

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年05月15日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2011
課題番号：22790651
研究課題名（和文） RNF43 パルス樹状細胞と特異的活性化リンパ球を用いた免疫細胞療法の開発
研究課題名（英文） Development of adoptive immunotherapy using autologous dendritic cell pulsed with a RNF43 peptide in patients with advanced solid tumors
研究代表者
土方 康基 (HIJIKATA YASUKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80460856

研究成果の概要（和文）：本研究は標準治療不応の進行固形腫瘍患者で、HLA-A*2402 または HLA-A*0201 を有し、かつ腫瘍に Ring finger protein 43 (RNF43) が高発現している患者を対象とした RNF43 を用いた免疫細胞療法第 I 相臨床試験である。これまでに 7 例の患者が登録され、5 例において試験が完遂した。主要評価項目である安全性評価では本療法に起因すると考えられる重篤な有害事象を認めず、本療法の忍容性は高いと考えられる。副次評価項目である抗腫瘍効果評価では 5 例中 4 例が SD (stable disease) であり、そのうち 2 例が腫瘍マーカーの低下を認めた。現在投与症例における免疫学的解析を実施中である。

研究成果の概要（英文）：This is an open-label, Phase I study of adoptive immunotherapy using a RNF43 peptide in patients with advanced solid tumors which are confirmed that RNF43 are highly expressed. 7 patients with HLA-A*2402 or HLA-A*0201 were enrolled in this study. Of these, 5 patients completed all schedule. The primary end point was to assess safety of the treatment. No serious adverse event occurred in any patients and the treatment was considered to be tolerable. The secondary end point includes clinical response and it showed that 4 of 5 patients had stable disease (SD) and the level of tumor marker decreased in 2 of 4 SD patients. Immunological studies in these patients have been underway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：下部消化管学(小腸、大腸)

1. 研究開始当初の背景

近年の集学的治療法の進歩により、悪性腫瘍に対する治療成績は年々向上してきている。しかし、手術療法、化学療法、放射線療法等の標準的治療法に対する治療抵抗例や再発例などに対しては有効な治療法は無く、症状緩和療法主体の対症療法に留まっているのが現状である。そのような患者に対して、新しい治療法を開発することが社会的にも強く要請されている。悪性腫瘍に対する免疫療法は第4の治療法として注目されており、現在までに様々な抗腫瘍免疫療法が開発され、癌ペプチドワクチン療法、抗原提示能が優れた樹状細胞療法や抗腫瘍特異性を高めた腫瘍浸潤リンパ球療法 (tumor-infiltrating lymphocyte 療法: TIL 療法)、腫瘍特異的細胞傷害性 T リンパ球療法 (cytotoxic T-lymphocyte 療法: CTL 療法) などが実際に臨床研究としてヒトに対して実施されてきた。これ迄の報告では悪性黒色腫や腎癌などの一部の症例では有効性が示されている。

共同研究者の東京大学医科学研究所中村祐輔教授らは高腫瘍選択性腫瘍特異的免疫反応誘導の重要性に着目し、cDNA マイクロアレイ法による包括的ゲノム情報から理想的腫瘍抗原 Ring finger protein(RNF)43 を同定し、その腫瘍抗原因由来で HLA 拘束性のエピートープペプチドを決定した。いずれもヒト遺伝子 23040 個のマイクロアレイスクリーニング法により同定されたものであり、正常臓器に発現しておらず、大腸癌を筆頭に肺癌、胃癌、肝癌に発現している。この腫瘍抗原因由来ペプチド RNF43 を用い、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローンの樹立が可能でありこの CTL クローンは RNF43 発現大腸癌細胞株に対して HLA 拘束性に特異的細胞傷害活性を示した。このことから RNF43 は免疫原性を有し、RNF43 を認識・傷害する CTL を誘導するがんワクチン療法に応用できる可能性が示唆された。しかし体外で CTL が誘導されても体内に投与された後、短い寿命で死滅していくことが報告されており、生体内で CTL を長期的に維持できる方法の開発が極めて重要であると考えられる。

