

総説

難治性固形癌に対する癌抗原ペプチドパルス樹状細胞を用いた癌ワクチン療法 トランスレーショナルリサーチとしての展開

西岡安彦¹⁾, 中川達夫²⁾, 水口和生³⁾, 曾根三郎¹⁾

徳島大学医学部生体防御腫瘍医学講座分子制御内科学分野¹⁾, 徳島大学病院臨床試験管理センター²⁾, 同薬剤部³⁾

(平成15年10月20日受付)

(平成15年11月4日受理)

はじめに

手術不能の進行肺癌に対する標準的治療は化学療法、放射線療法を中心とした集学的治療が用いられる。一方、癌免疫療法として非特異的免疫賦活剤 (BCG, N CWS, OK 432など), インターロイキン (interleukin: IL) 2, インターフェロン (interferon: IFN), LAK (lymphokine-activated killer 細胞や腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes: TIL) を用いた受動免疫療法が展開されてきた。しかしながらこれらの免疫療法には既存の治療法以上の臨床効果が確認できなかったことから一部の血液腫瘍や特殊な腫瘍以外には広く適応されるには至っていない。

一方、1991年の Boon らによる細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocytes: CTL) が認識する腫瘍抗原 MAGE (melanoma antigen) の同定¹⁾は、「癌に対する特異的免疫応答は存在するのか?」という命題に対する明確な解答であるとともに、これらの癌抗原を用いた能動免疫療法という新たな展開につながる大きな発見であった。現在多くの施設で抗原エピトープである癌抗原ペプチドを用いた癌ワクチン療法が進行中である。また、同時に高い抗原提示能を持つ樹状細胞の培養法が確立され²⁾, 癌抗原提示樹状細胞を用いた特異的免疫療法としての臨床試験も展開されている。われわれは、平成14年12月より徳島大学医学部倫理委員会の承認のもと「肺癌に対する癌抗原ペプチドパルス樹状細胞を用いた癌ワクチン療法」の第Ⅰ相臨床試験を開始した。本稿では、このような樹状細胞療法の現状と問題点およびわれわれの行っている臨床試験の経過について述べたい。

1. 樹状細胞の特徴と癌免疫療法への応用

樹状細胞は1973年 Steinman ら³⁾により脾臓中に同定された抗原提示細胞であるが、1992年頃より *in vitro* での培養法が確立され、癌免疫療法への応用がマウスモデルで検討されるとともに⁴⁾, 臨床応用へと展開されてきた。樹状細胞は、抗原提示に必要な MHC クラス I, クラス II 分子や共刺激分子である CD40, CD80, CD86 を高発現していること, Th1 誘導に必要な IL 12 の分泌能が高いこと, さらに末梢組織で抗原を取り込んだ後, 所属リンパ節へ移動する能力を有することなどから専門的抗原提示細胞と考えられている。これまでも欧米を中心に樹状細胞を用いた癌免疫療法が試みられている。図1に示すように、樹状細胞療法にはさまざまなアプローチが知られている⁵⁾。樹状細胞の採取法として、末梢血から直接樹状細胞前駆細胞を純化する方法、末梢血単球から granulocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) と IL 4 を用いて、また骨髄の CD34 陽性血液前駆細胞から GM-CSF と tumor necrosis factor- α (TNF- α) を用いて樹状細胞を誘導する方法がある。癌抗原の処理方法としては、癌抗原ペプチド、蛋白あるいは遺伝子を用いる方法や、癌細胞の溶解物を用いる方法、癌細胞と樹状細胞を融合して用いる方法などがある。臨床では、末梢血単球から誘導した樹状細胞に癌抗原ペプチドをパルスした後、癌患者に免疫する手法が用いられる場合が多い。実際にこれまでの報告では GM-CSF と IL 4 で誘導した未熟樹状細胞を用いたメラノーマに対する臨床試験が多い。今回われわれは、肺癌患者を中心に、より抗原提示能の高い成熟樹状細胞を用いた臨床試験を計画した。

