

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
戦略的イノベーション創出推進プログラム (S-イノベ)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) LAP 陽性制御性 T 細胞および TGF- β に対する選択除去材の創製およびがんの革新的治療法への応用

(英 語) Development of the selective remover of LAP positive suppressive T cells and TGF- β and the application to innovative cancer therapy

研究開発実施期間：平成 24 年 4 月 1 日～令和元年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 小笠原 一誠

(英 語) Kazumasa Ogasawara

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 国立大学法人滋賀医科大学・医学部病理学講座疾患制御病理学部門・教授

(英 語) Shiga University of Medical Science・Department of Pathology, Division of Pathology and Disease Regulation・Professor

II 研究開発の概要

形質転換成長因子ベータ（Transforming Growth Factor- β 、TGF- β ）シグナル伝達経路は悪性腫瘍の免疫回避に関与することから、TGF- β シグナルの遮断は、がん免疫療法の標的として有望である。TGF- β は代表的な免疫抑制性蛋白質であり、循環血液中では latency-associated peptide（LAP）に包埋された複合体（以下、TGF-LAP と略称）の形で存在する。さらに、TGF-LAP は活性化した制御性 T 細胞（Treg）の表面に存在しており、腫瘍組織への TGF- β の供給源となっている。そこでわれわれは、血液中の LAP を結合した白血球（LAP 陽性細胞）を体外循環により吸着除去することでがん患者の免疫向上を図る医療機器の開発を着想した。

開発する医療機器の基本コンセプトを、① リガンドを繊維に固定化した吸着体を使用すること、② 生産を考慮してリガンドは抗体ではなく合成化合物から選択すること、③ 吸着体を充填したカラムは体外循環手技のなかでは簡単な直接血液灌流法で施行できることとし、がんの革新的治療法の開発を目指した。

採択期間中の研究開発の成果は以下の通りである。

1. カラム製造技術開発

(1) リガンド設計・スクリーニング

- ① LAP の細胞膜上受容体である Glycoprotein A repetitions predominant の構造を参考に吸着材のリガンドを設計、合成、スクリーニングした。
- ② 吸着選択性の高いリガンドを選定し、血清成分の吸着性を評価した。臨床上問題になる成分の吸着性を評価し、懸念がないことを確認した。
- ③ 繊維担体へのリガンドの固定化密度と LAP 陽性細胞及び TGF- β の吸着性能の関係を確認した。また、抗凝固薬の吸着材への吸着特性を確認した。両者の特性をふまえて、リガンド固定化密度を決定した。
- ④ 繊維担体の構造について、編地構造と不織布構造について吸着性能の評価をふまえ、技術開発課題の少ない編み地構造を選択した。
- ⑤ 選定したリガンドの一部構造を改変したバックアップ化合物のスクリーニングを行い、評価した。

(2) カラム設計

- ① 極細繊維紡糸技術を用いて繊維断面構造を最適化し、リガンド導入反応に伴う繊維表面の劣化を抑制する技術を開発した。また、編地構造の最適条件を検討した。
- ② ISO10993 に従った非臨床試験のうちクリティカルな試験項目（発熱性試験、血液毒性試験等）を実施し、安全性を確認した。
- ③ 吸着材およびカラムの規格値を検討、評価した。

(3) 量産化基本技術の確立

- ① 繊維担体へのリガンド反応工程について、小規模カラム製造設備を導入し量産化に向けた基本技術を確立した。

2. カラム治療技術の開発

(1) 評価系の作成

- ① 有効性の評価は担癌動物モデルを用いて実施した。肝癌由来の KDH-8 細胞または KDH-V 細胞を MHC が同じ WKAH/Hkm ラットの皮下に接種して担癌ラットを作成した。
- ② がん免疫療法の評価について、種差によるマウス、ラット等での評価の限界から、サル等を用いた評価系が望まれている。本研究開発課題では、サル由来癌細胞を使用して担癌カニクイザルの作成を試みたが、MHC が同じでも免疫細胞に認識されて拒絶されることが判明し、評価系は確立できなかった。

った。がん化した細胞が免疫監視機構（immune surveillance）をすり抜けないと、がん細胞が増殖できないことを改めて認識した。

(2) 作用機序の解明

- ① 担癌ラットを開発カラムで体外循環し、末梢血中の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞の LAP 陽性率が減少することを確認した。また、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の LAP 陽性率が無治療ラットに比べ減少することを確認した。
- ② また、バックアップ化合物をリガンドとしたカラムを用いた担癌ラットでの評価で、体外循環後に末梢血中の免疫が増強していることを確認した。

(3) 有効性の確認

- ① X 線照射 KDH-V で免疫をした担癌ラットに、回路のみ、リガンドなし編地カラム、リガンドあり編み地カラム（開発カラム）で体外循環をしたところ、開発カラム群において腫瘍の成長抑制、腫瘍組織中の血管新生抑制を確認した。
- ② 一方で、①に示す評価において、無処置の担癌ラット群に比して回路のみ体外循環をした担癌ラット群において腫瘍成長が促進されることを確認した。体外循環に伴う特定の処置が侵襲となり、腫瘍成長に影響を及ぼしていることを確認した。

(4) 安全性の評価

- ① 静脈-静脈シャント法でカニクイザルの体外循環を行って、カラムによる LAP 陽性細胞の低下を確認した。さらに、当体外循環を 2 週間隔で 3 回繰り返しても、摂餌量の減少、皮膚病変、下血等の自己免疫疾患様異常が出ていないことを確認した。

