続が必要、12) 造血幹細胞移植等の移植療法が実施された患者、13) 中枢神経浸潤を有する、14) 登録 4 週間以内に他の治験薬を投与されている、15) その他治験遂行に不適当と考えられる。

#### 治験デザイン：

第 1a 相部は、各コホート 3～6 名づつ、0.1mg/kg から開始し、忍容性が確認されれば 0.5mg/kg 及び 1.0mg/kg へ増量を行う。第 1b 相部では、忍容性が確認された投与群のうち高用量群及び 0.1mg/kg の 2 群（第 a 相部で 0.5mg/kg が MTD の場合、0.1mg/kg 1 群）で実施。がん種を割り付け因子として各群 20 例となるように登録する。

#### 投与方法：

【第 a 相部】0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg のいずれかの投与量を 1 週間に 1 回 2 時間かけて静脈内投与し、計 8 回投与する。用量制限毒性 (DLT) 評価期間は 5 回目の投与前までとした。

【第 b 相部】第 a 相部で 1.0mg/kg までの忍容性が確認された場合は 0.1mg/kg 又は 1.0mg のいずれか、0.5mg/kg までの忍容性が確認された場合は 0.1mg/kg 又は 0.5mg/kg のいずれか、0.1mg/kg までの忍容性が確認された場合は 0.1mg/kg を 1 週間に 1 回 2 時間かけて静脈内投与し、計 8 回投与する。【第 a 相部・第 b 相部共通】9 回目以降の投与は、維持投与の実施基準（8 回投与後に制御性 T 細胞除去効果及び抗原特異的抗体免疫反応又は RECIST において SD 以上が確認された被験者）を満たした場合に可能とし、4 週毎に治験薬を投与する。投与前

の前処置として、治験薬投与の 30 分前にジフェンヒドラミン 30～50mg 及びアセトアミノフェン 300～500mg を内服する。初回投与時にはハイドロコチゾン 100mg を静脈内に投与する。併用療法：骨転移例に対するゾレドロン酸やパミドロネートの静脈内点滴、及びデノスマブの皮下注射については、本治験参加前から継続していた場合は、4 週に 1 回の投与であれば併用可とする。

#### 投与中止基準：

1) 投与延期基準により 2 週間を超えて延期となった場合、2) 24 週目以降において RECIST の変法の評価で総合効果が PD であった場合、3) grade 3 以上の皮膚障害が発現した場合、4) 治験責任医師により治験継続が困難と判断される場合、5) 被験者が治験の中止を申し出た場合、6) 不適格例であることが判明した場合、7) その他、治験責任医師が中止すべきと判断した場合である。

#### 治験で実施する検査：

ベースライン検査としては、一般血液検査、腫瘍マーカー、尿検査、CT または MRI による画像検査、腫瘍抗原 (NY-ESO-1, XAGE-1b) 発現検査、CCR4 発現検査、抗原特異的抗体免疫反応検査、制御性 T 細胞検査を実施する。治験治療開始後は、一般血液検査や尿検査に加えて、抗原特異的抗体免疫反応検査、制御性 T 細胞検査を実施する。第 1a 相部では薬物動態検査を実施する。加えて、任意ではあるが書面での同意がいただけた場合には、免疫増強効果検査、遺伝子バイオマーカー検査も実施する。

#### 予定登録症例数：

第 1a 相部は各群 3 例（最大 6 例）で計 3～18 例、第 1b 相部は各群 20 例づつで計 40 例

#### 治験実施期間：

2013 年 2 月～2015 年 6 月

#### 倫理面への配慮：

本治験は、「ヘルシンキ宣言」ならびに、且つ治験実施計画書、薬事法第 14 条第 3 項及び第 80 条の 2 に規定する基準及び「医薬品の臨床試験実施の基準に関する省令 (GCP)」(厚生省令 第 28 号) に則り実施する。本治験の実施に先立ち、各実施医療機関の治験審査委員会において、治験実施計画書、被験者の同意を得

るのに使用される方法、治験薬概要書及びその他の必要な文書を審議し、本治験が倫理的及び科学的に妥当であるかどうか、その他、本治験が実施医療機関において行うのに適当であるかどうかを審査し承認を得た上で患者登録を開始する。治験責任医師等は、被験者に治験について十分に説明し、文書による同意を得る。被験者が熟読し保管できるように、治験の詳細を示した説明文書を被験者に渡し、被験者に情報を十分に考慮する時間を与え、疑問点を確認した後で、同意文書に署名及び日付を記入していただく。

### C. 研究結果

#### 1) 第 1a 相への患者登録とプロトコール治療の実施

名古屋市立大学病院においては、KW-0761 の臨床第 1a 相への参加同意を 5 名の患者から得た。病理検体の免疫染色で CCR4 抗原陰性を確認した肺がん患者 2 名、卵巣がん患者 2 名、悪性黒色腫患者 1 名であり、肺がん患者 2 名はそれぞれ KW-0761 0.1mg/kg 群と 0.5mg/kg へ登録され、プロトコール治療を実施した。卵巣がん患者 2 名は、第 1a 相において登録待機中に原疾患の増悪のため不適格となった。悪性黒色腫患者 1 名は、患者希望で登録を延期したが、その後の増悪のため不適格となった。

プロトコール治療を受けた肺がん患者 2 名は、扁平上皮癌の病期 IIIB および腺がんの病期 IIIA であり、それぞれ 0.1mg/kg の KW-0761 を週 1 回で 5 回投与、0.5mg/kg の KW-0761 を週 1 回で計 7 回投与した。0.1mg/kg 群に登録された患者では、4 回目の投与後から皮疹が出現、5 回目の投与後にグレード 2 の疼痛を伴い拡大傾向のある多型滲出性紅斑を認めたため抗ヒスタミン剤内服とステロイド軟膏を使用し改善傾向にあったが、休薬中に原病の増悪を認めたため患者希望で治験治療は中止となった。0.5mg/kg に登録された患者は、2 回目の投与後に原病増悪による喘鳴とグレード 2 の呼吸難が出現するも対症療法によって継続投与が可能であったが、原疾患増悪により治験治療は中止に至った。何れの患者においても前投薬により輸注反応は認めず、投与開始後 28 日以内での

用量制限毒性は認めなかった。またベースライン採血に比して、KW-0761 投与後 29 日目の CD4 陽性 T リンパ球分画中の制御性 T 細胞分画は減少していた。ともに NY-ESO-1 および XAGE-1b 抗原は陰性であり、それらの癌精巢抗原に対する免疫反応増強効果も認めなかった。

全施設においては、0.1mg/kg に 3 名、0.5mg/kg に 3 名、1.0mg/kg に 4 名が登録され何れの投与量においても用量制限毒性は観察されなかった。投与開始後 12 週での効果判定が可能であった 6 名においては 4 名で RECIST による安定 (SD) の最良効果が得られ、少なくとも 2 名において NY-ESO-1 または XAGE-1b 抗原に対する抗原特異的抗体免疫反応の上昇を確認した。皮疹はグレード 2 を 5 名 (50%) で認め、ステロイド剤の全身投与が 4 名で実施された。

#### 2) 第 1b 相への患者登録とプロトコール治療の実施

第 1a 相における用量制限毒性の発現がなかったことを含む安全性についての効果・安全性評価委員会での承認を経て、平成 25 年 10 月 21 日から第 1b 相での患者登録が開始された。KW-0761 の投与量は、癌種を割り付け因子として 0.1mg/kg と 1.0mg/kg のランダム化が開始された。名古屋市立大学病院では平成 25 年度に悪性黒色腫患者 3 名と食道がん患者 1 名から参加同意を得て、各々の患者各 1 名にプロトコール治療が実施された。悪性黒色腫患者は、グレード 2 の皮疹が出現するも対症療法でコントロール可能で計 8 回の投与を実施して治療効果判定を待っているところである。食道がん患者は、計 3 回の投与後に原疾患増悪による食思不振を発症し、その後担当医判断によりプロトコール治療中止に至った。平成 25 年度内に第 1b 相では計 14 名の患者にプロトコール治療が開始されている。

#### 3) プロトコール改訂

平成 25 年度には 3 回のプロトコール改定を実施した。第 1 版から 2 版への改訂は同年 5 月に実施し、HBs 抗原陰性であっても HBe 抗体または HBs 抗体陽性の被験者の場合は HBV-DNA が検出されない場合に登録が可能であること等の追記を行った。第 3 版への改定は同年 8 月に実施し、主な変更点として被験者の除外基準に、

「腫瘍に対する免疫療法（腫瘍ワクチン、サイトカイン等）が治療開始前 12 週間以内に行われていたこと」を追記した。第 3 回改定は平成 26 年 1 月に実施し、第 4 版への主な変更点として被験者の除外基準として「サイトカイン療法については治療開始前 4 週間以内に前治療として施行されていたこと」に変更したことである。これは、悪性黒色腫に対するインターフェロン 製剤投与患者が、本治験に参加希望されても 12 週間待たなければならぬ不都合が生じたためである。

#### 4) その他

治験患者登録と同時に開始した附随研究「抗 CCR4 抗体 (Mogamulizumab) 療法を受けた進行・再発がん患者における臨床効果と免疫関連有害事象を予測するゲノムバイオマーカーの探索的検討」には、第 1a 相において遺伝子倫理審査委員会承認が間に合わなかった 1 名を除いた 9 名から参加同意をいただき検体提出をいただいた。第 1b 相においても既に 14 名から同意をいただき末梢血単核球 (PBMC) と血清の保存を行っている。第 1a 相で検体提出をいただいた 9 名の PBMC からは既に DNA を抽出し Genome-wide association study (GWAS) 実施の準備を進めている。

#### D. 考察

がんの発生や制御には、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) が重要な役割を担っている。最近、CTL の働きを負に制御する CTLA4 分子や PD-1/PD-L1 分子を標的とした抗体療法が腫瘍の縮小効果を有することが示され、既に臨床応用が始まっている。一方、CTL を含む免疫系を負に制御している制御性 T 細胞 (regulatory T-cell: Treg) が、もう一つの治療標的として注目されている。Treg は CD4 陽性 CD25 陽性 FoxP3 陽性分画に存在するとされているが、本研究班の分担研究者である大阪大学の西川らはその中でも CCR4 陽性の分画に活性化 Treg が存在していることを明らかにしている。がん免疫療法が十分な効果を発揮できていないのも活性化 Treg による抗腫瘍免疫抑制作用によるものであることが推定されている。実際、最近 CCR4 ノックアウトマウスにおいては、Treg 作用の減弱のため腫瘍増殖が抑制されることが明らかになっている。

本治験において進行・再発固形がん患者に対する抗腫瘍免疫増強効果を期待して用いる Mogamulizumab (KW-0761) はポテリジェント技術を用いて ADCC 効果を増強したヒト化抗 CCR4 抗体である。Mogamulizumab 療法を受けた成人 T 細胞性白血病・リンパ腫 (ATLL) 患者の中で、顕著な抗腫瘍効果が認められた患者では、Treg の長期間の枯渇とともに、時に抗 Tax あるいは抗 NY-ESO-1 特異的な CD8 陽性 CTL が増加を示すことが観察されている。同様の Treg 減少効果と抗腫瘍免疫活性の増強は、CTLA4 分子の中和抗体である Ipilimumab を投与された悪性黒色腫患者においても観察されている。このように、Treg の減少により、CTL の増殖や活性化効果が期待される。しかし、固形がん患者においては ATLL 患者のように腫瘍細胞が直接 CCR4 を発現しているわけではないため、Mogamulizumab の投与量はより少なくても済む可能性がある。Mogamulizumab による有害事象で最も重篤な有害事象は、Treg 抑制により活性化された自己反応性 T 細胞によると考えられる皮膚障害をはじめとした自己免疫性有害事象 (immune-related adverse events: irAE) である。したがって本治験では、第 1a 相において ATLL 患者に対する推奨投与量である 1mg/kg の 1/10 の投与量である 0.1mg/kg から慎重に投与を開始し、安全性と薬物動態を確認しながら 1.0mg/kg まで増量するデザインとした。第 1b 相においては、患者体内における Treg の動態をセカンダリーエンドポイントに設定し、長期の Mogamulizumab 投与の安全性と Treg の減少効果、そして臨床効果や安全性を考慮して推奨投与量を決定するためのランダム化試験のデザインとした。また同時に 5 がん種を割り付け因子として、Mogamulizumab 療法の有効性が期待できるがん種を探索するように設定した。

第 1a 相の患者登録は 2013 年 2 月に開始され、順調に進捗した。0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg にそれぞれ 3 名、3 名、4 名が登録され DLT は観察されなかった。また本治験治療における輸注反応は、ATLL 患者への Mogamulizumab 投与時の輸注反応に比較して概して軽度であった。しかし、皮疹は 11 名中 7 名に出現し、グレード 2 の患者が 5 名であった。グレード 3 以上の自己免疫性有害事象は認められず、いずれも対症療法で対応可能であったが、第 1a 相での登録例数が少ないため引き続き十分な注意を行うことが班会議でも確認された。

第 1b 相の患者登録は、2013 年 10 月に開始となった。予定通り、0.1mg/kg と 1.0mg/kg の 2 群にラン

ダム化を行い、安全性とTreg減少効果をエンドポイントとして第II相試験における推奨用量と対象がん種を決定することとした。2014年3月末までに全施設で既に14名がランダム化され治験治療を開始している。当院においても既に2名の登録が行われ、治験治療を開始した。第Ib相における予定患者登録数は40名であり、残る26名の登録を2015年6月までに完遂できるように各施設および施設内の連携体制を整えてゆく方針である。

#### E. 結論

ヒト化単クローン性抗CCR4抗体 (Mogamulizumab) を用いてTregを抑制し、固形がん患者に対する抗腫瘍免疫の活性化を期待した医師主導の第I相臨床治験を順調に実施することが出来た。予定患者登録期間内に患者登録を完遂し、企業主導の臨床第II相治験に繋げてゆくことが本研究班の目的である。しかし、固形がん患者に対するMogamulizumabの投与経験は本研究班において世界で初めて成されるものであり、治験治療中の患者様の安全性、特にTreg減少に伴う重篤な自己免疫性有害事象の発生に十分に注意しながら進めることが重要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

英文

- (1) Ishida T, Ito A, Sato F, Kusumoto S, Iida S, Inagaki H, Morita A, Akinaga S, Ueda R. Stevens-Johnson syndrome associated with mogamulizumab treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci* 2013; **104**: 647-650.
- (2) Masaki A, Ishida T, Suzuki S, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Yamada T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, Iida S, Ueda R. Autologous tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOD/Shi-scid IL-2 $\gamma$ <sup>null</sup> mouse model. *J Immunol* 2013; **191**:

135-144.