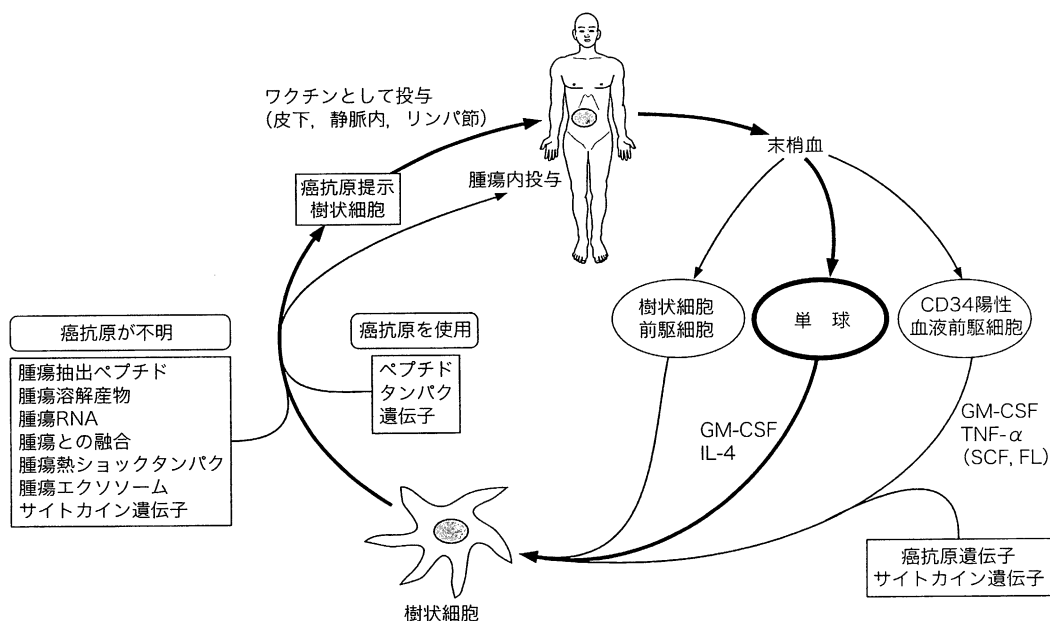


図1 樹状細胞を用いた癌免疫療法
 樹状細胞の誘導法には、CD34陽性造血幹細胞、末梢血単球、末梢血樹状細胞を用いる方法がある。現在、臨床試験には単球由来樹状細胞が使用される場合が多い。癌抗原処理方法として多くの方法が報告されているが、臨床試験では主に癌抗原ペプチドが使用されている。

2. 細胞療法による医師主導臨床試験の問題点とその克服

細胞療法による医師主導の臨床試験を行う上で、いくつかの大きな問題点がある。

平成10年に施行された新GCP (Good Clinical Practice) ICH (International Conference on Harmonisation) を受け、本邦においても倫理性と科学性を担保した質の高い臨床試験が要求されている。新GCPは医師主導の臨床試験に対しても適応されることから、細胞療法を進めるには臨床レベルの専用細胞培養施設の整備や、細胞培養に用いるGMP (Good Manufacturing Practice) gradeの試薬の準備が必要となる。しかしながら、このような基盤整備には膨大な費用が必要であり、現状では全国的にみても細胞療法が可能な施設は数施設に限られる。このような中、徳島大学病院においては平成14年11月に臨床試験管理センター生物由来製品調整室が整備された。同時に、文部科学省高度先進医療開発経費の援助も得られたことから学内倫理委員会の承認のもと平成14年12月より難治性固形癌を対象にした樹状細胞を用いた癌ワクチン療法の臨床試験を開始した。現在、多くの診療科の協力を得て臨床試験を進めている。

