

**厚生労働科学研究費補助金  
医薬品等規制調和・評価研究事業**

**平成25 - 26年度総合研究報告書**

**がんワクチン等の品質及び有効性評価手法の検討に関する  
レギュラトリーサイエンス研究**

**研究代表者 山口 照 英**

**平成27年(2015年)3月**

# 目次

## I. 総合研究報告書

がんワクチン等の品質及び有効性評価手法の検討に関するレギュラトリーサイエンス研究 (がんワクチンの有効性評価手法に関する研究 . . . . .)	1
山口 照英	

資料1. Cancer Vaccine NIH Clinical Study Protocol . . . . .	29
---	----

資料2. 案1. 治療用がんワクチンの評価における考慮事項に関するガイドライン . . . . .	273
---	-----

資料3. 最終案 治療用がんワクチンの評価における考慮事項に関するガイドライン . . . . .	291
---	-----

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	307
------------------------------	-----

III. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	309
----------------------------	-----

## がんワクチン等の品質及び有効性評価手法の検討に関する レギュラトリーサイエンス研究 （がんワクチンの有効性評価手法に関する研究）

研究代表者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

### 研究要旨

がんワクチンの開発が急速に進んでいるが、がんワクチンは従来の細胞障害性の抗がん剤と異なる作用メカニズムで臨床効果を発揮すると考えられ、従来の抗がん剤での臨床評価をがんワクチンに適用することは困難であり、がんワクチンに特化した評価が必要とされている。

25年度では、がんワクチンの臨床評価や品質に関して次のような点を明らかにした。

- 1) NIH Clinical Trial に記載されているがんワクチンプロトコルやがんワクチンの臨床試験報告から、がんワクチンによって惹起される抗腫瘍免疫反応を評価するために複数の免疫評価指標が用いられることが必要と考えられている。免疫応答性の評価では、がん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞やがん抗原特異的なヘルパー T 細胞数の解析、機能解析に加えて液性免疫応答性も評価されることが多い。また、がんによる免疫抑制反応からの解除を目指して抗体医薬や特定の抗がん剤が用いられており、患者の免疫抑制に関わる Treg 細胞数や免疫応答性の強さを評価する目的として遅延型アナフィラキシー応答性などが評価されている。またがんワクチンの投与方法や投与スケジュール、投与量の設定がこれまでの抗がん剤の臨床試験とは異なっていることが明らかになった。
- 2) がんワクチンでは従来の最大耐性投与量や毒性制限投与量の設定は不要な場合が多いと想定されるが、いくつかの臨床試験では MTD や DLT を主用評価項目や副次評価項目としているプロトコルもある。
- 3) これらの成果に基づいて昨年作成したがんワクチンの評価ガイダンスの素案の再検討を行った。ガイダンスでは臨床初期に絞った記載とし、特に免疫応答に対する評価や投与量の設定などを中心に書き、臨床後期での有効性の評価については、他のがん治療と大きな差異はないと考えられるために簡略な記載とし、1 次案としてはがんワクチン特有の留意点のみを記載することとした。がんワクチンの品質管理の考え方を明らかにする目的で、有効成分として用いられる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

26年度には次のような事項に取り組んだ

- 1) がんワクチンの品質管理においては組換えタンパク質を有効成分とする従来のバイオ医薬品の品質管理の考え方が参考に来る一方で、がんワクチンに固有の特性を踏まえた品質管理手法の構築が重要であると考えられる。本研究では、抗イディオタイプ抗体を有効成分とするがんワクチンの現状について調査するとともに、従来の抗体医薬品との比較を踏まえて、抗イディオタイプ抗体の品質管理を考える上で重要となる事項について考察した。
- 2) がんワクチンの臨床試験や免疫応答性についての最新の論文や総説からいくつかの課題が浮かび上がってきている。免疫応答性をより最適化するための方法の重要性やがんによる免疫抑制からの解除の重要性が明らかになりつつある。  
また抗免疫チェックポイント抗体を用いた臨床試験成績から免疫抑制の解除の重要性のみならず、がんワクチンの投与方法や製剤化の重要性が指摘されつつある。がんワクチンによる細胞性免疫の誘導の重要性に加えてむしろ従来アジュバント療法と異なる考え方が必要とされるかもしれない。さらに、がんワクチンに反応性ある患者と反応性ない患者の絞り込みが、今度重要となってくる可能性が指摘された。  
これらの要素を追記してがんワクチンガイドラインの最終案を提示した。

## 研究分担者

川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所・部長

多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所・室長

## 研究協力者

柴辻正喜 医薬品医療機器総合機構・部長

佐藤大作 医薬品医療機器総合機構・部長

井口豊崇 医薬品医療機器総合機構・審査役

朝倉 渡 医薬品医療機器総合機構・審査役

野中孝浩 医薬品医療機器総合機構・主任専門員

甘粕晃平 医薬品医療機器総合機構・審査専門員

老邑温子 医薬品医療機器総合機構・審査専門員

秦 利幸 医薬品医療機器総合機構・審査専門員

## A. 研究目的

近年患者自身の免疫能を賦活化することにより抗腫瘍効果を発揮させる治療法が開発されつつある。樹上細胞の機能をはじめ、がんに対する基礎的研究の進展やがんによる免疫抑制効果についての解析が進むと共に、腫瘍による免疫抑制からの解除する抗免疫チェックポイント抗体が開発されがん免疫療法に期待が持てる成果が得られ始めている。

米国 NIH の臨床研究ウェブページによると既に1600 を超えるがん免疫療法が登録されており、年々増加の一途に至っており、ペプチドワクチンをはじめ、タンパク質、組換えウイルスなど多様な製品を複雑に組み合わせた治療もおこなわれている。それぞれの製品の製法や特性解析、品質管理などは各種ガイドラインや指針に従った解析や管理が求められると考えられるが、非臨床試験や臨床試験では、安全性や有効性の評価において様々な課題が存在する。

非臨床試験では免疫応答性の種差もあり、必ずしも適切なモデル動物が存在するわけではないし、モデルマウスを用いた検討も行われているが必ずしもヒトに外挿できるデータがえられるとは限らない。

また、臨床試験では特に従来の抗がん剤とことなり、MTD や DLT が見られないケースも多い。またがん抗原を発現していない患者に対してはがんワクチンの効果がない可能性があり、そのためにがん抗原の発現を評価するためのコンパニオン診断薬の開発も必要と思われる。また、治験初期で行われる多様ながん種の患者に対する試験の必要性についても、がん抗原の発現性の観点から再考する必要がある。

本研究では、種々のがんワクチンを用いたがん免疫治療に関して臨床試験に関する国際的な登録情報やその臨床試験結果に関する論文等について調

査し上で、臨床試験でどのような免疫応答性を評価しているかを調査した。そのデータを参考として、有効性評価との関連についても明らかにした。また、品質、非臨床試験において考慮すべき事項について解析した。これらの成果から、がんワクチンガイドラインに取り込むべき要素について明らかにすると共に、がんワクチンガイドライン作成のための案を提示した。

がんワクチンの品質管理の考え方を明らかにする目的で、有効成分として用いられる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

がんワクチンの品質特性解析やその管理手法に関して、有効成分として用いられる組換えタンパク質のうち、抗イディオタイプ抗体に着目し、抗イディオタイプ抗体を有効成分とするがんワクチンの開発動向について調査すると共に、その品質管理手法について考察した。

## B. 研究方法

2015 年時点で、がんワクチンの臨床開発を目指して NIH Clinical Trial のウェブページに約1600 の臨床プロトコールが掲載されている。これらのプロトコールの調査では、パピローマウイルスやがん患者の感染症防御のためのワクチンに関する研究もあり、それらを除いた上で、どのような免疫応答性について臨床試験で明らかにしようとしているかを調査した。ペプチド/タンパク質を用いた開発のみならず、糖脂質を用いた開発、さらには細胞治療、遺伝子治療として分類される臨床開発が行われている。また併用薬としてもアジュバント、核酸医薬、低分子化学医薬品など様々な取り組みが行われている。このような併用薬を含めた治療レジメンとその免疫応答性の評価の関係についても調査した。

さらに治療レジメンに関しても多岐にわたっている。このような現在実施されている臨床プロトコールの解析を行うと共に、FDA のがんワクチンガイドラインや公表文献等も含め調査の対象とした。

また、患者での免疫応答性を評価する国際的な標準化プロジェクトから出された T 細胞のバイオアッセイガイドライン (Minimal Information about T Cell Assays (MIATA) ガイドライン) の有用性についても取り上げた。

各種ガイドライン及び文献情報等を参考にバイオ医薬品の規格及び試験方法についてまとめた。

これをもとにがんワクチンの有効成分として用いられる組換えタンパク質およびペプチドの品質管理手法について考察した。

がんワクチンの臨床試験結果についての報告が相次いでおり、またこれらの臨床試験のレビューも出されていることから、がんワクチン開発における課題や臨床試験と免疫応答との関連などについて得られた臨床試験データに関する文献や総説を含めて解析してみた。

各種文献情報等を参考に抗イディオタイプ抗体を有効成分とするがんワクチン開発の現状について調査した。がんワクチンの有効成分としての抗イディオタイプ抗体の品質管理手法について考察した。

得られた結果と昨年度までの成果を重ね合わせ、ガイドライン案を作成した。

(倫理面への配慮)

本研究は主として調査研究であるため、倫理面への配慮を必要としない。

## C. 研究結果

### C-1. がんワクチンの臨床プロトコール

米国 NIH の NIH Clinical Trial ウェブページには 2013 年現在で 1600 を超えるがんワクチンプロトコールが掲載されている。がん抗原ペプチドとして短鎖ペプチド及び長鎖ペプチドの他、がん抗原ペプチドと KLH などのスーパー抗原との融合タンパク質なども用いられている。がん抗原タンパク質そのもののみならずがん抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入するためのプラスミドやウイルスベクターの他、がん抗原でパルス刺激した樹上細胞による細胞治療も行われている。さらに、自己や同種がん細胞を放射線照射などにより増殖能を失わせた細胞製品なども用いられている。このような細胞製品にがん抗原をより強く発現させるためにがん抗原の遺伝子を搭載したプラスミドや mRNA を導入して投与したり、さらに免疫応答性を刺激するために GM-CSF やインターフェロン等のサイトカインの遺伝子を導入するなどの改変が行ったうえで、患者に投与することも行われている。

このような多様な製品が投与されるばかりでなく、投与レジメンとしてウイルスベクターのよるワクチン投与に引き続いてがん抗原ペプチドによる追加免疫を実施するレジメンやサイトカインによる刺激を行うプロトコールが報告されている。さらに数ヶ月から数年にわたる免疫刺激を行うことも試みられている。また、このような投与スケジュールのみならず、投与量、投与ルート、併用

薬などについても様々な試みが行われている。このような情報を明らかにした上で、免疫応答性の評価項目、評価スケジュール、有効性の評価項目、評価スケジュールについて整理した(資料1)。

### C1.1. 製品群の多様性

図1に、NIH Clinical Protocol のデータベースの収載されているプロトコールで用いられている製品を分類してみた。最も多いのはペプチドであるが、この中には短鎖ペプチドと長鎖ペプチドが含まれる。また、KLH などのキャリアタンパク質との融合ペプチドも含まれている。次に多いのが自己由来細胞であるが、この中には自己樹状細胞と自己のがん細胞に遺伝子導入などの何らかの処理をした後に抗原として投与される場合も含まれる。樹状細胞を用いたプロトコールが非常に多いが、この中には樹状細胞を刺激するペプチドやタンパク質、mRNA、プラスミドなども含まれている。タンパク質の中には、特定のがん抗原のイディオタイプ抗体なども含まれる。

遺伝子治療の中にはウイルスベクターを用いるケースからプラスミドやプラスミドをリボソームに封入した製品も含まれる。

またペプチドをスーパー抗原と結合させたり、がん抗原タンパク質をリボソームなどに封入することにより免疫応答性を高める製剤の開発も行われている。キャリアタンパク質が用いられるケースでは、キャリアタンパク質に対する免疫応答性を評価し、がんによる免疫抑制からどの程度回復しているのかについての解析も平行して行われることがある。

