

## 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 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249069

研究課題名（和文）国産ウイルスベクターを用いた癌に対する遺伝子細胞療法の臨床研究開発

研究課題名（英文）Preclinical Development of Cellular Gene therapy using Viral Vector

研究代表者

田原 秀晃（TAHARA HIDEAKI）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70322071

研究成果の概要（和文）：がんに対する遺伝子・細胞療法を開発するため、臨床グレードの Interleukin-12(IL-12)発現アデノウイルス・ベクターを自ら作製した。また、それを用いた樹状細胞による臨床試験の前臨床試験を行い安全性を検証した。また同時に、その全身的抗腫瘍効果をより強く発揮させるための基礎検討を進め、MFG-E8 を抗体により阻害することによりアポトーシスに陥った腫瘍細胞の貪食機構を修飾し免疫を更に賦活化する手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：In order to develop cellular-gene therapy against cancer, we have successfully produced cGMP-grade adenoviral vector expressing IL-12. We also performed preclinical safety examination for clinical trials using dendritic cells engineered to produce IL-12 at a high level. Furthermore, we have found the blockade of MFG-E8, an opsonin for phagocytosis, could enhance immune response against cancer cells as a basic research. These results, including generation of clinical grade vector, preclinical safety testing, and basic research to further enhance systemic immune responses, enables the development of novel approach to treat cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	12,900,000	3,870,000	16,770,000
2010 年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2011 年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
総計	36,100,000	10,830,000	46,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：実験外科学、腫瘍免疫、細胞療法、遺伝子治療、臨床研究、ウイルスベクター

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の代表者は、IL-12 遺伝子を腫瘍局所で発現させれば、副作用なく高い抗腫瘍効果の得られることをマウス腫瘍モデルを用いて世界に先駆けて発見し、この発見を基に臨床応用も実現した(Tahara, H. and Lotze, M. T. Human Gene Therapy 6:1607-1624, 1995)。この臨床試験と並行して、より強い治療効果の実現を目指して、再びマウス腫瘍モデルを用いて基礎研究をさらに進めた結果、全身的

免疫反応の制御に重要役割を持つ樹状細胞に IL-12 遺伝子を導入したもの（IL-12-DC）を腫瘍内投与すると線維芽細胞を用いた際よりもさらに強い抗腫瘍効果が発揮され、全身の免疫反応においても高い活性を持った腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)が誘導されることが判明した(Nishioka, Y., Tahara, H. et al Cancer Research 59:4035-41, 1999)。これらの結果を基にヒトでの臨床応用を検討するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌に対する遺伝子改変樹状細胞療法臨床試験を準備するとともに、それに関連する基礎研究を行う。臨床試験に関しては、東大医科研附属病院の有する治療ベクター開発室を利用して自ら作製する GMP 準拠 Ad-IL-12 を用いる。また、臨床試験施行に必要となる前臨床試験、臨床試験結果の解析、そして治療効果の更なる増強を図るための基礎開発研究も行う。

臨床試験では、本研究責任者がマウス腫瘍システムを用いて基礎的研究を重ねたものであり、その手法については米国にて特許を申請した手技を応用する。すなわち、Ad-IL-12 を用いて抗原獲得能を有しながら IL-12 を強発現する未熟樹状細胞 (IL-12DC) を調製し、それをがん患者の腫瘍近傍に投与する。この治療により、投与された部位の腫瘍の縮小を図るだけでなく、局所にて獲得された腫瘍抗原が樹状細胞の機能により全身的抗腫瘍免疫反応を惹起することを期待するものである。

臨床試験の開始のためには、使用する臨床グレードのベクターの調製だけでなく、安全性を担保するための前臨床試験が必須であるため、これらを行う。また同時に、さらに強い効果の期待できる治療法の開発の継続は必要であり、そのための基礎研究を行う。

以上を目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、下記の項目の研究を遂行することとした。

(1) IL-12DC を用いた遺伝子細胞療法臨床試験プロトコル (第 I あるいは第 I/II 相) を開始するために必要な、臨床グレードの遺伝子治療用アデノウイルスベクターを作製し、その品質を検証する。