- (3) Suzuki T, Kusumoto S, Iida S, Tada T, Mori F. Amelanotic malignant melanoma of unknown primary origin metastasizing to the bone marrow: case report and review of the literature. *Int Med*. 2013;53: 325-328.
- (4) Mori F, Ishida T, Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Yamada T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imada K, Takaori-Kondo A, Niimi A, Ueda R, Inagaki H, Iida S. Anti-tumor effect of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. *Eur J Hematol* 2014; 92: 219-228.
- (5) Narita T, Ishida T, Masaki A, Suzuki S, Ito A, Mori F, Yamada T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Niimi A, Iida S, Ueda R. HTLV-1 bZIP factor specific T cell response in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* 2014;192: 940-947.
- (6) Zwick C, Held G, Auth M, Bernal-Mizrachi L, Roback JD, Sunay S, Iida S, Kuroda Y, Sakai A, Ziepert M, Ueda R, Pfreundschuh M, Preuss K-D. Over one third of African-American MGUS and multiple myeloma patients are carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, an autosomal-dominantly inherited risk factor for MGUS/MM. *Int J Cancer* 2014; Jan 20 Epub ahead of print.

和文

該当なし

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: 第Ia/Ib相臨床治験の実施及び管理

研究分担者 土岐祐一郎・大阪大学消化器外科・教授

研究要旨

成人T細胞白血病リンパ腫に対する日本発のがん治療薬であるヒト化抗CCR4モノクローナル抗体(Mogamulizumab)を、制御性T細胞(Treg)の除去を介した抗腫瘍免疫増強による固形がん治療に用いるという革新的がん治療の実用化に関する臨床研究を行う。安全性、制御性T細胞除去効果及び薬物動態を検討することを目的に医師主導第Ia/Ib相臨床治験を食道・胃・婦人科・皮膚科癌を対象に実施している。また、抗原特異的免疫療法を並行して行うことにより、Mogamulizumabとの将来的な併用への準備をしている。

A. 研究目的

「がん対策基本法」による「がんの克服を目指し、がんに関する専門的、学際的又は総合的な研究を推進するとともに、がんの予防、診断、治療等に係る技術の向上その他の研究等の成果を普及し、活用し、及び発展させること」という基本理念の達成のため、成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)に対する日本発のがん治療薬であるヒト化抗CCR4モノクローナル抗体(Mogamulizumab/KW-0761)を、制御性T細胞(Treg)の除去を介した抗腫瘍免疫増強による固形がん治療に用いるという革新的がん治療の実用化に関する臨床研究を行う。Treg細胞表面にCCR4抗原が著明に強発現していることによる。大阪大学大学院・消化器外科では、安全性、制御性T細胞除去効果及び臨床効果を検討することを目的に医師主導第Ia/Ib相臨床治験を実施する。

B. 研究方法

臨床試験; 標準治療抵抗性CCR4抗原発現陰性の進行・再発肺・胃・食道・卵巣・皮膚がん患者を対象とし、第Ia相では、第Ib相に用いるMogamulizumabの最大投与量を決定する。投

与量増量試験を、0.1 mg/kg群に3例(最大6例)、0.5 mg/kg群に3例(最大6例)、1.0 mg/kg群に3例(最大6例)について行い、安全かつ十分なTreg除去(減少)効果を認める投与量を決定する。Mogamulizumabの投与回数は8回とし、週1回で投与する。第b相部は、第a相部において忍容性が確認された投与量のなかで高用量の1用量及び0.1mg/kgにて各群約20例となるように投与する。投与は、週に1回8週連続で静脈内投与する。

胃癌・食道癌患者に対する免疫療法の実践と解析; 当科では2004年より癌精巢抗原NY-ESO-1を用いた癌ワクチン療法を行ってきた。ワクチン投与患者体内における種々の免疫学的解析として、NY-ESO-1抗原特異的液性・細胞性免疫反応、腫瘍組織を用いた腫瘍細胞抗原・免疫担当細胞の免疫染色、投与抗原以外の腫瘍関連抗原に対する免疫反応の推移などを探索している。その中で、アジュバントの開発と抗原蛋白の投与形態の工夫をしている。

(倫理面への配慮) 大学病院の臨床試験部、臨床治験部とともに、適応症例に対する説明や登録手法を慎重に検討し、同意取得・記録保存・データ管理などに際しては対象患者への倫理

的配慮を十分に行っている。また参加症例の安全性確保のため、外来化学療法部と連携し、十分な観察を行っている。

### C. 研究結果

症例登録；3例の食道癌症例（OUH-03；平成25年7月に1例、OUH-05、-06；平成26年3月に2例それぞれ投与開始）、1例の卵巣癌症例（OUH-04；平成26年1月投与開始）が参加した。OUH-03は3回投与にて原疾患の増悪により離脱した。OUH-04は8回の投与を完遂し、評価を行う予定である。OUH-05、-06は現在投与を行っている。試験薬に関連した重篤な副作用は、観察していない。

NY-ESO-1がんワクチン臨床試験；NY-ESO-1抗原を用いたがんワクチン臨床試験を2004年より行っている。総蛋白を用いたワクチンでは2009年よりコレステリルプルラン（CHP）をドラッグデリバリーシステムとして用いた第一相臨床試験を行った。蛋白量として100 $\mu$ g群13例、200 $\mu$ g群12例が参加した。重篤な副作用は見られず安全な試験であった。両群を比較すると、200 $\mu$ g群においてNY-ESO-1特異的免疫反応が有意に良好に誘導され、また生存率においても有意に良好な成績が認められた。これによりNY-ESO-1蛋白ワクチンにおいて容量依存的に臨床効果が得られることを示した。一方、NY-ESO-1分子の高免疫原性部位を含む重複する長鎖ペプチドを用いたがんワクチン臨床試験を2009年より開始した。総蛋白は作製に混在物の存在と高額な費用が掛かる事に比して、長鎖ペプチドは安価で混在物も少なく作製でき、抗原提示細胞に効果的に取り込まれることなどから有効な抗原の形態としてワクチンに用いられている。この臨床試験では、重篤な有害事象は観察されず、2人のSD症例を見た。また、NY-ESO-1特異的免疫反応は効果的にほぼ全例において観察することができ、この長鎖ペプチドは有効なワクチン抗原の形態であることが証明された。

### D. 考察

症例選択・受け入れ・実施・他科協力などの方法・組織が確立・構築され、症例登録や試験薬の投与、症例の安全性の確保、記録などが十分に可能である。

進行癌症例に対するNY-ESO-1がんワクチンにおいて、NY-ESO-1蛋白ワクチンがCHPとの併用で、臨床的にかつ免疫誘導に関して有効かつ効果的であることが分かった。また、蛋白に代わり重複

する長鎖ペプチド群を用いた場合においても、有効ながんワクチンとなりうる可能性を示した。

### E. 結論

抗CCR4抗体療法を胃癌、食道癌をはじめとする各種固形がんに対して投与する医師主導治験を実施中である。NY-ESO-1抗原を用いたがんワクチン臨床試験を種々遂行した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

##### 英文

- (1) Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino SH, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osako M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, Doki Y, Shiku H. J Transl Med. 2013 11:246 Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients.
- (2) Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Uono H, Seto Y, Yamada K, Nishikawa H, Pan L, Venhaus R, Oka M, Doki Y, Nakayama E. Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. J Immunother. 2014;37(2):84-92.
- (3) Nishikawa S., Konno M., Hamabe A., Hasegawa S., Ogawa H., Kano Y., Fukusumi T., Ohta K., Noguchi Y, Ozaki M., Kudo T., Sakai D., Haraguchi N., Satoh T., Doki Y, Mori M. and Ishii. Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy. Int J Oncol 2014; 42: 1437-1442
- (4) Ogino T., Nishimura J., Barman S., Kayama H., Uematsu S., Okuzaki D.,

- Osawa H., Haraguchi N., Uemura M., Hata T., Takemasa I., Mizushima T., Yamamoto H., Takeda K., Doki Y., Mori M. Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterol* 2014;145 (6):1380-1391
- (5) Takahashi T. Serada S., Ako M., Fujimoto M., Miyazaki Y., Nakatsuka R., Ikezoe T., Yokoyama A., Taguchi T., Shimada K., Kurokawa Y., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Takiguchi S., Mori M., Doki Y., Naka T., Nishida T. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. *Int J Cancer* 2013;133(11):2737-2743
- (6) Suzuki R., Yamamoto H., Ngan CY., Ohtsuka M., Kitani K., Uemura M., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Sekimoto M., Minamoto T., Doki Y., Mori M. Inhibition of angiopoietin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels in vivo. *Int J Oncol* 2013;43(5):1447-1455
- (7) Nagano H., Tomimaru Y., Eguchi H., Hama N., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S., Mori M., Doki Y. MicroRNA-29a induces resistance to gemcitabine through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2013;43(4):1066-1072
- (8) Tsujinaka T. Yamamoto K., Fujita J., Endo S., Kawada J., Nakahira S., Shimokawa T., Kobayashi S., Yamasaki M., Akamaru Y., Miyamoto A., Mizushima T., Shimizu J., Umeshita K., Ito T., Doki Y., Mori M.; Clinical Study Group of Osaka University on Section of Risk Management. Subcuticular sutures versus staples for skin closure after open gastrointestinal surgery: a phase 3, multicentre, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2013;382(9898): 1105-1112
- (9) Iwagami Y., Eguchi H., Nagano H., Akita H., Hama N., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S., Tomokuni A., Tomimaru Y., Mori M., Doki Y. miR-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via SMARCC1. *Br J Cancer* 2013; 109(2):502-511
- 和文
- (10) RECIST と irResponse Criteria 4) Mogamulizumab の効果判定 和田 尚、西塔拓郎、長瀬博次、土岐祐一郎 腫瘍内科 vol.12 No.4, 394-400 2013
- (11) XIV 特論 胃癌に対する免疫療法 和田尚、土岐祐一郎 最新胃癌学 - 基礎と臨床の最新研究動向 - 日本臨床 72 巻増刊号 1 p735-739
2. 学会発表  
なし。
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

固形がんに対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia/Ib 相医師主導治験

分担研究課題：第 a/ b相臨床治験

研究分担者 岡 三喜男 川崎医科大学 教授

研究要旨

進行再発がん患者に対してMogamulizumab ( 抗CCR4抗体 ) を週1回反復投与した際の安全性及び薬物動態を検討すること ( 第 a相部 )、及び週1回反復投与した際の安全性及び制御性T細胞除去効果を検討すること ( 第 b相部 ) を目的とする医師主導治験である。

川崎医科大学は、約6カ月で医師主導治験の実施体制を整え、全国に先駆けて第一例目へ治験薬を投与し、肺がん症例を中心に症例を登録している。平成26年5月14日の現在、第 a相部で5例の患者に、第 b相部で1例に治験薬の投与を完了して、その安全性を確認した。現在も更なる症例登録を予定している。今後、安全性、忍容性の確認を行うとともに、臨床効果、制御性T細胞除去効果および免疫増強効果の検討を行う予定である。

A. 研究目的

進行再発がん患者に対して Mogamulizumab ( 抗 CCR4 抗体 ) を週 1 回反復投与した際の安全性及び薬物動態を検討すること ( 第 a 相部 ) 及び週 1 回反復投与した際の安全性及び制御性 T 細胞除去効果を検討すること ( 第 b 相部 ) を目的とする。