一方、近年の研究から普遍的に腫瘍免疫による抗腫瘍効果を阻害する因子として制御性 T 細胞の関与が明らかにされてきた。またシクロフォスファミドの投与により制御性 T 細胞が特異的に排除できる可能性も報告され、それにより免疫細胞療法の効果が増強さ

れることが示唆されているが、国内外において腫瘍抗原特異的免疫療法と制御性 T 細胞排除を目的としたシクロフォスファミド併用による臨床試験の報告はまだない。さらに、生体内で効果的に CTL が機能するためにはどの分化過程の CD8+Tcell が有効なのか、また stimulator として何が有効なのかは実際に臨床試験で検討されている報告は少ない。今後、より有効で安全性の高い新規免疫細胞療法を開発して行く上では、1)腫瘍選択性の高い腫瘍特異的免疫反応の誘導と維持、2)腫瘍免疫による抗腫瘍効果を阻害する免疫寛容関連因子の排除、3)腫瘍免疫による抗腫瘍効果を増強する免疫制御因子の投与、4)抗腫瘍効果を増強する免疫制御因子のモニタリングおよび抗腫瘍効果を阻害する免疫寛容関連因子のモニタリングを組み合わせた治療効果の予測系の導入、の4点を含んだ臨床試験を実施していかなければならないものと考えられる。

本研究では以上の観点から、次世代抗腫瘍免疫療法開発に向けた基礎的検討を実施する

2. 研究の目的

本免疫細胞療法臨床試験により臨床的抗腫瘍効果を明らかにする。そして、その抗腫瘍効果と腫瘍特異的免疫反応および抗腫瘍効果を阻害する免疫寛容関連因子排除との関連を明らかにすることで、治療効果の予測因子が明らかになるものと期待される。具体的には、1)本臨床試験で得られた抗腫瘍効果、2)樹状細胞の成熟化と腫瘍抗原特異的 CTL の誘導、3)シクロフォスファミドおよび IL-2 投与の制御性 T 細胞への影響の判定、および4)治療前後における腫瘍免疫増強関連サイトカインもしくは免疫寛容関連サイトカインおよびケモカインの変化と抗腫瘍効果との関連性の検討 5)in vivo で抗腫瘍免疫誘導を行う癌ペプチドワクチン療法と本療法のように養子免疫療法によって抗腫瘍免疫を誘導する場合の相違や対象患者の適性評価を行う。

3. 研究の方法

他に有効な治療法のない進行固形腫瘍患者で、HLA-A*2402, または HLA-A*0201 を有し、腫瘍に RNF43 が高発現している患者を対象とする。強力な抗原提示細胞である樹状細胞に、固形腫瘍特異的に発現している新規腫瘍抗原ペプチド RNF43 ペプチドを in vitro で提示させ、末梢血リンパ球と共培養することに

より誘導した RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いて、シクロホスファミド前投与併用による制御性 T 細胞の特異的排除の後、この活性化リンパ球および RNF43 ペプチドパルス樹状細胞の同時投与を行なう腫瘍特異的強化養子免疫療法の安全性および抗腫瘍免疫誘導効果を検討する第 I 相臨床研究である。対象患者は当大学の先進医療適応評価委員会で適正評価され、承認後に参加する。RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球数の 2 群(各群 5 例、合計 10 例)に分けた容量漸増試験である。(レベル 1: 5×10^7 , レベル 2: 2×10^8)

1. GMPgarde で RNF43 ペプチドを用いて以下の細胞加工を行ない患者に投与する。

アフエレーシスで採取した患者末梢血単核球層より、プラスチックプレートを用いて接着性細胞と非接着性細胞を分離し、前者より割り付けられた細胞数の未成熟樹状細胞を作製する。GM-CSF、IL-4 各 1000U/ml 存在下に 5 日間培養した後、TNF- α 、KLH を添加し 24 時間後に OK432 を添加して成熟樹状細胞を作製する。成熟樹状細胞に RNF43 ペプチドを最終濃度が $20 \mu\text{g/ml}$ となるように添加後 20°C で 2 時間培養する。これにより RNF43 抗原提示が誘導された樹状細胞は、細胞障害性 T リンパ球を多く含むと考えられる活性化 T 細胞の誘導に用いるとともに(樹状細胞により 1 回/週、3 回抗原提示)、患者への皮下投与にも用いる。RNF43 ペプチドパルス樹状細胞は使用時まで凍結保存する。