3. 対象患者の選択基準

本臨床試験においては、対象癌患者の癌組織にターゲットとなる癌抗原が発現していることが必須の条件となる。今回ターゲットとした癌抗原はMAGE 3である。MAGE 3はメラノーマのみならず多くの癌種において発現がみられること、また膀胱癌、消化器癌などに対する治療において一部有効例が報告されていることからその他の癌種においても格好のターゲットとなる可能性がある^{6,7)}。従って本臨床試験における対象癌種を肺癌をはじめとする難治性固形癌 (卵巣癌、腎癌、悪性黒色腫、骨軟部腫瘍など) とした。癌組織のMAGE 3の発現はreverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって検討した (図2)。また癌抗原は最終的に9個のペプチドとしてMHCクラスI拘束性に提示されるため、癌患者のHLAの型が使用するペプチドの拘束性と一致する必要がある。一般的に、日本人は約60%にHLA A*2402を有するという特徴から、癌抗原ペプチドの同定もHLA A*2402に関して進められる場合が多い。今回使用するMAGE 3抗原ペプチドであるIMPKAGLLI⁸⁾もHLA A24拘束性ペプチドであることから、HLA A*2402陽性の患者を対象とした。その他の患者選択の基準として、標準的治療が無効であること、

年齢20～75歳で performance status(PS) が0～2であること、3ヵ月以上の予後が見込めることなどがある。

4. 本臨床試験の特徴と樹状細胞誘導法

既に述べたようにこれまでの樹状細胞療法は、末梢血単球からGM-CSFとIL-4を用いて誘導した未熟樹状細胞を用いた報告が多い。しかしながら、樹状細胞の抗原提示能は、未熟樹状細胞からTNF-αやlipopolysaccharide(LPS)により誘導された成熟樹状細胞において明らかに高いことが知られている。また、最近OK-432(Chugai

pharm. Co., Ltd.)で誘導した成熟樹状細胞はTNF-αに比べて細胞障害性T細胞(CTL)誘導効果が高いことが報告されている⁹⁾。そこで、本臨床試験では未熟樹状細胞から菌体成分であるOK-432を用いて誘導した成熟樹状細胞を使用した。図3に本臨床試験における樹状細胞誘導法を示した。樹状細胞誘導に必要なGM-CSF(NCPC GeneTech), IL-4(R&D)はGMP gradeあるいは準GMP gradeで作成されたサイトカインであり、OK-432は臨床で治療薬として使用されている薬剤である。文書にて同意を得た癌患者に対してアフエーシスを施行し単核球を採取した。総処理量は3000～5000ml

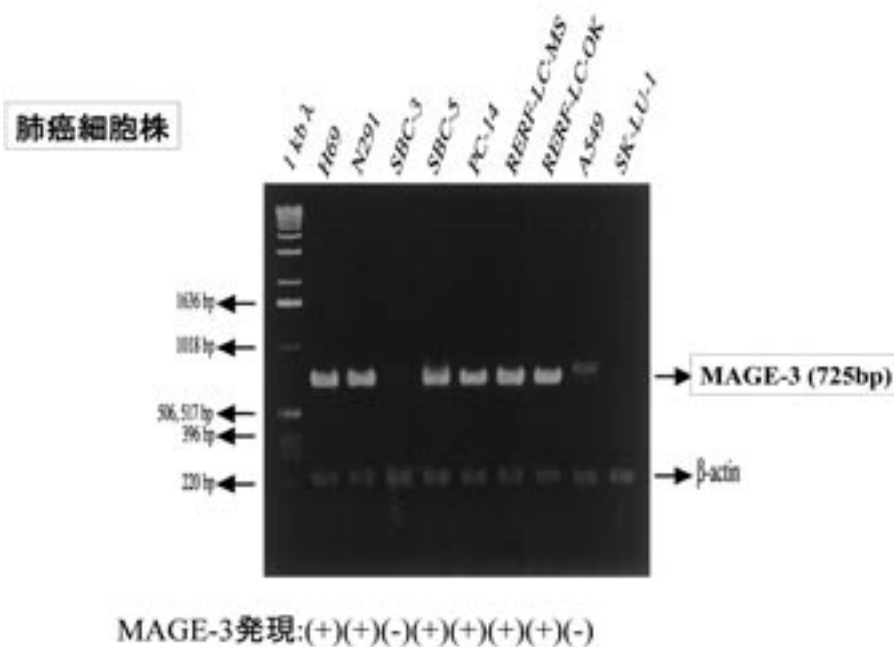


図2 RT-PCRによる癌抗原(MAGE-3)発現の検討
 肺癌細胞株より total RNA を抽出し、MAGE-3 特異的プライマー (sense: TGGAGGACCAGAGGCCCCCC, anti-sense: GGACGATTATCAGGAGGCC TGC)を用い、RT-PCR キット(タカラ)でPCR反応を行う(反応条件: 94℃, 1分; 70℃, 1分; 72℃, 2分(35回))。2%アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色にてMAGE-3に特異的な725bpのバンドを検出した。

