

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430175

研究課題名(和文)ファーストライン化学療法抵抗性胆道がんに対するワクチン療法の基礎及び臨床研究

研究課題名(英文)A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine with low dose cyclophosphamide in biliary tract cancer

研究代表者

由谷 茂 (YUTANI, SHIGERU)

久留米大学・がんワクチンセンター・教授

研究者番号：20279160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：低用量シクロホスファミド(=以下CPA)併用が進行胆道がん患者に対するテラーメイドペプチドワクチンの効果に影響をするかを検討するために、ペプチドワクチン投与前に低用量のCPAを併用する群とペプチドワクチン単独群の無作為比較試験を行い、評価可能な症例が各々24例、25例が登録された。全生存期間、有害事象および免疫学的検索・解析を行った。CPA併用群で有意に生存期間の延長(12.1カ月VS 5.9カ月 Log-rank P=0.004)が認められた。免疫学的解析ではCPA併用群でIL-6の上昇が抑えられ、その結果有意にCTLの誘導が得られたことが理由であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we conducted an open-label randomized phase II study to test whether low dose cyclophosphamide (CPA) could improve antigen-specific immune responses and clinical efficacy of personalized peptide vaccination (PPV) in 49 previously treated aBTC patients. Patients with aBTC were randomly assigned to receive PPV with low dose CPA (100 mg/day for 7 days before vaccination) (PPV/CPA, n=24) or PPV alone (n=25). T cell responses to the vaccinated peptides in the PPV/CPA arm tested to be greater than those in the PPV alone arm. The PPV/CPA arm showed significantly better overall survival (median time: 12.1 vs 5.9 M; HR: 0.376; P=0.004), compared to the PPV alone arm. The PPV alone arm, but not the PPV/CPA arm, showed significant increase in plasma IL-6 after vaccinations, which might be associated with inhibition of antigen-specific T cell responses.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胆道がん ペプチドワクチン 免疫療法 キラーT細胞 シクロホスファミド 血清IL-6値

## 1. 研究開始当初の背景

ほとんどの胆道がんは診断時において切除不能癌であり、予後1年以内と不良である。さらに、抗がん剤抵抗性の胆道がんの予後は6カ月前後である(J Clin Oncol.28:3531-3540,2010)。そのために我々を含めて新規ワクチン療法が試みられているが、免疫抑制に阻まれてその臨床効果は限定的なものにとどまっている(Hum Vaccine Immunother.9:1069-1072,2013)。

胆道癌患者での免疫抑制は、がん局所炎症、抗がん剤治療による骨髄抑制、免疫抑制性のT細胞(Regulatory T cells, 以下 Treg)や骨髄由来抑制細胞(Myeloid derived suppressor cells, 以下 MDSC)など種々の因子や細胞が関与している。これらを克服する新規ワクチン療法の開発が必要であるが、患者数が多く、企業での開発は当面困難である。本学では進行前立腺癌や膠芽腫に対してのテラーメイドペプチドワクチン(Personalized peptide vaccine, 以下 PPV)を独自開発しており、第II相試験までは優れた臨床効果が得られたために(CII.59:1001-1009,2010)現在第III相の無作為比較試験を前立腺がん患者を対象に実施中である。またPPVをファーストライン抵抗性進行胆道がんに対して第II相試験を実施して安全性、免疫反応性、及び一部の症例において臨床効果を確認した(Experimental and Therapeutic Medicine 3: 463-469,2012)。

## 2. 研究目的

本研究では進行胆道がんに対して新期テラーメイドペプチドワクチンの基礎・臨床研究を実施し、真に有効なワクチン療法の科学的根拠を構築する。我々はファーストライン抵抗性胆道がん症例に対して低用量シクロホスファミド(以下 CPA)の経口投与後にテラーメイドペプチドワクチンを開始した症例が、CPA非投与群に比して免疫反応向上と全生存期間延長(382日 vs 149日)を示す事を見出した。(日本癌学会発表)。CPAを併用する意義について、基礎解析が必要と考えられた。症例の蓄積と同時に免疫学的検討を行い、そこに免疫抑制・T細胞疲弊等の関与が示唆される。そこで本研究ではCPA前投与後にテラーメイドペプチドワクチンを実施する症例を2群に無作為に分けて免疫抑制・T細胞疲弊度を解析し臨床効果との相関性を解明する。

## 3. 研究の方法

臨床研究：第2相無作為比較試験；  
従来型ペプチド選択基準でのCPA・PPVと逐次変更型CPA・PPVの第2相無作為比較試験を開始する(各群23例とする)。1年目の目標総症例数は20例とする。無作為比較試験の症例数を各群23例の根拠は、過去PPVのデータより従来型ペプチド選択基準でのCPA・PPVで40%免疫賦活作用増加が期待できるとして、個々の症例の治療前後の相関係数を0.5とした場合。検出率80%で $\alpha=0.05$ とすると必要症例数は41例となる。脱落症例を考慮して全体数を46例とした。過去実績から月1.5~2例の症例確保ができる為、年間20例は可能と考えられる。

基礎研究：免疫抑制及びT細胞疲弊の解明：

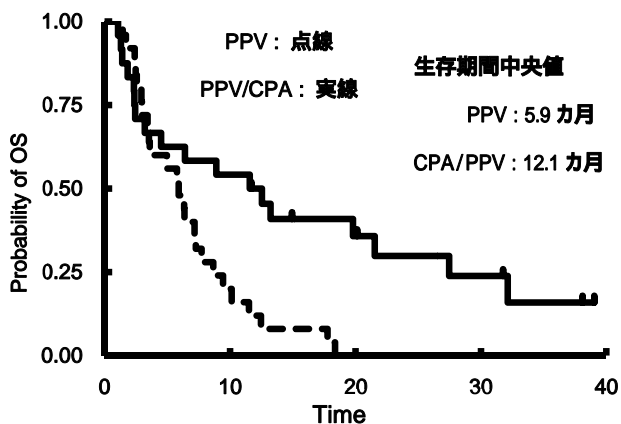
PPV実施症例の投与前後検体(末梢血単核球及び血漿)を用いて以下の研究を実施する。総検体は約100例(当該研究症例が42例と過去の症例が48例)である。取分け臨床効果との関連性から、PPV療法に抵抗性を示した患者におけるTreg, Breg, MDSC、及びハプトグロビン(SNP及び蛋白量)の関与。PPV療法にて一程度の臨床効果が得られた症例におけるCTLA-4、PD-1、PDL-1分子の関与、PPV療法にて明らかな効果がえられたがその後増悪した症例におけるT細胞疲弊度の関与に注目して解析する。研究手法はすでに報告済みであるので簡単に記載する。Treg(CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells)、MDSC(CD33+CD15+MDSCs)、疲弊T細胞(Tim-3+, Lag3+, CD28+)、チェックポイント分子(CTLA-4、PD1、PDL-1、BTLA)陽性T細胞の発現頻度はFACSにて解析する。ペプチド特異的CTL活性はELISPOT法、ペプチド特異的IgG抗体はルミネックス法を用いて測定する。またハプトグロビン等の可溶性分子群はELISAを用いて解析する。ハプトグロビンゲノタイプはPCRにて遺伝子増幅後シーケンス解読する。統計処理は、SAS社製統計ソフトJMP10(10.02)を用いる。

## 4. 研究成果

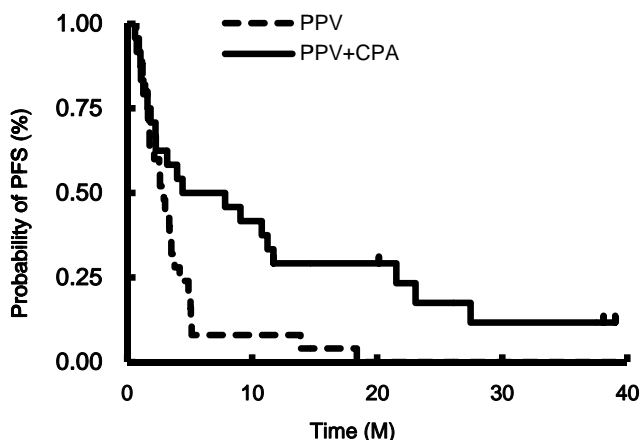
(臨床試験結果について)

今回行った進行胆道がん患者55例がプロトコルにエントリーした。これらの内評価対象となったのは、シクロホスファミド併用例24例とペプチドワクチン単独例25例の計49例であった。また、当初予定していたペプチド選択法を毎クールごとに変化させる逐次変更型のプロトコルは従来のペプチド選択型のプロトコルに於いてCPA/PPV併用群がPPV単独群に比べ中間評価の時点で全生存期間が明らかに上回っていたため、同プロトコルの症例蓄積を優先することとした。単一プロトコルとなったが、CPA併用、PPV単独両群における患者背景は、年齢、性別、PS、臨床病期、前化学療法のレジメ数など有意な差は認められなかった。有害事象に関しては、シクロホスファミド併用群に於いて、併用によるSAEは認められず、全体に於いてもペプチドワクチンそのものによるSAEは認められなかった。主な有害事象はワクチン皮下注射部位の発赤・硬結・搔痒感で、その程度はCTCAEグレードで最高でGrade2であり、本治療法は安全に遂行できるものと判断した。

CPA併用の臨床効果を評価するために、2群間で生存期間、無増悪生存期間について検討した。生存期間中央値：CPA併用群；12.1カ月、PPV単独群；5.9カ月、統計学的解析ではHR:0.376(95%CI:0.189-0.747) Log-rank test : $P=0.004$ 、免疫療法で多く用いられるHamington-Fleming法による解析では $P<0.001$ であり、CPA併用群で有意に生存期間の延長が認められた。(図1)



(図1: CPA併用群とワクチン単独群の生存曲線)



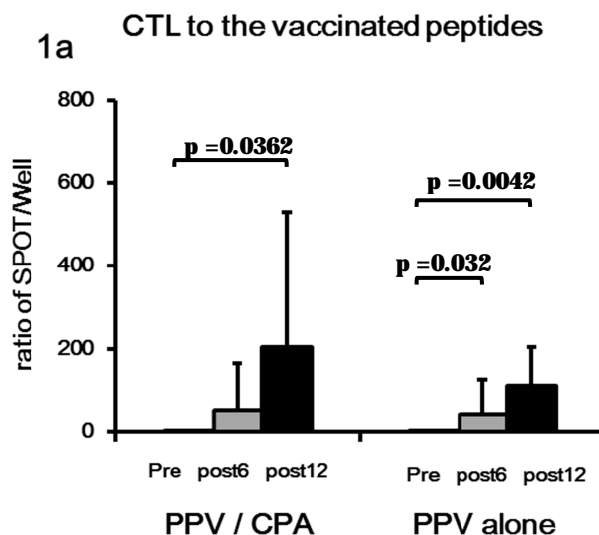
(図2:無増悪生存期間)

また、無増悪生存期間も比較した(図2)が、統計学的に HR:0.427 (95%CI:0.224-0.813)、Log-rank test P=0.008、Hamington-Fleming test : P<0.001であった。これらから、PPV 単独より CPA を併用した群で有意に無増悪生存期間の延長が認められた。また、基礎解析として免疫学的検索を CTL 活性を IFN- ELISPOT 法によって、抗ペプチド IgG 抗体を LUMINEX 法にて測定した。

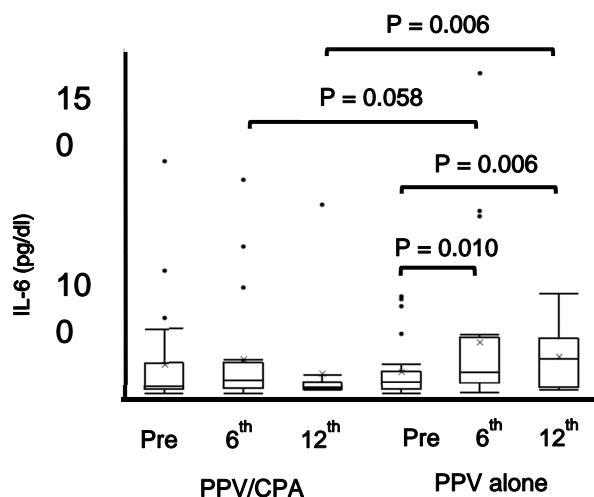
ELISPOT (Spots 数) は CPA 併用群、単独群共に上昇していたが併用群で有意に上昇し、それは 2Kur 終了時点で顕著であった(図4)。一方でペプチド特異的 IgG 測定では両群共に上昇しており、その差は認められなかった。これらから、免疫学的検索では細胞性免疫に於いて CPA 併用群が有意に良好な結果であった。

次の基礎的解析として、予定していた Treg、MDSC の測定を行った。その結果、Treg は CPA 併用群でも単独群でも有意な差は認められず、CPA による Treg 抑制効果は認められなかった。MDSC に於いては、G-MDSC ではワクチン単独群の 1Kur 終了時に減少している他は有意な変化は認められなかった。また M-MDSC では CPA 併用群の 1Kur 終了時のみ上昇していた。これらから、MDSC に関しては CPA 併用では抑制効果が認められず、むしろ単独群より

