

## 癌免疫療法のさらなる発展を願って



医療と技術

和田 尚\*

Development of Cancer Immunotherapy; past to future

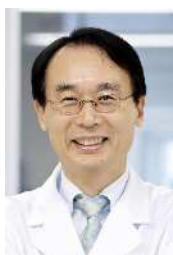
Key Words : regulatory T cell, CTL, Immune checkpoint

「免疫って本当がんに効くのね」と市中病院の医師に言われるようになったのがここ数年。外科医のはずががん免疫の研究を始めて30年、ヒトに投与し始めて15年、免疫チェックポイント阻害剤が世に認められた今、やっと、うれしい、まだまだ、と様々な感情が入り混じった複雑な気持ちです。大阪大学・消化器外科に属し博士取得のために腫瘍免疫の研究を始めたのが1990年、中山睿一・岡山大学名誉教授に師事し、影響を受けてきました。この時期の腫瘍免疫研究者の最大の興味は腫瘍特異抗原の同定であり、中山先生も例外ではありませんでした。腫瘍免疫の下地は長い年月をかけて熟成されてきましたが、この時期以降の発展は目覚ましいものがありました。やがて免疫促進ではなく抑制の解除により近年の飛躍が訪れます。独自の免疫療法を開発し医師主導治験へ、そして企業主導の様々な免疫療法治験にも参加し、がん患者さんへの効果をずっと見てきました。今回は、その時々時代の背景を見ながら、私の研究の進展のみならず人とのかわりについてもお示ししたいと思います。

T細胞は抗原と同時にMHCをも認識していることが1975年ZinkernagelとDohertyにより報告されたのに引き続き、1984年にはDavisやTak MakによりT細胞抗原受容体(TCR)遺伝子が同定されました。それまで漠然と細胞同士が出会い、相手を

傷害すると考えられていた細胞性免疫が、分子のレベルで解明されようとしていたのです。しかし、T細胞のTCRの標的となる抗原とMHCの関係は依然として不明のままでした。T細胞は二つのTCRを使いMHCと抗原ペプチドを同時に、しかし別々に認識している可能性もありました。McMichaelは、T細胞は10数個にまで短くしたインフルエンザ抗原ペプチドを認識することを明らかにしましたが、抗原ペプチドとMHCの関係の謎が解明されたのは1987年BjorkmanによるHLA-A2分子の結晶化を待ちます。3次元構造解析により、HLA-A2分子にはアミノ酸10個前後がちょうどはまり込む細長い溝があることが解ったのです。構造図は今では免疫学の教科書に必ず載っています。ペプチドをMHCが部分的に包み込み、その結合分子を一度にTCRが覆いかぶさるように認識するという報告は、細胞性免疫の標的分子の最小単位を明らかにしたのです(和田、他、実験医学増刊2016)。

恩師の中山先生は元来、細胞性免疫の専門家で、マウス由来のがん細胞に対する細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T lymphocyte; CTL)を世界で初めて作った研究者でした。腫瘍にもT細胞を中心に免疫が働くことを明らかとしたことから、免疫の最終兵器はCTLであるとの信念を持っていました。出会った1990年頃は、インフルエンザ抗原のヒトMHC結合性ペプチドが同定され、腫瘍では1991年Boonが悪性黒色腫症例の腫瘍細胞株から得たcDNAを用いてコスミドライブラリーを作製し、同一症例のCTLを探索子としてMAGEをヒト腫瘍特異抗原として世界で初めて同定した時期でした。中山先生はマウス腫瘍RL♂1の腫瘍特異抗原の同定研究を開始し、Akt同定の成功を1994年JEMに報告した(Uenaka他、J Exp Med, 1994)時期が私が直接師事した時期と重なったことは、私の今後の



\* Hisashi WADA

1959年5月生まれ  
大阪大学医学部(1985年)  
現在、大阪大学医学系研究科・臨床腫瘍免疫学 特任教授 医学博士  
腫瘍免疫、消化器外科  
TEL: 06-6210-8413  
E-mail: wada@climm.med.osaka-u.ac.jp