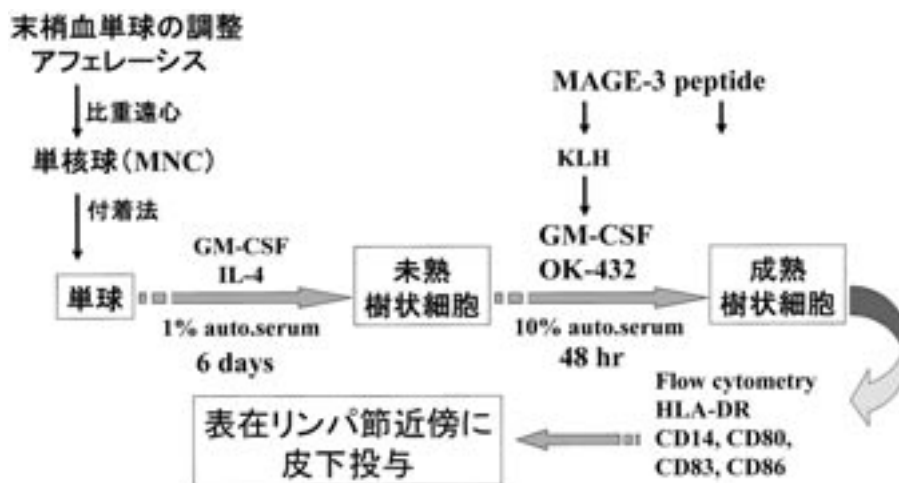


図3 樹状細胞ワクチンの誘導法

で、単核球 $6 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^9$ 個が採取できた。生物由来製品調整室において細胞培養を開始し、残りの細胞は以後のワクチン準備のため液体窒素内に凍結保存した。単核球をプラスチック培養皿に付着させることにより単核球を純化し、GM-CSF 50ng/ml, IL-4 50ng/ml を添加し、1%自己血清存在下のRPMI1640培地を用いて培養を開始した。培養6日目にピペッティングにより未熟樹状細胞を回収し、改めてGM-CSF, IL-4, OK432と癌抗原ペプチド(HLA-A24拘束性MAGE-3ペプチド: IMPKAGLLI, MPS社)を50μg/mlで添加し、10%自己血清添加RPMI1640培地で2日間培養し成熟樹状細胞を誘導した。同時に、コントロール抗原としてKLH(Keyhole Limpet Hemocyanin: Calbiochem)を50μg/mlで添加した。最終的に回収した樹状細胞に再度MAGE-3ペプチドをパルスし、洗浄後患者の皮下リンパ節近傍に投与した。培養ごとに品質管理として樹状細胞の表面抗原の解析と培養液中のエンドトキシン、マイコプラズマの有無をチェックした。

5. 治療プロトコールと評価法

本臨床試験は、第I相臨床試験でありprimary endpointは安全性と有害事象の評価である。樹状細胞の投与数を、1回 1×10^7 個(グループ1), 3×10^7 個(グループ2), 1×10^8 個(グループ3)の3グループの容量増加試験とした。Secondary endpointが、免疫学的評価と臨床効果である。樹状細胞ワクチンは2週ごとに投与し計4回投与を1クールとした。最終投与後2週目に評価を行い、NC以上の効果が認められた場合には継続投与とした。

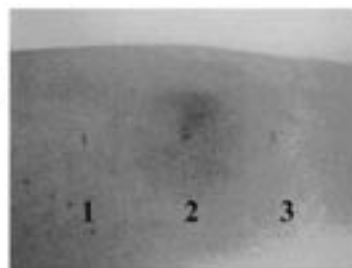
特異的免疫療法の特徴は、免疫療法の評価が科学的に検証可能である点にあり、この点で従来型の免疫療法と大きく異なっている。われわれの臨床試験においても、使用したペプチドに対する遅延型皮膚反応(DTH)および細胞障害性T細胞活性、MHCテトラマーによる免疫反応をモニタリングとして行っている(図4)。

