

「第21回日本臨床環境医学会学術集会特集」

総説 シンポジウム

免疫療法：特に肺癌に対する免疫療法の可能性

安元公正¹⁻⁴⁾ 宗哲哉²⁾ 能勢直弘³⁾
内藤恵子⁴⁾ 富山舞⁵⁾ 前川隆治⁵⁾

- 1) 産業医科大学 名誉教授
- 2) 社会医療法人財団池友会新小文字病院
- 3) 社会医療法人財団新行橋病院
- 4) 医療法人社団混志会瀬田クリニック福岡
- 5) 株式会社メデイネット、先端医学研究所

Cancer immunotherapy; with special reference to historical view points and its possibility in fighting lung cancer

Kosei Yasumoto¹⁻⁴⁾ Tetsuya So²⁾ Naohiro Nose³⁾
Keiko Naitoh⁴⁾ Mai Tomiyama⁵⁾ Ryuji Maekawa⁵⁾

- 1) Emeritus Professor, University of Occupational and Environmental Health
- 2) Shinkomonji Hospital
- 3) Shinyukuhasi Hospital
- 4) Seta Clinic Fukuoka
- 5) Medinet Medical Institute, MEDINET CO.,Ltd.

要約

癌に対する免疫療法の歴史的背景と潮流、肺癌に対する免疫療法で国際的に第3相試験が進んでいるものについてその第2相試験での結果及び第3相試験の目標症例数、最終評価項目について記した。また我々が取り組んでいる自己腫瘍 lysate を用いる樹状細胞ワクチン療法についても現状を概説した。

このところさかんになってきた immune checkpoint blocker による治療の効果についても報告された情報を網羅した。

最後に新しい潮流として T cell receptor (TCR) gene transduction を行ったリンパ球による養子免疫療法の可能性や Chimeric Ag receptor を導入したリンパ球による養子免疫療法の可能性に言及した。

(臨床環境 22: 18-24, 2013)

《キーワード》肺癌免疫療法、肺癌特異抗原、DC ワクチン療法、免疫チェックポイント阻害、TCR 移入リンパ球

別刷請求宛先：安元公正

〒800-0057 北九州市門司区大里新町2-5 新小文字病院

Reprint Requests to Kosei Yasumoto, Shinkomonji Hospital, Dairi Shinmachi 2-5, Mojiku, Kitakyushu 800-0057, Japan

Abstract

The historical background and current direction of cancer immunotherapy have been overviewed. Among them has been a special focus on lung cancer immunotherapies, which have been undergoing global phase III trials, such as L-BLP25 (MUC 1), MAGE A3 protein, and Belagenpumatucel-L (allogeneic lung cancer cell lines). We also introduced our new trial using autologous tumor lysate-pulsed DC as a surgical adjuvant therapy (Umin-CTR: 000005776). Finally, results from the new methods to block immune checkpoints, such as anti-CTLA4 Ab, anti-PD-1 Ab, and anti-PD-L1 Ab, and the adoptive transfer of gene manipulated T lymphocytes, such as TCR transduced T cells and chimeric Ag receptor transduced T cells have been examined.

(Jpn J Clin Ecol 22 : 18 – 24, 2013)

《Key words》 lung cancer immunotherapy, lung cancer specific antigen, dendritic cell (DC) vaccination, immune checkpoint block, T cell receptor (TCR) transduction

I. はじめに

癌に対する治療法には外科療法、放射線療法、化学療法が3大療法として考えられており、第4の治療法として免疫療法が考えられている。その考え方は Macfarlane Burnet らにより1950年代に提唱された“癌に対する免疫監視機構”による¹⁾。彼らは移植片の拒絶と同様の免疫が自己に発生する新しい抗原を持った腫瘍細胞に対しても発動して、発生の初期にこれらの細胞を拒絶して生体の恒常性が保たれていると推定している。腫瘍細胞は生体内で頻繁に発生しているがこの免疫監視機構により多くが早期に拒絶されるために臨床的な癌にまで増殖するものは少ないと考えた。このことで Burnet は1960年にノーベル賞を受賞している。その後の免疫学の進歩で癌に対する生体防御の全体像が自然免疫系と獲得免疫系に分類されて次第に明らかにされて現在に至っている。自然免疫系にはNK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、樹状細胞(DC)等がかかわり、とくにDCにはToll-like receptor (TLR)が存在して対応する danger signalと遭遇すると成熟・活性化されてT細胞を主役とする獲得免疫を誘導する。このような免疫系を治療に応用しようというのが「がんの免疫療法」である。

