

平成 30 年 4 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09050

研究課題名(和文) 進行膵癌に対する免疫化学療法の選択基準

研究課題名(英文) Selection of immunochemotherapy for patients with advanced pancreatic cancer

研究代表者

小井戸 薫雄 (Koido, Shigeo)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70266617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 進行膵癌に対して、WT1を標的とした免疫療法の有効性を明らかにするため、多施設共同ランダム化第 Ⅱ 相試験を実施し、免疫誘導の有無と治療効果との関連を検討した。進行膵癌においてWT1ペプチドワクチンによるWT1特異的免疫反応の誘導が、無増悪生存期間(PFS)の改善に優位に寄与していることが示された。さらに、膵癌は全例WT1の発現を認めた。特に、細胞質におけるWT1の低発現群は、中～高発現群と比較し、有意差に全生存期間(OS)と無病生存期間(DFS)が延長していた。進行膵癌に対してWT1を標的とした免疫療法(WT1ペプチドワクチンとWT1樹状細胞ワクチン)と化学療法の併用の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)： We investigated the efficacy of a Wilms' tumor gene 1 (WT1) peptide vaccine combined with gemcitabine (GEMWT1) and compared it with gemcitabine (GEM) monotherapy for advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) in a randomized phase II study. GEM plus the WT1 peptide vaccine prolonged progression free survival (PFS) and may improve 1-year overall survival (OS)% in patients with PDA. These clinical effects were associated with the induction of WT1-specific immune responses. Moreover, WT1 protein expression was detected in the nucleus and cytoplasm of all PDA cells. OS and disease free survival (DFS) times for patients with PDA following surgical resection demonstrated that the OS and DFS times of patients with weak cytoplasmic WT1 expression were significantly prolonged compared with those of patients with moderate-to-strong cytoplasmic WT1 expression. Therefore, the results support the development of WT1-targeted therapies to prolong survival in all patients with PDA.

研究分野：がんワクチン

キーワード：WT1 膵癌 がんワクチン 免疫療法 細胞障害性T細胞 ペプチドワクチン 樹状細胞ワクチン 免疫化学療法

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞は細胞表面に PD-L1 などの抑制性シグナル分子のリガンドを発現することにより、免疫活性を制御している。特に、腫瘍微小循環では、浸潤リンパ球から産生される IFN- γ により、腫瘍細胞が PD-L1 を高発現し、抗腫瘍免疫活性は抑制された状態であると報告されている。最近、免疫チェックポイント分子を阻害することにより悪性黒色腫に極めて有効な治療成績が報告され(*N Engl J Med.* 2013)、国内で臨床応用への期待が高まっている。しかしながら、免疫チェックポイント阻害療法の適応基準は明らかでない。

われわれは、進行膵癌を対象として下記の臨床試験を実施し、学会及び論文報告してきた。

(1) ペプチドワクチン併用化学療法

進行膵癌 32 例を対象とし、「MHC class I (HLA*2402) に提示されるウイルムス腫瘍遺伝子産物 (WT1) 由来のキラーペプチドと化学療法を併用療法(第 I 臨床試験)」を実施した。その結果、治療早期から末梢血に WT1 特異的メモリー T 細胞が存在している症例は全生存期間が有意に延長することを明らかにした (*J Immunother* 2014)。1 例著名な腫瘍縮小を認め手術が可能となった症例を経験した。現在、治療の有効性確認と治療選択基準のバイオマーカー探索目的で、「第 II 相無作為化臨床試験」を実施している。

(2) ヘルパーとキラーペプチドをマルチプル・パルスした樹状細胞併用化学療法

進行膵癌に効果的な免疫誘導を目的とし、「MHC class I (HLA*2402 および 0201) と class II の 3 種類の WT1 ペプチドをマルチプル・パルスした樹状細胞(Dendritic cells: DCs) と化学療法の併用療法(第 I 臨床試験)」を 7 例に実施した。全例とも安全に実施可能であった。特に、WT1 ペプチドに対して遅延型皮内反応が見られた 3 例は全例長期生存期間を認めた(582 日生存と 717 日生存が各 1 例、2 年以上生存例が 1 例で現在も治療継続中)。この 3 例は免疫抑制分子である PD-1 の低発現を伴った WT1 特異的メモリー T 細胞が継続して末梢血に存在していた(*Clinical Cancer Res* 2014)。