毎週、計 3 回の RNF43 ペプチドパルス樹状細胞を皮下接種するとともに 1 回の活性化リンパ球の経静脈投与を行なう。体外にて誘導した活性化リンパ球を体内でさらに活性化する目的で樹状細胞投与後に IL-2 の皮下接種を 3 日間(計 3 回)行う。細胞製剤は無菌検査や細胞表面マーカー検査等品質検査を全て行い、出荷基準を満たしたものを投与する。

対象患者: HLA typing 検査により HLA-A*2402 または 0201 陽性が確認されており、かつ腫瘍細胞または腫瘍組織にリアルタイム RT-PCR 法にて RNF43 の発現が認められ、健常組織部位での発現と差のある患者。(凍結保存した手術標本がある、または腫瘍部位の生検により正常、腫瘍組織が入手可能な患者であること。)

2. 有害事象および有効性などの評価

1) 有害事象の評価: Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 に基づき評価する。

2) 抗腫瘍効果(腫瘍縮小効果): 免疫療法は臨床効果発現まで、化学療法と比してタイムラグがあることが示唆されており(遅延反応)、画像で判定できる腫瘍に対し細胞製剤 DC 最終投与後 1 週間後および 4 週間後に、固

形癌の治療効果判定のための新ガイドライン(RECIST ガイドライン)に準拠して効果を判定する。

3) 生存期間の評価: 免疫療法は腫瘍縮小効果を示さなくても Overall survival (OS) を延ばすことが多くの臨床研究で報告されているように、その特殊性を考慮し本臨床試験においては OS も臨床評価項目に加え、生存期間も検討する。

4) Delayed-type hypersensitivity (DTH): ペプチド皮下注 48 時間後に Ludwig Institute for Cancer Research (LICR) マニュアルに従い評価する。

5) 免疫学的解析: 担癌患者由来の末梢血単核球細胞ならびに血漿を用いて抗腫瘍効果と腫瘍特異的免疫反応、免疫寛容因子との関連を評価する。

4. 研究成果

本免疫細胞療法臨床試験に 7 例が登録され、いずれも九州大学病院先進医療適応評価委員会において検討し適応症例と認められた。7 例中 5 例がプロトコール完遂に至った。免疫細胞の調製は GMP (Good Manufacturing Practice) に準拠して行うために、妥当性確認を厳密に行った(表 1)。本試験は RNF43 特異的活性化リンパ球の 2 段階容量漸増試験(各レベル 5 例)であり、レベル 1 の 5 例を完遂したため、現在レベル 2 への移行準備を行っている。主要評価項目の安全性評価は CTCAEv4.0 に則り、全例で Grade2 以下の注射部位反応を認めたが、それ以外に Grade3 以上の重篤な有害事象は認められなかった(表 2)。抗腫瘍効果については RECIST 基準に則り評価し、免疫療法特有に認められる遅延反応効果の可能性も考慮し、細胞療法終了 1 週間と 4 週間後の 2 点で評価した。2 点とも 5 例中 4 例が SD(安定)、1 例が PD(進行)であった。また SD 症例の 2 例に腫瘍マーカーが低下し、そのうちの 1 例が 1 週間後に上昇した腫瘍マーカーが 4 週間後に低下を示し、遅延反応効果が示唆された。免疫学的評価において、SD 症例で末梢血中の RNF43 ペプチド特異的 CTL 誘導が CD107a/b アッセイ法によって確認された。また誘導された活性化リンパ球細胞表面の表現型解析の結果、セントラルメモリー T 細胞の多い症例が臨床効果を示した。免疫寛容関連因子として血清中の IL-6、IL-10 濃度が PD 例で試験期間中に上昇し、SD 例では低値継続であったため、これらはバイオマーカーの指標となる可能性が示唆された。さらに末梢血中制御性 T 細胞(Treg)の DC4+T 細胞に占める割合が 5 例中 4 例(SD3 例、PD1 例)でシクロホスファミド(CY)投与後に低下し、CY 投与によって臨床効果を低下させることなく Treg を排除できる可能性が示唆された。本療法は免疫寛容因子を排除