B. 研究方法

治験実施予定期間は平成 25 年 2 月～平成 27 年 6 月とし、進行又は再発固形がんで 腫瘍細胞の CCR4 発現が陰性 ( 診断は本邦で標準化されている方法を用いること ) であり、且つ病理組織診断で肺がん、胃がん、食道がん、悪性黒色腫、卵巣がんの悪性腫瘍の診断が確定している患者、標準治療に不応・不耐性の患者、適切な治療法がない患者、又は標準治療を拒否した患者、 performance status ( ECOG 基準 ) が 0、1、2 であること、 治験参加同意取得日の年齢が 20 歳以上であること、 主要臓器 ( 骨髄、心、肺、肝、腎等 ) に高度な障害がなく臨

床検査値 ( 登録前 2 週間以内 ) が基準を満たすこと、 同意取得時から治験薬投与終了後 24 週まで、コンドーム等の避妊方法による避妊に同意していること ( 閉経後 ( 最終月経から 1 年以上経過 ) 又は外科的不妊手術を施行した女性及び外科的避妊術を施行した男性は除く )、 本人が文書により同意していること、 Mogamulizumab の初回投与前から初回投与翌日まで投与入院が可能な患者 効果判定の対象になる RECIST version 1.1 ( New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1) ) における測定可能病変を有すること、 3 カ月間以上の生存が期待できる患者を対象に以下のように執り行う。

【第 a 相部】Mogamulizumab 0.1 mg/kg 群 3 例 ( 最大 6 例 )、その後 0.1 mg/kg 群の忍容性が確認された場合は 0.5 mg/kg 群を 3 例 ( 最大 6 例 )、0.5 mg/kg 群の忍容性が確認された場合は 1.0 mg/kg 群 3 例 ( 最大 6 例 ) について所定の用量の治験薬を週に 1 回 8 週連続で静脈内投与する。

【第 b相部】第 a相部において忍容性が確認された投与量 ( MTD の一段階下の投与量又は MTD に達

していない場合は1.0 mg/kg)のなかで高用量の1用量及び0.1 mg/kgにて各群20例となるように投与する。投与は、週に1回8週連続で静脈内投与する。ただし、第 a相部において、忍容性が確認された投与量が0.1 mg/kgのみであった場合は、第 b相部では、0.1 mg/kgの1用量を用いて20例となるように投与する。

なお、8回投与後の制御性T細胞検査及び抗原特異的抗体免疫反応検査あるいは画像診断において、制御性T細胞除去効果及び抗原特異的抗体免疫反応又はRECISTにおいてSD以上が確認された被験者については、被験者に治験薬の維持投与の希望があり、且つ治験責任医師等が治験薬の維持投与が適当と判断した場合は、12週以降4週毎に、投与中止基準に該当するまで治験薬の維持投与を可とする。

主要評価項目は第 a相部では、安全性：最大耐用量 (MTD)、用量制限毒性 (DLT)、有害事象の種類・頻度・程度と薬物動態の検討を行い、第 b相部では、安全性：有害事象の種類・頻度・程度と制御性T細胞除去効果を検討する。

さらに副次的評価項目として、第 a相部では制御性T細胞除去効果と有効性：腫瘍縮小効果、無増悪生存期間 (PFS)、全生存期間 (OS) を検討し、第 b相部では有効性：腫瘍縮小効果、無増悪生存期間 (PFS)、全生存期間 (OS) および第 相試験以降の推奨投与量の決定を行う。

付随研究として、同意を得られた患者より得た検体を用いて、担当研究機関と連携をとりながら、抗原特異的抗体免疫反応検査、抗原特異的細胞免疫反応検査、サイトカイン産生能評価、免疫担当細胞・制御細胞解析などを総合的に解析し抗原特異的なT細胞免疫の増強効果を証明する。

以上の治験および付随研究は、全て倫理面に配慮して、大学の倫理審査委員会で承認されている。

## C. 研究結果

医師主導治験実施の院内体制整備の為、平成24年7月に川崎医科大学学長、同附属病院病院長の了承を得てSOPの作成を開始した。同年11月のPMDA対面助言を契機に治験体制の準備が本格化し、同年12月に当院の治験委員会、病院運営委員会でSOPの承認を得た。さらに平成25年1月21日、治験審査委員会で治験の承認を得た後、病院運営

委員会でも承認され、平成25年1月23日付で川崎医科大学附属病院病院長から治験承認書が発行された。平成25年2月1日からCRCの業務を開始し、2月4日には外部機関によるシステム監査を終了した。同年2月12日、第一例目の治験同意を取得し、2月18日に治験登録を行った。平成25年2月26日、全国初の第一例目に治験薬の投与を行った。

その後、平成26年5月14日の現在、第 a相部の2例で0.1 mg/kg、1例で0.5 mg/kg、1例で1.0 mg/kgの用量で計5例の患者に治験薬を投与した。

第 a相部において、1例目は0.1 mg/kg の用量で治験薬の投与を行い、週に1回8週連続毎週投与で8回の治験薬を投与終了した後、6回の維持投与を行い中止となった。

2例目は0.1 mg/kg の用量で治験薬の投与を行い、週に1回8週連続毎週投与で8回の治験薬を投与終了した後、3回の維持投与を行い中止となった。

3例目は0.5 mg/kg の用量で治験薬の投与を行い、週に1回8週連続毎週投与で8回の治験薬を投与終了した後、3回の維持投与を行い中止となった。

4例目は1.0 mg/kg の用量で治験薬の投与を行い、週に1回8週連続毎週投与で7回の治験薬を投与終了し中止となった。

5例目は1.0 mg/kg の用量で治験薬の投与を行い、週に1回8週連続毎週投与で8回の治験薬を投与終了し中止となった。

全例で、DLTの発生はなく忍容性が確認された。現在は第 b相部に移行し、1例で治験薬の投与を終了している。

現在まで、当科の全患者において投与を完遂し、問題となる重篤な有害事象は認められなかった。今後、更なる症例登録を予定している。また、安全性、忍容性の確認を行うとともに、臨床効果、制御性T細胞除去効果および免疫増強効果の検討を行う予定である。

## D. 考察

平成24年6月の厚生労働省のヒアリングから約6カ月で医師主導治験の実施体制を整え、全国に先駆けて症例登録し、第一例目へ治験薬を投与し、さらに治験が順調に進行中である。現在まで投与した肺がん患者においてMogamulizumab (抗CCR4抗体)の安全性を確認した。

今後、Ib相で更なる症例登録を行っていくとともに、関連研究施設と密に連携をとって、臨床効果、制御性T細胞除去効果および免疫増強効果の検討を行う予定である。

## E. 結論

平成26年5月14日の現在、第 a相部で5例の患者に、第 b相部で1例に対して治験薬の投与を完了し、現在まで投与した肺がん患者において Mogamulizumab (抗CCR4抗体) の安全性を確認した。今後も更なる症例登録を予定している。今後、安全性、忍容性の確認を行うとともに、臨床効果、制御性T細胞除去効果および免疫増強効果の検討を行う予定である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 英文

- (1) Eikawa S, Kakimi K, Isobe M, Kazushima K, Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, Nishikawa H, Uono H, Oka M, Nakayama E. Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. *Int J Cancer* 132(2):345-54, 2013
- (2) Pandey JP, Namboodiri AM, Ohue Y, Oka M, Nakayama E. Genetic variants of immunoglobulin  $\gamma$  and  $\alpha$  chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Exp Immunol* 176(1):78-83, 2014
- (3) Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, Honda H, Yamashita T, Nohara S, Oka M, Jimbow K, Nakayama E. TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimid-dextran (NPCMD). *J Dermatol Sci* 73(3): 209-15, 2014
- (4) Mizote Y, Uenaka A, Isobe M, Wada H, Kakimi K, Saika T, Kita S, Koide Y, Oka M, Nakayama E. Production of NY-ESO-1 peptide /DRB1\*08:03 tetramers and their use for ex vivo detection of CD4 T-cell responses in the vaccinated cancer patients.

Vaccine 32(8): 957-64, 2014

#### 和文

- (5) 黒瀬浩史、大植祥弘、岡 三喜男：抗 CCR4 抗体と制御性 T 細胞、癌と化学療法 第 8 巻第 10 号：1150-1155、2013

### 2. 学会発表

- (6) Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Ohue Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E. Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb. 104th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR), April 6-10, 2013, Washington DC, USA.
- (7) Ohue Y, Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Matsumoto H, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Nakayama E, Oka M. Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and its clinical relevance. 104th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR), April 6-10, 2013, Washington DC, USA.
- (8) Kurose K, Ohue Y, Mizote Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E. Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb. 21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium, Sep 30-Oct 2, 2013, New York, USA.
- (9) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto H, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Oka M, Nakayama E. Prolonged overall survival in XAGE-1b (GAGED2a) antibody positive NSCLC patients. 21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium, Sep 30-Oct 2, 2013, New York, USA.
- (10) 黒瀬浩史、大植祥弘、堅田洋佑、阿部公亮、磯辺みどり、松本博文、上中明子、中山睿一、岡 三喜男、Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb、第 54 回日

本肺癌学会総会、平成 25 年 11 月 21-22  
日、東京

- (11) 大植祥弘、黒瀬浩史、松本博文、阿部公  
亮、堅田洋佑、磯辺みどり、上中明子、  
中山睿一、岡 三喜男、Immune response  
to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC  
patients and its clinical relevance、第 54 回  
日本肺癌学会総会、平成 25 年 11 月 21-22  
日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題:

日本人の悪性黒色腫患者におけるNY-ESO-1, XAGEなど腫瘍抗原の発現と免疫に関する解析

研究分担者 舩越 建 慶應義塾大学医学部皮膚科学 助教

研究要旨

近年、悪性黒色腫は分子学的にも疫学的にも異なる個性を有した疾患の集合体と考えられるようになってきている。今回我々は、抗腫瘍免疫を増強する治療が有効と予測できる因子と、それに関連して患者の予後を予測し得るマーカーの探索を行うことを目的として研究を進めている。当院で集積した悪性黒色腫94検体を用いて候補となるバイオマーカーの免疫染色をし、その発現強度と患者の予後および治療反応性を統計学的解析により比較検討している。

研究協力者

森 真理子 助教

種瀬 啓士 助教

と予後予測が可能なバイオマーカーの確立を目指している。

A. 研究目的

近年、悪性黒色腫の病態に対する理解は長足の進歩を遂げた。BRAF, NRAS, c-KIT等のERK1/2MAPKシグナル伝達経路を構成する因子の遺伝子変異が頻回に認められることが明らかとなり、BRAFのV600E変異を有する症例に対しては分子標的薬がある一定の成果をあげている。また、抗腫瘍免疫を増強する治療においても進歩が見られている。T細胞の抗腫瘍活性を負に制御するCTLA-4やPD-1に対する抗体製剤が患者の予後を有意に改善することが明らかとなり、これらの製剤は近く本邦においても臨床の現場に用いられる見通しとなっている。しかし、半数以上の症例がこれらの治療に対しても抵抗性であり、悪性黒色腫の更なる病態の解明が望まれている。そのような中で我々は、抗PD-1および抗CTLA-4阻害薬等の抗腫瘍免疫を増強する治療が有効と予測できる因子(NY-ESO-1をはじめとした癌精巢抗原; cancer-testis antigen)の確認と探索を行うことで、悪性黒色腫患者における治療反応性

B. 研究方法

本研究を行うにあたり、院内倫理委員会より承認された患者説明文書・同意書を用いて悪性黒色腫患者より研究のための同意を得た。対象は2000年から2013年の間に当院皮膚科を受診し悪性黒色腫と診断された107症例で、これまでに72症例(男性25例、女性47例、年齢中央値60歳、最高年齢86歳、最少年齢13歳)、94検体(原発巣61例、リンパ節転移巣22例、その他の転移巣11例)に対しNY-ESO-1の発現の有無を確認した。

原発巣の発症部位、病理組織学的stageは以下の表のとおりである。

臨床病型		病理組織学的病期	
Nodular	28	pT1a	16
Superficial spreading	22	pT2a	8
Acral	20	pT2b	5
Lentigo maligna	2	pT3a	6
		pT3b	2
		pT4a	7
		pT4b	13

## 染色方法

染色を行うにあたり、組織内にメラニンの沈着を多く認める検体は脱メラニン処理を要した。また、すべての検体について赤発色を施行した。

### 1. 脱メラニン処理（過マンガン酸カリウム・シュウ酸法）

- 0.25%過マンガン酸カリウム水溶液に1時間浸す
- 水洗い
- 5%シュウ酸水に切片が脱色するまで2~5分間浸す。
- 静かに水洗い、10分間。
- 蒸留水洗浄

### 2. 染色

脱メラニン後の標本を、5%スキムミルク水（EZprepで溶解）に10分間浸す  
EZバッファーにより脱パラフィン、親水化を行う。

イムノブロックにより撥水防止処理を行う

CC1バッファーによる抗原不活化を行う。

（～は自動組織免疫染色装置（Ventana:Roche）を用いて行う。）

一次抗体（100倍希釈）を100μl添加。2時間反応させる。（抗体はanti NY-ESO-1 clone(Aigma Aldrichi)を使用）

PBSで洗浄。

二次抗体（ヒストファインAPシンプルステインAP(M)）を3滴添加し40分反応させる。

PBSで洗浄。

ファーストレッド 基質キットを添加、12分反応させる。

miliQ洗浄

HE染色を行う。

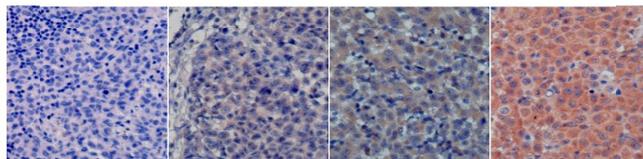
染色態度の評価は陽性細胞のパーセンテージ（Number）と陽性細胞の染色強度（Intensity）の2項目に対して行う。