このほかに統計データとしては含めていないシアルリルイスXなどの糖鎖抗原やGD1、GD2などの糖脂質抗原などをターゲットした試験が実施されている。

### C1.2. 併用薬

がんワクチンの併用薬として、免疫賦活化作用を有する顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)やIL-2、インターフェロンの他、がんによる免疫抑制に関与するTreg細胞を抑制すると考えられているシクロフォルファミドやフルダラビン、Treg細胞の機能を抑制するためのアンチセンス核酸やsiRNAなどが用いられている。

近年、がんによる免疫抑制解除に抗体医薬品を用いる試みが行われており、大きな成功を収めている。代表的な例として、Treg細胞の発現するCTLA4やケモカインレセプターCCR4をターゲット

とした抗体医薬品としてイピリムマブやモガムリズマブ、がん細胞に発現する免疫抑制性のリガンドである PDL-1 や PDL-1 に結合する PD-1 に対する抗体医薬品などが利用されており、イピリムマブや抗 PD-1 抗体では高い有効性が得られたとの報告がある。

併用薬の効果とがんワクチンの効果が同じであれば臨床的な応答性について区別して評価する必要はないが、例えば Treg 細胞の抑制を評価する場合には、Treg 細胞集団のどの population が低下したのか評価する必要があるかもしれない。

また、Treg 細胞のようにいくつかのサブセットが存在する場合には、サブセットを区別して解析することも有用であると考えられる。

### C.1.3. 臨床開発初期での安全性

従来の細胞傷害性の抗がん剤と異なり、僅かな例外を除いてがんワクチンで最大耐性毒性が同定されたことは無いと考えられる。がんワクチンの臨床試験では、投与可能な最大投与量は毒性というより製品の製造上の限界や投与部位の物理的あるいは解剖学的な観点からの制限を受けることになると考えられる。従って従来の 3+3 用量試験を用いて最大耐用毒性 (MTD) や用量制限毒性 (DLT) を明らかにする必要がないと考えられる。

一方で、がんワクチンの臨床試験のデザインにかんする調査では、MTD や DLT を明らかにすることを主用評価項目や副次評価項目に挙げているプロトコルもある。がんワクチンの製品は非常に多用であり、これらの中には細胞製剤やアジュバントを用いたプロトコルが含まれており、そのためにこのような MTD や DLT を明らかにすることを目指しているとも考えられる。

### C.1.4. がんワクチンの免疫応答性評価

がんワクチンの有効性を予測可能な PD マーカーのとして、抗原特異的な細胞性免疫の活性測定や液性免疫反応の評価が行われてきている。また非特異的な免疫応答性として標準抗原に対する遅延型アナフィラキシー反応の強度を測定することも行われている。

細胞性免疫の応答性の評価に当たってはがんワクチンの投与スケジュール等を考慮する必要がある。すなわちがんワクチンの投与では、ウイルスベクター等による持続刺激がある場合を除いて 1-2 ヶ月の反復投与から、3-4 年といった長期にわたる反復投与を行うプロトコルも試みられている。また免疫応答性の評価ポイントも投与スケジュールに応じて数ヶ月から数年という長期の評価

を行う場合もある。従って長期にわたっての細胞を用いた評価を行うの際に、異なる日時での測定データの比較可能な結果が得られるような標準化が重要となる。

主とした有効性を示唆する細胞免疫応答性の評価項目としては、細胞傷害性 T 細胞やヘルパー T 細胞の増減をテトラマーアッセイや ELISPOT アッセイ、サイトカイン産生能をフローサイトメトリーで解析する方法など複数の方法で解析されている。

テトラマーアッセイ、ELISPOT アッセイ、サイトカイン産生フローサイトメトリーアッセイについては国際的なタスクフォースで標準化が試みられており、参考になる部分が多い。

### (1) クラス I あるいはクラス II の MHC ポリマーを用いた抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) あるいは抗原特異的 CD4+ 細胞の定量

ウイルス感染細胞やがん細胞の除去に免疫学的に重要な役割を担っている細胞傷害性 T 細胞は、抗原提示細胞の MHC クラス I 分子と結合した抗原ペプチドを認識し、標的細胞を特異的に攻撃、排除するとされている。この MHC 主要組織適合遺伝子複合体のクラス I 分子上に抗原ペプチドを提示することが出来る。さらに、CD8+ の細胞傷害性 T 細胞は HLA-I 分子に結合したがん抗原ペプチドを T 細胞受容体 (TCR) が認識し、刺激を受けた抗原を発現している標的細胞を攻撃するようになる。抗原が特定されたがんワクチンの臨床試験評価では、がんワクチンの接種により増加するがん抗原特異的 CTL ががん細胞を攻撃すると想定されており、特異ペプチドを結合した HLA class-1 複合体を用いて、その血中の抗原特異的 CTL 数を測定することが PD マーカーとなると考えられる。

しかし、MHC Class-1 / ペプチド複合体は、単量体では TCR への結合親和性が低いために、抗原特異的な CTL の検出に HLA class-1 / ペプチド複合体を利用するには、HLA の多量体化が必要とされている。すなわち、がん特異的なペプチドと MHC-class1 ポリマーを作製し、さらにそのペプチドポリマー複合体を蛍光標識したものを用いて、フローサイトメーターにより CD8 陽性でかつポリマーとの結合能をもつ陽性ゲートの T 細胞数を測定することにより、抗原特異的 CTL 数を算出する。さらに、蛍光標識された MHC Class-1 / ペプチド複合体は、CTL の特異的 T 細胞受容体 (TCR) との結合能を有するが、一方で MHC は CD8 とも非特異的に結合する性質があるために、特異結合を抑制す

る必要があるとされている。このために非特異的な HLA の結合部位に変異を導入する方法も考案されている。

## (2) MHC-class2/がん特異的ペプチド複合体の4量体を用いたヘルパーT細胞 (CD4 陽性) の検出

クラス2分子は、HLAのクラスII (HLA-2) 領域にコードされる鎖と鎖から構成されており、HLA-DR、DQ、DPがある。ヘルパーT細胞は、HLA-2分子に結合した抗原ペプチドを、TCR/CD3複合体が認識し、同時に抗原提示細胞の補助刺激分子(インテグリンリガンド;CD86)を補助受容体( CD28 )が認識することにより抗原特異的な活性化が起こる。抗原刺激によって活性化された抗原特異的ヘルパーT細胞は、CTLの活性化のみならずがん組織への浸潤にも必要とされていることから、血中における抗原特異的ヘルパーT細胞の濃度を測定することにより、がんワクチンの有効性を予測可能な指標となるとされている。

抗原特異的ヘルパーT細胞の測定では、細胞傷害性T細胞と同様にMHC Class-2とペプチド複合体の4量体やポリマーに蛍光物質で標識し、患者由来血液細胞等と反応させ、同時に蛍光標識したCD4抗体とのダブルラベルを行い、CD4陽性でかつMHC Class-1/ペプチドの反応性の細胞をフローサイトメーターにて定量する。測定ではMHC Class-2/ペプチド複合体ポリマーとの非特異反応性を排除することである。

テトラマーアッセイのフローサイトメトリーを用いた解析において細胞傷害性T細胞の表現系について同時測定が可能である。しかし、長期保存中にテトラマーの立体構造が変化しやすいことが知られており、安定性について十分な評価が必要である。また検出した細胞傷害性T細胞の機能的な面の評価ができないという欠点がある。また末梢血中で目的とするT細胞の検出感度としては0.01から0.2%であり、これより少ないT細胞の検出が難しい。このためにin vitroで抗原刺激を与え目的とする細胞傷害性T細胞を増幅させることにより感度を増加させる工夫も行われている。

さらに混合リンパ球反応を利用した細胞傷害性T細胞のin vitroでの増幅法も用いられており、単なる抗原刺激よりも増幅能が高いとされている。しかし、in vitro刺激を加えても感度は100倍ほど増加するが、それより少ないT細胞集団を検出することは技術困難とされている。

## (3) 特異的抗原刺激によって活性化された CD4+ または CD8+T細胞数の ELISPOT による計測、ある

## いは細胞内サイトカイン染色による解析

がん抗原特異的に反応するCD4陽性やCD8陽性細胞を測定するもので、Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT)では、特異抗原刺激によりこれらのT細胞が産生するインターフェロン(IFN-)の産生を測定するものである。IFN-はCD4、CD8、NK細胞などが産生するサイトカインであり、炎症免疫反応の調整に関与すると考えられ、抗原刺激を受けたこれらの細胞の反応性を検出することが可能とされる。産生また、細胞内サイトカインアッセイでは、抗原刺激によりT細胞我が活性化され産生するサイトカインを細胞内に蓄積させサイトカイン陽性細胞を定量するものである。

### (3-1) ELISPOT アッセイ

がんワクチンの投与を行った患者末梢血より白血球を分離し、リンパ球層あるいは、CD8やCD4細胞を分離して、一定期間抗原刺激を与えながら培養を行う。その際、培養プレートを抗IFN-コートとしておき、T細胞が産生するIFN-をトラップ可能としておく。所定の培養期間を経過した後、T細胞やリンパ球を除去した後、トラップしたIFN-量を酵素免疫反応により検出する。細胞から産生されるIFN-は培養プレートにコートされた抗IFN-により効率よくトラップされ、IFN-産生細胞が存在した部位のみがプラーク状に染色される。この染色パターンからIFN-産生細胞量の推定が可能となる。培養プレートのスポットとして検出されるために、定量範囲がそれほど広がらないが、機器を用いなくても解析可能な測定法である。

ELISPOTアッセイの感度は0.01%とされている。ELISPOTアッセイでは細胞傷害性T細胞の機能面の評価も可能であるが、陽性細胞傷害性T細胞の回収が出来ないために、その機能や抗原特異性などについて詳細な検討が出来ない。

### (3-2) 細胞内サイトカインアッセイ

フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカインアッセイは、ELISPOTと同様にがん抗原特異的なT細胞の機能情報に着目したアッセイ法である。抗原刺激に反応して、CD4細胞やCD8細胞が産生するサイトカイン(インターロイキン2; IL-2)を産生するが、そのIL-2再生している細胞を特異的に染色する。このために、MonensinやBrefeldin-Aなどの細胞内タンパク質輸送を阻害する薬剤を用いて抗原刺激を行い、細胞内に蓄積されたIFN-やIL-2を膜透過処理を行ったうえで蛍光免疫染色により検出する。同時に、CD4及

び CD8 抗体を用いて蛍光免疫染色し、CD4 陽性 / IL-2 陽性、あるいは CD8 陽性 / IL-陽性の細胞をフローサイトメーターにより解析する。細胞内サイトカインアッセイの特徴は、抗原刺激による機能(サイトカイン産生)を測定できるだけでなく、CD4 と CD8 陽性の細胞を同時に測定することも可能とされている。

細胞内サイトカインアッセイの感度は 0.02% ほどであり、感度の点が課題となっている。

#### (4) がん抗原の特異性が不明な場合

がん抗原タンパク質やこれをコードするような遺伝子を発現させる製品では、抗原のどの部位に対する免疫応答が惹起されるか不明であり、また MHC-1 と MHC-2 の両方に別々の抗原ペプチドが呈示される可能性がある。さらに、複数の MHC に異なるがん抗原ペプチドが提示される可能性がある。従って、がん抗原タンパク質の中の複数のペプチドに対する免疫応答性を評価することが有用と考えられる。

このために、導入したがん抗原タンパク質をコードするプラスミド等を導入した抗原提示細胞を用いて複数の抗原ペプチドを MHC 上に発現させることも行われている。例えば、複数のがんペプチド発現する抗原提示細胞と患者由来のリンパ球分画を *in vitro* で同時に反応させ、抗原提示細胞からの刺激を受けた特異的な細胞傷害性 T 細胞や CD4 陽性細胞のサイトカイン放出を ELISPOT アッセイにより検出するというものである。

一方で、抗原タンパク質の全体を網羅するようにペプチドライブラリーを合成し、ELISPOT アッセイやサイトカインフローサイトメトリーアッセイを行うものである。

#### (5) 制御性 T 細胞の測定

以上のがんワクチンの免疫応答性の評価では、がん組織は様々な因子を放出したりすることにより、がんに対する免疫応答を抑制する機構があることが知られている。このがんによる免疫抑制機構の中で重要な役割を果たしているのが制御性 T 細胞 (Treg 細胞) といわれている(図 2)。また、がん細胞は肝臓などに発現される PD-L1 を発現することがあり、この PD-L1 は免疫細胞の PD-1 に結合し、免疫細胞を不活化することが知られている。