同様の背景にも係わらず、治療効果を認めた症例と認めなかった症例が存在した。治療効果が得られなかった症例は、免疫誘導が抑制されている可能性がある。そこで、本研究では各種免疫モニタリングを実施することにより、治療効果予測のバイオマーカーの探索や抗腫瘍免疫の誘導機序に関して検討をする。

2. 研究の目的

(1) 臨床試験における免疫モニタリング
進行膵癌に対する GEM 併用 WT1 ペプチドワクチン(GEM/WT1)の臨床効果を評価する目的で、多施設共同ランダム化第 II 相試験を実施し、治療前後で免疫誘導の有無を検討する。

(2) 新規臨床試験の準備

膵癌は診断時に手術適応があっても、手術時には予想外に進行していて、手術適応が無いことが多々ある。したがって、診断から手術まで 1 ヶ月以上ある患者は、ネオアジュバントとして術前に化学療法が実施されることが多い。このような背景から、われわれは手術適応のある膵癌症例に術前と術後に化学療法 + 免疫療法を実施する臨床試験の準備研究を行う。

3. 研究の方法

(1) WT1 ペプチドワクチンの臨床試験と免疫モニタリング

切除不能進行または術後再発の浸潤性膵管癌で、HLA-A*02:01 か HLA-A*24:02、またはその両者を有する症例を対象とし、ゲムシタピン併用 WT1 ペプチドワクチン(GEM/WT1) 群とゲムシタピン(GEM)単独群へ 1:1 にランダム割付した。GEM は day1、8、15 に 28 日周期で投与した。HLA-A*02:01 または HLA-A*24:02 拘束性の WT1 ペプチド(3mg) と Montanide ISA51 免疫アジュバントのエマルジョン製剤を、WT1 ペプチドワクチンとして、day1 と 15 に皮内投与した。尚、GEM 群では、病状進行後に GEM/WT1 療法へのクロスオーバーを許容した。主要評価項目は、1 年生存割合 (1 年 OS%) である。副次評価項目である WT1 特異的免疫反応は、WT1 ペプチドに対する遅延型過敏反応 (DTH) と tetramer 法を用いた抹消血中の WT1 特異的 CD8 陽性細胞障害性 T 細胞 (WT1-CTL) を評価した。

(2) WT1 樹状細胞ワクチンの臨床試験と免疫モニタリング

WT1 樹状細胞ワクチンに参加された進行膵癌患者の血漿中のサイトカインの変動と予後の関連を評価した。

(3) 新規臨床試験の準備

膵癌に WT1 および PDL1 の発現の有無と臨床的意味を検討するために、手術 50 例の病理標本をもいって後ろ向きに免疫組織化学的な検討を行った。

4. 研究成果

(1) WT1 ペプチドワクチンの臨床試験と免疫モニタリング

進行膵癌 85 例 [GEM/WT1 群 : 42 例 (局所進行 7 例、転移 33 例、再発 2 例) ; GEM 群 : 43 例 (局所進行 9 例、転移 34 例、再発 0 例)] が最終的に解析可能であった。1 年 OS% は、GEM/WT1 群 35.7%、GEM 群 20.9% であった。無増悪生存期間 (PFS) 中央値は、GEM/WT1 群 157 日、GEM 群 100 日 (HR 0.66, p=0.089) であった。この傾向は IV 期 (転移) 膵癌において有意であった (GEM/WT1 群 vs GEM 群: 1yr-OS% 27.3% vs 11.8%; PFS 中央値 107 日 vs 76 日 HR 0.50, p=0.013)。GEM/WT1 群の 50% で治療後に DTH 陽性化を認めた。転移膵癌で GEM/WT1 群 DTH(+), GEM/WT1 群 DTH(-)、GEM 群の、1 年 OS% は 40.0%、20.0%、13.3%、PFS 中央値は 198 日、87 日、100 日であった。治療前における末梢血中の WT1-CTL は、両群間に差を認めなかったが、治療後に GEM/WT1 群の DTH(+)例で顕著に増加した。一方、GEM 群では、末梢血中の WT1-CTL の増加は認めなかった。grade3 以上の有害事象の出現頻度は両群間に差を認めなかった。また、WT1 ワクチン関連の重篤な有害事象は認めなかった。以上より、GEM/WT1 療法は、進行膵癌患者において、GEM 単独療法に比較して 1 年 OS% を改善し、PFS の延長が期待された。したがって、進行膵癌において WT1 ペプチドワクチンによる WT1 特異的免疫反応の誘導が、治療効果の改善に寄与している可能性が示唆された。