Numberの評価は以下の通りを行う。

陽性細胞	5%以下	スコア	0
陽性細胞	5-25%	スコア	1

陽性細胞	26-75%	スコア	2
陽性細胞	75%以上	スコア	3

Intensityの評価は以下に例示する染色強度の通りを行う。左からスコア0、1、2、3の順である。



スコアリングは皮膚病理と免疫染色の原理に習熟した二人の皮膚病理医により独立に行われ、スコアの結果が異なる場合には二人でスコアリングにつき検討を行い、合意が得られたものを採用する。合意が得られない場合は第三者のスコアリングを参照するという手法をとる。

各染色態度の評価がそろった段階で、腫瘍のステージ、患者の予後等の臨床情報と対比することで、統計解析を行う。

（倫理面への配慮）

インフォームドコンセントを取るに当たり、臨床研究指針に準拠した同意書を作成し、これに患者の同意を得た。また、臨床検体を用いるにあたり、情報公開し、オプトアウトの機会提供をしている。本研究は慶應義塾大学・倫理委員会の承認を得たプロトコールにしたがって行われた。

## C. 研究結果

これまでに72症例94検体につき、NY ESO-1の発現を検討している。その結果を以下の表に示す。

Intensity

	0	1	2	3	
Primary	40	14	3	4	61
Lymph node	7	11	3	1	22
Metastatic lesion	3	2	2	4	11
	50	27	8	9	94

72症例 94検体中

Number

	0	1	2	3	
Primary	40	4	7	10	61
Lymph node	7	3	2	10	22
Metastatic lesion	3	0	3	5	11
	50	7	12	25	94

72症例 94検体中

以上より、原発巣においては61例中21例(34.4%)、リンパ節転移巣では22例中15例(68.2%)、他臓器転移巣では11例中8例(72.7%)で発現が認められ、癌の進展に伴って発現する症例が増加するという傾向が認められている。

続いて、原発巣および節転移巣の両方の検体が解析可能であった18症例22検体を検討した。以下に結果を示す。

Intensity

	Metastatic lesion					
	0	1	2	3		
Primary lesion	0	4	6	0	1	11
	1	2	2	3	0	7
	2	0	1	0	1	2
	3	1	1	0	0	2
		7	10	3	2	22

18症例 22検体中

Number

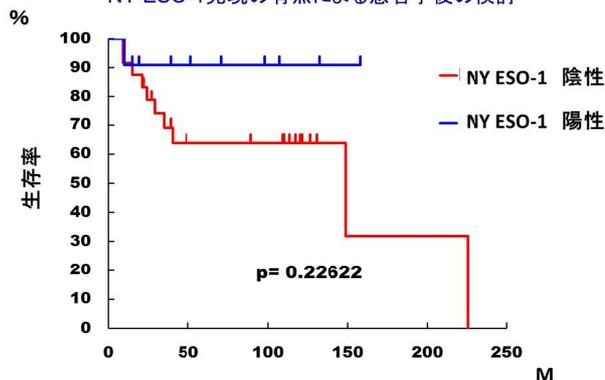
	Metastatic lesion					
	0	1	2	3		
Primary lesion	0	4	1	0	6	11
	1	1	0	2	2	5
	2	2	0	0	0	2
	3	0	0	1	3	4
	7	1	3	11	22	

18症例 22検体中

原発巣においてNY ESO-1の発現が陰性であった11症例中、7例(63.6%)において転移巣に発現が認められることが明らかとなり、個別の症例においても、本因子が腫瘍進展のマーカーとなりうることを示唆された。

最後に原発巣における本因子の発現と予後の相関を検討した。原発巣において腫瘍深達度が2mm以上(TNM分類でpT2a以上)の症例27例のNY ESO-1の発現と予後の相関を検討した。発現は27例中16例が陰性、11例が陽性であった。以下にKaplan-Meier法により解析した結果を示す。

Tumor thickness 2mm ≤ の悪性黒色腫原発巣におけるNY ESO-1発現の有無による患者予後の検討



有意差検定は一般化Wilcoxon検定を用いている。現時点では症例数が少ないためか有意差は認められていないものの、NY ESO-1を発現している症例において予後が良い傾向があることが示唆されている。

**D. 考察**

上述の知見よりNY ESO-1は悪性黒色腫において腫瘍の進展に伴って発現が増強する傾向がある一方で、発生初期の原発巣の段階から発現して

いる症例においては、良好な予後を予測するマーカーとなる可能性が示唆された。

#### **E. 結論**

本研究から得られている知見より、NY ESO-1 が悪性黒色腫の進展や予後を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆される。今後より有意な結果が得られることが予想され、更なる症例の蓄積と検討を重ねるべく研究継続を行っていく。

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題：  
日本人の悪性黒色腫患者におけるNY-ESO-1, XAGEなど腫瘍抗原の発現と免疫に関する解析

研究分担者 舩越 建 慶應義塾大学医学部皮膚科学 助教

研究要旨

近年、悪性黒色腫は分子学的にも疫学的にも異なる個性を有した疾患の集合体と考えられるようになってきている。今回我々は、抗腫瘍免疫を増強する治療が有効と予測できる因子と、それに関連して患者の予後を予測し得るマーカーの探索を行うことを目的として研究を進めている。当院で集積した悪性黒色腫94検体を用いて候補となるバイオマーカーの免疫染色をし、その発現強度と患者の予後および治療反応性を統計学的解析により比較検討している。

研究協力者

森 真理子 助教

種瀬 啓士 助教

と予後予測が可能なバイオマーカーの確立を目指している。

A. 研究目的

近年、悪性黒色腫の病態に対する理解は長足の進歩を遂げた。BRAF, NRAS, c-KIT等のERK1/2MAPKシグナル伝達経路を構成する因子の遺伝子変異が頻回に認められることが明らかとなり、BRAFのV600E変異を有する症例に対しては分子標的薬がある一定の成果をあげている。また、抗腫瘍免疫を増強する治療においても進歩が見られている。T細胞の抗腫瘍活性を負に制御するCTLA-4やPD-1に対する抗体製剤が患者の予後を有意に改善することが明らかとなり、これらの製剤は近く本邦においても臨床の現場に用いられる見通しとなっている。しかし、半数以上の症例がこれらの治療に対しても抵抗性であり、悪性黒色腫の更なる病態の解明が望まれている。そのような中で我々は、抗PD-1および抗CTLA-4阻害薬等の抗腫瘍免疫を増強する治療が有効と予測できる因子(NY-ESO-1をはじめとした癌精巢抗原; cancer-testis antigen)の確認と探索を行うことで、悪性黒色腫患者における治療反応性

B. 研究方法

本研究を行うにあたり、院内倫理委員会より承認された患者説明文書・同意書を用いて悪性黒色腫患者より研究のための同意を得た。対象は2000年から2013年の間に当院皮膚科を受診し悪性黒色腫と診断された107症例で、これまでに72症例(男性25例、女性47例、年齢中央値60歳、最高年齢86歳、最少年齢13歳)、94検体(原発巣61例、リンパ節転移巣22例、その他の転移巣11例)に対しNY-ESO-1の発現の有無を確認した。

原発巣の発症部位、病理組織学的stageは以下の表のとおりである。

臨床病型		病理組織学的病期	
Nodular	28	pT1a	16
Superficial spreading	22	pT2a	8
Acral	20	pT2b	5
Lentigo maligna	2	pT3a	6
		pT3b	2
		pT4a	7
		pT4b	13

## 染色方法

染色を行うにあたり、組織内にメラニンの沈着を多く認める検体は脱メラニン処理を要した。また、すべての検体について赤発色を施行した。

### 1. 脱メラニン処理（過マンガン酸カリウム・シュウ酸法）

- 0.25%過マンガン酸カリウム水溶液に1時間浸す
- 水洗い
- 5%シュウ酸水に切片が脱色するまで2~5分間浸す。
- 静かに水洗い、10分間。
- 蒸留水洗浄

### 2. 染色

脱メラニン後の標本を、5%スキムミルク水（EZprepで溶解）に10分間浸す

EZバッファーにより脱パラフィン，親水化を行う。

CC1バッファーによる抗原不活化を行う。

（～は自動組織免疫染色装置（Ventana:Roche）を用いて行う。）

一次抗体（100倍希釈）を100μl添加。2時間反応させる。（抗体はanti NY-ESO-1 clone(Aigma Aldrichi)を使用）

PBSで洗浄。

二次抗体（ヒストファインAPシンプルステインAP(M)）を3滴添加し40分反応させる。

PBSで洗浄。

ファーストレッド 基質キットを添加、12分反応させる。

miliQ洗浄

HE染色を行う。

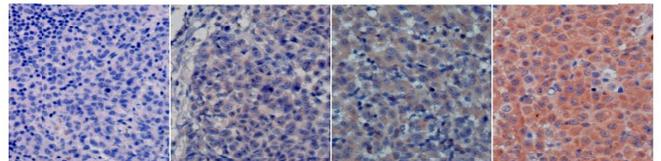
染色態度の評価は陽性細胞のパーセンテージ（Number）と陽性細胞の染色強度（Intensity）の2項目に対して行う。

Numberの評価は以下の通りを行う。

陽性細胞	5%以下	スコア	0
陽性細胞	5-25%	スコア	1

陽性細胞	26-75%	スコア	2
陽性細胞	75%以上	スコア	3

Intensityの評価は以下に例示する染色強度の通りを行う。左からスコア0、1、2、3の順である。



スコアリングは皮膚病理と免疫染色の原理に習熟した二人の皮膚病理医により独立に行われ、スコアの結果が異なる場合には二人でスコアリングにつき検討を行い、合意が得られたものを採用する。合意が得られない場合は第三者のスコアリングを参照するという手法をとる。

各染色態度の評価がそろった段階で、腫瘍のステージ、患者の予後等の臨床情報と対比することで、統計解析を行う。

（倫理面への配慮）

インフォームドコンセントを取るに当たり、臨床研究指針に準拠した同意書を作成し、これに患者の同意を得た。また、臨床検体を用いるにあたり、情報公開し、オプトアウトの機会提供をしている。本研究は慶應義塾大学・倫理委員会の承認を得たプロトコールにしたがって行われた。

## C. 研究結果

これまでに72症例94検体につき、NY ESO-1の発現を検討している。その結果を以下の表に示す。

Intensity

	0	1	2	3	
Primary	40	14	3	4	61
Lymph node	7	11	3	1	22
Metastatic lesion	3	2	2	4	11
	50	27	8	9	94

72症例 94検体中

Number

	0	1	2	3	
Primary	40	4	7	10	61
Lymph node	7	3	2	10	22
Metastatic lesion	3	0	3	5	11
	50	7	12	25	94

72症例 94検体中

以上より、原発巣においては61例中21例(34.4%)、リンパ節転移巣では22例中15例(68.2%)、他臓器転移巣では11例中8例(72.7%)で発現が認められ、癌の進展に伴って発現する症例が増加するという傾向が認められている。

続いて、原発巣および節転移巣の両方の検体が解析可能であった18症例22検体を検討した。以下に結果を示す。

Intensity

	Metastatic lesion					
	0	1	2	3		
Primary lesion	0	4	6	0	1	11
	1	2	2	3	0	7
	2	0	1	0	1	2
	3	1	1	0	0	2
		7	10	3	2	22

18症例 22検体中

Number

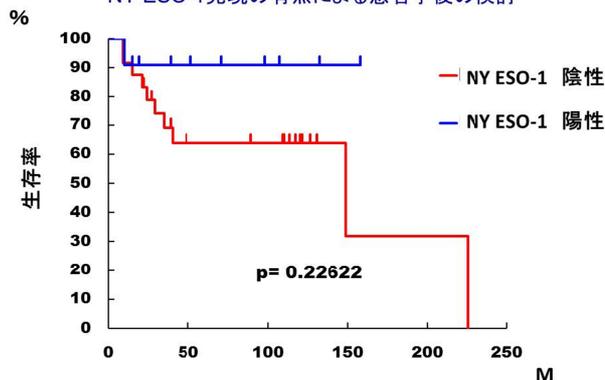
	Metastatic lesion					
	0	1	2	3		
Primary lesion	0	4	1	0	6	11
	1	1	0	2	2	5
	2	2	0	0	0	2
	3	0	0	1	3	4
	7	1	3	11	22	

18症例 22検体中

原発巣においてNY ESO-1の発現が陰性であった11症例中、7例(63.6%)において転移巣に発現が認められることが明らかとなり、個別の症例においても、本因子が腫瘍進展のマーカーとなりうることを示唆された。