研究方針もやはり CTL でがんを治す、という方向性が決まった時期でもありました。

腫瘍免疫の分野で免疫療法として一躍前面に押し出されてきたのが、MHC 結合抗原ペプチドを用いたがんワクチンです。ウイルスなどの外来抗原にさらされない普段は、細胞を構成するようなアミノ酸数百個からなる正常タンパクから切り出されたアミノ酸 8～10 個ほどの短鎖抗原ペプチドを載せている MHC ですが、高濃度の別の MHC 結合性の短鎖抗原ペプチドが細胞外に存在すると元々の抗原ペプチドと容易に交換してしまいます。T 細胞を教育したり刺激できる樹状細胞などの抗原提示細胞が豊富にある体内微小環境に、人工的に作製した腫瘍抗原ペプチドを大量に投与できれば、腫瘍細胞を傷害できる CTL を体内で産生可能となります。がん免疫療法を臨床で実施する際にいわゆる POC (Proof of concept) として重要なのが、患者さんの体内で腫瘍特異的な CTL が効率よく誘導されているかです。がんワクチンに用いる抗原ペプチドは、*in vitro* でも患者さんの血液に付加するだけで CTL 反応を簡単かつ簡便に観察でき、臨床効果との比較が容易でした。この免疫モニタリングの容易さは、さらにがんワクチンを発展させていきました。

腫瘍抗原同定としては世界 3 番目だったマウス腫瘍 RL ♂1 の腫瘍特異抗原 *Akt* の報告の後、ヒト腫瘍抗原同定の発表が世界中から続きます。やはり CTL を探索子として gp100、Melan-A/MART-1 などが見つかりますが、その後、がん抗原の同定をさらに加速させたのが、SEREX (serological analysis of recombinant cDNA expression library) 法の開発です。担がん患者の体内で、腫瘍に対して産生される“自己”抗体を研究していた Pfreundshuh らは、患者血清中抗体が認識する腫瘍抗原を網羅的に解析するため、腫瘍細胞から cDNA 発現ライブラリーを作製し、患者血清でスクリーニングする SEREX 法を 1995 年開発しました。患者血清中抗体を探索子として用いるこの方法により、1997 年 Chen は食道がん患者から腫瘍抗原 NY-ESO-1 を同定しました。その後 SEREX 法を用い腫瘍抗原同定が世界中から報告されますが、その多くはがん・精巣 (cancer/testis, CT) 抗原と呼ばれその発現が種々のがんと、正常組織では精巣にのみ限られること、そして抗体を自然産生するほど強い免疫原性を有す

る特徴を持っていました。このため、がん免疫療法の標的分子として期待され、抗原発現の特異性および抗原の強さには差はあれ、200 種類以上の CT 抗原がすでに報告されています。

私のがん免疫療法の最初の臨床応用はこの CT 抗原である NY-ESO-1 の総蛋白を用いたがんワクチンでした。SEREX 法を認めた Lloyd. J. Old 先生の研究室に、丁度この抗原を同定した時期に私は留学していて、NY-ESO-1 の HLA-A2 結合性ペプチドの探索とその反応性を見る ELISPOT 法の改良に従事していました (Jager 他、JEM、1998)。こののち、HLA-A2 結合性 NY-ESO-1 短鎖ペプチドを用いたがんワクチンを実行したのが Knuth で、Boon が MAGE を同定するための同一症例からの CTL と腫瘍細胞株を作った研究者です。Knuth は、中山先生が Old 先生の研究室にスタッフとして働いていた時期にその下にきた若きフェローでもありました。私の帰国した 2000 年前後は日本でも HLA 結合ペプチドを用いたがんワクチン療法が花開いていました。そんな中、臨床応用可能な GMP グレードの NY-ESO-1 総蛋白を Old 先生が供給してくれることになったのです。投与抗原として全長蛋白を用いた場合でも抗原提示細胞は取り込むことが可能で、その後 HLA クラス II のみならずクラス I にも抗原性を提示可能であることが分かっています。様々な HLA に対応するアミノ酸配列を包含することから、1) 複数種類の CTL を誘導、2) 複数の抗原特異的ヘルパー CD4 T 細胞を誘導、3) サブドミナントなエピトープも使用可能、4) 対象症例は HLA 型に制限されない、などの利点があります。抗原提示細胞などへの取り込み効率は悪いのですが、180 個のアミノ酸からなる NY-ESO-1 総蛋白の作製・精製への高額の費用をすべて負担してくれるという Old 先生の好意を断るわけがありません。2004 年からコレステロール抱合疎水化プルラン (CHP) をドラッグデリバリーシステムとして NY-ESO-1 タンパクとの複合体 (CHP-NY-ESO-1) によるがんワクチン療法第 I 相臨床試験を中山先生と実施しました (Wada 他、Int J Cancer、2008)。多施設共同で行い、大阪大学病院では進行食道がん症例 6 例を登録しましたが、はじめて患者さんの腕に注射する際には、実験室でだけ使ってきた試薬を患者さんに本当に投与しているのだろうかという手震えを覚えています。もち