(2) WT1 樹状細胞ワクチンの臨床試験と免疫モニタリング

MHC class I および class II 拘束性の 3 種類の WT1 ペプチドを樹状細胞にパルスしたものを WT1 樹状細胞ワクチン (WT1-DC) とした。進行膵癌 7 例に対して、WT1-DC と GEM を併用した。治療経過中の血漿中の IL-6 および IL-8 が低いレベルを維持している患者は WT1 特異的な免疫が誘導でき、さらに末梢血中の PD1 が低いレベルで維持していた。

(3) 新規臨床試験の準備

膵癌に対して WT1-DC の新規臨床試験を実施する上で、膵癌細胞における WT1 および PDL1 の発現の有無と臨床的意味を検討する必要がある。膵癌手術 50 症例の病理標本をもちいて、後ろ向きに免疫組織化学的な検討を行った。免疫組織化学的な方法を新たに確立することにより、進行膵癌全例に、WT1 の発現を、細胞核および細胞質に認めることが可能であった。また、膵臓癌の細胞質における WT1 蛋白の発現を、低発現群、中等度発現群、および高発現群に分類した。膵臓癌の細胞質における WT1 の低発現群 (n=19) は、中等度 (n=23) ~ 高発現群 (n=8) と比較し、有意差に OS と無病生存期間 (DFS) が延長していた。ま

た、これまでに報告されている他の予後関連因子との多変量解析においても、膵臓癌細胞質における WT1 蛋白の発現強度の増強と OS/DFS の悪化との間に、有意な関連性が示された。以上より、膵臓癌の細胞質における WT1 蛋白の中～高発現は、術後の再発および生命予後関連バイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。また、膵癌細胞の PD-L1 発現が見られた症例は、見られなかった症例と比較し優位に OS/DFS が延長していた。したがって、WT1 および PD-L1 が高発現している膵癌は、術後慎重な経過観察が必要である。さらに、WT1 および PD-L1 を標的とした治療法を開発することで、治療効果の改善が期待される。

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 21 件)

1. Nishida S, Ishikawa T, Egawa S, Koido S, Yanagimoto H, Ishii J, Kanno Y, Kokura S, Yasuda H, Oba MS, Sato M, Morimoto S, Fujiki F, Eguchi H, Nagano H, Kumanogoh A, Unno M, Kon M, Shimada H, Ito K, Homma S, Oka Y, Morita S, Sugiyama H. Combination gemcitabine and WT1 peptide vaccination improves progression-free survival in advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: A phase II randomized study. *Cancer Immunol Res.* 2018 6(3); 320–31.
2. Ito M, Hayashi K, Minamisawa T, Homma S, Koido S, Shiba K. Encryption of agonistic motifs for TLR4 into artificial antigens augmented the maturation of antigen-presenting cells. *PLoS One.* 2017 30;12(11):e0188934.
3. Koido S, Okamoto M, Kobayashi M, Shimodaira S, Sugiyama H. Significance of Wilms' tumor 1 antigen as a cancer vaccine for pancreatic cancer. *Discov Med.* 2017 24(130):41-49.
4. Ito Z, Takakura K, Suka M, Kanai T, Saito R, Fujioka S, Kajihara M, Yanagisawa H, Misawa T, Akiba T, Koido S, Ohkusa T. Prognostic impact of carbohydrate sulfotransferase 15 in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2017 13(6):4799-4805.
5. Koido S, Okamoto M, Shimodaira S, Sugiyama H. Wilms' tumor 1 (WT1)-targeted cancer vaccines to extend survival for patients with pancreatic cancer.

- Immunotherapy. 2016 8(11):1309-1320.
6. Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S, Koido S, Ohkusa T, Tasaki T, Hayashi K, Komita H, Watanabe N, Suzuki Y, Yamamoto Y, Mori R, Arai T, Tanaka T, Joki T, Yanagisawa T, Murayama Y. Phase I/II trial of combination of temozolomide chemotherapy and immunotherapy with fusions of dendritic and glioma cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2016 65(12):1499-1509.
 7. Koido S. Dendritic-Tumor Fusion Cell-Based Cancer Vaccines. *Int J Mol Sci*. 2016 26;17(6).
 8. Kajihara M, Takakura K, Kanai T, Ito Z, Matsumoto Y, Shimodaira S, Okamoto M, Ohkusa T, Koido S. Advances in inducing adaptive immunity using cell-based cancer vaccines: Clinical applications in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 22(18):4446-58.
 9. Kajihara M, Takakura K, Kanai T, Ito Z, Saito K, Takami S, Shimodaira S, Okamoto M, Ohkusa T, Koido S. Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 22(17):4275-86.
 10. Okamoto M, Kobayashi M, Yonemitsu Y, Koido S, Homma S. Dendritic cell-based vaccine for pancreatic cancer in Japan. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2016 7(1):133-8.
 11. Takakura K, Koido S. Direct therapeutic intervention for advanced pancreatic cancer. *World J Clin Oncol*. 2015 6(6):216-9.
 12. Takakura K, Shibazaki Y, Yoneyama H, Fujii M, Hashiguchi T, Ito Z, Kajihara M, Misawa T, Homma S, Ohkusa T, Koido S. Inhibition of Cell Proliferation and Growth of Pancreatic Cancer by Silencing of Carbohydrate Sulfotransferase 15 In Vitro and in a Xenograft Model. *PLoS One*. 2015 10(12):e0142981.
 13. Takakura K, Ito Z, Suka M, Kanai T, Matsumoto Y, Odahara S, Matsudaira H, Haruki K, Fujiwara Y, Saito R, Gocho T, Nakashiro K, Hamakawa H, Okamoto M, Kajihara M, Misawa T, Ohkusa T, Koido S. Comprehensive assessment of the prognosis of pancreatic cancer: peripheral blood neutrophil-lymphocyte ratio and immunohistochemical analyses of the tumour site. *Scand J Gastroenterol*. 2016 51(5):610-7.
 14. Kajihara M, Takakura K, Ohkusa T, Koido S. The impact of dendritic cell-tumor fusion cells on cancer vaccines - past progress and future strategies. *Immunotherapy*. 2015;7(10):1111-22.
 15. Tsukinaga S, Kajihara M, Takakura K, Ito Z, Kanai T, Saito K, Takami S, Kobayashi H, Matsumoto Y, Odahara S, Uchiyama K, Arakawa H, Okamoto M, Sugiyama H, Sumiyama K, Ohkusa T, Koido S. Prognostic significance of plasma interleukin-6/-8 in pancreatic cancer patients receiving chemoimmunotherapy. *World J Gastroenterol*. 2015 21(39):11168-78.
 16. Kan S, Koido S, Okamoto M, Hayashi K, Ito M, Kamata Y, Komita H, Nagasaki E, Homma S. Up-regulation of HER2 by gemcitabine enhances the antitumor effect of combined gemcitabine and trastuzumab emtansine treatment on pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *BMC Cancer*. 2015 15:726.
 17. Komita H, Koido S, Hayashi K, Kan S, Ito M, Kamata Y, Suzuki M, Homma S. Expression of immune checkpoint molecules of T cell immunoglobulin and mucin protein 3/galectin-9 for NK cell suppression in human gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep*. 2015 34(4):2099-105.
 18. Kan S, Koido S, Okamoto M, Hayashi K, Ito M, Kamata Y, Komita H, Ishidao T, Nagasaki E, Homma S. Gemcitabine treatment enhances HER2 expression in low HER2-expressing breast cancer cells and enhances the antitumor effects of trastuzumab emtansine. *Oncol Rep*. 2015 34(1):504-10.
 19. Koido S, Gong J. Cell fusion between dendritic cells and whole tumor cells. *Methods Mol Biol*. 2015 1313:185-91.
 20. Koido S, Homma S, Kan S, Takakura K, Namiki Y, Kobayashi H, Ito Z, Uchiyama K, Kajihara M, Arihiro S, Arakawa H, Okamoto M, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by fusion cells generated from allogeneic plasmacytoid dendritic and tumor cells. *Int J Oncol*. 2015 46(6):2679.
- Takakura K, Kajihara M, Ito Z, Ohkusa T, Gong J, Koido S. Dendritic-tumor fusion cells in cancer immunotherapy. *Discov Med*. 2015 19(104):169-74.