6. 臨床試験の現状と今後の展開

平成15年6月10日現在、樹状細胞の投与量1回 1×10^7 個のグループに3例(肺癌2症例, メラノーマ1症例)

1) 遅延型皮膚反応(DTH)

PBS 100μl, ペプチド10μg/100μl, KLH10μg/100μlを皮内投与
48時間後に判定(陽性:発赤>10mm, 硬結>5mm)



結果: 1. 陰性、2. 陽性、3. 陰性

2) MHC tetramer

MAGE-3(IMPKAGLLI)/HLA-A*2402/PE
(MBL, ProIMMUNE)

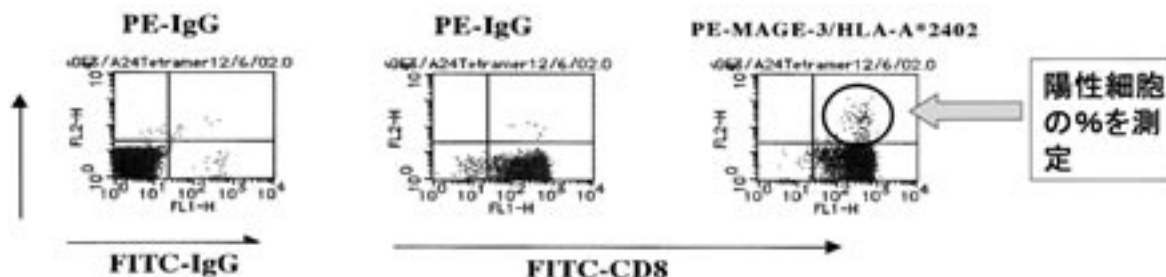


図4 免疫学的モニタリング法

- 1) 遅延型皮膚反応 (delayed type hypersensitivity: DTH): 症例における治療後のDTH反応。
- 2) MHCテトラマー (MHC tetramer): HLA/抗原ペプチド複合体の4量体(テトラマー)を作成することで、安定してT細胞に結合することから、蛍光標識したテトラマーを用いてフローサイトメトリー法で抗原特異的T細胞数を測定する方法。図は、FITC標識抗CD8抗体との二重染色。

表1 グループ1 (1回1×10⁷細胞投与)症例の結果

症例	有害事象	DTH		Tetramer + CD8T 細胞 (%)		腫瘍マーカー 低下	臨床効果
		KLH	MAGE 3	(治療前)	(治療後)		
症例	皮膚 (Grade 1) 発熱 (Grade 2)	+	-	0.09	0.10	+	PD
症例	皮膚 (Grade 1) 発熱 (Grade 1)	+	+	0.41	0.30	-	PD
症例	皮膚 (Grade 1) 発熱 (Grade 1)	+	-	0.05	0.06		PD

PD: progress disease

の進行癌患者がエントリーした。3例のまとめを表1に示す。有害事象は, grade 2までの発熱と grade 1までの投与局所の皮膚反応(発赤)であった。1例で癌抗原ペプチドに対するDTHが陽転したが臨床効果はPDであった。また, 1例で血清腫瘍マーカーの低下が見られた。以上から, 現在までのところOK 432を用いて誘導した成熟樹状細胞を用いた癌ワクチン療法は安全に実施可能と思われる。今後, 樹状細胞の投与量を増やして検討を進める予定である。

おわりに

これまでの報告では, 樹状細胞療法を用いた癌ワクチン療法は当初期待されていた程の有効率は得られていない。しかしながら, 実際に腫瘍特異免疫が誘導され, 一部の患者に腫瘍退縮がみられているのも事実である。従って, 今後も臨床試験を進めると同時に免疫学的モニタリングによってどのような症例に有効であるかを詳細に検討することが重要であろう。また, 樹状細胞ワクチンに関しては, 樹状細胞の source, 樹状細胞の誘導法, 癌抗原の処理方法, 投与量, 投与ルート, 投与スケジュールなどまだまだ不明の点が多い。今後もより効果的な樹状細胞を確立するよう基礎・臨床の両面から更なる検討が必要と思われる。