最後に原発巣における本因子の発現と予後の相関を検討した。原発巣において腫瘍深達度が2mm以上(TNM分類でpT2a以上)の症例27例のNY ESO-1の発現と予後の相関を検討した。発現は27例中16例が陰性、11例が陽性であった。以下にKaplan-Meier法により解析した結果を示す。

Tumor thickness 2mm ≤ の悪性黒色腫原発巣におけるNY ESO-1発現の有無による患者予後の検討



有意差検定は一般化Wilcoxon検定を用いている。現時点では症例数が少ないため有意差は認められていないものの、NY ESO-1を発現している症例において予後が良い傾向があることが示唆されている。

**D. 考察**

上述の知見よりNY ESO-1は悪性黒色腫において腫瘍の進展に伴って発現が増強する傾向がある一方で、発生初期の原発巣の段階から発現して

いる症例においては、良好な予後を予測するマーカーとなる可能性が示唆された。

#### **E. 結論**

本研究から得られている知見より、NY ESO-1 が悪性黒色腫の進展や予後を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆される。今後より有意な結果が得られることが予想され、更なる症例の蓄積と検討を重ねるべく研究継続を行っていく。

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野))  
分担研究報告書(平成25年度)

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: **臨床治験 抗体療法モニタリング**

**研究分担者 石田高司 名古屋市立大学大学院医学研究科 准教授**

#### 研究要旨

- ATL患者の解析で、Mogamulizumabが強力な effector Treg (CD45RA<sup>lo</sup>FOXP3<sup>hi</sup>) 除去作用を有することを明らかにした。
- effector Treg 減少は皮疹など免疫関連有害事象の発症を規定する因子の一つである。免疫関連有害事象の発症を規定する宿主遺伝学的因子については、現在解析中である。
- 患者由来 ATL 細胞を用いて ATL モデルを樹立、同一患者から増幅した HTLV-1 Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞による養子免疫治療実験を行った。結果、治療群では各臓器への ATL 細胞の浸潤が抑制され、生存期間は有意に延長した。本結果は、ATL 治療の標的分子として、HTLV-1 Tax が有望であることを示す。

#### A. 研究目的

本研究全体の目的は、日本発の抗体薬 Mogamulizumab を用いて、Treg 除去による抗腫瘍免疫応答の増強、という新たな概念の治療法を創出し、標準治療抵抗性の進行・再発固形がん患者に有効な治療法を提供することである。

Mogamulizumab は 2012 年 5 月末から再発難治性の成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATL)を適応症として発売開始された。研究分担者は ATL での mogamulizumab 投与例における免疫応答の変化を詳細に検討し、固形がんに対する最適な使用方法確立に寄与するデータ取得を目指した。

#### B. 研究方法

約 30 名の ATL 患者で、Mogamulizumab 投与前後で下記の項目を解析した。

- HTLV-1 特異的液性免疫反応
- i) HTLV-1 感染細胞株培養上清から精製された、不活化 HTLV-1 抗原に対する抗体反応(ルミパルスプレスト®HTLV-1 で解析)

#### ii) Recombinant-HTLV-1Tax に対する抗体反応

- HTLV-1 Tax 特異的細胞性免疫 (Tax 特異的 tetramer で解析)
- 血液中の B、T、NK 細胞の比率
- サイトメガロウイルスに対する免疫 (血漿中のサイトメガロウイルス量、サイトメガロウイルスアンチゲネミア法、サイトメガロウイルス特異的 CTL 反応、サイトメガロウイルスに対する抗体反応)
- 血液中の effector Treg (CD45RA<sup>lo</sup>FOXP3<sup>hi</sup>)、naïve Treg (CD45RA<sup>hi</sup>FOXP3<sup>lo</sup>)の存在比率。
- 上記検査データの動きと有害事象の関連。

HTLV-1 関連抗原の治療標的としての可能性は、ATL 患者由来の腫瘍細胞で ATL マウス(NOG)を作成し、さらに同一の患者から 抗原特異的 CTL を誘導し、治療実験を実施することにより評価した。

## (倫理面への配慮)

Mogamulizumab治療中のATL患者の免疫応答を解析するにあたり、多施設共同前方視的観察臨床研究“ATLに対するモガムリズマブ治療中の免疫モニタリング”を実施した。本試験は名古屋市立大学病院医薬品等臨床試験審査委員会の承認を得た。患者由来の腫瘍細胞を用いたヒト化リンパ腫マウスを用いた併用実験については、実施するにあたり、下記の委員会の承認を得ている。名古屋市立大学大学院医学研究科ヒト遺伝子倫理審査委員会、名古屋市立大学医学部遺伝子組み換え実験安全委員会、名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験委員会

## C. 研究結果

ヒトでは FOXP3 分子発現の Treg 特異性が低いが、FOXP3 と CD45RA の発現レベルにより FOXP3+CD4+細胞を 3 つに分類することで、より厳密に Treg を定義することが可能である。すなわち、naive Treg (CD45RA<sup>hi</sup>FOXP3<sup>lo</sup>)、effector Treg (CD45RA<sup>lo</sup>FOXP3<sup>hi</sup>)、non-Treg (CD45RA<sup>lo</sup>FOXP3<sup>lo</sup>)に分類され、naive Treg および effector Treg は免疫抑制活性を有するが、non-Treg は抑制活性を有しない。また、naive Treg に比較し、effector Treg は強い抑制活性を有する。CCR4 の発現は naive Treg では認めず、effector Treg で強い。よって、CCR4 抗体で標的となる Treg は、理論上 effector Treg であるが、実際に Mogamulizumab の治療を受けた ATL 患者では、effector Treg の存在比率は著しく低下し、HTLV-1 Tax に対する特異的 CTL は増加する傾向を認めた。また、effector Treg が低下した状態において HTLV-1 Tax 特異的 CTL の誘導効率は著しく向上した。このことは、Mogamulizumab 治療によって effector Treg が除去されることにより、HTLV-1 Tax に対する免疫応答が増強することを意味している。

HTLV-1 特異的液性免疫反応については、HTLV-1 抗原、Tax 抗原ともに症例間の変化が大きく、Mogamulizumab 治療による、その動態の変化様式を結論するには至っていない。ステロイド薬を含む、併用薬、また follicular helper T 細胞 (Tfh) 上の CCR4 の発現等が関与していると考えられ、症例数を増やし、更なる検討を必要とする。また、HTLV-1 Tax に対する液性、細胞性免疫反応の動態との相関を解析したが、統計学的に有意な相関を見出すに至っていない。

Mogamulizumab 治療中の ATL 患者では比較的高頻度にサイトメガロウイルスの陽転化(サイトメガロウイルスアンチゲネミア法)を認めた。しかしながら Mogamulizumab を使用せず、化学療法のみで治療を受けた ATL 患者での陽転化との統計学的な差異を検出するには至っていない。CMV 特異的 CTL の動態については、症例間の変化が大きく、Mogamulizumab 治療による、その動態の変化様式を結論するには至っていない。理論上 effector Treg の低下は CMV-CTL の活性化につながるため、症例数を増やし、更なる解析を要する。

皮膚障害をはじめとする有害事象は、Mogamulizumab の投与回数が多いほど増加する傾向を認めた。Mogamulizumab の投与回数は血液中の effector Treg の存在比率と有意な相関を認め、投与回数が多いほどその低下の程度が強かった。これらの所見は、研究分担者らがこれまでに見出してきた、“Mogamulizumab の有害事象は effector Treg の低下による異常免疫の活性化が関与”とする所見に一致した。免疫関連有害事象の重症度は effector Treg 低下に加え、宿主遺伝学的因子の関与が強く示唆される。故に 昨年度から引き続き、名古屋市立大学ヒト遺伝子倫理委員会の承認を受けた研究計画に基づき、GWAS 解析を実施している。

ATL 患者より得た ATL 細胞を用いて NOG マウスを用いて、ATL モデルを樹立、同一患者から HTLV-1 Tax 特異的 CD8 陽性 T 細胞を増幅し、養子免疫治療実験を行った。結果、治療群では各臓器への ATL 細胞の浸潤が抑制され、生存期間は有意に延長した。これらの結果は、ATL 治療の標的分子としての、HTLV-1 Tax の妥当性を示すものである。

## D. 考察

Mogamulizumab による effector Treg 除去は、抗 HTLV-1 あるいは抗 ATL 免疫を活性化する可能性がある一方、免疫関連の重篤な有害事象を引き起こし得る。このことは固形がんにも当てはまると考えられる。一方 effector Treg に CCR4 が強発現することは、末梢血および皮膚への浸潤細胞では確認できている。しかしながら、各種固形がんの Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) 中の、effector Treg における CCR4 発現については十分なデータの蓄積がない。Mogamulizumab が各種固形がんに必要な抗腫瘍効果を発揮するには、TIL 中の

effector Treg 除去が必要不可欠である。  
今後は、各種固形がんTILにおける Treg 表面形質 (CCR4発現) 様式を明らかにし、Mogamulizumabによる抗腫瘍効果が期待できる、がん種を同定する必要がある。

## E. 結論

ATLでの経験から、Mogamulizumabは強力なCCR4陽性 effector Treg 除去作用を有する。重症の皮疹など免疫関連有害事象に十分な注意を払いつつ、本治験を遂行する必要がある。  
また、研究分担者の施設ではIa相で、2例(肺がん 2例)、Ib相で2例(悪性黒色腫 1例、食道がん 1例)の患者を登録、治験治療している。引き続き適格症例の適切なリクルートに努める。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

英文 (2013 以降)

1. Ishida T, Ito A, Sato F, Kusumoto S, Iida S, Inagaki H, Morita A, Akinaga S, Ueda R. Stevens-Johnson Syndrome associated with mogamulizumab treatment of Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* 2013; 104:647-50. ([corresponding author](#))
2. Ogura M\*, Ishida T\*, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, Fujimoto K, Yamamoto K, Miyamoto T, Uike N, Tanimoto M, Tsukasaki K, Ishizawa K, Suzumiya J, Inagaki H, Tamura K, Akinaga S, Tomonaga M, Ueda R. Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-CCR4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2014 Apr 10;32(11):1157-63. (\*[equally contributed](#))
3. Narita T, Ishida T, Masaki A, Suzuki S, Ito A, Mori F, Yamada T, Masaki Ri, Kusumoto S, Komatsu H, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Niimi A, Iida S, Ueda R. HTLV-1 bZIP factor specific CD4 T cell responses in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol.* 2014 Feb 1;192:940-7. ([corresponding author](#))
4. Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Takatsuka Y, Eto T, Miyazaki Y, Hidaka M, Uike N, Miyamoto T, Tsudo M, Sakamaki H, Morishima Y, Suzuki R, Utsunomiya A. Impact of GVHD on allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma focusing on preconditioning regimens: nationwide retrospective study *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant. . 2013;19:1731-9. ([corresponding author](#))
5. Suzuki T, Kusumoto S, Yoshida T, Mori F, Ito A, Ri M, Ishida T, Komatsu H, Niimi A, Iida S. Successful salvage therapy using lenalidomide in a patient with relapsed multiple myeloma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2013;97:540-3.
6. Masaki A, Ishida T, Suzuki S, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Yamada T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, Iida S, Ueda R. Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOD/Shi-scid, IL-2Ry<sup>null</sup> mouse model. *J Immunol.* 2013;191(1):135-44.. ([corresponding author](#))
7. Sato F, Ishida T, Ito A, Mori F, Masaki A, Takino H, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Suzuki S, Komatsu H, Niimi A, Ueda R, Inagaki H, Iida S. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model. *Leuk Res.* 2013;37:21-7. ([corresponding author](#))
8. Inagaki A, Tajima E, Uranishi M, Totani H, Asao Y, Ogura H, Masaki A, Yoshida T, Mori F, Ito A, Yano H, Ri M, Kayukawa S, Kataoka T, Kusumoto S, Ishida T, Hayami Y, Hanamura I, Komatsu H, Inagaki H, Matsuda Y, Ueda R, Iida S. Global real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detecting proto-oncogenes associated with 14q32 chromosomal translocation as a valuable marker for predicting survival in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2013;37:1648-55.
9. Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, Ishida T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, Mizokami M, Ueda R, Utsunomiya A. Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepatol Res.*

- 2014 Mar;44(3):354-7.
10. Mori F, Ishida T, Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Yamada T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imada K, Takaori-Kondo A, Niimi A, Ueda R, Inagaki H, Iida S. Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. Eur J Haematol. 2014 Mar;92(3):219-28. (corresponding author)
  11. Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. Blood. 2013 Jun 13;121(24):4894-901.
  12. Kato H, Saito C, Ito E, Furuhashi T, Nishida E, Ishida T, Ueda R, Inagaki H, Morita A. Bath-PUVA Therapy Decreases Infiltrating CCR4-Expressing Tumor Cells and Regulatory T Cells in Patients With Mycosis Fungoides. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2013 Jun;13(3):273-80.
  13. Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, Ishida T, Ueda R, Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H. Prognostic impact of miR-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/ lymphoma. Human Pathol, in press
- aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL). 2013 ASCO Annual Meeting , Oral Abstract Session, J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 8506)
2. Ryuzo Ueda, Michinori Ogura, Takashi Ishida, Kiyohiko Hatake, Masafumi Taniwaki, Kiyohiko Ando, Kensei Tobinai, Katsuya Fujimoto, Kazuhito Yamamoto, Toshihiro Miyamoto, Naokuni Uike, Mitsune Tanimoto, Kunihiro Tsukasaki, Kenichi Ishizawa, Junji Suzumiya, Hiroshi Inagaki, Kazuo Tamura, Shiro Akinaga, Masao Tomonaga. The Efficacy and Safety of Mogamulizumab (KW-0761) in Multicenter Phase II Study for Patients with Relapsed Peripheral or Cutaneous T-Cell Lymphoma (oral) (abs 041) 12th International Conference on Malignant Lymphoma. 19-22 June 2013. Lugano, Switzerland.
  3. Shigeki Takemoto, Takashi Ishida, Tatsuro Jo, Kimiharu Uozumi, Hitoshi Suzushima, Kazuhito Yamamoto, Naokuni Uike, Yoshio Saburi, Kisato Nosaka, Atae Utsunomiya, Kensei Tobinai, Hiroshi Fujiwara, Kenji Ishitsuka, Shinichiro Yoshida, Naoya Taira, Yukiyoshi Moriuchi, Kazunori Imada, Toshihiro Miyamoto, Kunihiro Tsukasaki, Masao Tomonaga, Ryuzo Ueda. Combination of Mogamulizumab (KW-0761) with VCAP-AMP-VECP (mLSG15) is Well Tolerated and Effective as an Initial Therapy for Aggressive Adult T-Cell Leukaemia-Lymphoma (ATL) (oral) (abs 154) 12th International Conference on Malignant Lymphoma. 19-22 June 2013. Lugano, Switzerland.