(2) 作製したアデノウイルスベクターを利用した臨床試験を開始するために必要な施設内 IRB および政府機関への申請を指し、臨床試験プロトコル原案を作成する。

(3) 関連技術開発とさらに強い効果の期待できる治療法の開発のための基礎研究を行う。特に、生体内に存在する腫瘍細胞を抗原として利用してより強い全身的抗腫瘍効果を惹起させる方法の開発を目指す。

## 4. 研究成果

上記の研究方法に基づき、下記のような成果を上げた。

(1) 臨床グレードの遺伝子治療用アデノウイルスベクターの作製と品質検証

これまでの経験に基づいて改良を重ねた製造工程を開発し高い品質の試薬を作製した。そして、この試薬が米国 FDA (Food and

Drug Administrations) の定める GMP (Good Manufacturing Procedure) 基準を満たすものか否かの品質検査を行った。

IL-12 遺伝子導入アデノウイルスベクターの調製には、ヒトアデノウイルス 5 型の E1 遺伝子 (nt1 から nt4137) によって形質転換したヒト胎児腎細胞株 (293 細胞) を用いる。このため、293 細胞の E1 遺伝子と IL12 発現ユニットの両端の遺伝子の間で相補的組換えが生じる可能性があり、その結果として増殖性アデノウイルス (RCA) が出現する可能性が考えられる。RCA が試薬に混入した場合、遺伝子の導入程度を制御することが困難になったり、野生型アデノウイルスによる感染の際に見られるような副作用が生ずる可能性があるため、遺伝子治療用試薬に特有のものとして厳密な検査をすることが推奨されている。

そのため、製造工程から最終製品に至るまで、A549 細胞を指示細胞株として RCA の有無を確認した。最終製品に関してはバイオリアランス社で FDA 基準に従って行った RCA 混入試験の結果、 $1 \times 10^{10}$  ウイルス粒子中に RCA の混入はなかった。プロトコルとして想定されている、樹状細胞を用いた ex vivo 法に使用する場合、Replication Competent Adenovirus (RCA) の混入がない試験薬であることが確認され、臨床研究に用いることが可能であることが判明した。

その他の、一般的な検査である細菌等の混入についても検査を行ったが、いずれも陰性であった。以上の結果より、臨床試験実施に当たっての安全性が示唆された。

## (2) 臨床試験プロトコル原案の作成

転移・進行性悪性黒色腫に対する治療介入プロトコルとして原案を作成した。内容の概要としては、アデノウイルスベクターを用いて Interleukin-12 (以下 IL-12) 遺伝子を導入した樹状細胞を腫瘍近傍に投与した場合の a) 安全性の検討 (主要エンドポイント)、b) 樹状細胞と IL-12 によって誘起される局所および全身免疫反応の解析 (副次エンドポイント)、c) 治療効果の評価 (副次エンドポイント) とする。

対象は、有効性が認められている既存の治療法に抵抗性となった皮膚あるいは皮下腫瘍ならびに転移性病変を有する悪性黒色腫患者とする。悪性黒色腫は皮膚のメラノサイト、あるいは母斑細胞が悪性化した腫瘍と考えられ、現在の推定発生数は年間 1,500-2,000 人前後 (人口 10 万人に対して 1.5 人) で、年々増加傾向にある。その予後は極めて不良であり、特に Stage IV の 5 年生存率は 10% 未満である。外科的切除、化学療法、放射線療法のいずれも生命予後に寄与するという報告は未だ認められず、新たな