ろん膨大な書類を Old 先生のもとにも、大学病院の IRB にも提出し、審査を受け、Old 先生のもとからは臨床試験の品質管理のため二人の監査員が病院や薬剤部にやってきました。その第一例目で進行癌が画像上ほぼ消えてなくなるほどの臨床効果を示したのです。臨床医として、研究者として、これほどの達成感はありませんでした。ところが後が続きません。総蛋白に続いて長鎖ペプチド (Kakimi 他、*Int J Cancer*, 2011) や連続長鎖ペプチド群 (Wada 他、*J Immunother*, 2014)、さらには免疫賦活剤として Toll 様受容体アゴニストである PolyIC などを用いた臨床試験を数本実施しました (Takeoka 他、*J Immunother*, 2017) が、望むような好ましい臨床効果は得られませんでした。これは世界的にも腫瘍抗原を用いたがんワクチン全般に言えることだったようで、「がんワクチンの効果は患者の 1%」と Rosenberg はレビューしました。短鎖ペプチドを用いたワクチンでは有効な CTL の誘導が不十分だということが原因といわれています。

私たちの症例では、様々な角度からの免疫学的な検討を加えました。末梢血を用いた NY-ESO-1 特異的な抗体はもとより CD8、CD4T 細胞の反応はワクチン後にほぼ全例で誘導・増強していました (Kawabata 他、*Int J Cancer*, 2007)。蛋白ワクチンは短鎖ペプチドと異なりヘルパー CD4T 細胞も活性化されるため、有効な CTL が誘導される、との報告があります。腫瘍組織を用いた免疫染色でも、有効例では CD4、CD8T 細胞の浸潤が増加していました (Tsuji 他、*Cancer Immunol Immunother*, 2008)。また、抗体反応では投与した NY-ESO-1 のみならず、他の腫瘍抗原に対する抗体も誘導される antigen spreading も観察されました (Kawada 他、*Int J Cancer*, 2012)。一方で MHC や NY-ESO-1 抗原の消失などはほぼ見られなかったものの、腫瘍組織に浸潤する T 細胞数に比例して Foxp3 陽性細胞や CD68 陽性細胞の浸潤の増加が免疫染色により多くの症例で観察できました。これらは後述する制御性 T 細胞や腫瘍関連マクロファージと考えられ、いわゆる免疫抑制性の細胞であり、これら抑制性の因子が抗原特異的免疫の効果を邪魔している可能性が示唆されたのです。