謝 辞

本臨床試験を開始するにあたり生物由来製品調整室の整備にご尽力いただいた徳島大学病院長の香川 征教授をはじめ臨床試験にご協力いただいた各診療科の先生方に深謝致します。

文 献

- 1) van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., *et al.* : A gene encoding antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 : 1643 ,1991
- 2) Steinmann, R. M., Cohn, Z. A. : Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.*, 137 : 1142 1162 ,1973
- 3) Sallusto, F., Lanzavecchia, A. : Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 179 : 1109 1118 ,1994
- 4) Nishioka, Y., Hirao, M., Robbins, P. D., Lotze, M. T., *et al.* : Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin12. *Cancer Res.*, 59 : 4035 4041 ,1999
- 5) 西岡安彦, 曾根三郎 : 肺癌の特異的免疫療法, 内科 88 : 873 877 2001
- 6) Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., Tahara, K., *et al.* : Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 7 : 2277 2284 2001
- 7) Nishiyama, T., Tachibana, M., Horiguchi, Y., Nakamura, K., *et al.* : Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen A24 specific MAGE 3 peptide.

- Clin. Cancer Res., 7 : 23-31, 2001
- 8) Tanaka, F., Fujie, T., Tahara, K., Mori, M., *et al.* :
Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes
with a MAGE-3 encoded synthetic peptide presented
by human leukocyte antigen A24. *Cancer Res.*,
57 : 4465-8, 1997
- 9) Nakahara, S., Tsunoda, T., Baba, T., Asabe, S., *et al.* :
Dendritic cells stimulated with a bacterial product,
OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes
specific to tumor rejection peptide. *Cancer Res.*,
63 : 4112-4118, 2003

Vaccination of lung cancer patients with dendritic cells pulsed with tumor antigen peptides

Yasuhiko Nishioka¹⁾, Tatsuo Nakagawa²⁾, Kazuo Minakuchi³⁾ and Saburo Sone¹⁾

¹⁾Department of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, Course of Medical Oncology, The University of Tokushima School of Medicine, ²⁾Clinical Trial Center for Developmental Therapeutics, and ³⁾Division of Pharmacy, Tokushima University Hospital, Tokushima, Japan

SUMMARY

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells. DCs pulsed with peptides of tumor-associated antigens (TAA) have been used in cancer immunotherapy. An early clinical study demonstrated the safety of these trials, but the clinical effect was not sufficient. Most studies have used immature DCs generated from peripheral blood monocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4). Here, we conducted phase I clinical trial of active immunotherapy using mature DCs induced by a streptococcus derivatives OK-432. DCs were generated from blood monocytes by culturing with GM-CSF and IL-4 for 6 days and then GM-CSF, IL-4 and OK-432 for 2 days. Before injection, DCs were pulsed with MAGE-3 peptide (IMPKAGLLI), which is restricted for HLA-A*2402, and keyhole limpet hemocyanin (KLH) as a control antigen. We selected HLA-A*2402-positive patients who had advanced solid tumors expressing MAGE-3 mRNA. DC vaccine was administered subcutaneously every 2 weeks for a total of four vaccinations in a dose-escalation design at the dose level per cohort of 0.1 (Group 1), 0.3 (Group 2) and 1 (Group 3) $\times 10^8$ DCs/injection. Immunological monitoring with delayed type hypersensitivity (DTH) reaction and MHC tetramer was performed. Three patients with advanced solid tumor (two lung cancer and one melanoma patients) were so far enrolled in Group 1 of this study. This protocol was well tolerated. A mild fever (Grade 1 to 2) and local reaction of injection site (erythema and induration: Grade 1) were found in all patients. DTH for MAGE-3 peptide became to be positive after fourth vaccination in one patient. The decrease of tumor marker (CEA) was found in one patient. However, clinical responses in all three patients were not observed. These results indicated that vaccination with mature DCs (0.1 $\times 10^8$ DCs/injection) was safe and feasible, but further analysis using the higher dose of DCs was required to assess the immunological and clinical responses.

Key words : dendritic cells, MAGE-3, mature DCs, OK-432, HLA-A*2402