治療法の開発が切望されている。

以下の条件を満たす患者を対象とする。

- A. 第 IV 期悪性黒色腫症例で、皮膚あるいは皮下腫瘍等の IL12-DC 局所投与が容易な病変を有する患者。第 IV 期以外でも、延命効果が科学的に証明された他の治療法がないと判断された悪性黒色腫患者。
- B. 症例検討会申請時点での年齢が 20 歳以上、75 歳以下の成人。
- C. performance status (PS) が 2 以下の者。
- D. 被験者は効果判定のため治療施行後、少なくとも 12 週間以上の生存が見込める。
- E. 被験者は本臨床試験参加に支障を来さない骨髄機能、肝機能、腎機能を保っていること。その指標としては末梢血白血球数 2,000 以上 15,000 以下、血小板数 100,000/mm<sup>3</sup> 以上、肝逸脱酵素：AST 150, ALT 150 以下、ビリルビン値 3.0 mg/dL 以下、クレアチニン 1.5 mg/dL 以下。
- F. IL12 遺伝子導入樹状細胞の投与は、前治療の影響を除くために前治療（手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、他の免疫療法等）から 4 週間以上間隔をあけて行う。ただし、疼痛コントロールを目的とした対症的治療ならびにアフエレーシスはその規制を受けない。

また、以下の項目に該当する被験者は本研究の対象から除外する。

- A. 妊婦（本臨床研究開始後は、妊娠可能な女性は避妊し、男性は避妊する。）
- B. 授乳中の女性（授乳を中止）
- C. コントロール困難な活動性感染症がある場合。
- D. 臨床試験中に以下の薬剤の投与を必要性があるもの。

副腎ステロイド剤の全身投与。免疫抑制剤の全身投与。

非ステロイド性消炎鎮痛剤は使用を認めるが、薬剤名と用量を記録。

- E. 制御困難な重複癌を有する場合。
- F. 治癒に至っていない外傷性病変を有するもの。
- G. 明らかな出血を伴う潰瘍性病変を有するもの。
- H. 本研究参加 6 ヶ月以内に未承認薬の臨床試験/治験に参加している場合。
- I. 医師、責任医師が不適と認めたもの。

この遺伝子治療臨床試験への参加にあたっては、患者ならびに家族（親族）に対し、文章によるインフォームド・コンセント（第 1 回目）を行い、同意が得られて場合に限り、本臨床研究へ患者登録し治療前検査を開始する。その後、治療検査にて前述の選択基準に合致、さらに除外基準に抵触しないことが明らかになった場合、院内の遺伝子治療臨床研究審査委員会の下に設置された症例検討

会にて適応を評価する。症例検討会で本臨床研究の適応と判断された場合、アフエレーシスを行い、治療可能な末梢血単核球細胞が採取された場合、第 2 回目の症例検討会で本遺伝子細胞治療の適応を検討し、問題がないと判断された場合、患者ならびに家族（親族）に対し、文章によるインフォームド・コンセント（第 2 回目）を行う。同意が得られた場合に限り、IL-12 遺伝子導入樹状細胞の腫瘍内局所投与を細胞数を漸増するドーズ・エスカレーション方式で行い、副作用、治療効果、及び局所・全身的免疫応答性の評価を目的とする。

なお、本研究は医師主導型臨床研究であり、製造販売承認を目的とした治験ではない。

(3) より強い免疫療法を開発するための基礎検討

CTL の効率よい誘導を目指す方法の一つである IL-12-DC の腫瘍内投与法の全身的抗腫瘍効果を更に促進する方法として、抗 CTLA4 抗体の併用療法を考案した。その効果をマウス腫瘍モデルを利用して検討しところ、両者を併用すると、各治療法単独の場合に比べ強い抗腫瘍効果が得られた。

また、生体内においてアポトーシスに陥った腫瘍細胞を樹状細胞が貪食する機構において重要な働きを持つオプソニンの一種である MFG-E8 に着目し、この機能を阻害する抗体を用いて、特異的免疫反応をさらに増強する方法を検討した。この抗体併用療法は、併用する治療法が腫瘍細胞のアポトーシスのある程度引き起こすことのできるものでありさえすれば、同様の抗腫瘍効果を有し、強い免疫反応を惹起できることが示唆された。抗 MFG-E8 抗体投与により、腫瘍抗原の認識に好適な微小環境となり抑制性 T 細胞の出現を阻止でき、液性および細胞性免疫を介した強力な免疫反応が誘導できることが判明した。この強い免疫反応は、MFG-E8 を抗体により阻害することにより、免疫寛容を誘導する経路である Integrin  $\alpha v \beta 3$  を介した腫瘍細胞の獲得が妨げられ、免疫反応を促進する経路である Fc $\gamma$  レセプターを介した獲得が促進されることにより起こることも判明した。