し、抗腫瘍免疫をより効率的に誘導して臨床効果を引き出す新たな方法となることが期待でき、さらにレベル2を継続する予定である。

表1 品質検査

- : 最終報告有り
- : 中間報告
- ◎ : 後追い試験

製品	検査項目	Day 8	Day 22	Day 29	Day 36	Day 43
		DC凍結	CTL出荷 1w前 みなし 試験	DC ① CTL 出荷	DC ② 出荷	DC ③ 出荷
樹状細胞 DC	FACS	●	—	—	—	—
	Viability	●	—	●	●	●
	エンドトキソン	●	—	—	—	—
	マイコプラズマ (PCR・アタート)	●	—	—	—	—
	無菌試験	●	—	—	—	—
活性化リンパ球 CTL	FACS	—	—	◎	—	—
	Viability	—	—	●	—	—
	エンドトキソン	—	○	◎	—	—
	マイコプラズマ (PCR・アタート)	—	○	◎	—	—
	無菌試験	—	○	◎	—	—

表2 有害事象評価

CTCAEv4.0 Term	例数	発現率 (%)	Grade1	Grade2	Gr3	Gr4
注射部位 反応	5	100	4	1	0	0
倦怠感	3	60	3	0	0	0
腹部膨満	1	20	0	1	0	0
便秘	1	20	0	1	0	0
胸水	1	20	0	1	0	0
悪心	1	20	0	1	0	0
咳嗽	1	20	0	1	0	0
呼吸困難	1	20	0	1	0	0
低酸素血症	1	20	0	1	0	0
無気肺	1	20	0	1	0	0
低Alb血症	1	20	0	1	0	0
食欲不振	1	20	1	0	0	0
腹水	1	20	1	0	0	0
四肢浮腫	1	20	1	0	0	0
腹痛	1	20	1	0	0	0

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

土方康基、村橋(伊賀)睦了、岡崎利彦、谷憲三朗、固形腫瘍に対する新規免疫療法の開発—当科における第I相臨床試験の現状—Development of novel immune therapies for solid tumors: phase I clinical trials in a single institute
臨床血液、査読有、5月号、2012

宮本将平、土方康基、岡崎利彦、谷憲三朗、樹状細胞療法の現状—当科で実施中の進行固形腫瘍に対する強化養子免疫細胞療法臨床研究を中心に—、臨床と研究、査読有、88巻4号2011、42-48

谷憲三朗、悪性腫瘍に対する免疫遺伝子・細胞療法の現状と今後の課題、胆と膵、32巻、2011、107-121

谷憲三朗、土方康基、悪性腫瘍に対する免疫遺伝子・細胞療法の現状と展望
臨床血液、査読有、vol.51, No10, 2010、1616-1622

〔学会発表〕(計3件)

シンポジウム: Development of Experimental Immune Therapies for Solid Tumors: Our Clinical Trial Experiences in Phase I. Hijikata Y, Murahashi, Okano S, Tanaka. Y, Odaira K, Okazaki T, Tani K et al.

第73回日本血液学会学術集会(2011, 10, 名古屋)

一般演題: RNF43 ペプチドパルス樹状細胞ならびにRNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第I相臨床試験

土方康基、岡崎利彦、村橋(伊賀)睦了、田中芳浩、大平公亮、岡野慎士、谷憲三朗など
第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会(2011, 8 別府)

一般演題: RNF43 ペプチドパルス樹状細胞ならびにRNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第I相臨床試験

土方康基、岡崎利彦、田中芳浩、大平公亮、谷憲三朗など
第2回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会(2010.8. 松山)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計◇件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
UMIN CTR 臨床試験情報

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土方 康基

研究者番号: 80460856

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: