

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790498
 研究課題名（和文）：進行・再発固形腫瘍に対する新規腫瘍抗原エピトープペプチドを用いた免疫療法の開発
 研究課題名（英文）：Development of an immune therapy against advanced solid tumors using the epitope peptides derived from novel tumor-associated antigens
 研究代表者：伊賀睦了（MUTSUNORI IGA）
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：20422420

研究成果の概要（和文）：本研究は、他に有効な治療法のない進行・再発固形腫瘍、特に消化器がん・肺がん・子宮頸がん患者で HLA-A*2402 を有している患者を対象に、Cyclophosphamide 投与後、HLA-A*2402 拘束性で KOC1, TTK, CO16 (URC10), DEPDC1, MPHOSPH1 由来の腫瘍関連抗原エピトープペプチドカクテルを皮下接種し、IL-2 を投与する。この方法の安全性を検証する第 I 相臨床試験である。3 患者コホートの Cyclophosphamide 用量漸増試験とし、副次目的として、投与された患者のペプチドに対する特異的細胞性免疫反応誘導の可否および臨床効果についても検討した。これまでに適応患者計 22 例を登録、17 例に対して安全に投与を終了した。本 17 例においてこれまでに Grade3 以上の有害事象を認めない。現時点で評価を終了した 15 例中 8 例に SD (stable disease) 症例を認め、投与症例における免疫学的解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：This is an open-label, Phase I dose-escalation study targeting HLA-A*2402- positive patients with advanced, metastatic, and/or recurrent gastrointestinal cancer, cholangiocellular carcinoma, pancreatic cancer, small cell and non-small cell lung cancer, and cervical cancer. The study treatments include pre-administration of cyclophosphamide (CPM) to exclude regulatory T cells, vaccination with five HLA-A*2402 restricted peptides derived from tumor-associated antigens, followed by administration of low-dose IL-2. The primary endpoint of safety was investigated in a CPM dose-escalation study that included a cohort of three patients. The secondary endpoint was to observe the induction of antigen-specific immune responses and clinical antitumor response. Twenty-two patients satisfying the eligibility criteria enrolled in this study, and the vaccination protocol was found to be well tolerated in 17 enrolled patients. Stable disease (SD) was observed in 8 of 15 patients. Immunological analysis will be demonstrated in these patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胆道学、膵臓学

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、悪性腫瘍の治療成績は年々向上している。しかし、手術療法、化学療法、放射線療法等既存の一般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(1)。この傾向は特に固形腫瘍において顕著であり、これら現在の治療法では治癒が望めない症例に対して、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。欧米においてはメラノーマや悪性リンパ腫に対する腫瘍抗原ペプチドによる腫瘍特異的免疫療法の臨床研究が1990年代初めより精力的に実施され、HLA-A1拘束性MAGE3ペプチドでの臨床研究においては31例中7例の腫瘍縮小例が認められた(2)。また、HLA-A2拘束性gp100改変ペプチドによる臨床研究では11例中10例においてCTL誘導が確認され、高用量IL-2との併用により31例中13例に臨床効果が得られている(3)。このように一部の疾患、症例において有効性が示されているものの、既存の抗腫瘍治療に比較し、治療効果における個体間の差が大きく免疫療法は未だ確立されていない。その理由として1)腫瘍特異的免疫反応誘導が困難であること、2)免疫療法の効果の予測が困難であることの2点が挙げられる。一方、固形癌においてはこれまでにペプチドを用いた抗腫瘍免疫療法の報告は少ないが、その原因の1つとして固形癌では癌病変へのアクセスが困難かつ得られる標本も少量であるため、癌抗原の同定が困難であったことが挙げられる。腫瘍特異的免疫療法における理想的腫瘍抗原は、腫瘍に高頻度に高発現し、正常臓器には発現のない遺伝子であり、かつその遺伝子が強い免疫原性を有することである。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を同定し、その腫瘍抗原由来でHLA拘束性のエピト-ブペプチドを決定した。この中で5種類の新規腫瘍抗原(KOC1, TTK, CO16(URC10), DEPDC1, MPHOSPH1)は、いずれもヒト遺伝子32000個のスクリーニングにより見い出されたものであり、正常臓器に発現しておらず、胆管系悪性腫瘍を中心に消化器がんのいずれかにおいて50-100%の頻度

で正常組織に対し5倍以上の発現を認める。また、肺がん、子宮頸がんにおいても14-100%の頻度で正常組織に対し5倍以上の発現を認める(4)。これらの腫瘍抗原由来エピト-ブペプチドにより強力な細胞傷害性を有したCTLクローンを樹立できたことから、本ペプチドは強力な免疫原性を有すると考えられるが、臨床レベルでの有効性はまだ証明されていない。一方、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(5)。シクロホ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ことが報告され、それにより免疫細胞療法の効果が増強される可能性が示唆されている(6)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ホスファミド併用による臨床研究の報告はまだない。このような免疫寛容関連因子除去はこれまでの腫瘍特異的免疫反応の誘導もしくは増強を目的としたconventional therapyに対し、novel therapyとして位置づけられる(7)。IL-2はconventional therapyに分類される分子であり、抗原特異的T細胞の増殖に関与することが証明されている。腫瘍免疫においては、腫瘍抗原特異的免疫反応を増強することにより抗腫瘍効果を増強すると考えられてきたが、IL-2 receptor (CD25)を介した制御性T細胞に対する効果により、抗腫瘍免疫における否定的な効果を指摘する報告も散見されるようになってきた(8)。しかし、その是非については結論は得られておらず、シクロホスファミド併用による制御性T細胞排除下におけるIL-2の効果増強の可能性についても知見は得られていない。以上のこれまでの知見を総合すると、今後開発される新規抗腫瘍免疫治療は1)腫瘍選択性の高い腫瘍特異的免疫反応の誘導、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4点を含んでいなければならないと思われる。本研究ではこの仮説に則り新規抗腫瘍免疫治療の可能性を追求する。

2. 研究の目的

まず、本免疫治療による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。具体的には以下の項目からなる。1)本治療による抗腫瘍効果、2)腫瘍抗原特異的 CTL の誘導、3)シクロホスファミドおよび IL-2 投与の制御性 T 細胞への影響判定、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。

3. 研究の方法

他に有効な治療法のない進行・再発固形腫瘍例（消化器がん・肺がん・子宮頸がん）で HLA-A*2402 を有している患者を対象に、シクロホスファミド投与後、HLA-A*2402 拘束性で KOC1, TTK, CO16 (URC10), DEPDC1, MPHOSPH1 由来の腫瘍関連抗原エピトープペプチドカクテルを皮下接種し、IL-2 を投与する。3 患者コホートのシクロホスファミド用量漸増試験とし、抗腫瘍効果について検討する。投与された患者のペプチドに対する特異的免疫反応および制御性 T 細胞や抑制性サイトカインなど免疫寛容関連因子についても評価する。

1. ペプチドワクチン投与

対象患者：治療切除不能あるいは再発の食道、胃、大腸がんおよび膵胆管がんを含む消化器がん、肺がん、子宮頸部がんで、標準治療が無効と考えられる症例。あるいはそれらの治療に関連する副作用などのため治療継続が困難な場合で、九州大学病院倫理委員会に承認された規定に従う。3 患者コホートのシクロホスファミド用量漸増試験（dose escalation study）とする。すなわち、同一投与量レベルの 3 例の症例登録が終了した時点で登録を中断する。ワクチン投与は下図のスケジュールを 1 コースとして施行する。HLA タイピングは全血由来ゲノム DNA を当科で調製後（DNeasy キット, QIAGEN により）、湧永製薬株式会社に受託解析を依頼する。

1) シクロホスファミドの投与：レベル 1 ではペプチド投与前 4 日にシクロホスファミド $150\text{mg}/\text{m}^2$ を 1 回投与。100mg 当たり生理食塩水 5mL に溶解し維持輸液 500ml に加え点滴静脈内投与（約 2~3 時間での投与）する。レベル 2 ではペプチド投与前 4 日にシクロホスファミド $300\text{mg}/\text{m}^2$ を 1 回投与。レベル 3 ではペプチド投与前 4 日および前 3 日にそれぞれシクロホスファミド $300\text{mg}/\text{m}^2$ を 1 回、計 2 回投与する。