II. がん免疫療法の歴史から学ぶ (表1)

がんの免疫療法が文献上に登場したのは1893年のColey's toxinが最初といわれている。New YorkのSloan Kettering Cancer Centerの外科医であっ

たWilliam B Coleyは丹毒の菌を悪性腫瘍に直接注射をすることで腫瘍の退縮がみられることを報告している²⁾。その後この方法はヨーロッパに伝わったが治療法として認可されることはなかった。1960年代の終わりごろにBCG生菌が悪性黒色腫や白血病、肺癌等に米国、フランスなどで盛んに使われるようになった³⁻⁵⁾。日本ではBCGの持つアジュバント活性の研究を盛んに行っていた山村雄一大阪大学教授のグループがBCG-cell wall skeleton (BCG-CWS)の抗腫瘍効果を証明し、これを用いた治療が肺癌、胃癌、白血病などで試みられた⁶⁾。その後この研究はNocardia rubraのCWS⁷⁾へとすすめられたが効果の再現性、proof of conceptに疑問が投げかけられて薬として認可されることはなかった。これらの治療法は非特異的免疫療法としてマクロファージを主体とする抗腫瘍効果による考えられていた。日本ではこのころからStreptococcus pyogenesをペニシリン処理したものがピシバニールとして使われだし⁸⁾、菌糸類・猿の腰掛からの多糖体がPSKとして登場した。

このような中、1975年にはCesar Milsteinがモノクローナル抗体を作るHybridoma techniqueを発明し⁹⁾、免疫学は飛躍的に発展することとなった。1978年にはRalph M Steinmanらによる樹状細胞(DC)の発見があり¹⁰⁾その後このDCが獲得免疫の発動・維持や喪失に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。1985年になると遺伝子工学の発展により免疫反応の過程で重要な

役割を担う種々のサイトカインの遺伝子がクローニングされて IL-2¹¹⁾、や IL-12、IFN などが大量に手に入るようになった。中でも IL-2 の存在下でリンパ球を培養すると増殖反応とともに抗腫瘍活性を獲得する lymphokine activated killer cell (LAK cell) ができる事が明らかにされ悪性黒色腫や腎細胞がんでの効果が証明された¹²⁾。長い間不明であった人の癌に抗原性があるのかという命題に回答が与えられたのは1991年の van der Bruggen, Thierry Boon らの melanoma 患者の CTL から自己腫瘍細胞で同定された cancer testis antigen (がん精巣抗原) : MAGE (melanoma antigen gene) が最初であった¹³⁾。これ以来この方法 cDNA expression cloning method を用いて多くの癌で腫瘍特異抗原が同定されて抗原を用いたワクチン療法が世界を席卷した。われわれも自己肺癌培養細胞株を樹立して肺癌関連抗原を多数同定した (表2)¹⁴⁾。しかし、2004年になって Steven A Rosenberg らが様々なワクチン療法を色々な悪性腫瘍で試みたがその効果は RECIST (response evaluation criteria in solid tumor : 固形がんの化学療法に対する効果判定基準) 判定で見ると2.9%に過ぎなかった事を報告して反省期にはいった (表3)¹⁵⁾。効果を発揮できない理由として様々な免疫学的逃避機構があることが明らかにされ、これらに対する対策の重要性が認識されて今日に至っている。この間1984年には Milstein はノーベル賞を受賞しモノクローナル抗体 rituximab が治療に使われたのが1997年であった。また DC 発見者の Steinman は2011年にノーベル賞を受賞したが受賞時には膵臓がんのために自らが開発した DC ワクチン療法を受けながら4年間の闘病生活に終止符を打っていた。2010年には apheresis で得られた PBMC (末梢血単球) を GM-CSF と PSA の融合蛋白で in vitro 刺激した Sipuleucel-T (Provenge) が初めての免疫細胞療法としてホルモン不応性前立腺がん FDA から承認された¹⁶⁾、2011年には免疫応答の priming phase で活性化された T 細胞を不活化するシグナル CTLA-4 をブロックする抗体 Ipilimumab が悪性黒色腫に対して FDA から認可され^{17, 18)}、2012年には CTL