上昇している結果となった。一方、複数測定したサイトカインの内、IL-6 に於いては CPA 併用群では単独群と比べ IL-6 の上昇を抑制している結果であった(図3)。さらに可溶性分子であるハプトグロビンを測定したが、ワクチン投与前のハプトグロビン値が高い群で有意に予後が悪い傾向にあったが、CPA 併用によるハプトグロビン値の変化に特徴は見いだせなかった。このハプトグロビンの知見は以前からのものと差異はなく、従ってゲノムタイプの解読は不要と考え割愛した。



(図3:CPA併用群とワクチン単独群のCTL活性)



(図4:CPA併用によるIL-6抑制)

(新しく見出された知見について)  
ペプチドワクチンに CPA を併用する事(低用量でワクチン投与前 7 日間のみ服用する用法)はペプチドワクチンの効果を増強させる可能性が示唆された。その科学的根拠は、従来 CPA の作用として言われている Treg の抑制や MDSC の抑制(文献 1-6)によるものではなく、IL-6 の抑制によるところ(文献 2.7.8)が考えられた。今回併用した CPA の用法用量が Treg を抑制するためには少量であった可能性が

あると考えられる。一方で今回 IL-6 の上昇を CPA が抑制し、このことが 2Kur 終了時の CTL のより強い誘導に寄与し、その結果生存期間の延長につながった可能性が考えられた。

(今後の更なる研究課題について)

従来言われてきた CPA が免疫療法に寄与する際のメカニズムと今回の我々の得た結果が少々異なっていた。胆道がんに対するペプチドワクチン療法では以前の検討でも投与前の IL-6 値が予後に関係するという結果を報告したが、今回の検討でも CPA により IL-6 値の上昇を抑制することで CTL の誘導が得られている。

他のがん種(大腸がんなど)でも IL-6 値が予後に影響するとい知見を得ており、今後は ワクチン投与前 IL-6 値が高い症例に対して抗 IL-6 抗体投与後にワクチンを投与する、IL-6 値が低い患者に対しては CPA を併用するという所謂 2 段階の試験を組み、CPA と IL-6 の関係をより深く検討することが望ましい。

また、ペプチドワクチンと併用する CPA の適切な用法用量を検索するべく、今回の 100 mg × 7 日間と 50 mg × 42 日間の比較を行う事も検討課題である。

< 引用文献 >

1. Noguchi M, Moriya F, Koga N et al. A randomized phase II clinical trial of personalized peptide vaccination with metronomic Low-dose cyclophosphamide in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Immunother* 2016; 65:151-160
2. Sistig A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zivogel L. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementation for vaccine design. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 369-383
3. Le DT, Jaffe EM. Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: a current perspective. *Cancer Res* 2012; 72: 3439-3444
4. Madono MT, Quinn M, Plebanski M. Low dose cyclophosphamide: mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat Rev* 2016; 42: 3-9
5. Abu Eid R, Razavi GS, Mkrtychian M, Janik J, Khleif SN. Old-school chemotherapy in immunotherapeutic combination in cancer, a low cost drug repurposed. *Cancer Immunol Res* 2016; 4:377-382
6. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A et al. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 2012; 18: 1254-1261
7. Ghirighelli F, Menard C, Puig PE et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+ CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 641-648

8. Ge Y, Domschke C, Stoiber N et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized cancer patients; immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 353-362

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ]

Takahisa Shirahama, Daisuke Muroya, Satoko Matsueda, Akira Yamada, Shigeki Shichijo, Masayasu Naito, Takuto Yamashita, Shinnjiro Sakamoto, Koji Okuda, Kyogo Itoh, Tetsuro Sasada and Shigeru Yutani

A Randomized phase II trial of personalized peptide vaccine with low dose cyclophosphamide in biliary tract cancer

*Cancer Science*(査読あり) 2017,vol 108, no.5, 838-845

[ 学会発表 ]

12<sup>th</sup> CIMT (The Association for Cancer Immunotherapy) Annual Meeting. May 7, 2014  
Maintz, Germany

第 29 回 バイオセラピー学会 学術集会 総会 Dec 2, 2016

[ その他 ]

ホームページ

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/cvc/>

## 6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者

由谷 茂 (YUTANI Shigeru)

久留米大学・がんワクチンセンター・教授

研究者番号 : 20279460

( 2 ) 研究分担者

七條茂樹 (SHICHIJO Shigeki)

久留米大学・がんワクチンセンター・准教授

研究者番号 : 30080592