## 2 . 学会発表

### 海外 (2013 以降)

1. Tatsuro Jo, Takashi Ishida, Shigeki Takemoto, Hitoshi Suzushima, Kimiharu Uozumi, Kazuhito Yamamoto, Naokuni Uike, Yoshio Saburi, Kisato Nosaka, Atae Utsunomiya, Kensei Tobinai, Hiroshi Fujiwara, Kenji Ishitsuka, Shinichiro Yoshida, Naoya Taira, Yukiyoshi Moriuchi, Kazunori Imada, Toshihiro Miyamoto, Masao Tomonaga, Ryuzo Ueda. Randomized phase II study of mogamulizumab (KW-0761) plus VCAP-AMP-VECP (mLSG15) versus mLSG15 alone for newly diagnosed

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: 抗CCR4抗体投与と制御性T細胞の関連の解析

研究分担者 西川 博嘉 大阪大学 特任准教授

研究要旨

ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体(Mogamulizumab/KW-0761)は、脱フコシル化技術によりADCC活性を飛躍的に高めた抗体で、CCR4を発現する成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)に対する治療薬として承認されている。一方、これまで様々ながん抗原分子を標的とした臨床研究が行われ、がんワクチン療法が宿主に抗原特異的免疫を誘導することが明らかになっているが、臨床効果は限定的である。この原因としてがん組織に浸潤しているリンパ球中の制御性T細胞(Tregs)に注目が集まっている。つまり、がんワクチン療法によって誘導されたがん抗原特異的T細胞の抗腫瘍活性が、Tregsによって抑制されるため、十分な臨床効果をあげられないと考えられており、Tregsのコントロールはがん免疫療法が克服すべき大きな課題である。

がん組織に浸潤するTregsにCCR4が強発現していることから、本事業ではヒト化抗CCR4モノクローナル抗体を投与することにより、これらのTregsが減少しエフェクターT細胞の活性化といった抗腫瘍免疫応答の活性化が誘導されるか、またそれらが臨床効果につながるかを検討する。

今年度は本分担研究により、1)がん組織に浸潤しているCCR4+Tregsを詳細に解析すると共に、それらのTregsを除去することにより、がん抗原特異的エフェクターT細胞の活性化が可能かを検討した。(POCの確立)また、2)ヒトTregアッセイ方法を標準化すると共に、ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与によりCCR4+Tregsが除去されるかを、標準化されたアッセイ方法により解析した。

A. 研究目的

現在進行中の種々のがん免疫療法は、一部の患者で臨床効果を示すものの、大多数の患者では満足すべき臨床効果をあげていない。その原因としてがん組織中に多数の制御性T細胞(Tregs)が浸潤し、抗腫瘍免疫応答を抑制していることがあげられる。

ヒトCD4+Tregsは遺伝子発現およびマーカーの上でも多様であることが明らかとなってきたが、CD4、FOXP3およびCD45RA(もしくはCD45RO)発現を組み合わせることにより、CD4+TregsをCD4+CD45RA+FOXP3lowTregs(ナイーブ型)とCD4+CD45RA-FOXP3highTregs(エフェクター型)に分けられることが明らかになっている(Miyara et

al. Immunity 30:899-911 2009)。本分類によりエフェクター型Tregsに分画される部分にCCR4が高発現していることが明らかになっている。よってヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与によりこれらのTregsの動態を末梢血およびがん組織で解析することが本治験において抗体の効果判定の一つとして必須である。加えて、このTregアッセイ方法を標準化することが抗CCR4抗体の実用化を進める上では重要である。

一方でヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与により、がん抗原に加えて広範な免疫応答の誘導・活性化が期待される。よって特定のがん抗原への免疫応答を検討することに加えて網羅的な免疫反応への影響を解析する必要がある。

## B. 研究方法

書面にて同意が得られた健康人、がん患者およびヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者の末梢血より単核球を比重遠心法により単離し、解析に用いた。

単核球より CD4+ および CD8+ T 細胞を分離し、がん・精巢抗原特異的 T 細胞誘導を検討した。一部の培養では、CCR4+ 細胞を除去した後にがん・精巢抗原特異的 T 細胞応答を検討した。また誘導された NY-ESO-1 特異的 T 細胞のエフェクター機能も検討した。

ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者の末梢血単核球を CD4、CD25、CD45RA、FOXP3 を用いて Tregs を同定し、さらに CCR4 発現をフローサイトメトリーにて検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究は大阪大学研究倫理審査会にて審査され、承認されたプロトコールに準拠して行った。また、すべての検体は書面での同意が得られたのち採取されたものを研究に用いた。

## C. 研究結果

抗 CCR4 抗体による活性型 Tregs 除去によるがん免疫療法の POC の確立

a. 腫瘍局所には CCR4+ 活性型 Tregs が浸潤している

ヒト Tregs の分類法を用いて、悪性黒色腫患者検体を解析した。腫瘍局所に浸潤している Tregs は活性型 (Fr2:CD4+CD45RA-FOXP3high) であり、末梢血に存在する Tregs と異なっていた。つまり、末梢血には活性型 Tregs とナイーブ Tregs (Fr1:CD4+CD45RA+FOXP3low) の両者が存在していたが、腫瘍局所に浸潤する Tregs の大部分は活性型 Tregs であった。腫瘍局所に存在する活性型 Tregs を除去するため、特異的に発現している分子の検索を行ったところ、悪性黒色腫局所に浸潤している活性化型 Tregs は、ケモカインレセプター 4 (CCR4) を強発現していた。腫瘍局所の活性型 Tregs は、マウスで CCR4 の発現が報告されている Th2 および Th17 サブセットなどのヘルパー T 細胞よりも CCR4 を強発現していた。

b. CCR4+ 活性型 Tregs 除去により NY-ESO-1 特異的 T 細胞誘導が認められる

抗 CCR4 抗体を用いた活性型 Tregs の選択的除去 (全ての Tregs を除去するわけではない) が、NY-ESO-1 特異的免疫応答に与える影響を検討した。健康人では、CD4+ T 細胞からがん・精巢抗原 NY-ESO-1 特異的 T 細胞を誘導することが出来ないことが明らかになっている (Gnjatic S, Nishikawa H et al. *Adv Cancer Res.* 95: 1-30 2006)。そこで、健康人由来 PBMCs から CCR4+ 活性型 Tregs を除去し、NY-ESO-1 特異的 CD4+ T 細胞誘導を検討した。NY-ESO-1 特異的 CD4+ T 細胞誘導が 43.8% で認められた。

また、免疫応答が抑制されているがん患者での検討を行うため、NY-ESO-1 を発現しているが NY-ESO-1 に対する免疫応答を惹起できない悪性黒色腫患者由来の PBMCs で同様のアッセイを行った。未処理の CD4+ T 細胞からは NY-ESO-1 特異的 CD4+ T 細胞が誘導できなかったが、活性型 Tregs を除去された CD4+CCR4- T 細胞からは NY-ESO-1 特異的 CD4+ T 細胞が 37.5% の患者で誘導された。

さらに、NY-ESO-1 特異的 CD8+ T 細胞に対する影響を検討した。悪性黒色腫患者由来の CCR4+ 活性型 Tregs を除去した末梢血単核球と除去しない末梢血単核球を用いて NY-ESO-1 特異的 CD8+ T 細胞誘導を検討した。活性型 Tregs を除去された末梢血単核球からは、NY-ESO-1 特異的 CD8+ T 細胞誘導が増強した。

### Treg の機能評価技術の確立と解析

前述したように、抗体投与後に活性型 Tregs の体内での動態を正確に解析することが、抗 CCR4 抗体を実用化する上で極めて重要である。CD4、CD25、FOXP3 および CD45RA を組み合わせ、より厳密に Tregs を定義できる。この Treg アッセイ方法を標準化するため、本事業に参画する 10 施設の研究室間でプロトコールを共有し、アッセイおよび解析の安定化、標準化の可能性を検討した。

まず当施設 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター) でアッセイしたデータを 10 施設に送付し、解析方法の標準化を行った。当初、解析にばらつきが認められたが、プロトコールの共有により改

善された。次にアッセイ方法の標準化を行った。プロトコルの共有化によりばらつきなくアッセイ及び解析が可能で、本 Treg アッセイ方法の標準化が本研究班内で達成されたと考えられた。

次に本方法を用いて、ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者の末梢血を解析した。全ての患者で活性型 Tregs の減少が認められた。

#### D. 考察

抗 CCR4 抗体ががん局所に浸潤する Tregs を選択的に除去し、効果的に抗腫瘍免疫応答を増強可能な特異的抗体であると考えられた。これまで抗 CCR4 抗体を投与された患者末梢血で CCR4+ 活性型 Tregs の減少が認められている。欧米各国で先行する抗 CTLA-4 抗体療法のデータから、がん局所での Tregs の減少と臨床効果との相関が明らかになっており、今後はさらにながん局所での活性型 Tregs の動態を明らかにすることが重要であると考えられた。

また、本事業では Treg アッセイ方法を標準化することが極めて重要な要素である。今年度、本事業に参画する10施設で Treg アッセイ方法の標準化が達成されたことは極めて重要であり、今後は本手法の検査機関等への導出もしくはキット化を検討していく必要があると考えられた。

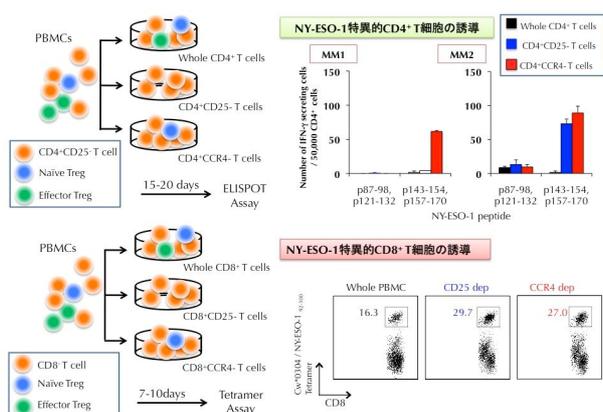


図2 活性型 Treg 除去はがん抗原特異的 CD4/CD8+ T 細胞誘導を増強する

#### E. 結論

これまで、Tregs は抗腫瘍免疫応答を抑制しているため、全ての Tregs を除去する必要があると考えられてきたが、活性型 Tregs という一部を標的とすることで十分にながん抗原特異的免疫応答

の増強がみられ、抗腫瘍活性増強につながることが明らかになった。一方で、一部の Tregs(主に naive Tregs)は残存するため、Tregs 本来の機能である自己に対する免疫応答をコントロールすることができ、副作用を軽減することが出来る可能性も示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

英文

1. [Nishikawa H](#), Sakaguchi S; Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* Jan 9;27:1-7 2014. doi: 10.1016/j.coi.2013.12.005.
2. Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Uono H, Seto Y, Yamada K, [Nishikawa H](#), Pan L, Venhaus R, Oka M, Doki Y, Nakayama E.; Vaccination With NY-ESO-1 Overlapping Peptides Mixed With Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in Patients With Cancers Expressing the NY-ESO-1 Antigen. *J Immunother.* 2014Feb-Mar;37(2):84-92. doi: 10.1097/CJI.000000000000017.
3. Sugiyama D, [Nishikawa H](#), Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E and Shakaguchi S; Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking anti-tumor immune responses in humans. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 110(44):17945-17950 2013. (Corresponding Author). doi: 10.1073/pnas.1316796110.
4. Atarashi K, Tanoue T, Suda W, Oshima K, Nagano Y, [Nishikawa H](#), Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Oille B, Sakaguchi S Taniguchi T, Morita H, Hattori M and Honda K; Treg induction by a rationally selected Clostridia cocktail from the human microbiota. *Nature.* 500 (7461):232-236 2013. doi: 10.1038/nature12331.
5. Hirayama M\*, [Nishikawa H](#)\*, Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnajatic S, and Shiku H.; Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of Streptococcus pyogenes. *Eur J Immunol.* 43 (4):989-1000 2013 \*Equal contribution,

(Corresponding Author). doi:  
10.1002/eji.201242800.

6. Adeegbe DO, Nishikawa H.; Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Frontiers in Immunology*. 4:190 2013 (Corresponding Author). doi: 10.3389/fimmu.2013.00190.
7. Noguchi T, Ritter G, Nishikawa H.; Antibody-based therapy in colorectal cancer. *Immunotherapy*. 5 (5):533-545 2013 (Corresponding Author). doi: 10.2217/imt.13.35.
8. Muraoka D, Nishikawa H., Noguchi T, Wang L, Harada N, Sato E, Luescher I, Nakayama E, Kato T, Shiku H.; Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8+ T cells. *Vaccine*. 31(17):2110-2118 2013 (Corresponding Author). doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.056.
9. Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Takahashi T, Fujita J, Hirao T, Shibata K, Makari Y, Iijima S, Nishikawa H., Jungbluth A, Nakamura Y, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Nakayama E, Mori M, and Doki Y.; NY-ESO-1 antibody as a novel tumor marker of gastric cancer. *Br J Cancer* 108 (5):1119-1125 2013. doi: 10.1038/bjc.2013.51.
10. Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H., Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N.; Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol*. 41(4):367-376 2013. doi: 10.1016/j.exphem.2012.12.001.

#### 和文

1. 前田優香、西川博嘉: 成人 T 細胞白血病・リンパ腫における免疫応答 **臨床免疫・アレルギー科**, 59:367-376 2013
2. 杉山大介、西川博嘉: 免疫抑制の克服による抗腫瘍免疫応答増強の可能性 **医学のあゆみ**, 244:800-807 2013
3. 西塔拓郎、西川博嘉: Tregs 制御による抗腫瘍免疫応答増強の可能性 **医学のあゆみ**, 246: 913-920 2013

4. 西岡めぐみ、西川博嘉: 制御性 T 細胞による抗腫瘍免疫抑制 そのコントロールによる効果的ながん免疫療法の可能性 **実験医学** 31, 1864-1872 2013

#### 2. 学会発表

##### 海外

- (1)Nishikawa H.: Potential of combination immunotherapy targeting regulatory T cells, Cancer Immunotherapy Consortium, April 25<sup>th</sup>, 2013, Washington DC
- (2) Sugiyama D, Nishikawa H., Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E and Shakaguchi S.: Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+regulatory T cells and augments anti-tumor immune responses in humans. 21<sup>st</sup> Annual CRI International Cancer Immunotherapy Symposium, Sep30 - Oct 2, 2013, New York, NY

##### 国内

##### シンポジウム

- (1) 西川博嘉: 制御性 T 細胞を標的としたがん免疫療法 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会 シンポジウム 2013 年 8 月 9 日 山梨県甲府市
- (2) 西川博嘉: Treg による免疫抑制の基礎 第 22 回日本組織適合性学会 シンポジウム 2013 年 9 月 15 日 福島県福島市
- (3) Nishikawa H.: Regulatory T cells: Friends or foes for cancer. 18<sup>th</sup> Japanese Foundation for Cancer Research International Symposium on Cancer Chemotherapy シンポジウム 2013 年 12 月 4 日 東京都
- (4) 西川博嘉: がん免疫における制御性 T 細胞の役割 第 26 回日本バイオセラピー学会 シンポジウム 2013 年 12 月 6 日 岩手県盛岡市
- (5) Nishikawa H.: Control of Regulatory T cells in anti-tumor immunity. The 29<sup>th</sup> Nagoya International Cancer Treatment Symposium シンポジウム 2014 年 2 月 9 日 愛知県名古屋市

##### 一般講演

(1) 杉山大介、西川博嘉、前田優香、西岡めぐみ、種村 篤、片山一朗、江副幸子、金倉 譲、坂口志文: エフェクター型制御性 T 細胞の選択的除去による抗原特異的免疫応答の増強、第 17 回日本がん免疫学会 2013 年 7 月 3 日~5 日 山口県宇部市

(2) 杉山大介、西川博嘉、前田優香、西岡めぐみ、種村 篤、片山一朗、江副幸子、金倉 譲、坂口志文: Selective depletion of effector-type CD4+regulatory T cells efficiently induces anti-tumor immune responses. 第 72 回日本癌学会 2013 年 10 月 4 日 神奈川県横浜市

(3) 西塔卓郎、和田 尚、磯部みどり、垣見和宏、榮川伸吾、大植祥弘、西川博嘉、森 正樹、土岐裕一郎、岡三喜男、中山睿一: NY-ESO-1 重複長鎖ペプチドを用いたがんワクチン第 1 相臨床試験. 第 72 回日本癌学会 2013 年 10 月 4 日 神奈川県横浜市

(4) 榮川伸吾、垣見和宏、磯部みどり、和田 尚、上中明子、葛島清隆、西川博嘉、鵜殿平一郎、岡三喜男、中山睿一: NY-ESO-1f ペプチドワクチンによる抗体・CD4・CD8T 細胞免疫応答の誘導. 第 72 回日本癌学会 2013 年 10 月 4 日 神奈川県横浜市

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: 液性免疫・細胞性免疫モニタリング

研究分担者 鷗殿平一郎 所属 岡山大学 職名 教授

研究要旨

固形がん患者を対象に、ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体(mogamulizumab/KW-0761)の医師主導第Ia/Ib相臨床治験を多施設で実施する。第I相では、各症例につきmogamulizumabの安全性を検討し、制御性T細胞(Treg)の除去(減少)を確認した後に、岡山大学ではCD8,CD4T細胞における免疫応答(細胞性免疫)増強効果を検討する。

A. 研究目的

固形がん患者の抗CCR4抗体投与前後に於ける細胞性免疫機能について解析を行う。

B. 研究方法

既存のがんワクチン投与患者の治療前の末梢血単核球(PBMC)をPMAおよびionomycinにより刺激し、細胞内染色法によりCD8 T細胞におけるサイトカイン(IL-2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )および免疫疲弊分子(PD-1, Tim-3)を検出し、CD8 T細胞の多機能性評価を行い、免疫治療効果に反映するかどうかを検討した。また、CD4T細胞の機能検出のためのアッセイ条件を検討し、同患者においてサイトカイン産生を検出し、CD8T細胞の多機能性に關するかどうかを解析した。

(倫理面への配慮)岡山大学倫理委員会(審査No.1709)に本研究について提出している。

C. 研究結果

患者CD8 T細胞のPD-1発現とサイトカイン産生は正の相関関係があり、Tim-3発現とサイトカイン産生の低下には中程度の負の相関関係( $R^2 > 0.4$ ,  $p < 0.01$ )があり、免疫治療効果とも相関する。CD4T細胞のサイトカイン産生は健常者より明らかに高く、CD8T細胞の多機能性と逆相関( $p = 0.38$ ,

$p = 0.05$ )する傾向にある。

D. 考察

CD8T細胞のサイトカイン産生とCD4T細胞のサイトカイン産生とは負の相関関係があるため、がん患者ではサイトカイン過剰産生CD4T細胞がCD8T細胞の多機能性低下、免疫疲弊に關与している可能性がある。

E. 結論

本研究における多機能性解析は患者CD8およびCD4T細胞の免疫状態を検出できる手段であると考えられる。この手法により、抗CCR4抗体治療経過の免疫モニタリングを行い、治療効果を評価する。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

(1) Methods in Mol Biol. 2014

(2) Journal of Immunotherapy, 2014, 37(2): 84-92

和文

該当なし

## 2. 学会発表

- (3) Metformin-induced reversion of immune-exhausted tumor infiltrating CD8+T lymphocytes leads to sustained anti-tumor immunity(  
岡山 (高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム) 2014年2月
- (4) Reversion of immune-exhausted tumor infiltrating CD8+T lymphocytes by metformin causes effective anti-tumor immunity  
千葉 (日本免疫学会) 2013年12月
- (5) Reversion of immune-exhausted tumor infiltrating CD8+T lymphocytes by metformin causes effective anti-tumor immunity  
横浜 (日本癌学会) 2013年10月
- (6) NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) ペプチドワクチンによる抗体・CD4・CD8T細胞免疫応答の誘導  
横浜 (日本癌学会) 2013年10月
- (7) 腫瘍局所における免疫疲弊 CD8T細胞の機能回復を介したメトホルミンの抗腫瘍効果  
山口 (日本がん免疫学会) 2013年7月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: 治験症例がん組織での、CCR4および腫瘍精巢抗原(NY-ESO-1, XAGE-1b)の発現検査

研究分担者 佐藤 永一 東京医科大学 医学総合研究所 准教授

研究要旨

「固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験」で、候補患者のがん組織でのCCR4, 腫瘍精巢抗原(NY-ESO-1 および XAGE-1b)の発現を標準化手順に従い、免疫組織化学を用いてスクリーニングした。同時に新規の抗原発現スクリーニング法として、RNA in situ hybridization 法を導入して予備検討を行った。

A. 研究目的

本治験では、被験者の腫瘍細胞がCCR4陰性であること求められる。また腫瘍細胞の免疫原性を反映する因子として、腫瘍精巢抗原(NY-ESO-1 および XAGE-1b)の発現を観察項目としている。本分担課題の第一の目的は、標準操作手順に従って、候補患者サンプルで上記の発現のスクリーニングを完遂することにある。

一方で、多施設共同研究である本治験では施設毎に検体の処理条件やホルマリン固定標本の作製条件、切片の製法に相違があり、標準手順に従った免疫組織化学に不安定性が生じることが想定される。そこで免疫組織化学に代わりうる手法として、近年開発された自動化RNA in situ hybridization system を用いて、ホルマリン固定標本でRNAレベルでの抗原発現を解析することも試みた。

B. 研究方法

候補患者のスクリーニングに際しては、各参加施設で手順書にしたがって作成された検体を用いて、免疫組織化学を行った。

RNA in situ hybridization には Advanced Cell Diagnostics 社により開発された RNA scope system をもちいた。NY-ESO-1 および XAGE-1b を標的とした RNA プローブを作成し、Roche Diagnostics 社の Ventana Discovery system を用いた自動検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた検体は全て連結不可能に匿名化されており、個人情報とは同定不能である。

C. 研究結果

38例の候補患者について、組織標本でのスクリーニングを行った。標準操作手順書に従った染色で判定に支障を来した例はなかった。

RNA in situ hybridization については、腫瘍精巢抗原の生理的な発現組織である精巢を用いてプロトコルを検討した。Ventana 社の標準プロトコルで、NY-ESO-1 と XAGE-1b のいずれも陽性シグナルが検出可能であった。ただしシグナル強度がやや不安定であった。

D. 考察

さらに慎重な検証も必要であるが、現時点では免疫組織化学は支障なく遂行されている。

ホルマリン固定標本で、RNAレベルでの腫瘍抗原発現の検出が可能であった。ただし自動検出装置での検出に不安定性がある。癌組織も加えてプロトコルの検討を行うが、非自動化システムでの運用も試みる必要がある。

E. 結論

被験者選択の抗原発現検査を適切に施行した。次世代の抗原発現検出システムとしてRNA in situ hybridization は有望と考えられた。

G. 研究発表

本計画については該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

本計画については該当なし



### 3 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogura M, <b><u>Ishida T</u></b> , Hat ake K, Taniwaki M, An do K, Tobinai K, Fujim oto K, Yamamoto K, M iyamoto T, Uike N, Tan imoto M, Tsukasaki K, Ishizawa K, Suzumiya J, Inagaki H, Tamura K, Akinaga S, Tomonaga M, <b><u>Ueda R</u></b> .	Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-07 61), a defucosylated anti-C CR4 antibody, in patients with relapsed peripheral T- cell lymphoma and cutaneo us T-cell lymphoma.	J Clin Oncol.	32	1157-63	2014
Narita T, <b><u>Ishida T</u></b> , Mas aki A, Suzuki S, Ito A, Mori F, Yamada T, M asaki Ri, Kusumoto S, Komatsu H, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Utsuno miya A, Niimi A, <b><u>Iida S, Ueda R</u></b> .	HTLV-1 bZIP factor specif ic CD4 T cell responses in ATL patients after allogene ic hematopoietic stem cell transplantation.	J Immunol.	192	940-7	2014
Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Oh ue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, H onda H, Yamashita T, Nohara S, <b><u>Oka M</u></b> , Jimb ow K, and <b><u>Nakayama E</u></b> .	TLR4 and NLRP3 inflam masome activation in monoc ytes by N-propionyl cystea minylphenol-maleimid-dextr an (NPCMD).	J Dermatol Sci,	73	209-15	2014
Mizote Y, Uenaka A, Is obe M, Wada H, <b><u>Kaki mi K</u></b> , Saika T, Kita S, Koide Y, <b><u>Oka M</u></b> , and <b><u>Nakayama E</u></b> .	Production of NY-ESO-1 p eptide/DRB1*08:03 tetramer s and ex vivo detection of CD4 T-cell responses in v accinated cancer patients.	Vaccine	32	957-64	2014
Wada H, Isobe M, <b><u>Kaki mi K</u></b> , Mizote Y, Eikaw a S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, I watsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, <b><u>Udono H</u></b> , Seto Y, Yamada K, <b><u>Nishikawa H</u></b> , Pan L, Venhaus R, <b><u>Oka M</u></b> , <b><u>Doki Y</u></b> , <b><u>Naka yama E</u></b> .	Vaccination with NY-ESO- 1 overlapping peptides mix ed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in p atients with cancers express ing the NY-ESO-1 antigen.	J Immunother	37	84-92	2014

Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, <b>Ishida T</b> , T akeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, Mizokami M, <b>Ueda R</b> , Utsunomiya A.	Utsunomiya A. Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab.	Hepatol Res.	44	354-7	2014
<b>Nishikawa H</b> , Sakaguchi S	Regulatory T cells in cancer immunotherapy.	Eur J Haematol.	27	1-7	2014
Sugiyama D, <b>Nishikawa H</b> , Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E and Shakaguchi S	Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking anti-tumor immune responses in humans.	Proc. Natl. Acad Sci USA.	110	17945-50	2014
Mori F, <b>Ishida T</b> , Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Yamada T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imada K, Takaori-Kondo A, Niimi A, <b>Ueda R</b> , Inagaki H, <b>Iida S</b> .	Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model.	Eur J Haematol.	92	219-28	2014
Zwick C, Held G, Auth M, Bernal-Mizrachi L, Roback JD, Sunay S, <b>Iida S</b> , Kuroda Y, Sakai A, Ziepert M, <b>Ueda R</b> , Pfreundschuh M, Preuss K-D.	Over one third of African-American MGUS and multiple myeloma patients are carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, an autosomal-dominantly inherited risk factor for MGUS/MM.	Int J Cancer		Epub ahead of print.	2014
Nishikawa S. Konno M., Hamabe A., Hasegawa S., Ogawa H., Kano Y., Fukusumi T., Ohta K., Noguchi Y, Ozaki M., Kudo T., Sakai D., Haraguchi N., Satoh T., <b>Doki Y.</b> , Mori M. and Ishii.	Aldehyde dehydrogenasehigh gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy.	Int J Oncol	42	1437-42	2014
Ogino T., Nishimura J., Barman S., Kayama H., Uematsu S., Okuzaki D., Osawa H., Haraguchi N., Uemura M., Hata T., Takemasa I., Mizushima T., Yamamoto H., Takeda K., <b>Doki Y.</b> , Mori M.	Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease.	Gastroenterol	145	1380-91	2014

Wada I, Matsushita H, Noji S, Mori K, Yamashita H, Nomura S, Shimizu N, Seto Y, <b><u>Kakimi K.</u></b>	Intraperitoneal injection of in vitro expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells together with zoledronate for the treatment of malignant ascites due to gastric cancer.	Cancer Med.	3	362-75	2014
Ichimura T, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Matsushita H, <b><u>Kakimi K.</u></b> , Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M.	Prognostic Significance of CD204-Positive Macrophages in Upper Urinary Tract Cancer.	Ann Surg Oncol.		Epub ahead of print	2014
Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, <b><u>Ishida T.</u></b> , <b><u>Ueda R.</u></b> Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H.	Prognostic impact of miR-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/ lymphoma.	Human Pathol		in press	2014
<b><u>Ishida T.</u></b> , Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Takatsuka Y, Eto T, Miyazaki Y, Hidaka M, Uike N, Miyamoto T, Tsudo M, Sakamaki H, Morishima Y, Suzuki R, Utsunomiya A.	Impact of GVHD on allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma focusing on preconditioning regimens: nationwide retrospective study Biology of Blood and Marrow Transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant.	19	1731-9	2013
Suzuki T, Kusumoto S, Yoshida T, Mori F, Ito A, Ri M, <b><u>Ishida T.</u></b> , Komatsu H, Niimi A, <b><u>Iida S.</u></b>	Successful salvage therapy using lenalidomide in a patient with relapsed multiple myeloma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Int J Hematol.	97	540-3	2013
Masaki A, <b><u>Ishida T.</u></b> , Suzuki S, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Yamada T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, <b><u>Iida S.</u></b> , <b><u>Ueda R.</u></b>	Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOD/Shi- <i>scid</i> , IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup> mouse model.	J Immunol.	191	135-44	2013
Sato F, <b><u>Ishida T.</u></b> , Ito A, Mori F, Masaki A, Takino H, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Suzuki S, Komatsu H, Niimi A, <b><u>Ueda R.</u></b> , Inagaki H, <b><u>Iida S.</u></b>	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model.	Leuk Res.	37	21-27	2013

Inagaki A, Tajima E, Ur anishi M, Totani H, Asa o Y, Ogura H, Masaki A, Yoshida T, Mori F, Ito A, Yano H, Ri M, Kayukawa S, Kataoka T, Kusumoto S, <b><u>Ishida T</u></b> , Hayami Y, Hanamura I, Komatsu H, Inagaki H, Matsuda Y, <b><u>Ueda R, Iida S</u></b> .	Global real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detecting proto-oncogenes associated with 14q32 chromosomal translocation as a valuable marker for predicting survival in multiple myeloma.	Leuk Res.	37	1648-55	2013
Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, <b><u>Ishida T</u></b> , Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M.	Development of a novel redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia.	Blood	121	4894-901	2013
Kato H, Saito C, Ito E, Furuhashi T, Nishida E, <b><u>Ishida T, Ueda R</u></b> , Inagaki H, Morita A.	Bath-PUVA Therapy Decreases Infiltrating CCR4-Expressing Tumor Cells and Regulatory T Cells in Patients With Mycosis Fungoides.	Clin Lymphoma Myeloma Leuk.	13	273-80	2013
<b><u>Ishida T</u></b> , Ito A, Sato F, Kusumoto S, <b><u>Iida S</u></b> , Inagaki H, Morita A, Akinaga S, Ueda R.	Stevens-Johnson Syndrome associated with mogamulizumab treatment of adult T-cell leukemia / lymphoma.	Cancer Sci.	104	647-50	2013
Takaki A, Yagi T, Yasunaka T, Sadamori H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Sato D, Nobuo ka D, Utsumi M, Yasuda Y, <b><u>Nakayama E</u></b> , Miyake Y, Ikeda F, Shiraha H, Nouse K, Fujiwara T, and Yamamoto K.	Which patients respond best to hepatitis B vaccination after a hepatitis B virus-related liver transplantation?	J Gastroenterol	48	1373-83	2013
Pandey J, Namboodiri A, Ohue Y, <b><u>Oka M, Nakayama E</u></b> .	Genetic variants of immunoglobulin and chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer.	Clin Exp Immunol	176	78-83	2013
Reis BS, Jungbluth AA, Frosina D, Holz M, Ritter E, <b><u>Nakayama E</u></b> , Ishida T, Obata Y, Carver B, Scher H, Scardino P, Slovin S, Subudhi S K, Reuter VE, Savage C, Allison JP, Melamed JM, J?ger E, Ritter G, Old LJ, Gnjatich S.	Prostate cancer progression correlates with increased humoral immune response to a human endogenous retrovirus GAG protein.	Clin Cancer Res	19	6112-25	2013

Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, <b><u>Nakayama E</u></b> , Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, and Kamihira M.	T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles.	Nanomedicine	8	891-902	2013
Muraoka D, <b><u>Nishikawa H</u></b> , Noguchi T, Wang L, Harada N, Guilaume P, Luescher I, Uenaka A, <b><u>Nakayama E</u></b> , Old LJ, Kato T, and Shiku H.	Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8+ T cells.	Vaccine	31	2110-8	2013
Jimbow K, Ishii-Osai Y, Ito S, Tamura Y, Ito A, Yoneta A, Kamiya T, Yamashita T, Honda H, Wakamatsu K, Murase K, Nohara S, <b><u>Nakayama E</u></b> , Hasegawa T, Yamamoto I, and Kobayashi T.	Melanoma-targeted chemotherapy and in situ peptide immunotherapy through HSP production by using melanogenesis substrate, NPrCAP and magnetite nanoparticles.	J. Skin Cancer			2013
Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Fujita J, Hirao T, Makari Y, Shibata K, Iijima S, Jungbluth AA, Nakamura Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, <b><u>Nakayama E</u></b> , Mori M, and <b><u>Doki Y</u></b> .	NY-ESO-1 antibody as a novel tumor marker of gastric cancer.	Br. J. Cancer	108	1119-25	2013
Atarashi K, Tanoue T, Suda W, Oshima K, Naganoya Y, <b><u>Nishikawa H</u></b> , Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M and Honda K	Treg induction by a rationally selected Clostridia cocktail from the human microbiota.	Nature	500	232-6	2013
Hirayama M, <b><u>Nishikawa H</u></b> , Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnjatich S, and Shiku H	Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of Streptococcus pyogenes.	Eur J Immunol.	43	989-1000	2013

Adeegbe DO, <b><u>Nishikawa H.</u></b>	Natural and induced T regulatory cells in cancer.	Frontiers in Immunology.	4	190	2013
Noguchi T, Ritter G, <b><u>Nishikawa H.</u></b>	Antibody-based therapy in colorectal cancer.	Immunotherapy	5	533-45	2013
Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, <b><u>Nishikawa H.</u></b> , Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N.	Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy.	Exp Hematol.	41	367-76	2013
Suzuki T, Kusumoto S, <b><u>Iida S.</u></b> , Tada T, Mori F.	Amelanotic malignant melanoma of unknown primary origin metastasizing to the bone marrow: case report and review of the literature.	Int Med.	53	325-28	2013
Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino SH, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osaka M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, <b><u>Doki Y.</u></b> , Shiku H.	Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients.	J Transl Med.	11	246	2013
Takahashi T, Serada S., Ako M., Fujimoto M., Miyazaki Y., Nakatsuka R., Ikezoe T., Yokoyama A., Taguchi T., Shimada K., Kurokawa Y., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Takiguchi S., Mori M., <b><u>Doki Y.</u></b> , Naka T., Nishida T.	New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis.	Int J Cancer	133	2737-43	2013
Suzuki R., Yamamoto H., Ngan CY., Ohtsuka M., Kitani K., Uemura M., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Sekimoto M., Minamoto T., <b><u>Doki Y.</u></b> , Mori M.	Inhibition of angiopoietin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels in vivo.	Int J Oncol	43	1447-55	2013

Nagano H., Tomimaru Y., Eguchi H., Hama N., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S., Mori M., <b><u>Doki Y.</u></b>	MicroRNA-29a induces resistance to gemcitabine through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in pancreatic cancer cells.	Int J Oncol	43	1066-72	2013
Tsujinaka T. Yamamoto K., Fujita J., Endo S., Kawada J., Nakahira S., Shimokawa T., Kobayashi S., Yamasaki M., Akamaru Y., Miyamoto A., Mizushima T., Shimizu J., Umeshita K., Ito T., <b><u>Doki Y.</u></b> , Mori M.	Clinical Study Group of Osaka University on Section of Risk Management. Subcuticular sutures versus staples for skin closure after open gastrointestinal surgery: a phase 3, multicentre, open-label, randomised controlled trial.	Lancet	382	1105-12	2013
Iwagami Y., Eguchi H., Nagano H., Akita H., Hama N., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S., Tomokuni A., Tomimaru Y., Mori M., <b><u>Doki Y.</u></b>	miR-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via SMARCC1.	Br J Cancer	109	502-11	2013
Eikawa S, <b><u>Kakimi K.</u></b> , Iisobe M, Kazushima K, Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, <b><u>Nishikawa H.</u></b> , <b><u>Udono H.</u></b> , <b><u>Oka M.</u></b> , <b><u>Nakayama E.</u></b>	Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide.	Int J Cancer	132	345-54	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
和田 尚、 <b><u>中山書一</u></b>	免疫バイオマーカーと抗腫瘍効果	実験医学増刊	31	204 - 8	2013
和田 尚、 <b><u>中山書一</u></b>	がん患者における免疫モニタリング 評価法と国際標準化	医学のあゆみ	244	871-77	2013
前田優香、 <b><u>西川博嘉</u></b>	成人T細胞白血病・リンパ腫における免疫応答	臨床免疫・アレルギー科	59	367-76	2013
杉山大介、 <b><u>西川博嘉</u></b>	免疫抑制の克服による抗腫瘍免疫応答増強の可能性	医学のあゆみ	246	913-20	2013
西塔拓郎、 <b><u>西川博嘉</u></b>	Tregs制御による抗腫瘍免疫応答増強の可能性	医学のあゆみ	246	913-20	2013

西岡めぐみ、 <b>西川博嘉</b>	制御性T細胞による抗腫瘍免疫抑制 そのコントロールによる効果的ながん免疫療法の可能性	実験医学	31	1864-72	2013
--------------------	--	------	----	---------	------