(細胞障害性 T 細胞) の effector phase で CTL の機能を negative regulation する PD-1¹⁹⁾ およびその ligand である PD-L1²⁰⁾ に対する抗体が肺癌、悪性黒色腫などで効果を発揮することが示された。奇しくもこのことによって多くの癌でその進行に免疫が関与していることを証明することになった。

表1 がん免疫療法の歴史

1898	Coley's toxin(Strept. pyogenes, Seratia marcescens)
1969~	Living BCG
1974~	BCG-CWS, OK432 ,Nocardia-CWS , PSK etc.
1975	Hybridoma technique for production of MoAb(Dr Cesar Milstein)
1978	Dendritic cells ; identification and role in immune response(Dr Ralph M Steinman)
1985~	Recombinant cytokine : IL-2, IL-12, IFN etc. Adoptive transfer of LAK cells
1991~	Identification of human cancer rejection Ag: MAGE Ag vaccination(peptide, protein, DNA, tumor cell) w/wo adjuvant(DC, FCA, FICA, CpG etc.) Adoptive transfer of CTL
1997~	MoAb for cancer treatment rituximab, trastuzumab, bevacizumab etc.
2003	Completion of human genome project
2004~	Counter-measures for tumor escape mechanisms Treg, IDO, TGF-β, VEGF etc.
2010	Approval of Sipuleucel-T against prostate cancer by FDA
2011	Approval of ipilimumab for malignant melanoma
2012	Effect of anti-PD-1, PD-L1 for various solid tumors including NSCLC

表2 われわれが培養細胞系から同定した肺癌関連抗原と分類

Classification	Origin	Ag coding gene	Epitope peptide	HLA restriction
Mutated Ag	A904L	mutated-p53	TRVLAMAIY (R)	Cw7
	B1203L	mutated-NF-YC	AQQITKTEV (Q)	B52
Cancer-testis Ag				
	F1121L	KK-LC-1	RKRILVNL	B15
Over-expressed Ag				
	A904L	Tara	NYGFZHTK	A24
		SGT1	CHILLGNYC	B39
		AL137255	VYPEYVIQY	Cw7
	A110L	GITR	not yet determined	Cw12
	H1224L	RP-L19	KNKRILMEH	A31
	C831L	LRRC8C	GPRESRPPA	B7

表3 Final Results of Various Vaccine Trials at Surgery Branch of NCI

(Rosenberg SA et al., Nature Med. 10: 909-915, 2004)

Disease	No. of patients	Percentage
melanoma	422	96%
renal cell cancer	10	2
ovarian cancer	4	1
colorectal cancer	3	1
breast cancer	1	0
Response evaluated by RECIST		
CR	4	0.9%
PR	9	2.0
NR	427	97.0

Ⅲ. 肺癌に対する免疫療法の現状

1. 世界の現状

これまでに第二相試験が終わり第三相試験に入っているものとして表4にあげたものがある。それらの第二相試験での結果をまとめたのが表5である。L-BLP25はMUC1を標的としてMUC1蛋白の中の25アミノ酸からなるペプチドを合成 lipid Aを加えて liposome として投与するもので、Stage IIIBで Best supportive care のコントロールに比べて生存期間の有意の延長が認められている²³⁾。MAGE-A3はMAGE-A3蛋白を完全切除された stage IB/II の NSCLC (非小細胞肺癌) に術後のアジュヴァントとして投与して Disease free interval (DFI) が延びる傾向がみられている²⁴⁾。Belagenpumatucel-Lは4種類の肺癌細胞株(腺癌:2、扁平上皮癌:1、大細胞癌:1)に TGF-β の anti-sense oligonucleotide 処理して放射線照射 100Gyを加えて投与するもので、投与細胞数が $2.5 \sim 5 \times 10^7$ 以上のもので Overall survival (OS) が延長している²⁵⁾。これらのデータをもとに第三相試験が組まれて、それぞれ1,476例、2,270例、700例の症例集積をめざして進行中である。その結果が待たれるところである。

表4 Ongoing Phase 3 Immunotherapy Trials in NSCLC

Treatment Arms	Study Design	Planned accrual	Primary End Point
L-BLP25 vs placb	unresectable stage III	1476	overall survival
MAGE-A3 vs placb survival	MAGE-A3+ stage IB,II, or IIIA, randomized2:1	2270	disease free
Belagenpumatucel-L vs placb	stage III/IV as maintenance following first line chemo/	700	overall survival

表5 Phase 2 Study Results of Vaccines Currently in Phase 3 Development

Name	Target	Study Design	Outcome
L-BLP25	MUC1	171 patients with stage IIIB/IV NSCLC BLP25 or BSC	Patients with stage IIIB showed improved survival (30.6 vs 13.3m, p=0.16)
MAGE-A3	MAGE-A3	182 with completely resected MAGE-A3+ stage IB/II NSCLC	trend for extending DFI, p=0.107
Belagenpumatucel-L		75 NSCLC received 4 lung cancer 1.25, 2.5, or 5×10^7 cells cell lines + anti-sense TGF-β2	15% response rate in advanced group, 2y OS 52 vs 20%; 2 higher doses vs lower dose

2. われわれの新しい取り組み: 自家腫瘍

lysate-pulsed DCによるワクチン療法 (表6)

我々は切除後肺癌のアジュヴァント療法として CBDCA (Carboplatin) + GEM (Gemcitabine) の化学療法と組み合わせて Autologous tumor lysate-pulsed DCによる免疫療法を切除可能な stage IB ~ IV の NSCLC 患者 8例に行った (UMIN-CTR: 000005776)。その結果 3例で抗原特異的 CTL の誘導が認められ、これらの症例では lysate-pulsed DC に対する DTH (Delayed-Type Hypersensitivity: 遅延型免疫反応) も認められ、また CTL clone が得られた症例もありこの免疫療法の proof of concept が得られたと考えている (表6)。今後は臨床効果について検討してゆく。

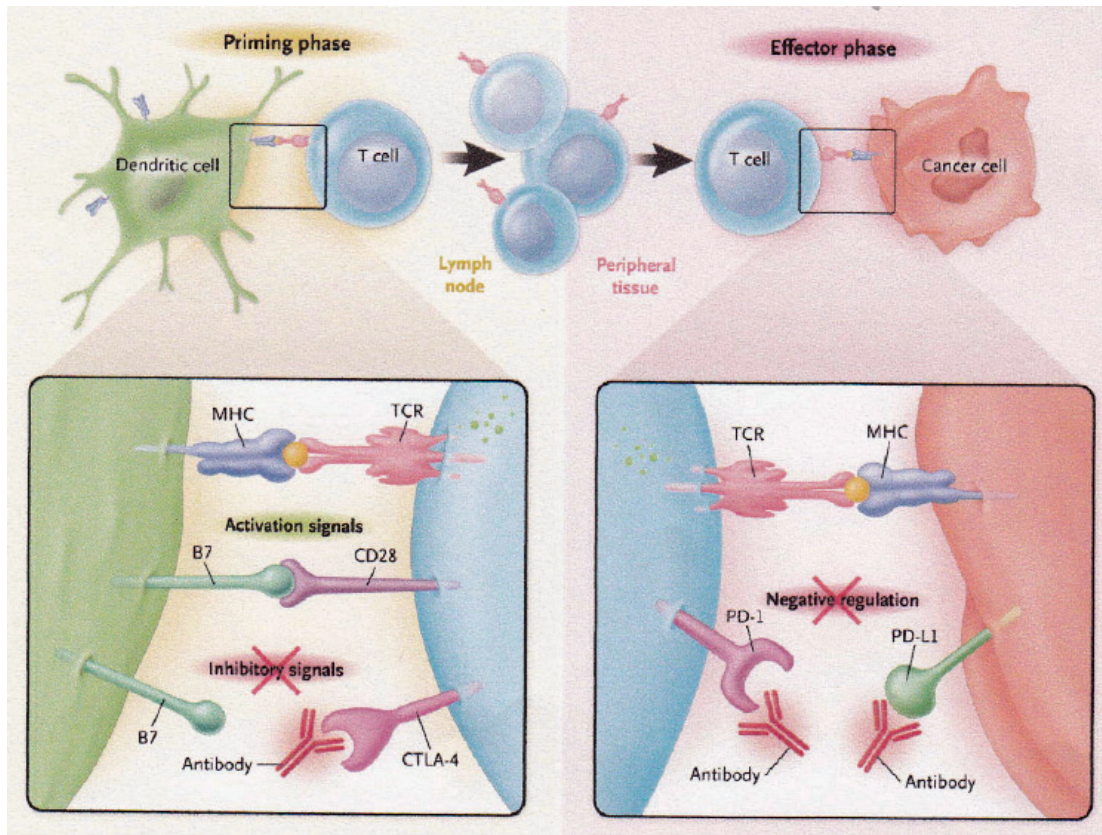
表6 autologous tumor lysate-pulsed DC による肺癌の術後補助療法の試みの結果

症例	年齢	術式	組織型	TNM	病期	DTH	CTL induction	DFI(m)	OS (m)
1	79	RLL	Sq	T3N1M0	IIIA	17x10	yes	>21	>21
2	66	RLL	Ad	T1bN2M0	IIIA	10x8	yes	6 ^a	>20
3	61	RLL	Sq	T2aN2M0	IIIA	90x60	yes	6 ^a	>18
4	63	RUL	Sq	T2aN0M0	IB	(-)	no	>15	>15
5	67	LLL	Ad	T1bN2M1b	IV	2x1	no	12 ^b	>13
6	73	RUL	Ad	T2bN0M0	IIB	15x15	no	10 ^c	>13
7	75	RLL	Sq	T3N2M0	IIIA	15x10	no	8 ^d	>12
8	70	RLL	Sq	T2aN1 M0	IIA	(-)	no	>9	>9

a: hilar node=PET positive at 6months after operation
 b: chest wall recurrence
 c: liver metastasis detected by CT
 d: mediastinal lymph node meta detected by PET/CT

3. Immune checkpoint blocker による免疫療法の効果 (図1)

免疫が活性化されるには priming phase では TCR (T cell receptor) が DC 側の MHC/Ag と会合しただけではだめで costimulatory signal が CD28を通して B7によってはいる必要がある。この costimulatory signal が CTL に入ると直ちに CTL は CTLA-4を発現しこれは B7から inhibitory signal を受け取ることにより CTL の活性化を抑制する。一方、effector phase では CTL の TCR に MHC/Ag の signal が入ると PD-1が発現してその ligand である PD-L1により CTL は apoptosis に陥る。このように免疫系は過剰反応を起こさないように巧みにコントロールされている²⁶⁾。これら



Immune checkpoints: normally terminate immune responses after Ag activation 文献26より

図1 Immune-checkpoint-pathway inhibitors

の checkpoint をブロックするのが anti-CTLA-4 Ab (ipilimumab) であり、anti-PD-1 Ab あるいは anti-PD-L1 Ab である。

Ipilimumab については当初 malignant melanoma への効果から2011年に認可されているがその後肺癌でも効果があることが報告されている²⁷⁾。Anti-PD-1¹⁹⁾ についてはそれぞれ objective response (奏効率) が melanoma で26/94 (28%)、NSCLC14/76 (18%)、renal cell carcinoma 9/33 (27%) であり腫瘍の PD-L1の発現がないものでは0/17、発現があるものでは9/25(36%) の response rate であったという。Anti-PD-L1については melanoma で 9/52 (17.3%)、NSCLC では5/49 (10.2%) の response rate であった²⁰⁾。しかも効果の持続が長かったと報告されている。

IV. 新しい潮流

このように当初は癌抗原に対する免疫応答を抗原を用いたり用いなかったりする免疫賦活が治療の主流であったが、最近では免疫反応を negative にコントロールする機序のブロックで治療効果があることが解り、今後はこの両者を組み合わせた治療法が模索されていくものと考えられる。もう一つの流れは CTL が比較的簡単に誘導できるようになったことから特定の抗原に対する CTL の TCR 遺伝子をクローニングして患者自身のリンパ球に遺伝子移入して遺伝子改変 CTL が作成可能となった²¹⁾。われわれも肺癌で同定した癌精巢抗原 KKLC-1を HLA-B15拘束性に認識する CTL クローンから TCR 遺伝子のクローニングを行いレトロウイルスベクターで $\gamma\delta$ T 細胞に移入して抗腫瘍効果を確認する実験を KKLC-1 (+)、HLA-B15 (+) 肺癌細胞を使って SCID マウスを