昨年ノーベル賞を受賞した Allison は免疫研究として T 細胞の活性化の first signal としての TCR を、

次いで second signal として特にナイーブ T 細胞の抗原特異的な活性化のための costimulatory signal を研究の対象としてきました。ヒト CD28 からマウス CD28 を同定したのは、最も有望な costimulatory signal として CD28 を対象に 1990 年頃に研究を加速、ジム (Allison) をして CD28 は T 細胞の “Gas (ガソリン)” と言わしめました。私の留学中も Old 先生とは頻繁に交通し、私もジムと愛称で呼び何度か話をしたことがあります。まあジムは覚えてないでしょうけど。ノーベル賞の対象となった CTLA-4 は、ジムが CD28 のファミリーとして着目した分子です。抗 CTLA-4 抗体は当初、培養に混ぜるとリンパ球が活性化したため、CTLA-4 を T 細胞活性化分子だと考えました。しかし培養では固相化しなくとも阻害抗体として有効であること、また担癌マウスに投与すると腫瘍の縮小どころか消失してしまったことなどから CTLA-4 は T 細胞の抑制分子であるとジムは気づくと同時に、その抗腫瘍効果に驚きその臨床応用に思いをはせたのでした。しかし研究者が臨床の薬を生み出すことには常に困難が待ち受けます。BMS 社は CTLA-4 がリンパ球活性化分子であることの特許を持っていましたが、ジムがいう所のリンパ球の抑制解除でヒトのがんを治す抗体を作製する決断には至っていませんでした。その後約 2 年、ジムは臨床応用に向けて巨大製薬会社から小さなバイオテクノロジー会社まで回り、たどり着いたのがヒト化マウスをもつ Medarex 社でした。やっとヒト抗 CTLA-4 抗体 Ipilimumab ががん治療薬として世に生み出されたのでした。2000 年に臨床試験が始まってからも試験は続きます。がん免疫療法としての免疫チェックポイント阻害剤として 2003 年には臨床効果が発表されながらも当初は広く認知されず、2010 年進行メラノーマ患者の生存率延長を世界で初めてもたらしたことが NEJM に発表され、やっと世界に認められたのでした。

本庶先生の PD-1 の同定から抗体医薬としての誕生に関しては皆さんもよくご存知でしょう。昨年来のテレビや講演会で拝見する本庶先生は、テレビ報道も何とか親近感を演出しようとする努力は分かるのですがどこか頑なで…。私の頭の中の本庶先生は、大阪大学に遺伝学の教授として約 1 年だけ在籍し、抗体のクラススイッチの講義を受けたころの 30 代後半の若くエネルギーでりりしい天才肌

のお姿です。本庶先生はゴルフが得意だそうです、ジムはハーモニカが玄人はだしで、ステージにもよく登壇していますね。

がん免疫研究者の免疫チェックポイント阻害剤への驚きの対象にはもちろんその臨床効果があるのですが、さらにもう一つの理由がありました。がん免疫において免疫チェックポイント機構がそれほど大きな役割を占めているとの認識が全くなかったのです。一般的に免疫は賦活・増強と抑制の相反する力のバランスをうまく取りながら作用していると言われています。従来、がんに対して免疫は力不足であるが故に、免疫療法ではその反応を増強させることに力が注がれてきました。NY-ESO-1を用いたがんワクチン然り、Toll様受容体アゴニストによる免疫賦活然り。抑制性の免疫チェックポイント分子は免疫を抑制する代表的な因子であり、免疫の過剰反応、つまり自己免疫疾患のような暴走を防ぐと言われていました。がん細胞は、どうやらこの抑制機構を最大限に悪用してがん免疫から逃れ、自分の存在・増殖に都合のいい環境を整備していました。この予想外に強い抑制系の働き故に、これら抑制機構をブロックする抗体医薬を用いると、がん免疫のスイッチが入り、良好な臨床効果を示すようです。自己免疫疾患という予想された副作用をコントロールできる範囲内であるにもかかわらず、抗腫瘍効果をもたらしていることから、この抑制機構はがん免疫の抑制には多大な力を注いでいた、あるいは注がされていたことが推測できます。

T細胞表面に発現するこれら免疫チェックポイント分子とは別に、T細胞に属する制御性T細胞 (regulatory T cell: Treg) が免疫の抑制に関与することが明らかとなっています。坂口志文先生が発見したTregは当初は自己免疫疾患にかかわっていることから研究が始まり、腫瘍組織内に高頻度に浸潤し活性化した状態にあること、このような活性化したTregが抗腫瘍免疫に対して『負』の働きかけをしていることが分かりました。CD4 T細胞群の一分画で細胞表面のCD25、核内の転写因子Foxp3の発現が特徴です。効果細胞であるT細胞の働きを抑制する機序としては、表面に恒常的に発現するCTLA-4がT細胞のsecond signal CD28と競合阻害すること、IL-2受容体であるCD25を介して効果T細胞の分化や増殖に関わるIL-2を消費することなどで、

さらにIL-10、IL-35、TGF- $\beta$ といった抑制性サイトカインの産生、パーフォリン・グランザイムによる活性化T細胞の破壊、なども報告されています(浦川、他、炎症と免疫、2018)。

教室では、大腸がん組織に浸潤した活性化Tregのフローサイトメトリー解析においてFoxp3弱発現と強発現分画に着目、弱発現分画が多い症例と少ない症例の2群に分かれる原因が大腸細菌叢に含まれるFusobacterium nucleatumの存在であることを報告しました(Saito、他、Nat Med. 2016)。また、胃がん組織内に浸潤したTregにおいては、Foxp3+ ICOS+細胞が活性化Tregである可能性を見出し、特にピロリ菌感染で多く誘導され、胃がん患者の予後に影響していることを報告しています(Nagase、他、Int J Cancer. 2017)。胃粘膜のピロリ菌感染はさらに大腸がん組織内にFoxp3+ ICOS+の活性化Tregを誘導し、大腸がん症例の予後にも影響している可能性を明らかとしました。中山先生からも京大時代の坂口先生は紹介を受けたことがありますが、現在は大阪大学におられ、しかも私の講座設立に際して世話人として尽力いただきました。また坂口研の西川博嘉准教授(現・名古屋大学教授)には院生の面倒を見てもらい、上記大腸がんTregの研究を指導してもらいました。西川先生もまたOld先生門下生です。

Tregを標的とした免疫療法としては、CD25に対する抗体療法が試みられましたが、その効果は不十分でした。一方で、抗CTLA4抗体医薬はT細胞の誘導相の抑制解除以外にも、Tregに対して働きその抑制能の解除により臨床効果を発揮するとも言われています。そんな中、活性化したTregではCCR4(CC chemokine receptor type 4)が強発現していることが報告されました。ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体(Mogamulizumab, ポテリジオ®)は、ADCCによる細胞傷害能を持つことからCCR4を強発現する成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia lymphoma: ATL)の治療薬として2012年に保険適応となっています。

Mogamulizumabは上田龍三・名古屋市立大学名誉教授がATL治療のため開発、治験を経てオーファンドラッグとして国の認可を受けるまでに尽力された抗体医薬です。日本固有の疾患ともいわれたATLは、原因ウイルスHTLV-1が同定されるも有

効な治療法がありませんでした。ATL患者の90%でATLにCCR4が強発現していることを臨床で、脱フコシル化を施したヒト化抗CCR4抗体がADCC活性を飛躍的に高めることを研究室で証明し、臨床応用したのです。ATLの驚くべき完全寛解例を多くの患者さんで確認したのは、国に働きかけ一気に承認まで進めました。ですから、日本での基礎研究から得られたシーズで、国内で前臨床研究を成し遂げ、第I相、第II相治験も完遂し、がんに対する抗体薬として世界で13番目、日本初の抗体薬として承認に至った薬剤となったのです。この業績を受け、上田先生は2017年紫綬褒章を受章されました。ちなみに上田先生も中山先生と同時期、Old先生の研究室で癌に対する抗体を研究していました。この時期、Old先生の薫陶を受けた日本人のみならず世界各国からの研究者たちは、現代のがん免疫研究という分野の強固な礎石となっていますね。

Mogamulizumab投与後にATL症例体内ではTregの減少およびATLに対するCTL活性の増強が報告され、固形がん症例においてもMogamulizumabを投与した場合、Treg除去を介した抗腫瘍免疫増強によるがん免疫療法となりうる事を示唆していました。上田先生のあくなき挑戦は進行固形がん患者に対するMogamulizumab投与の臨床試験につながり、医師主導治験として2014年具体化されました。第Ia相には10例が登録され、安全性や忍容性ととも、末梢血における活性化Tregの除去効果を観察し、臨床効果としてはSD症例を8例中4例に認めました(Kurose他、*Clin Cancer Res.* 2015)。第IIb相には39例が登録され、安全性が確認された現在、結果を解析中です。この治験に私も計画段階から参加し、食道がん、胃がん、卵巣がん症例を登録しました。これら症例では投与早期から末梢血中のTregはほぼ消失し、POCは得られました。NY-ESO-1などの腫瘍特異抗原を持つがん患者を持つ体内では抗原特異的反応性T細胞や抗体の反応の増強が観察されました。

Mogamulizumab投与によるTreg除去を介したがん免疫療法の第二の試みは、さらなる段階に挑んでいます。臨床効果の増強の探求と腫瘍組織内Treg動態の確認です。近年、免疫チェックポイント阻害剤の有効性の評価が確立されたことから、抗PD-1抗体であるNivolumabやPembrolizumabを

中心にIpilimumabや化学療法などと併用投与をすることで、さらなる臨床効果を求める機運が高まっています。このため我々もMogamulizumabに加えNivolumabを併用投与し、さらなる効果を期待しています。そして両薬剤の投与を標準療法としての外科的切除術前に実施し、投与前にも生検などで腫瘍組織を採取することで、試験薬投与の前後での腫瘍組織の採取が可能となり、腫瘍組織内の免疫担当細胞に対する薬剤投与の影響を各個人で正確に解析することが可能となります。この新たな臨床試験は、私が責任医師となり他施設共同医師主導治験として推進しています。手術前に併用投与、ということでハードルが高く、対象疾患の適応はかなりの慎重さを求めた上で決定しました。PMDA、倫理委員会でも何度か議論をさせてもらい、投与により手術後の再発抑制効果の期待も高まること、手術前の待機期間内であることなどを十分理解してもらい最終的に実施にこぎつけた経緯があります。無論、実臨床では患者さんに十分な理解を得るため、他の治療法との比較なども説明を尽くし、同意を得よう注意をしています。現在、治験を実施中で、登録を進めています。大阪大学でのこれら治験の遂行には私の母体である消化器外科の土岐祐一郎教授と森正樹教授にお世話になっています。

がん免疫療法の次世代型としてはCAR-Tに代表される遺伝子導入T細胞による養子免疫が脚光を浴びています。私も腫瘍抗原特異的TCRの遺伝子導入T細胞を用いた養子免疫療法も計画段階までは参加した経験があります。これは珠玖洋・名古屋大学名誉教授が中心になって進めた研究で、現在では幅広く臨床試験を推進しています。2012年に共同実施施設として参画予定として、病棟師長からも大阪大学の倫理委員会からもうどうだと言われながらもなんとか承認を得たのに、今度は厚労省のヒアリングで変な委員からいわれなきいちゃもんを付けられ、最終的に不許可となりました。この件は未だに納得がいかない。しかもダメと言ったときながら、申請をこっちから取り下げると時の厚労大臣から書面が来ました。いやいや、それはいいとして、そうです、珠玖先生もまたOld先生門下生であり、中山先生と同時期にNYの研究室でスタッフとして仕事をしていましたし、長崎大学の教授時代に夜通しの説得の末、中山先生を助教授に迎えたこともありま

した。前述の CHP-NY-ESO-1 ワクチンの際の CHP は珠玖先生の開発したシステムです。また、私の臨床の恩師である門田守人・大阪大学名誉教授も、NY 留学中に中山先生と知り合い、その縁で私に対して中山先生のもとで免疫を研究をするように指示したのであり、門田先生こそが私の免疫研究を始めさせた張本人ですね。

日進月歩の躍進を継続している現代の腫瘍免疫は、がん治療を支える第4の柱として認知されました。

免疫チェックポイント阻害剤が副作用を押さえながらも臨床効果を上げる範囲で使われていますが、これはある意味、ラッキーだったと言えます。サイトカインストームのような制御不能な免疫作動薬もありますし、理論上はどんな免疫療法にも致死的な副作用は起こりえます。今後も様々な免疫療法が世に出るでしょうし、私も出すべく基礎研究を進めていますが、その作用強度が副作用と臨床効果の間の狭いレンジにうまく収まることを願っています。