このために Treg 細胞上に発現する機能タンパク質である CTLA4 やケモカイン受容体である CCR4 に対する抗体や、PD-L1 や PD-1 に対する抗体を用いてがんによる免疫抑制を回避する方策が試みられている(図 2)。

また Treg 細胞の抑制効果があるとされるサイクロヘキシミド(CHX)投与などの投与ががんワクチンの併用薬として用いられている。

このような免疫抑制からの解除を評価することもがんワクチンの効果を評価する上で非常に重要とされる。例えば Treg 細胞の血中濃度やがん組織やリンパ節内での Treg 細胞の量を測定することも有用と考えら得る。また、Treg 細胞の活性化状態に関しては、末梢血中の Treg 細胞数や Treg 細胞のサブタイプの解析、さらには腫瘍内に浸潤している Treg 細胞数やそのサブタイプ解析が行われている。また、特異抗原に対する免疫応答性のみならず、がんには関連しない非特異的な標準抗原に対する免疫応答性とした遅延型アナフィラキシー応答性の評価も行われている。

#### (6) 抗原提示細胞によるがん抗原のクロスプレゼンテーション

MHC-1 は基本的に全ての細胞に発現しており、内在性タンパク質がプロテアソームにより分解され生成したペプチドが抗原処理関連トランスポーター (TAP) 依存的に小胞体に運ばれ MHC-1 と結合して細胞外へ提示されるようになる。一方で外来性抗原はカテプシン S などの分解を受け、分解されたペプチドは抗原提示細胞特異的に発現される MHC-2 に発現される。

ナイーブな CD8 陽性細胞が外来抗原への応答性を誘導するためには抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞) により外来性抗原がその MHC-1 に提示される必要がある (クロスプレゼンテーション: 図 3) とされている。いくつかの概念的な仮説も含め、外来性抗原に対する細胞傷害性 T 細胞誘導の機能をになうのがどのような細胞なのか明確にはされていない。本来内在性抗原を提示する MHC-1 に外来性抗原を提示するクロスプレゼンテーションが惹起されることにより細胞傷害性 T 細胞の強力な誘導が起こり、高い抗腫瘍効果が発揮されると考えている研究者も多い。

クロスプレゼンテーションに関わる抗原提示細胞としては、*in vitro* での解析結果から樹状細胞がその主役とされているが、どの樹状細胞サブタイプがその役割を担っているのか明確でない状況で、クロスプレゼンテーションの誘導を評価することを求めるのは時期尚早の感がある。また抗原提示に関わる樹状細胞が局在すると想定される腫瘍内から樹状細胞を収集することも想定されるが、少なくともクロスプレゼンテーションに関わる樹状細胞が特定される必要があったが、近年の解析でその候補となる樹状細胞が特定されつつある。



マウスでの樹状細胞の解析結果から、リンパ節に常在するレジデント樹状細胞(cDC)、タイプ1インターフェロンを産生する形質細胞様樹状細胞(pDC)、移住性樹状細胞(mDC)のサブタイプが知られている。さらに、cDCはCD8陽性(CD8+cDC細胞)のCD8陰性(CD8-cDC細胞)の2種類があり、クロスプレゼンテーションに關与する樹状細胞はCD8+cDC細胞とされている。このマウスのCD8+cDC細胞に相当するヒト細胞について最近の研究でDC antigen-3(BDCA3)陽性(CD141陽性)細胞であるとする報告がされつつある。

しかしBDCA3+細胞はリンパ節や骨髄等でも非常に僅かなポピュレーションしかない細胞であり、クロスプレゼンテーションの有無の指標としてBDCA3+細胞の抗原提示能を指標とした場合に測定法として成立するのかが問題となる。

マウス DC8+cDC やヒト BDCA3+細胞は高いIL-12 やインターフェロン産生能をもつと共に トールライク受容体3 (TLR3)やTLR7を発現している。

マウス DC8+cDC やヒト BDCA3+細胞はMHC-1上に外来性抗原を提示できるされるが、TLR3に2本鎖RNAやpolyI:Cなどが結合するとMHC-1への抗原提示が活性化され、細胞傷害性T細胞の誘導が上昇する。また、産生するIL-12やインターフェロンを介してこの細胞傷害性T細胞の分化誘導を亢進させる能力を持つとされている(図3)。

クロスプレゼンテーション能を持つヒト樹状細胞(BDCA3+細胞)はがん免疫療法のキーとなる細胞と想定されている。樹状細胞を用いた抗腫瘍細胞製剤としてFDAが唯一承認しているSipleucel-T(Provenge)もこのような観点からの承認であると理解される。ただし、Provengeで得られている患者の全生存率の延長は対象に比べて統計的有意さはあるものの僅かであり、様々な改善の余地があるとされている。

例えば投与される樹状細胞の刺激因子、投与する樹状細胞量、投与頻度、投与ルート、投与部などである。このような解析が進展し、BDCA3+樹状細胞が真にがん免疫応答の中心に位置することが明らかになり、さらにその解析手法が確立することが期待される。

従って、樹状細胞に関するこのような解析が進めば、がんワクチンにおけるクロスプレゼンテーションの評価の意義もさらに明確になってくると考えられる。

## C.2. がんワクチンの臨床試験

最近のがんワクチンの臨床開発で大きな成果は免疫チェックポイント分子に対する抗体(抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体)で非常に顕著な臨床成績が得られている点であろう。これらの臨床試験で、がんによる免疫抑制の解除が非常に重要であり、免疫抑制解除を達成することによりがんワクチンの開発が進むと期待されている。一方で、がんワクチン抗原ペプチドを抗免疫チェックポイント抗体と併用した場合に、抗免疫チェックポイント抗体単独に比べてその効果がほとんど見られなかった点から、抗腫瘍免疫に対するメモリーで効果が発揮できるのではとの懸念も上がっている。

こういった点からも現時点でのがんワクチンの臨床試験で得られている結果を再評価することが有用と考えられる。

## C.3. がんワクチンに関する臨床試験結果とそのレビューについて

がんワクチンの臨床試験成績や最新の総説(Melero et al Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. Nat. Rev Clin. Oncol.11, 509-524 (2014))を取り上げ、がんワクチンの臨床試験と免疫応答についてまとめてみた。

### がんワクチンの開発戦略

宿主特異的かつ腫瘍特異的な免疫応答による治療効果があり得ることが知られており、長年の研究からこのような免疫応答を惹起したり亢進させたりする獲得免疫治療を目指した研究が行われている。抗腫瘍免疫療法は複雑であり、複数のコンポーネントから構成されていたり、そのうえ抗原や、アジュバント、抗原デリバリー系、投与ルートなどが最適化されているわけではない(表1)。免疫賦活化作用については、腫瘍による免疫抑制や免疫寛容機構との関係を考慮する必要がある。

### 腫瘍抗原提示

がん抗原は多くの場合に自己抗原であり、高いアビディティを示すT細胞のT細胞受容体(TCR)はTCRレパートリーから除去されやすいということになる(表2)。一つのがん抗原に対する免疫応答により、腫瘍細胞の溶解反応等により他のがん抗原に対する免疫応答を惹起する効果があり(antigen-spreadingないしepitope-spreading)、epitope-spreadingにより、非常に狭い抗原刺激により応答の弱点が補われる可能性がある。複数の抗原エピトープを持つような長いペプチド配列をがんワクチンとして用いることによりMHCのクラスIとクラスIIの両方を刺激することになり、免疫原性を改良することが可能となる。このよう

な MHC のクラス I とクラス II の両方を刺激する抗原提示をクロスプレゼンテーションを惹起できた時に、強い免疫応答を引き起こすがんワクチンとなると期待されている。

### 抗原とアジュバント

T 細胞に認識される多くのがん抗原はがん抗原特異的な腫瘍免疫応答を引き起こすことが期待される。アジュバントはこのがんに対する細胞性免疫応答を亢進する効果が期待されている。効果的な免疫療法を行うために複数の抗原を使用したりアジュバントとの併用が確実に高い免疫応答を引き起こすのに用いられる。

### アジュバントやがんワクチンベクター

がんワクチンによる免疫誘導を増強するために多くの場合アジュバントとの同時投与が行われる。がんワクチン投与においては活性化によってタイプ 1 ヘルパー T 細胞からのインターフェロン 産生の活性化や細胞傷害性 T 細胞の活性化が起こることが期待される。それぞれ用いるアジュバントによって惹起される免疫応答に違いが知られている。

アルミニウムアジュバントや感染防御ワクチンに用いられてきた古典的なアジュバントは、液性免疫依存するタイプ 2 ヘルパー T 細胞の活性化を引き起こすがタイプ 1 ヘルパー T 細胞の活性化はほとんど起こさないとされている。

フロイントアジュバントのような水中油中水型乳剤が広くがんワクチンに用いられているが、現在までのところこれらのアジュバントを用いた臨床試験で効果的な結果が得られているわけではない。水中油中水型乳剤はワクチンの投与部位から徐々に放出されることを期待した製剤設計となっている。このような抗体を誘導させる免疫反応を期待する場合には効果的な戦略となっている。Hailmichael らはこのような除放製剤設計による抗原投与は腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞の応答には向いておらず、活性化された細胞傷害性 T 細胞は除放性刺激ゆえにワクチン投与部位にとどまりやすくなり腫瘍組織への移行が阻害されると報告している ( Hailmichael et al. Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8(+) T cell sequestration, dysfunction and deletion. Nat. Med., 19, 465-472 (2013) )。このような免疫応答の強さとがんに対する臨床効果との食い違いを説明しているともいえる。例えば glycoprotein 100 (gp100) ペプチドを水中油中水型乳剤と共に抗 CTLA4 抗体である Ipilimumab と併用して転移性メラノーマ

の患者に投与した場合に Ipilimumab 単独の効果と同等であり、gp100 の効果が認められていないことの説明として十分な細胞性免疫に対する刺激が得られていなかった可能性が考えられる。抗原刺激の方法の問題であるとするアジュバントとの投与方法の変更により効果の改善の可能性が期待される。

現時点では単一のアジュバントを用いた臨床試験で有効な抗腫瘍効果が認められていないことから、多くの場合、複数のアジュバントを用いる臨床試験が実施されている。これらには免疫原性の高いウイルスベクターやリポソームベクターを用いるようなケースもあり、抗原とアジュバントをどのように組み合わせるかについての検討が続けられている。このような観点から高いアジュバント効果を持ち、腫瘍抗原提示をする最適な細胞は樹状細胞と考えることができる。がん免疫治療に用いる最適な樹状細胞としては、抗原刺激した後、活性化、成熟させて適切な投与部位に導入することによって達成されるものと考えられている。

頸頭部がんや肺がんの同所性移植モデルマウスで、鼻腔内ワクチネーションが試みられているが誘導された CD8+T 細胞は脾臓への移行は起こらず粘膜に対してホーミングする特性を持っていた。抗原刺激としては樹状細胞において HLA クラス I を介した CD8+T 細胞の活性化が起こることが高い細胞傷害性 T 細胞の誘導につながると考えられる。

樹状細胞は抗原提示のみならず、骨髄性及び形質細胞系の樹状細胞では直接がん細胞を傷害し殺す作用を持つことが知られており、このような作用によってもバイスタンダード効果も期待される。

がん抗原の免疫賦活化効果を得るために複数の抗原投与とレジメンを採用する場合も多い。最初にウイルスベクターや DNA ワクチン、あるいは mRNA により抗原投与を行った後で異なるベクターを用いて同じ抗原をブーストするといったように ( 例えばワクシニアウイルスベクターと fowlpox ウイルスベクターといった組み合わせである ) 非臨床試験からこのように同じ抗原を投与するのにベクターを変えることによって細胞性免疫をより活性化することができ、抗腫瘍効果が高いことが知られている ( Hallermalm, K et al Preclinical evaluation of a CEA DNA prime/protein boost vaccination strategy against colorectal cancer. Scand. J. Immunol. 66, 43-51 (2007), Ishizaki, H et al Heterologous prime/boost immunization with p53-based

vaccines combined with toll-like receptor stimulation enhanced tumor regression. J. Immunother. 33, 609-617 (2010) )

どのアジュバントが最も適しているのかを臨床的に実証することは困難であり、殆どデータは得られていない。そのため複数のアジュバントと抗原と組合わせた臨床試験が実施されることが多くなっている。

### がんによる免疫抑制を解除するための試み

腫瘍はさまざまなメカニズムを用いて宿主の免疫からの攻撃を避けることが可能であるが、そのメカニズムについて全てが明らかにされているわけではない。免疫原性を低下させたりがん抗原を消失させたりするような応答をするばかりでなく、大量の免疫抑制メディエーター産生することが知られている。このような免疫抑制性メディエーターとしては、アデノシン、キヌレイン、プロスタグランジン E2、TGF- $\beta$ 、VEGFA などが挙げられる(表3)。

がんの微小環境において Treg 細胞や myeloid-derived suppressor T cells (MDSCs) や腫瘍内マクロファージの誘導や活性化が起きている。このような免疫抑制性の細胞を除去、抑制し、がんワクチンの効果を増強する試みががんワクチンの投与と併行して行われている。低濃度のシクロフォスファミドは Treg レベルを低下させがん応答性の T 細胞の活性化を起こすことが知られている。

Treg 細胞とエフェクター細胞との動的な関係性についてはそれほど単純に理解できる状況ではなくさらに研究が必要である。腫瘍組織内の Treg レベルは数多くのがん種に亘って予後の悪さと相関しているとされるが、大腸がん患者の腫瘍内に浸潤している Treg 細胞数の検討から、Treg 細胞数がより多いほどむしろ全生存率(OS)や無増悪生存率(PFS)がよいという結果が報告されている。(Correale, P. et al.: Regulatory (FoxP3+) T cells tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. J. Immunother. 33, 435-441 (2011))

IL-2 単独か IL2+gp100 ペプチドワクチン投与群に割り付けられたメラノーマ患者の Phase III 試験で治療に反応しなかった群よりも治療効果のあった群の方が Treg 細胞数の高いという結果も得られている。これらの結果から Treg 細胞の応答性は炎症誘発性と抗炎症性応答のバランスによって効果が異なってくるのではと考えられている。

ヒト Treg 細胞には少なくとも機能の異なる 2 つのサブセットが存在する。一つは誘導型の iTreg 細胞であり、末梢中で分化誘導され、直接免疫系の細胞を接触するのではなく TGF などの免疫抑制性のサイトカインを分泌することによる特性を持つ。もう一つの Treg 細胞は自然 Treg 細胞であり、免疫寛容や自己免疫疾患の抑制に関与するものであり、胸腺で分化誘導され免疫系の細胞と直接作用することによりその抑制効果を発揮する。より Treg 細胞のサブセットの機能を明らかにするためには、それぞれのサブセットをノックダウンなどにより除去することによって初めて明らかにできるであろう。

微小腫瘍組織環境に存在する他の免疫抑制性の細胞を制御することにより免疫抑制を解除することができがんワクチンの効果をさらに亢進させることができるかもしれない。このターゲットとしては骨髄性抑制性マクロファージ(MDSC)などが挙げられる。

### 免疫チェックポイント因子の制御

免疫チェックポイント因子は通常過剰な免疫応答を制御するために機能しており、リンパ球の細胞膜上の受容体として機能している。免疫チェックポイント因子は CTLA-4 や PD-1/PDL-1 に限定されるものではない。がんワクチンに応答する T 細胞のクローナルな増幅を誘導するように免疫チェックポイント阻害剤が用いられる。PD-1 は抗原刺激が応答してクローナルな増幅にともない T 細胞上に一過性に誘導される分子であり、持続的な PD-1 の発現はアナジーを誘導したり排除されることになる。多くの腫瘍細胞は PD-1 リガンドである PDL-1 を発現しており、PDL-1 を発現している腫瘍は予後が悪いとされる。

2011 年に米国では抗免疫チェックポイント抗体である Ipilimumab(抗 CTLA-4 抗体)をがん治療薬として承認した。主要な作用としてはがん微小環境中の Treg 細胞を除去することによりがん免疫抑制からの解除により抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。転移性メラノーマを対象とした Phase III 試験で dacarbazine との併用により OS の顕著な亢進が得られている。また抗 PD-1 抗体についても有用な効果が得られており、さらに抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体との併用によって相乗効果が得られている。このように免疫チェックポイント分子に対する抗体により顕著な臨床効果が得られているということはがんによる免疫抑制からの解除ががんワクチンの治療効果を発揮するうえで重要なポイントとなることを示していると考えられる。一方で、また抗原投与が優位な

臨床効果を示さない点については、抗原投与が免疫誘導を起こすほどの刺激になっていないか既に存在する抗原メモリーで十分なのか今後解明されなければならない課題である。

### がん種ごとのがんワクチン臨床効果と免疫応答

がん種別に分けたがんワクチンのこれまで得られている臨床データについてまとめてみたのが表4である。いくつか顕著な効果を示す結果が得られているが、これらのデータの中でがんワクチンの対象患者の絞り込みが重要な課題となってきた。臨床効果があらかじめ予測される患者を選択し、効果のない患者に無駄な治療を施さないで済めば患者の負担も軽減される。

### C.4. ガイドライン作成に向けた議論

昨年度に引き続きがんワクチンのガイドラインについて、最新の学術動向に加えてPMDAの専門家やアカデミアの腫瘍免疫の専門家等の意見を聴取した。それらの意見とその対応策を以下にまとめた。:

1. LAK療法や非特異的免疫活性化療法に関する記述については今回の指針の範囲外と想定される。
  - LAK療法などの記載を削除し、全体としてペプチド/タンパク質を用いたがんワクチンに特化していることを明確にする
2. 樹状細胞等の抗原提示におけるクロスプレゼンテーションの記載については、クロスプレゼンテーションのがん免疫へのインパクトが十分に解明されていない。
  - 最近のがんワクチンの臨床試験を総括したレビューで、抗原提示細胞としての樹状細胞の重要性とクロスプレゼンテーションの重要性について言及されており、まだ確定的なことは言えないがクロスプレゼンテーションが重要か否かを評価しておくことは有用な情報をえることと考えられる。
  - Melero, I et al.: Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. Nature Reviews, Clin. Oncol. 1. 509-524 (2014)
3. 抗原特異的なヘルパーT細胞の測定法としてClass IIテトラマープローブについてはそれほど実績がなく、解析が困難な可能性がある。
  - Class IIテトラマーを用いた抗原特異的CD4ヘルパーT細胞の解析事例はそれほど多くの論文があるわけではない

が、下記に示すような論文が出されている。Class IIに提示されるがん抗原の同定など今後の開発によって手法の開発が進む可能性があり、例示的に示すのは問題ないと判断

- Novak, E.J. et al.: MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4+ T cells proliferating in response to influenza A antigen. J Clin. Invest. 104, R63-69 (1999)
  - Cecconi, Cecconi, et al.: Use of MHC Class II Tetramers to Investigate CD41 T Cell Responses: Problems and Solutions. Cytometry, Part A 73A: 1010-1018, 2008
4. 腫瘍免疫療法において、免疫活性化の評価手法として提唱されている標準抗原として「keyhole limpet hemocyanin, 液性免疫としての破傷風菌抗原、細胞性免疫の指標としてのphytohemagglutininへの応答性」を提唱しているが、その有用性について確立されているか。免疫応答性の評価法としての遅延型アレルギー反応の評価の有用性については?
    - 多くのがんワクチン臨床研究でがん特異抗原に対する遅延型アレルギー反応を解析している。一方、Her2抗原に対するがんワクチンでは破傷風菌抗原へのDTHを測定しており、乳がんでは7つの標準抗原(tuberculin, etanus, diphtheria, Streptococcus, Candida, Trichophyton, Proteus)に対するDTHを測定している。このようながんの特異的でない標準抗原に対するDTHを測定することの有用性については、現時点では不明な点が多い。このような標準抗原へのDTHの評価が、がん患者の免疫応答レベルの評価に使えるかどうかについては今度の解析データの積み重ねによると考えられる。
    - Schiffman K et al.: Breast Cancer Res Treat. Delayed type hypersensitivity response to recall antigens does not accurately reflect immune competence in advanced stage breast cancer patients. 74(1):17-23. (2002)
    - Turner-Cobb, J.M. et al.: The interaction of social network size and stressful life events predict delayed-type hypersensitivity among

women with metastatic breast cancer.  
Inter. J. Psychophysiol. 54, 241– 249  
(2004)

5. 非臨床データの有用性については、必ずしも明確でない。ヒトへの外挿性についても未だ不明な部分がおおい。特に動物モデルでは種差による免疫応答の違いが出てくる可能性が高いと考えられる。また、用量設定や用法についてどこまで非臨床試験データから示すことが可能か。

- 非臨床データ出られたがんワクチンの用量については種差の点を考慮すると必ずしも外挿性があるともいえない。用法については最も免疫応答の高い用法として定量性は別にして考慮可能では。用量についてのみ記載を変更。

6. がんワクチンと併用されるアジュバントに関してがんワクチンとの併用による安全性試験のみならず単独での安全性試験は必要となるか。

- がんワクチンのアジュバントとしての範囲をどの程度にするかによって記載が変りうる。免疫増強物質を総称するとすると、抗原の徐放性を高めるアルミニウムアジュバントやフロイントアジュバントなどの物質のみならず、Toll-like 受容体に結合する核酸、GM-CSF や IL-2, IL-4 などの免疫系サイトカインなど多様である。場合によってはアジュバント単独で試験を実施する方が評価が容易である可能性も、現行のままとする。

7. がんワクチンの効果が発揮されてくるまで一定の時間が必要と想定される。その場合に投与直後には臨床効果が現れず病状が進行 (PD) と判断されるような症状を呈する場合があります。治療の継続の判断が難しい。その場合に、PD とされる兆候があっても治療を継続する場合の判断基準をどのように説明するか。

- 例外事項プロトコールを患者救済措置と例示

8. マウスモデルでのがんワクチンの効果は追加免疫しなくてもメモリーセルによりがんが拒絶されるというデータが多い。マウスモデルでの追加免疫の効果の評価をヒトに外挿することが難しい可能性が高い。

がんワクチンの有効性を予測する試験として、追加免疫の評価は限界がある可能性があるが、安全性の観点からは長期に亘る反復投与の限界に言及していると考えて現行のままとする。

## C. 5. がんワクチンガイドライン案

以上の調査研究を通じて得られた情報を基に、がんワクチンガイドラインに盛り込むべき要素を検討した。24 年度に実施した特別研究でがんワクチンガイドラインの素案を作成しているが、本年度に明らかにした要素をこの素案に追加した。また、後期臨床評価での全生存期間の延長等の有効性評価はがんワクチン特有の課題ではないことから、特にがんワクチンに特化した記載のみに限定することとした (資料 2 と 3)。

## C. 6. がんワクチンの品質管理手法

がんワクチンの有効成分として用いられる組換えタンパク質及びペプチドの品質管理にあたっては、バイオ医薬品 (組換えタンパク質医薬品) で設定される規格及び試験方法が参考にできる。以下ではバイオ医薬品の規格及び試験方法<sup>1)</sup>を参考に、組換えタンパク質及びペプチドにおいて設定することが予想される規格及び試験方法について概説する。

規格及び試験方法は、品質管理のための方策の一部であり、品質は、原材料の管理、適切な製造工程の設定および管理などとあわせて全体として確保される。規格及び試験方法は、試験項目、分析方法および規格値 / 判定基準からなり、試験項目は、医薬品の有効性および安全性を確保するために必要な特性 (重要品質特性) と、その範囲および分布が確認できることを考慮して選択される。製造工程で生じうる特性の変化の範囲、医薬品の安定性及び有効性・安全性との関連等を明らかにすることにより、重要品質特性の範囲や分布が設定され、適切な規格及び試験方法を設定することが可能となる。表 5 にバイオ医薬品の原薬において設定される規格及び試験方法の項目の例を示す。製剤においては、同様の項目が設定されることが多いが、添加剤による試験への影響や製剤化工程により生じる変化を勘案して適宜項目が追加・簡略化されるほか、製剤試験として、無菌試験、エンドトキシン試験、不溶性微粒子試験および不溶性異物検査、質量偏差試験 / 含量均一性試験、ならびに凍結乾燥製剤に対する含湿度試験などが設定されることもある。組換えタンパク質医薬品は一般的に不安定であり、保存中に力価の低下や分解物および変化物が生じる可能性がある。そこで、外観、純度、力価およびその他の分子特性など複数の指標により安定性評価が可能となるよう適切に規格及び試験方法を組み合わせることが必要である。以下に、主な項目の概略を述べる。