1. 込田英夫、小井戸薫雄、林和美、伊藤正紀、鎌田裕子、田尻久雄、鈴木正章、本間定. GIST における免疫チェックポイント関連分子Tim-3/galectin-9の発現. 第74回 日本癌学会総会 2015年10月
2. 佐川 由紀子, 林 和美, 小井戸 薫雄, Kan, Shin, 込田 英夫, 鎌田 裕子, 伊藤正紀, 本間 定. セリンプロテアーゼ阻害剤はがん細胞のIFN- γ 誘導性PDL-1の発現上昇を抑制する. 第74回日本癌学会総会 2015年10月
3. 本間 定, 小井戸 薫雄, 佐川 由紀子, 林和美, 込田 英夫, 鎌田 裕子, 伊藤 正紀. 進行膵癌患者血中の可溶性PDL-1. 第74回日本癌学会総会 2015年10月
4. 伊藤正紀、林和美、小井戸薫雄、本間定、南澤宝美后、芝 清隆. Toll 様受容体4アゴニスト・リガンド・モチーフの埋め込みより人工タンパク質抗原の細胞性免疫誘導能力を増強する. 第74回日本癌学会総会 2015年10月
5. Komita H, Koido S, Tajiri H, Suzuki M, Homma S. Tim-3/galectin-9 interaction might be associated with the immunosuppression of gastrointestinal stromal tumor (GIST). Proc Am Assoc Cancer Res (AACR) 2015 Apr 20, 2015 PHILADELPHIA (April 18-22, 2015)
6. Ito M, Hayashi K, Homma S, Koido S, Minamisawa T, Shiba K. Antigen-presenting cells recognize the molecular contexts of artificial protein antigen. がん免疫療法・マクロファージ国際学会 ICCIM (International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages) 2015 19th JACI and 23rd MNCB 2015. 7月
7. 小井戸薫雄、西田純幸、石川剛、江川新一、石井淳、菅野良秀、柳本泰明、古倉聡、本創世子、大庭真梨、江口英利、島田英昭、本間定、森田智視、杉山治夫. 進行膵癌に対するゲムシタピン併用WT1ペプチドワクチン療法：ランダム化第II相臨床試験. 第54回日本癌治療会 ミニシンポジウム 2016年10月
8. 伊藤 善翔、高倉 一樹、金井 友哉、齋藤 恵介、松本 喜弘、小田原 俊一、北村 博頭、齋藤 良太、藤岡 秀一、三澤 健之、梶原 幹生、大草 敏史、小井戸 薫雄. 膵臓がんにおける carbohydrate sulfotransferase 15 発現による術後再発の予測因子. JDDW 2016 11月
9. 岡本正人、小井戸薫雄、金井友哉、西田純幸、尾路祐介、杉山治夫. 膵癌におけるWT1タンパク発現と予後. 日本バイオセラピー学. 2017年11月
10. 森本創世子、西田純幸、小井戸薫雄、江川新一、石川剛、石井淳、菅野良秀、柳本泰明、江口英利、中田潤、保仙直毅、坪井昭博、長谷川加奈、中島博子、藤木文博、尾路祐介、熊ノ郷淳、岡芳弘、杉山治夫. 切除不能進行膵癌に対するゲムシタピン併用HLA拘束性WT1ペプチドワクチン療法で誘導されたWT1特異的CTLの免疫学的機能解析. 日本がん免疫学会. 2017年06月
11. 金井友哉 小井戸薫雄など. 膵臓癌患者におけるウィルムス腫瘍遺伝子(WT1)発現の臨床的意義. JDDW2017 10月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

小井戸 薫雄 (KOIDO, Shigeo)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70266617

(2)研究分担者

本間 定 (HOMMA, Sadamu)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：50192323