2) ペプチドの投与：エピト - プペプチドを各 1.0 mg 投与する。投与方法はそれぞれの合成

ペプチド毎に IFA（Incomplete Freund Adjuvant）（Montanide*ISA51 VG, Seppic, France）1ml と混和し、患者腫瘍病巣最近傍の腋窩あるいは鼠径部付近の皮下に各ペプチドを別々に接種する。本接種を 1 週間ごとに 4 回繰り返す。

3) IL-2 の投与：1 回あたり Interleukin-2（proleukin, CHIRON 社） $35 \times 10^4\text{IU}$ を皮下投与とし、各ペプチド投与 1 日後から 3 日間連日投与を行う（計 12 回）。投与前 1 時間前にアセトアミノフェン（0.3~0.5mg）を服用させる。

2. 有害事象および有効性などの評価

1) 有害事象の評価：NCI（National Cancer Institute）- CTC（Common Toxicity Criteria）ver.2 に基づき評価する。

2) 抗腫瘍効果（腫瘍縮小効果）：画像で判定できる腫瘍に対し、最終ワクチン投与後 7 日目前後に、主として「固形がん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）に従って臨床効果を判定評価する。

3) Time to progression (TTP) と生存期間の評価：TTP は本ワクチン療法施行後、PD に至るまでの期間を意味する。免疫療法の特殊性を考慮し、本臨床試験に TTP も臨床評価に加える。また生存期間も検討する。

4. 研究成果

当初平成20年度終了予定であった臨床試験を平成21年1月29日に終了、11例を登録、9例がプロトコル完遂に至った。9例中4例にSD (stable disease) 症例を認め、免疫学的な解析（抗原特異的CD8T細胞における細胞内サイトカイン染色）により、objective response を認めたSD症例において上記エピトープペプチド特異的CD8+ T細胞にIFN 産生を確認した。一部のPD症例を含む200日以上長期生存した症例においてはワクチン接種部位に発赤、腫脹、硬結反応を認めている。これらの所見は免疫学的な反応と臨床効果が相関する可能性を示唆するものと考えられ、確実性を高めた第II相臨床試験を実施すべく、各レベル3人の3段階容量漸増試験を前回と同様な内容で追加し、平成22年3月31日現在、計22例を登録、17例を完遂した。本17例においてこれまでにGrade3以上の有害事象を認めていない。現時点で評価を終了した15例中8例にSD (stable disease) 症例を認め、追加症例における免疫学的解析を進めている。制御性T細胞(Treg)評価を終了した11例において、シクロホスファミド(CPM)投与前を100%とし、その排除効率を相対的に示したTreg阻害レベルはワクチン投与終了後ほぼ全例でベースラインより低いレベルに留まった。一方、CD4のレベルはワクチン投与終了後に開始前のベースライン以上に回復する症例が5例あり、Tregの推移との比較において大きな相違

点となっており、CPMのTregに対する特異的な作用を示唆している可能性がある。今後は追加症例のフローサイトメトリーによる解析に加え、Elispot、患者血漿中サイトカイン、ケモカインの測定を含む免疫学的解析を行い、さらなる検討を行っていく。

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0件)

[学会発表](計3件)

シンポジウム : New strategies of immune and cell therapy targeting malignancy. / Iga M.

Hijikata Y, Suehiro Y, Inoue H, Tanaka Y, Shimoda S, Marumoto T, Okazaki T, Tsunoda T, Nakamura Y, Tani K.

第71回日本血液学会学術集会 (2009, 10, 京都).

一般演題 : 進行再発固形腫瘍に対するシクロフォスファミド併用新規腫瘍関連抗原由来ペプチドを用いた腫瘍特異的強化ワクチン療法 / 伊賀睦了、土方康基、末廣陽子、岡崎利彦、村上佑介、田中芳浩、中村祐輔、吉田浩二、角田卓也、谷憲三朗.

第106回日本内科学会総会 (2009, 4, 東京).

一般演題 : 進行再発固形腫瘍に対する抗腫瘍ワクチン療法第1相臨床試験 / 谷憲三朗、伊賀睦了、土方康基、末廣陽子、岡崎利彦、村上佑介、田中芳浩、中村祐輔、吉田浩二、角田卓也.

第21回日本日本バイオセラピー学会学術集会総会 (2008, 11, 東京).

[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0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊賀睦了 (MUTSUNORI IGA)

研究者番号：20422420

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：