(1) 構造式

ペプチドおよびタンパク質性医薬品では、アミノ酸配列に加えて、ジスルフィド結合および糖鎖などの翻訳後修飾の構造およびその結合部位などを明記する。

#### (2) 分子式と分子量

均一なペプチドおよびタンパク質性医薬品では、分子式および分子量を記載する。糖鎖修飾などの翻訳後修飾により、分子式や分子量が不均一な場合は、タンパク質部分の分子式・分子量のみを記載し、修飾を含むおおよその分子量は、基原に記載する。

#### (3) 性状

固体、液体などの形状および色についての定性的な記述が必要である。保存中に変化する場合には、その変化について検討を行い、適切な規格を設定する。

#### (4) 確認試験

確認試験は、有効成分などをその特性に基づいて確認する試験である。類似した構造をもつ物質と識別できるような特異性の高い方法が望ましい。純度試験や定量試験など確認試験以外の試験と内容が重複する場合は、確認試験として設定する必要はない。確認試験は有効成分の特性を考慮して2つ以上設定すべきとされている。理化学手法としては、ペプチドマッピング、質量分析などが、免疫学的手法としては、ウエスタンブロット法やELISAなどが利用される。通常のバイオ医薬品では生物学的手法として、動物や細胞を用いた方法、酵素活性および結合性などを利用した方法が用いられるが、がんワクチンの場合にはこれらの生物学的手法を用いた試験の設定が困難な場合も想定される(考察の項を参照)。

#### (5) 示性値

示性値に相当するものとして、等電点、分子量・分子サイズ、分子吸光係数、アミノ酸組成、比活性、結合性、アイソフォームの不均一性、N末端の不均一性、糖含量、および糖鎖プロファイルなどがあげられる。医薬品の有効性および安全性を確保するために、必要に応じて、等電点、アミノ酸組成、比活性、糖鎖不均一性などのように設定する。確認試験、純度試験として設定されることもある。

#### (6) 純度および不純物試験

純度試験は、目的物質の純度、もしくは混在物の種類およびその量を規定する試験である(ウイルス等を除く)。組換えタンパク質医薬品に含まれる不純物は、製造工程由来不純物、目的物質由来不純物(保存中の分解物および変化物を含む)および混入汚染物質に分類される。組換えタンパク質医薬品は保存中に変化しやすいことを考慮し、

分解物や凝集体等の評価が可能な試験方法を設定する必要がある。また、組換えタンパク質医薬品においては、糖鎖付加、酸化や脱アミド化などの分子変化、あるいはそのほかに起因する不均一性が存在するため、純度を決定することは容易ではなく、得られる純度は試験方法に依存したものになるので、一般的に複数の方法により評価する。不純物に関する規格値は、不純物ごとに個別に、もしくは不純物の総量で設定される。製剤化工程において生じる不純物については、製剤において管理する。

#### (7) 定量法

定量法では、成分の含量をタンパク質含量や力価として適切な方法を用いて測定する。定量法として分解物および変化体などに対する特異性が十分でない場合は、適切な純度試験とあわせて、規格全体として有効成分含量を測定できるものとなるよう考慮する。製剤の場合には、添加物や保存中に出現する分解生成物によって妨害されることのない特異的な原薬含量の測定法を設定する必要がある。タンパク質含量は、日本薬局方第十六改正(日局)一般試験法<2.04>たん白質のアミノ酸分析法、<2.01>液体クロマトグラフィー、または参考情報 たん白質定量法、を参考に測定することができる。

#### (8) 力価

力価とは、生物学的性質に関連する特性に基づいて、適切な生物学的試験により測定され、生物活性を定量的に表す尺度のことである。組換えタンパク質医薬品の力価は、適切な標準物質/標準品を基に検定した活性の単位で表わされることが多い。力価の測定は、定量試験のほか、目的物質が意図する生物活性を有することの確認を目的として実施される。目的物質が適切な高次構造を保持していることの推定にもなる。おのおのの医薬品によりその生物活性は異なることから、それぞれの医薬品において適切な試験方法を構築する。生物活性は、その作用または作用機序に基づいて、結合性試験(リガンド 受容体結合など)、生化学的試験(酵素反応など)、細胞応答性試験(細胞レベルでの生化学的または生理学的応答)、in vivo試験(生体の生物学的応答)などにより測定される。力価と臨床効果との相関は、薬理学試験または臨床試験において確認しておく必要がある。がんワクチンの場合には臨床効果と相関のある力価試験を設定することが困難な場合があることに留意すべきである(考察の項を参照)。

#### (9) 標準物質/標準品

標準品あるいは標準物質は、定量、確認試験または純度試験において基準として用いるために調製

された物質であり、目的の用途に適した品質を有している必要がある。組換えタンパク質医薬品では、構造の複雑さおよび不均一性などにより、適切な試験の規格/判定基準を設定することが難しい。また、操作条件ならびに使用する試薬のわずかな変化が分析結果に影響を及ぼしうることから、操作が適切に行われていることの評価が必要である。そこで、定量法に加え、さまざまな試験で、標準物質を試料と同様に操作し、得られた結果を利用することにより試験結果を評価することが多い。組換えタンパク質医薬品の力価は、適切な標準物質の力価に関係づけて表すべきであり、生物学的試験において、標準物質/標準品の設定は特に重要である。「国際標準品」や「国内標準品」が入手可能であれば、それらを利用可能である。また、代表的な生産ロットから調製し、適切な特性解析を行ったものを用いて、「国際標準品」や「国内標準品」を参照として検定を行い、「自家標準物質」を確立することができる。「標準品」が存在しない場合は、適切に特性解析がなされた「自家標準物質」を確立する必要がある。標準物質/標準品の新設・更新にあたっては、十分に特性解析を行うとともに、力価の連続性の確保ならびにトレーサビリティを考慮することが重要である。

### C.7. がんワクチンに用いられるイディオタイプ抗体に関する検討

イディオタイプとは抗体改変領域の抗原決定基のことであり、抗体の抗原結合の特異性は、その抗体に特徴的な構造(=イディオタイプ)に反映されている。このような抗体の抗原結合部位(イディオタイプ)を認識する抗体が抗イディオタイプ抗体である。抗イディオタイプ抗体をワクチンとして投与することにより、抗原に対する免疫応答を誘導しようとする考え方は、1970年代に提唱されたイディオタイプネットワーク仮説に基づいている。すなわち、抗原Xに対する抗体(Ab1)は抗原Xを特異的に認識する抗原決定基(イディオタイプ)を有しており、Ab1のイディオタイプを認識する抗体(抗イディオタイプ抗体:Ab2)には抗原Xの高次構造を模倣した抗原決定基を有するものが存在するというものである。抗イディオタイプ抗体(Ab2)をヒトに投与すると、Ab2の抗原決定基(=抗原の構造を模倣している)に対する抗体(Ab3)が生産され、このAb3はAb1と同様に抗原Xを特異的に認識すると考えられる(図4)<sup>1)</sup>。このような抗イディオタイプ抗体を腫瘍関連抗原(Tumor-Associated Antigen; TAA)のサロゲートとして投与することにより、自己抗原であるTAAに対する免疫寛容の回避が期待で

きるほか、腫瘍特異的な糖鎖といった非タンパク質性の抗原に対する免疫応答の誘導が可能になる可能性がある。

これまでに臨床試験が実施された抗イディオタイプ抗体を有効成分とする癌ワクチンの例を表6に示す。腫瘍に特異的に発現するタンパク質の部分ペプチドを抗原とするがんペプチドワクチンとは異なり、癌特異的な糖鎖や糖脂質を標的とするものが多いことが特徴である。臨床試験で有効性が示されず開発中止となったものもあり、2014年時点で先進国での承認を得たものはないが、これら抗イディオタイプ抗体を有効成分とするがんワクチンのうち、最も開発の進むRacotumomabについて以下にまとめた。

RacotumomabはN-グリコシルノイラミン酸(NeuGc)の結合したGM3(NeuGcGM3)を認識するIgM抗体に対する抗イディオタイプ抗体である。NeuGcGM3は非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer; NSCLC)における癌抗原として知られており、RacotumomabはNeuGcGM3に対する免疫応答を誘導することにより、NSCLCに対する抗腫瘍活性を発揮する。既にキューバとアルゼンチンにおいて、再発性あるいは進行性のNSCLCに対する治療薬として承認されているほか、米国で進行性NSCLCに対する第三相試験が実施されている(NCT01460472)<sup>2)</sup>。

Racotumomabの開発者らは、ヒトと同様に正常組織にNeuGcが発現しないニワトリを実験動物として用いた非臨床評価系を構築し、Racotumomabの品質特性とその薬理作用(抗NeuGcGM3抗体の誘導)の関係について報告している<sup>3,4)</sup>。マウス腹水由来のRacotumomabとバイオリアクターで培養したハイブリドーマ由来のRacotumomabでは抗体に付加する糖鎖構造、電荷プロファイル(アスパラギンの脱アミド化、酸化)が大きく異なり、構造安定性に違いが見られる一方で、免疫応答には影響しないとしている<sup>3)</sup>。また、バイオリアクターの培養スケールの拡大に伴う翻訳後修飾の差異も免疫応答には影響しなかったことから、アジュバントであるアルミニウムと混合して投与されるRacotumomabでは可変領域のCDRの構造が抗原の構造を模倣しており、抗体Fc領域を介した作用は重要ではないと考察している<sup>4)</sup>。

#### 参考文献

- 1) Ladjemi MZ; Anti-idiotypic antibodies as cancer vaccines: achievements and future improvements. *Front Oncol.* 2:158 (2012)

- 2) Reichert JM ; Antibodies to watch in 2015. *MABs*. 7(1):1-8 (2015)
- 3) Machado YJ, Rabasa Y, Montesinos R, Cremata J, Besada V, Fuentes D, Castillo A, de la Luz KR, Vázquez AM, Himly M ; Physicochemical and biological characterization of 1E10 anti-idiotypic vaccine. *BMC Biotechnol*. 22;11:112 (2012)
- 4) de la Luz-Hernández K, Rabasa Y, Montesinos R, Fuentes D, Santo-Tomás JF, Morales O, Aguilar Y, Pacheco B, Castillo A ; Cancer vaccine characterization: from bench to clinic. *Vaccine*. 32(24):2851-8 (2014)

## D. 考察

### D.1. がんワクチンのガイドラインにもりこむべき要素に関する研究

本年度は、NIH Clinical Trial プロトコールや公表文献、MIATA プロジェクトガイドライン等に中心に調査を行った。これらの成果に基づいて、昨年作成したがんワクチンガイドライン素案に追記すべき内容として次のような要素が考えられた。

#### 1. ガイドライン作成に当たっての方向性

がんワクチンの対象として、ペプチドを長鎖ペプチドと単鎖ペプチドに分類して書き分けること。また単鎖ペプチドの役割は内在性のメモリーT細胞の増幅能を期待している点、長鎖ペプチドやがん抗原免疫タンパク質を投与する場合には抗原提示細胞でのプロセッシングが期待されること。

#### 2. ガイダンス案作成のポイント

##### (非臨床)

- ・有効性を示唆するデータをモデル動物で実施することの困難さと局所認容性などの点。その中で、薬理試験については、HLA の構造は動物種差が大きく、薬理的活性発現メカニズムの観点から、適切な実験動物種は存在しないこと等に留意が必要。

- ・毒性試験については、合成ペプチドの場合には化学合成由来の不純物や意図しない化合物の混在による安全性リスクが懸念されることから、これを確認する上で動物試験も有用性への言及。

##### (臨床)

##### ・投与方法

皮下、皮内、腫瘍内、リンパ節内など様々な投与方法が試みられている 投与部位 / 投与方法の説明 (非臨床試験から) とその妥当性

##### ・至適用量等

MTD や DLT についてはがんワクチンではこれまで殆ど報告されてこなかったことから、必ずしも MTD や DLT を明らかにすることは求めないこと。また、用量増加方法について従来の 3 + 3 用量を踏襲する必要がない点。

##### ・投与スケジュール

長期にわたるワクチン投与 (追加免疫の実施) も想定される。投与スケジュールの妥当性の説明。追加免疫では、異なるがんワクチンが投与されることもありうる。

##### ・併用薬の記載

後述する免疫活性化薬、免疫抑制解除のための抗体 / 低分子薬 ; GM-CSF やインターロイキン 2 などの免疫活性化剤。抗 CTLA4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗腫瘍抗原抗体などの抗体医薬品の併用。シクロホスファミドや他の Treg 抑制抗がん剤。TGF-β 等に対するアンチセンスや siRNA などの核酸医薬。

##### ・免疫応答性の評価

抗原特異的免疫応答性 (MIATA-P ; テトラマーアッセイ、エリスポットアッセイ、フローサイトメトリ) の評価のポイントと抗原ペプチドが特製されない場合の対応について。

##### ・免疫抑制状態の評価

評価方法: 標準抗原を用いた遅延型アナフィラキシー応答性、末梢血 Treg 細胞数、腫瘍内 Treg 細胞数、Treg 細胞のサブタイプの評価。

##### ・HLA

適合する HLA 型を有する被験者を対象とするのが一般的であるが、がん抗原タンパク質では HLA 型の特定が出来ないことが想定される。

同じ標的抗原であっても、被験者の HLA 型により選択すべきペプチドが異なる。治験を実施する際は、ペプチド 1 つ 1 つではなく血清 HLA グループ型毎 (例 A19 (A29、A30、A31、A32、A33、A74)) で計画するなど工夫が必要。

### D.2. がんワクチンの品質管理

有効成分として不均一性が高く比較的精製度の低い抗原 (不活化病原体等) が用いられる非組換えの感染症ワクチンとは異なり、がんワクチンでは有効成分として高度に精製された組み換えタン



パク質やペプチドが用いられる。これらの品質管理の上で重要となる規格及び試験方法の設定にあたっては、化学合成されたペプチドを有効成分とする場合には、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドライン Q6A<sup>2)</sup> が参考になる。また、組換えタンパク質やペプチドが有効成分であるがんワクチンの品質管理においては、ICH ガイドライン Q6B<sup>3)</sup> 及び、既存のバイオ医薬品の規格及び試験方法を参考にすることができる。原薬の規格として設定すべき項目は概ねバイオ医薬品と同様であると考えられるが、バイオ医薬品とがんワクチンとは、有効成分に求められる生物活性が大きく異なることに注意が必要である。品質管理戦略の構築においては、十分な特性解析により当該医薬品の有効性・安全性を確保するために必要な特性 (重要品質特性) を明らかにし、それに基づいた規格及び試験方法を設定することが重要である。バイオ医薬品では有効成分とする組換えタンパク質あるいはペプチドそのものが生理活性物質として薬理作用を発揮することが期待される。このため、薬理作用メカニズムに基づいた適切な生物活性試験 (ホルモン類の場合には受容体結合試験、細胞応答性試験など) を構築することにより、有効性に関わる品質特性とその範囲の特定に活用できる。一方、がんワクチンの有効成分である組換えタンパク質やペプチドは、それ自体は薬理作用を発揮せず、抗原提示細胞に提示されることにより、それらのタンパク質を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導あるいは亢進することを目的とする。がんワクチンの場合、*in vivo* においてはがん抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte ; CTL) の誘導が良い薬力学的マーカーとなると考えられている一方で、CTL の誘導を評価できる頑健な *in vitro* 試験系の構築は困難である。がんワクチンの有効成分となる組換えタンパク質の重要品質特性の特定にあたっては、樹状細胞等の抗原提示細胞への取り込みや抗原提示能、ペプチドの場合には MHC との結合能などを指標とした特性解析が有用であると考えられる。また、がんワクチンの薬理作用は種特異性が高いため、*in vivo* の薬理作用との相関を明らかにすることは困難であると思われるが、組換えタンパク質のように複雑な高次構造を有する有効成分の品質管理の上では、これらの *in vitro* の評価系を生物活性試験 (示性値) として適用することも有用であると考えられる。

不純物管理の考え方は、化学合成されたペプチドを有効成分とする場合には、ICH ガイドライン Q3A<sup>4)</sup> (原薬) Q3B<sup>5)</sup> (製剤) 及び Q6A<sup>2)</sup> が参考になる。1 日最大投与量が 2 g 以下の場合には、

構造決定の必要な不純物の閾値は 0.10% 又は 1 日摂取量 1.0 mg のどちらか低い方、安全性確認の必要な閾値は 0.15% 又は 1 日摂取量 1.0 mg のどちらか低い方とされている。一方、組換えタンパク質あるいはペプチドを有効成分とする場合には、不純物管理の考え方はケースバイケースである。組換えタンパク質医薬品の不純物としては、宿主細胞由来タンパク質 (HCP) 等の「製造工程由来不純物」、凝集体や切断体等の「目的物質由来不純物」が挙げられる。特に分子量の大きい組換えタンパク質を有効成分とする場合には、酸化体や脱アミド体、糖鎖バリエーションなど様々な分子種が混在し、不均一性を有することに留意が必要である。これらの分子変化体の管理の考え方については、ICH ガイドライン Q6B<sup>3)</sup> が参考になる。目的物質に由来する分子変化体のうち、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持つものは、「目的物質関連物質」として考える。適切な生物活性試験等に基づく特性解析は、それらが「目的物質関連物質」に該当するか、あるいは「目的物質由来不純物」に該当するかを判断する上で有用である。上に述べたように、がんワクチンの有効成分である組換えタンパク質やペプチドの薬理作用を直接的に評価する生物活性試験系の構築は困難であると思われるが、それらの作用機序に基づいた試験 (抗原提示細胞への取り込み、MHC との結合能等) の実施は、管理すべき不純物の特定においても有用であると考えられる。

### D.3 がんワクチンに関する最新の臨床開発動向

がんワクチンの最新の臨床試験結果やそれらをまとめたレビューについて評価を行った。がんワクチンの免疫応答としては、液性免疫を誘導することよりも主として細胞性免疫を誘導することを目指した検討が行われてきている。特にマウス等を用いた非臨床試験結果から、アジュバントの選択や投与方法などの制御により細胞性免疫を最も効果的に誘導する手法がとられてきている。

一方でがんワクチンについてこれまで、非常に多様な抗原を対象として臨床試験が実施されており、また投与したがん抗原に対する免疫応答をどのように評価するかが重要なポイントとなってきた。しかし、目的とするがん抗原のみならず場合によってはがんワクチンを発現しているがん細胞が溶解することなどを通じてがん細胞が発現している他の抗原に対する免疫応答も起こりうる事が示される場合がある。

さらに抗原提示に関しては樹状細胞が重要な役割を果たしており、抗原特異的な樹状細胞の分化誘導や活性化ががん免疫において重要とされてき

ており、特にクロスプレゼンテーションが起こることにより高い免疫誘導が期待されるとしている。

がん細胞が発現する様々な免疫抑制因子ががんワクチンの効果を阻害している可能性が指摘されており、がんによる免疫抑制からの解除が重要とされている。特に抗免疫チェックポイント抗体による顕著な臨床効果が確認されたことからがんによる免疫抑制からの解除が非常に重要と考えられる。

抗免疫チェックポイント抗体での臨床試験で gp100 の臨床効果が十分でない点に関する可能性として免疫誘導を惹起するための投与方法をさらに改良する必要性を指摘する意見もある。がんワクチンの被験者の絞り込みをするための免疫応答性に基づいた患者分類の重要性が指摘されている。より応答性の高い患者を絞り込むための免疫応答の評価法も重要であり、遅延型アレルギー反応の評価もその一つとされている。

#### D.4. がんワクチンに用いられるイディオタイプ抗体に関する検討

投与された抗体そのものが生体活性物質として薬理作用を発揮することが期待される抗体医薬品では、薬理作用メカニズムに基づいた生物活性試験により、有効性に関わる品質特性とその範囲の特定が行われる。抗体医薬品の有効性に関わる品質特性としては、抗原結合に影響を及ぼす可能性がある CDR 領域の翻訳後修飾のほか、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を薬理メカニズムとする抗体医薬品では、抗体 Fc 領域に結合する N-結合型糖鎖の構造等があげられる。一方、がんワクチンの有効成分として用いられる抗イディオタイプ抗体の場合、抗体自身による薬理作用 (抗原結合、エフェクター活性) は求められず、抗原提示細胞へ取り込まれ、標的抗原を模倣した可変領域部位のペプチドが提示されることで、標的抗原に対する免疫応答を誘導する。このため、がんワクチンの有効成分として用いられる抗イディオタイプ抗体の品質評価・品質管理の上では、ヒトでの免疫応答を予測・評価可能な試験系の構築が重要であると考えられる。結果の項で述べた Racotumomab の品質特性と有効性 (免疫応答) の関連に関する報告は、免疫応答性を評価可能な実験動物を用いた解析の良い例であるといえる。興味深いことに、マウス腹水由来とハイブリドーマ培養上清由来の Racotumomab では、翻訳後修飾の違いにより電荷プロファイルに顕著な違いが検出され、高次構造及び熱安定性が異なる一方で、実験動物における免疫応答性には有意な差は認められていない<sup>3)</sup>。実験動物とヒトにおける免疫系

の種差を考慮する必要はあるものの、これらの結果は、アジュバントであるアルミニウムと混合して投与される抗イディオタイプ抗体のがんワクチンとしての作用の発揮には、これらの構造特性の違いは影響しないことを示唆している。一方で、抗イディオタイプ抗体の Fc 領域を介した作用の必要性については、さらなる検討が必要であると考えられる。抗体 Fc 領域を介したマクロファージや樹状細胞等の抗原提示細胞上の Fc 受容体との相互作用は、抗原-抗体複合体の取り込みに関与している。従来の抗体医薬品においては凝集体が免疫原性 (抗薬物抗体の産生) の要因の一つであると考えられており、そのメカニズムとして Fc 受容体を介した抗原提示細胞への取り込みが想定される。がんワクチンとして用いられる抗イディオタイプ抗体では、免疫原性そのものが目的とする薬理作用であり、Fc 領域を有する抗体がワクチンとして投与される際には、Fc 領域を介した抗原提示細胞への取り込みが薬理作用の発揮に寄与する可能性が考えられる。上記の Racotumomab に関する論文では、アフコシル化糖鎖含量など、従来の抗体医薬品において Fc 受容体との相互作用に関与することが明らかな品質特性には製造方法の違いによる顕著な差が認められていないが、アルミニウムとの混合状態での Fc 領域の構造および Fc 受容体との相互作用と薬理作用との関連については、検討の余地があると考えられる。また、Racotumomab の生産培養スケールの拡大に伴う品質特性の違いを報告した論文<sup>4)</sup>では、有意差はないとされているものの、ロット間で平均粒子径に差が認められており、平均粒子径の大きなロットほど高い薬理作用 (免疫応答) を示す傾向が観察されている。一般的に凝集体の含有量が多いほど平均粒子径は増大することを考えると、凝集体含量が Racotumomab の有効性に関連している可能性も考えられる。

がんワクチンの有効成分として用いられる抗イディオタイプ抗体の品質管理の上では、ヒトでの免疫応答性を予測・評価可能な実験動物モデルを用いた評価系を活用し、Fc 領域を介した作用や凝集体の影響等を含めた、品質特性と有効性の関連について十分な検討が必要であると考えられた。

#### D.5. がんワクチンのガイドライン案

これまでのがんワクチンに関する検討から、

#### E. 結論

1) NIH Clinical Trial に収載されているがんワクチンプロトコルやがんワクチンの臨床試験報告から、がんワクチンによって惹起される抗腫瘍

免疫反応を評価するために複数の免疫評価指標が用いることが必要と考えられる。免疫応答性の評価では、がん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞やがん抗原特異的なヘルパー T 細胞数の解析、機能解析に加えて液性免疫応答性も評価されることが多い、また、がんによる免疫抑制反応からの解除を目指して抗体医薬や特定の抗がん剤が用いられており、患者の免疫抑制に関わる Treg 細胞数や免疫応答性の強さを評価する目的として遅延型アナフィラキシー応答性などが評価されている。またがワクチンの投与方法や投与スケジュール、投与量の設定がこれまでの抗がん剤の臨床試験とは異なっていることが明らかになった。2) がんワクチンでは従来の最大耐性投与量や毒性制限投与量の設定は不要な場合が多いと想定されるが、いくつかの臨床試験では MTD や DLT を主用評価項目や副次評価項目としているプロトコルもある。3) これらの成果に基づいて昨年作成したがんワクチンの評価ガイダンスの素案の再検討を行った。ガイダンスでは臨床初期に絞った記載とし、特に免疫応答に対する評価や投与量の設定などを中心に書き、臨床後期での有効性の評価については、他のがん治療と大きな差異はないと考えられるために簡略な記載とし、がんワクチン特有の留意点のみを記載することとした。

組換えタンパク質・ペプチドを有効成分とするがんワクチンの品質管理においては、規格及び試験方法について概ね既存のバイオ医薬品と同様の考え方が適用できる一方で、生物活性に関する考え方が異なること、それに基づいた重要品質特性の特定と、規格及び試験方法の設定が重要であることを明らかにした。

がんワクチンの臨床試験や免疫応答性についての最新の論文や総説からいくつかの課題が浮かび上がってきている。免疫応答性をより最適化するための方法の重要性やがんによる免疫抑制からの解除の重要性が明らかになりつつある。

また抗免疫チェックポイント抗体を用いた臨床試験成績から免疫抑制の解除の重要性のみならずがんワクチンの投与方法や製剤化の重要性が指摘されつつある。がんワクチンによる細胞性免疫の誘導の重要性に加えてむしろ従来アジュバント療法と異なる考え方が必要とされるかもしれない。さらに、がんワクチンに免疫応答性ある患者と相違のない患者の絞り込みが今度重要となってくる可能性が指摘された。

抗イディオタイプ抗体を有効成分とするがんワクチンの現状について調査するとともに、従来の抗体医薬品との比較を踏まえて、抗イディオタイ

プ抗体の品質管理を考える上で重要となる事項について考察した。

これらの要素を追記してがんワクチンガイドラインの最終案を提示した(資料2;意見対応案、資料3;最終案)。

## 参考文献

- 1) 原園 景, 橋井則貴, 多田 稔: バイオ医薬品の規格及び試験方法.  
*Pharm Tech Japan* 2012;28:1835-44.
- 2) ICH ガイドライン Q6A  
新医薬品の規格及び試験方法の設定  
[http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6a\\_01\\_5\\_1.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6a_01_5_1.pdf)
- 3) ICH ガイドライン Q6B  
生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定  
[http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b\\_01\\_5\\_1.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b_01_5_1.pdf)
- 4) ICH ガイドライン Q3A  
新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン  
[http://www.pmda.go.jp/ich/q/q3ar\\_02\\_12\\_16.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q3ar_02_12_16.pdf)
- 5) ICH ガイドライン Q3B  
新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン  
[http://www.pmda.go.jp/ich/q/q3br\\_03\\_6\\_24.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q3br_03_6_24.pdf)

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Yamaguchi, H. Okuda, and T. Kawanishi, High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* 5, 5899-5902 (2013)
- 2) Itoh, S., Hiruta, Y., Ashii, N., Fujita, N., Natsuga, T., Hattori, T., Bandoc, A., Sekimoto, Y., Miyata, K., Namekawa, H., Mabuchi, K., Sakai, T., Shimahashi, H., Kawai, K., Yoden, H., Koyama, S., Odgaard Herr, S., Natsuka, S., Yamaguchi, T., Kawasaki, N.: Determination of Galactosamine Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *Biologicals*, in press
- 3) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)

- 4) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 印刷中
- 5) 山口照英: バイオ医薬品の効率的製造に向けた世界動向と規制状況. BioIndustry, 30, 47-54 (2013)
- 6) 山口照英: 再生医療の安全性確保法と薬事法改正. レギュラトリーサイエンス学会誌 (RSMP), vol.4, No.3, 237 - 247(2014)
- 7) Maeda,D., Yamaguchi,T., Ishiduka,K., Takekita,T., Sato,D.: Regulatory Frameworks for Gene and Cell Therapies in Japan. in "Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products in Japan." Springer, Serbian,M. & Galli,M.C. eds., in press
- 8) Hashii,N., Nakazawa,S., Tada,M., Yamaguchi,T.: Analysis of aggregation-prone regions in monoclonal antibody by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. J. Pharma. Sci. in press
- 9) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験のPCR法改正のための共同研究. マイコプラズマ学会雑誌 (印刷中)
- 10) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45 (5), 442-451 (2014)

## G-2 学会発表

- 1) Kishioka,Y, Sakurai,K, Yamaguchi,T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. APEC International Symposium **Soul Korea**, (2013)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- H-1 **特許取得** なし  
H-2 **実用新案登録** なし  
H-3 **その他** なし

図 . 1 製品群別のがんワクチンプロトコール数

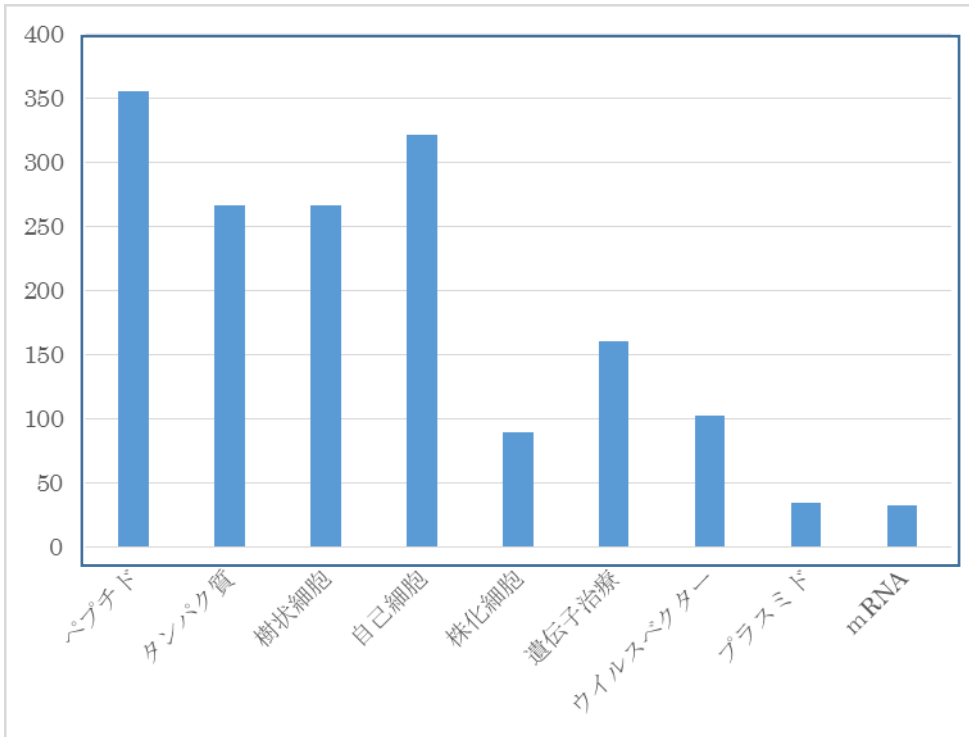
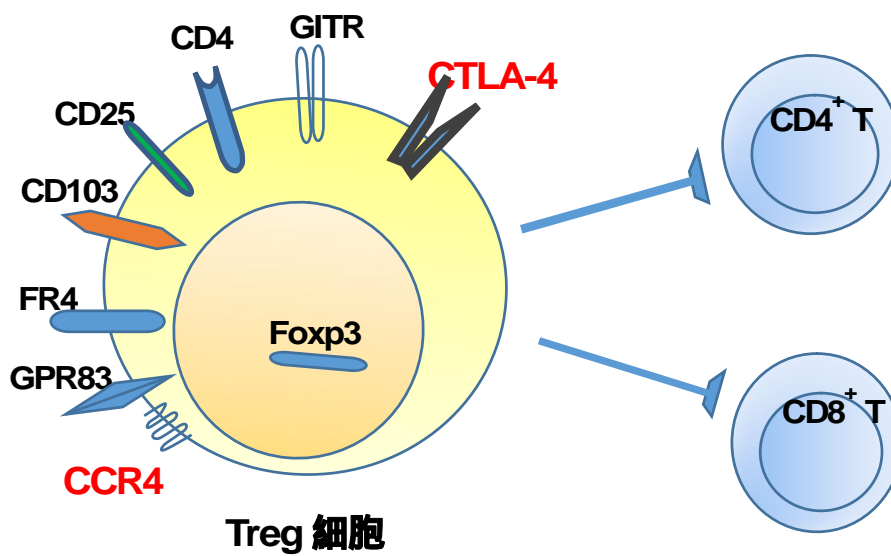


図 2 . Treg 細胞とその機能分子





**表1 . がんワクチンキーポイント**

- 
- がんをワクチンで治療するという戦略が多く、最近の成果から臨床的な有効性を示せる結果が出つつある
  - がん免疫に関する理解、特に腫瘍微小環境の性質やダイナミズムの理解が進んだ
  - 多くの臨床研究からは従来のがん治療とワクチンの作用がどのように異なるのか十分な情報が得られていないが、腫瘍微小環境において働くがんによる免疫抑制機構が重要な作用をしていることが明らかにされつつある
  - 活性化免疫療法に対してベネフィットのある患者を選択するためのがんワクチンバイオマーカー開発が望まれている
  - 臨床試験の結果から有効性が期待されるのはがんが進行していない患者集団である可能性が示唆されている
  - 将来の戦略として腫瘍特異的な免疫応答を最適化するために腫瘍微小環境を制御する方法を開発すべきである
- 

**表2 . がんワクチンに用いられる抗原**

共通抗原

- がん精巢抗原 ; BAGE、GAGE、MAGE、NY-ESO-1
- 分化抗原 : CEA、gp100、Melan-A、PSA、Tyrosinase
- Overexpressed antigen : HER2、hTERT、p53、survivin

特殊抗原

- Oncogene-associated antigens:  $\beta$ -catenin-m、HSP70-2/m、KRAS Shared antigens with unique mutations
- Glycans: GM2、MUC1

アジュバント

- Cytokine/endogenous immunomodulators: GM-CSF、IL12
  - Microbes and microbial derivatives : BCG、CpG、Detox、MPL、polyI:C
  - Mineral salts : Alum
  - Oil emulsions or surfactants : ASO2、MF59、Montanide™ ISA-51、QS21
  - Particulates : ASO4、polyactide co-glycolide、viroosomes
  - Viral vector : Adenovirus、vaccinia、fowlpox
-

**表3 . がん細胞が作り出す宿主免疫を抑制する物質とその作用機作**

- 
- キヌレニン：トリプトファンの代謝酵素であるインドールアミン 2, 3-ジオキシゲナーゼ(IDO)が T 細胞および NK 細胞の増殖を抑制するがその作用を介在しているのがキヌレニンとされる。
  - アデノシン：抗炎症性 T 細胞反応を媒介し、Treg 細胞による免疫抑制の主要メカニズムの一つと考えられている
  - PGE2：肺癌などの悪性腫瘍で非常に高レベルに産生され、免疫機能をもつ Treg 細胞を活性化し、癌に対する患者の免疫力を弱めると考えられている
  - TGF $\beta$ ：T 細胞の活性化、増幅、分化を阻害し、CTL や樹状細胞の活性を阻害、さらにレギュラトリー T 細胞の分化を誘導する。
  - VEGFA：腫瘍由来の血管新生因子である VEGF-A と VEGF 受容体の相互作用により、免疫チェック分子を誘導する重要な要素と想定されている。抗 VEGF-A 阻害と抗 PD-1 阻害抗体による併用療法によりがんの免疫抑制解除と抗腫瘍効果が発揮される報告がある。
- 

- 1) Opitz CA, et al.: An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203. (2011)
- 2) KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 204, 1257-1265. (2007)
- 3) Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, et al. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med.*;8:358-365. (2002)
- 4) Baratelli F et al.; Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1483-90.
- 5) Sharma S et al.: Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.* 2005 Jun 15;65(12):5211-20
- 6) Walker, M.R. et al.: Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J Clin. Invest.* 112, 1437-1443 (2003)
- 7) Voron T et al.: VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med.* Feb 9;212(2):139-48. (2015)



表4 . 臨床試験成績

免疫治療	抗原	アジュバント 免疫制御因子	対象患者	被験者数	臨床データ	論文
<b>前立腺がん</b>						
ワクシニアウイルスベクター と fowlpox ベクター	PSA	GM-CSF + co-stimulators	Metastatic, castration-resistant prostate cancer	125	<b>臨床効果</b> OS: 25.1 mo vs. 16.6 mo (HR 0.56; P=0.0061) PFS: 3.8 mo vs. 3.7 mo (HR 0.88; P=0.60) <b>免疫応答</b> No detectable antibody responses to PSA	Kantoff, P. W. et al. <i>J. Clin. Oncol.</i> <b>28</b> , 1099-1105 (2010). NCT01322490
アデノウイルスベクター	PSA	Vector	Recurrent/hormone-refractory prostate cancer	44	<b>臨床効果</b> Increase in PSA doubling time in 64% of patients <b>免疫応答</b> T cell response: 100% (recurrent disease) and 67% (hormone-refractory disease) of patients	Lubaroff, D. M. et al. <i>Cancer Res.</i> <b>72</b> , Abstr 2692 (2012).
mRNA: CV9103/9104, CureVac®	PSA + PSCA + PSMA + STEAP1	mRNA	Metastatic, castration-resistant prostate cancer	38	<b>臨床効果</b> Prolonged stabilization of PSA levels for individual patients <b>免疫応答</b> T cell response: 79% of patients, 58% with multiepitope responses	Kübler, H. et al. <i>J. Clin. Oncol.</i> <b>29</b> suppl., Abstr 4535 (2011).
<b>乳がん</b>						
Peptide: nelipepimut-S (E75), NeuVax™	HER2	GM-CSF	High-risk breast cancer, in remission after standard treatment	182	<b>臨床効果</b> 2-yr DFS:	Mittendorf, E. A. et al. <i>Cancer.</i> <b>118</b> , 2594-2602 (2012).

Overall: 94.3% vs. 86.8% (P=0.08)

NCT01479244

Low HER2-expressing tumours: 94.0% vs. 79.4% (P=0.04)

High HER2-expressing tumours: 90.3% vs. 83.3% (P=0.44)

Peptide:

**臨床効果**

GP2

HER2

GM-CSF

High-risk breast cancer, in remission after standard treatment

172

Recurrence rate: 4.3% vs. 11.6% (P=0.41)

Trappey, F. et al. *J.*

**免疫応答**

*Clin. Oncol.* **31**, Abstr 3005 (2013).

DTH: 21.5 vs. 6.0 mm (P<0.01)

**肺がん**

Peptide:

**臨床効果**

CIMAvax EGF

OS:

EGFR

Montanide  
ISA51 + CYC

Stage IIIB/IV NSCLC, after chemotherapy

80

Overall (vaccine vs. control): 6.5 mo vs. 5.3 mo (P=0.098)

Neninger Vinageras E.

Good vs. poor immune responders: 11.7 mo vs. 3.6 mo (P=0.002)

et al. *J Clin Oncol.* **26**, 1452-1458 (2008).

Good immune responders vs. control: 11.7 mo vs. 5.3 mo

NCT01444118

(P=0.0024)

**免疫応答**

Good antibody response in 51% of patients

Peptide:

**臨床効果**

GV1001

OS: 28.8 mo

Telomerase

GM-CSF

Unresectable stage III NSCLC; after chemoradiotherapy

23

PFS:

Brunsvig, P. F. et al.

Overall: 11.7 mo;

*Clin. Cancer Res.* **17**,

Immune responders vs. non-responders: 12.2 mo vs. 6.0 mo

6847-6857 (2011).

(P=0.20)

NCT01579188

**免疫応答**

				T cell response: 16/23 patients (69.6%)		
<hr/>						
Viral vector (vaccinia): TG4010	MUC1	Vector + IL-2	Stage IV NSCLC, with chemotherapy	148	<p><b>臨床効果</b></p> <p>6-mo PFS: 43.2% vs. 35.1% (P=0.307)</p> <p>OS: 10.7 mo vs. 10.3 mo (P=0.59)</p> <p>TTP: 5.9 mo vs. 5.2 mo (P=0.070)</p> <p>ORR: 41.9% vs. 28.4% (P=0.082)</p> <p>Outcomes worse than control in subset of patients with high levels of activated natural killer cells.</p> <p><b>免疫応答</b></p> <p>No significant differences between study arms in cellular responses to MUC1</p>	<p>Quoix, E. et al. <i>Lancet Oncol.</i> <b>12</b>, 1125-1133 (2011). NCT01383148</p>
<hr/>						
Allogeneic tumour cell: belagenpumatuCEL-L, Lucanix™	Tumour cell	Anti-TGF-β	Stage II-IV NSCLC; after front-line chemotherapy	75	<p><b>臨床効果</b></p> <p>OS: 14.4 mo; longer survival with higher (19.1 mo) vs. low (8.3 mo; P=0.0186) dose immunization</p> <p><b>臨床効果</b></p> <p>OS:</p>	<p>Nemunaitis, J. et al. <i>J. Clin. Oncol.</i> <b>24</b>, 4721-4730 (2006). NCT00676507</p>
Allogeneic tumour cell: tergenpumatuCEL-L, HyperAcute® Lung	Tumour cell	αGT	Stage IIIB/IV NSCLC; progressive or relapsed after chemotherapy	28	<p>Overall: 11.3 mo</p> <p>IFN<sub>γ</sub> responders vs. non-responders: 21.9 mo vs. 5.5 mo (P&lt;0.001)</p> <p><b>免疫応答</b></p> <p>Increased IFN<sub>γ</sub> responses in 61% of patients</p>	<p>Morris, J. C. et al. <i>J. Clin. Oncol.</i> <b>30</b> suppl, Abstr 2571 (2012). NCT01774578</p>
<hr/>						
Anti-idiotype: racotumomab	Idiotype	Alum	Stage IIIB/IV NSCLC; after primary treatment	176	<p><b>臨床効果</b></p> <p>OS: 8.3 mo vs. 6.3 mo (P=0.02)</p>	<p>Macías, A. et al. <i>Ann. Oncol.</i> <b>23</b> suppl 9, Abstr 1238PD (2012).</p>
<hr/>						

## メラノーマ

					<b>臨床効果</b>	
					OS:	
					Overall: 9.1 mo	
Peptide	survivin	Montanide ISA51 + CYC	Metastatic, treatment-refractory stage IV melanoma	61	Immune responders vs. non-responders: 19.6 mo vs. 8.6 mo; P=0.0077)	Becker, J. C. et al. <i>Cancer Immunol. Immunother.</i> <b>61</b> , 2091-2103 (2012).
					PFS:	
					Overall: 2.8 mo	
					<b>免疫応答</b>	
					T cell responses in 13/41 (32%) patients	
Peptide	gp100 + MART-1 + tyrosinase	GM-CSF + Montanide ISA51	Metastatic melanoma	22	<b>臨床効果</b>	
					OS: 13.4 mo	Tarhini, A. A. et al. <i>J.</i>
					PFS: 1.9 mo	<i>Immunother.</i> <b>35</b> , 359-366 (2012).
					<b>Immunologic</b>	
					T cell responses in 9/20 (45%) patients	
Dendritic cell	gp100 + MAGE-A1, A2, A3 + MART-1 + tyrosinase	KLH	Metastatic melanoma	24	<b>臨床効果</b>	
					OS:	
					Overall: 13.6 mo (vs. 7.3 mo matched controls)	Oshita, C. et al. <i>Oncol.</i>
					Immune responders vs. non-responders: 21.9 mo vs. 8.1 mo	<i>Rep.</i> <b>28</b> , 1131-1138 (2012).
					<b>免疫応答</b>	
					T cell responses in 18/24 (75%) patients; multiepitope responses in 13/24 (54%) patients	
Dendritic cell	gp100 + tyrosinase	KLH	Stage III/IV melanoma	33	<b>臨床効果</b>	Aarntzen, E. H. et al. <i>Cancer Res.</i> <b>73</b> , 19-29

表5 バイオ医薬品の原薬において設定される規格及び試験方法の項目の例

項目	内容
名称	一般的名称(JAN)、国際一般的名称(INN)及び販売名。
構造式	アミノ酸配列並びにジスルフィド結合や糖鎖修飾などの翻訳後修飾の情報を記載する。
分子式及び分子量	その分子式及び分子量を記載する。糖鎖など不均一な修飾を含む場合には、タンパク質部分の分子式及び分子量を記載する。
基原	本質(由来、分類、構造、物性、活性など)を記載する。
含量規格	含量、濃度又は比活性を記載する。
性状	物理的状态(例えば、固体、液体)及び色を定性的に規定する。
確認試験	有効成分などをその特性に基づいて確認するための試験。分子構造上の特徴、特異的な性質に基づき設定する。 例) 理化学試験: ペプチドマッピング、質量分析; 生物学的試験: 生物活性; 免疫学的試験: ウエスタンブロット法、ELISA
示性値	安定性、有効性及び安全性に関与する物理的・化学的性質等を設定する。
不均一性	翻訳後修飾や構造の不均一性の恒常性を評価する。 例) 糖鎖不均一性: 糖鎖分析、グリコフォーム分析、単糖分析
純度と不純物の試験	純度を規定するための試験。混在物の種類及びその存在量を測定する。 純度は一般に複数の方法にて評価される。 不純物の規格値は、それぞれ個別に及び/または総量で適切に設定する。 例) サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、SDS-PAGE
定量法	成分の含量、力価などを物理的・化学的または生物学的方法によって測定する。 力価: 生物学的性質に基づく生物活性(バイオアッセイ、結合性、細胞応答性) 物質含量: タンパク質含量
標準物質	試験において標準として用いる物質であり、適切な品質であることが必要である。バイオ医薬品では、定量法での使用以外に、確認試験や糖鎖試験で用いられる場合がある。

## 6 臨床試験が実施された抗イディオタイプ抗体を有効成分とするがんワクチン

抗イディオタイプ抗体ワクチン	模倣する抗原	適応	臨床試験
Racotumomab(1E10)	NeuGcGM3	Breast Cancer NSCLC	Phase I Phase III (NCT01460472)
TriGem (4B5)	GD2	Melanoma	Phase I/II (NCT00004184)
MK2-23	HMW-MAA	Melanoma	Phase I/II
BR3E4	EpCam	Colorectal Cancer	Phase I
3H1 (CeaVac)	CEA	Colorectal Cancer	Phase III
105AD7	CD55	Colorectal Cancer	Phase I/II (NCT00007826)
11D10 (TriAb)	HMGF	Colorectal Cancer	Phase II (NCT00033748) *3H1 との併用
Abagovomab	CA-125	Ovarian Cancer	Phase II/III (NCT00418574)

Ladjemi MZ. *Front Oncol.* 2:158 (2012). <https://clinicaltrials.gov> を参考に作成



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	頁
	なし						

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
山口照英	再生医療の安全性確保法と薬事法改正	レギュラトリーサイエンス学会誌( RSMP )	4(3)	237-247	2014
Maeda,D., Yamaguchi,T., Ishiduka,K., Takekita,T., Sato,D.	Regulatory Frameworks for Gene and Cell Therapies in Japan. in “Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products in Japan.	Springer, Serbian,M. & Galli,M.C. eds.			in press
Hashii,N., Nakazawa,S., Tada,M., Yamaguchi,T.	Analysis of aggregation-prone regions in monoclonal antibody by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry.	J. Pharma. Sci			in press
内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英	日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究	マイコプラズマ学会雑誌			印刷中
内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英	細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験の PCR 法の見直しに関する研究	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	45(5)	442-451	2014