この MFG-E8 についての検討を進めた結果、MFG-E8 は上記のように重要な免疫学的機構を担っているばかりではなく、癌幹細胞 (CSC) の生存・増殖に重要な働きを示すことが明らかとなった。すなわち、骨髄キメラ・システムおよび養子免疫細胞輸注法を用いた我々の研究により、腫瘍内に存在するマクロファージ (Tumor-Associated Macrophage; TAM) の分泌する MFG-E8 は、CSC の腫瘍形成能と抗がん剤に対する抵抗性を促進することが明らかとなった。これは、

MFG-E8 が Stat-3 とヘッジホック経路を IL-6 と協調的に増幅することによって起こる現象であることも明らかにした。

このように、MFG-E8 は多岐にわたる機能によりがん細胞の生存に関与している事が明らかとなったため、これを阻害することによるがん治療に関する期待が更に高まった。この状況を踏まえ、ヒトにおける検討も必要と考え、ヒト MFG-E8 に対するモノクローナル抗体の作製を開始した。

以上に述べたような成果を基に、腫瘍免疫機構を総合的に制御する新しい免疫療法の開発が可能となった。

#### 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 11 件)

- ① Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, Seya T.、TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal Effectors.、Proc Natl Acad Sci U S A、査読有、109 巻、2012、2066-71  
DOI: 10.1073/pnas.1113099109
- ② Nakano K, Kobayashi M, Nakamura K, Nakanishi T, Asano R, Kumagai I, Tahara H, Kuwano M, Cohene JB, Glorioso JC.、Mechanism of HSV infection through soluble adapter-mediated virus bridging to the EGF receptor、Virology、査読有、413 巻、2011、2-18  
DOI:10.1016/j.virol.2011.02.014
- ③ Yamano T, Watanabe S, Hasegawa H, Suzuki T, Abe R, Tahara H, Nitta T, Ishimaru N, Sprent J, and Kishimoto H.、Ex-vivo expanded DC induce donor-specific central and peripheral tolerance and prolong the acceptance of donor skin allografts、Blood、査読有、117 巻、2011、2640-48  
DOI: 10.1182/blood-2010-07-293860
- ④ Hikichi M, Kidokoro M, Haraguchi T, Iba H, Shida H, Tahara H & Nakamura T.、MicroRNA regulation of vaccinia virus for enhanced oncolytic activity and reduced pathogenicity in oncolytic virotherapy、Molecular Therapy、査読有、19 巻、2011、1107-15  
DOI: 10.1038/mt.2011.36
- ⑤ Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, Masutomi K, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Yagita H, Takaoka A, Tahara H.、Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells.、Proc Natl Acad Sci U S A、査読有、108 巻、2011、12425-30  
DOI:10.1073/pnas.1106645108/-/DCSupplemental.
- ⑥ Hayakawa Y, Sato M, Takeda K, Iwakura Y, Tahara H, Irimura T.、Early activation and IFN- $\gamma$  production of tumor infiltrating mature CD27<sup>high</sup> NK cells、Cancer Science、査読有、102 巻、2011、1967-71  
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02042.x . Epub 2011 Aug 21.
- ⑦ Imai T, Oikawa Y, Shimada A, Oguchi S, Takamiya Y, Katsuki T, Okubo Y, Osaki T, Tahara H, Matsushima Y, Miyazaki J, Itoh H.、Proatherogenic effect of interleukin-18 is exerted with high-fat diet, but not with normal diet in spontaneously hyperlipidemic mice、J Atheroscler Thromb、査読有、18 巻、2011、1090-101  
DOI:10.5551/jat.7567
- ⑧ Baba T, Sato-Matsushita M, Kanamoto A, Itoh A, Oyaizu N, Inoue Y, Kawakami Y, Tahara H.、Phase I clinical trial of the vaccination for the patients with metastatic melanoma using gp100-derived epitope peptide restricted to HLA-A\*2402、J Translational Medicine、査読有、8 巻、2010、84-95  
DOI:10.1186/1479-5876-8-84
- ⑨ Jinushi M, Sato M, Kanamoto A, Itoh A, Nagai S, Koyasu S, Dranoff G, and Tahara H.、Milk Fat Globule EGF-8 blockade triggers tumor destruction through coordinated cell-autonomous and immune-mediated mechanisms、Journal of Experimental Medicine、査読有、100 巻、2009、1389-1396  
DOI:10.1084/jem.20082614
- ⑩ Jinushi M, Tahara H.、Cytokine gene-mediated immunotherapy: Current status and future perspectives.、Cancer Science、査読有、100 巻、2009、1389-1396  
DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01202.x
- ⑪ Tahara H. et al. (56 authors in total), Emerging concepts in biomarker discovery; The US-Japan workshop on immunological molecular markers in oncology、Journal of Translational Medicine、査読無、7 巻、2009、1389-1396  
DOI: 10.1186/1479-5876-7-45