用いて行った (図2)。その結果、図3に示すように腫瘍移植後1w で治療開始した群ではすばらしい効果があるが、移植後2w で治療開始すると全く効果がなくなることも解った。この効果消失の原因として移植腫瘍に2w 後では FAS-L (細胞死受容体 FAS のリガンド) が発現することが明らかになっており、FAS (+) の CTL が apoptosis になると考えられた。PD-L1 の発現も検討する必

要があると考えている。一方で細胞表面抗原に対する抗体の変換部分と T 細胞の signaling domain を結合させた chimeric antigen receptor (CAR) を導入した T 細胞を用いる治療がとくに CD-19 に対する抗体を用いて B 細胞性白血病で有望視されており、この方法では HLA class I の拘束性が必要ではない利点があるが、一方で重篤な副作用 cytokine storm syndrome も報告されておりこの克服が課題となる²²⁾ し、肺癌の場合には抗体のもととなる細胞表面抗原を何にするかが key となる。

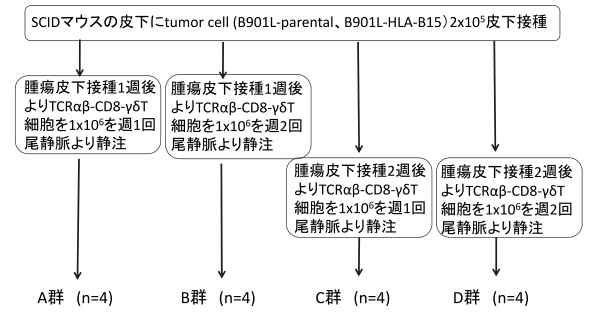


図2 TCRαβ 移入 γδT 細胞静注による治療効果 治療頻度および治療開始時期の検討

文献

- 1) Macfarlane Burnet F: Immunological Surveillance. Pergamon Press, Oxford, Engl. 1970
- 2) Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of Erysipelas: with a report of 10 original cases. Am J Med Sci 10: 487-511, 1893
- 3) Morton D, Eilber FR, et al. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. Surgery 68: 158-163, 1970
- 4) Mathe G, Schwarzenberg L, et al. The immunological

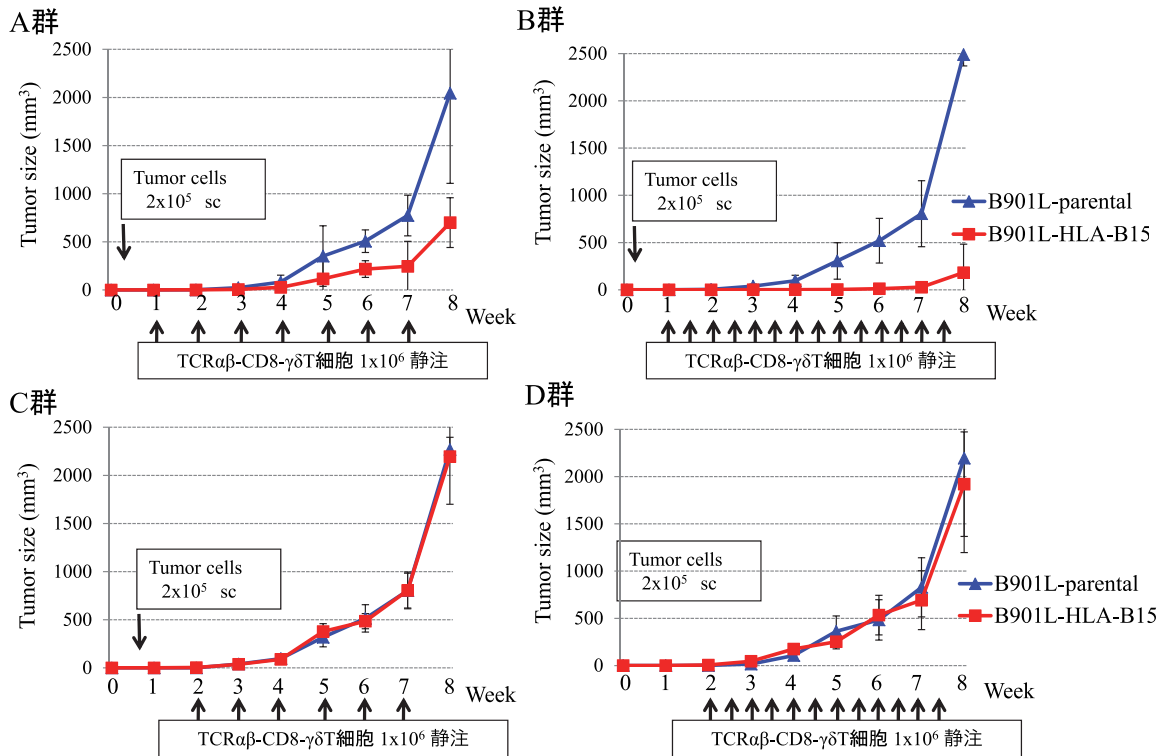


図3 Growth inhibition of B901L-HLA-B15 tumor by adoptive transfer of TCRαβ-CD8-γδT cells (intravenous injection)

- approach to the treatment of human cancer. *Eur J Cancer* 4: 423-433, 1967
- 5) Hersh EM, Mavligit GM, et al. Immunotherapy as related to lung cancer: a review. *Semin Oncol* 3: 273-278, 1974
 - 6) Yamamura Y, Azuma I, et al. Immunotherapy of cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guérin: experimental and clinical results. *Ann N Y Acad Sci* 277: 209-227, 1976
 - 7) Yasumoto K, Yaita H, et al. Randomly controlled study of chemotherapy versus chemioimmunotherapy in postoperative lung cancer patients. *Cancer Res* 43: 3001-3007, 1983
 - 8) Watanabe Y, Iwa T. Clinical value of immunotherapy for lung cancer by the streptococcal preparation OK-432. *Cancer* 53: 248-253, 1984
 - 9) Milstein C. The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays* 11: 966-973, 1999
 - 10) Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30: 1-22, 2012
 - 11) Fuse A, Fujita T, et al. Organization and structure of the mouse interleukin-2 gene. *Nucleic Acids Res* 12: 9323-9331, 1984
 - 12) Rosenberg SA, Lotze MT, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *New Engl J Med* 316: 889-897, 1987
 - 13) van der Bruggen P, Traversari C, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647, 1991
 - 14) Yasumoto K, Hanagiri T, et al. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 57: 449-457, 2009
 - 15) Rosenberg SA, Yang JC, et al. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10: 909-915, 2004
 - 16) Higano CS, Schellhammer PF, et al. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 115: 3670-3679, 2009
 - 17) Hamid O, Schmidt H, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med* 9: 204, 2011
 - 18) Verschraegen C. The monoclonal antibody to cytotoxic T lymphocyte antigen 4, ipilimumab, in the treatment of melanoma. *Cancer Manag Res* 4: 1-8, 2012
 - 19) Topalian SL, Hodi FS, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366: 2443-2454, 2012
 - 20) Brahmer JR, Tykodi SS, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366: 2455-2465, 2012
 - 21) Uttenenthal BJ, Chua I, et al. Challenges in T cell receptor gene therapy. *J Gene Med* 6: 386-399, 2012
 - 22) Curran KJ, Pegram HJ, et al. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med* 6: 405-415, 2012
 - 23) Butts C, Murray N, et al. Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 6674-6681, 2005
 - 24) Tyagi P, Mirakhur B, Magrit. the largest-ever phase III lung cancer trial aims to establish a novel tumor-specific approach to therapy. *Clin Lung Cancer* 5: 371-374, 2009
 - 25) Nemunaitis J, Dillman RO, et al. Phase II study of belagenpumatucel-L, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24: 4721-4730, 2006
 - 26) Ribas A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *New Engl J Med* 366: 2517-2519, 2012
 - 27) Tomasini P, Khobta N, et al. its potential in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol* 4: 43-50, 2012