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① 田原 秀晃、癌免疫療法の現状と展望(招待講演)、第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2011 年 6 月 24 日、東京都
- ② 田原秀晃、Cancer vaccination using tumor cells *in situ* as the source of tumor antigens、13th Asia Pacific-International Molecular Biology Network (A-IMBN) Symposium (Invited Speaker)、2010 年 11 月 14 日、Chinese Taipei
- ③ Hideaki Tahara、Cancer vaccination using tumor cells *in situ* as the source of tumor antigens、日本癌学会学術総会(シンポジウム)、2010 年 9 月 22 日、大阪
- ④ Sato-Matsushita M, Kanamoto A, Katano H, Itoh A, Tahara H、Translational research of clinical dendritic cell therapy using OK-432 and prostaglandin E2 (Phase I study)、14<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2010 年 8 月 27 日、神戸市
- ⑤ 田原秀晃 生体内に存在する腫瘍細胞を利用した癌免疫療法の開発日本がん免疫学会(シンポジウム)2010 年 7 月 23 日、熊本市
- ⑥ 田原秀晃 生体内がんワクチン療法の開発日本頭頸部癌学会(特別講演)2010 年 6 月 10 日、東京都
- ⑦ Hideaki Tahara、Cancer vaccination using tumor cells *in situ* as the source of tumor antigens、accine Working Group meeting (Invited Speaker)、2010 年 4 月 22 日、米国 NCI (Bethesda, MD)
- ⑧ 米山公康、佐藤まりも、田原秀晃、Significant enhancement of antigen-specific antitumor effects of DNA vaccine with systemic administration of interleukin-23、日本外科学会学術総会、2010 年 4 月 9 日、名古屋市
- ⑨ 米山公康、田原秀晃 他 3 名、Antigen-specific antitumor effects of DNA vaccine are significantly enhanced with systemic administration of interleukin (IL)-23、日本免疫学会総会、2009 年 12 月 4 日、大阪市
- ⑩ 田原秀晃、Cancer vaccination using tumor cells *in situ* as the source of tumor antigens、日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日、横浜市
- ⑪ 佐藤まりも、田原秀晃 他 5 名、Cancer vaccine against malignant melanoma using monocyte-derived dendritic cells stimulated with OK-432 and PGE2、日本癌学会総会、2009 年 10 月 2 日、横浜市
- ⑫ 地主将久、In situ cancer vaccination with anti-MFG-E8 Ab and chemotherapy against solid and hematological tumors.、日本癌学会総会、2009 年 10 月 1 日、横浜市
- ⑬ 地主将久、Milk-fat globule-EGF8 released from myeloid cells is a critical mediator to facilitate tumor invasion and metastasis、17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage、2009 年 7 月 3 日、金沢市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田原 秀晃 (TAHARA HIDEAKI)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：70322071

### (2) 研究分担者

伊藤 精彦 (ITO AKIHIKO)  
東京大学・医科学研究所・講師  
研究者番号：90241984  
金本 彰 (KANAMOTO AKIRA)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：10386021  
佐藤 まりも (SATO MARIMO)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：50401253

### (3) 連携研究者

地主 将久 (JIMUSHI MASAHISA)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授  
研究者番号：40318085  
(2009 年度は研究分担者)