3. 治験及び上市に向けた検討

- (1) インフォームドコンセント取得下に、膵臓がん・肝臓がん・大腸がん・肺がん患者の臨床検体を用いた血中 LAP 陽性細胞数の測定をし、本開発カラムの治験対象となり得るがん種および患者選定基準について知見を得た。また、臨床現場に実装する場合の課題、各種がん治療ガイドラインとの関係性、治験プロトコルに係る臨床情報を収集、整理した。
- (2) (1)の検討を踏まえて PMDA 対面助言を実施した。国内でがん治療カラムとして製造販売承認申請をするには、開発カラム単独でのがんに対する治療効果を検証する必要があるとの指摘を受けた。

滋賀医科大学、大阪鉄道病院、東レ株式会社の 3 社の連携体制で、8 年間の採択期間中に、合成化合物リガンドの選択、繊維担体の開発、編地設計、概念検証、基本的な安全性の確認、量産技術の確立、そして、複数の特許出願、学会・論文発表を成果として残すことができた。

我々は、LAP 陽性細胞を循環血液中から除去することによりがん免疫を向上させ、がん治療に寄与するというコンセプトで、適応症を「血中 LAP 陽性細胞の選択除去カラム」として製造販売承認を取得できる方策を国内にこだわらず探索・検討を継続している。

Summary

Block of the transforming growth factor-beta (TGF- β) signal is a promising target for the cancer immune therapy, because TGF- β involves the immune response evasion of malignant tumors. TGF- β is representative immunosuppressive protein and exists as the complex (TGF-LAP) embedded by latency-associated peptide (LAP) in circulation blood. Furthermore, the TGF-LAP exists on the activated regulatory T cell (Treg) surface and supply TGF- β to tumor tissues. Therefore we started to develop the extracorporeal circulation column which could improve the immunity of the cancer patient by adsorbing and removing the leukocyte expressing LAP (LAP positive cell) in patient's peripheral blood.

1 . Development of column production technology

The ligands immobilized on fiber fabric were designed and synthesized in reference to structure of Glycoprotein A repetitions predominant which was a receptor in a cell membrane of LAP. The ligand which had high adsorption selectivity was chosen and we confirmed that there was not concern in clinical practice. We also confirmed the immobilized density of the ligand to fiber fabric, the relations of its adsorptivity with LAP positive cell and TGF- β , and the adsorptivity of fiber fabric with the anticoagulant.

The structure of fiber cross section was optimized by NANODESIGNTM technology and developed the technique of ligand immobilization while suppressing the fiber deterioration. We carried out critical examinations in non-clinical studies according to ISO10993 and confirmed safety and specification value of the fiber fabric and column was evaluated.

In addition, test facility was introduced, and we established a basic technique for the mass production to immobilize ligand to fiber fabric.

2 . Development of the therapeutic techniques with column

The effectiveness was evaluated by using tumor bearing animal models in which inoculated KDH-8 cell derived from liver cancer or KDH-V cell were inoculated under the skin of MHC-matched WKAH/Hkm rat. Extracorporeal hemoperfusion with the development column has been done against tumor bearing rat and we confirmed that the LAP positive rates of the CD4-positive T cell, the CD8-positive T cell, and the B cell in peripheral blood were decreased. In addition, the LAP-positive rates of the CD4-positive and the CD8-positive T cell of the tumor infiltrating lymphocyte (TIL) were decreased in comparison with the case of untreated rat group.

We tried to establish a macaque tumor model in which macaque tumor cells were inoculated into MHC-matched macaques, but engraftment of the tumor cells was unable to seen. The immune surveillance against tumors was reconfirmed.

The restraint of tumor growth and vascularization in tumor tissue were confirmed in the group treated with the development column immobilized ligand column. On the other hand, tumor growth was promoted in the group did hemoperfusion in a blood circuit in comparison with the untreated group. Specific procedure with the hemoperfusion became the surgical stress and affected some influence to the tumor growth.

3 . Examination for a clinical trial and the marketing

Under the informed consent acquisition, we measured the number of LAP-positive cells using the clinical specimen of patients with pancreatic cancer, liver cancer, colon cancer, lung cancer and got knowledge about the cancer class that could be targeted for the clinical trial of this development column and patient selection criteria. In addition, we collected clinical information to be related to a problem when we implemented it in the clinical spot, the relationship with various cancer treatment guidelines, a clinical trial protocol and arranged it.

We have been developing to get approval for sales as “LAP-positive cells removal column for cancer patients” not only in Japan but worldwide.

III 評価総合所見

本課題は、平成 24 年度より「血液体外循環による革新的がん免疫療法の開発」をめざして開始され、ステージⅢでは、「ステージⅢ終了後速やかに臨床試験を開始できる」ように、(1)カラム生産技術の確立、(2)非臨床試験の実施、(3)カラム作用機序の解明を目標として研究開発を実施した。

「カラム生産技術の確立」では、パイロット設備導入が予定より遅れたこともあり、パイロット設備での製造条件設定や治験用カラム設計には至らなかったが、基本操作法の確立は完了し、今後の治験用カラム製造に目処がついたことは評価できる。

「非臨床試験の実施」については、生物学的安全性試験において、僅かな溶血は認められたが、問題となる毒性は認められず、安全性の観点から実用化に向けて期待が持てる結果が得られた。一方、本課題の重要な到達点の一つである「がん治療における有効性」を、担癌ラット単回体外循環で明確に示すことができなかった。

「カラム作用機序の解明」については、免疫動態の解明とラット血液の体外循環モデルと評価法の確立は、概ね目標を達成し、そこで得られた知見は今後の研究開発に大いに役立つと思われる。

以上のように、本課題のステージⅢの当初目標である「ステージⅢ終了後速やかに臨床試験を開始できる」段階には至らなかったが、本研究開発を通して、がん免疫療法の分野において、血液体外循環による免疫系の制御による新たな治療法の概念が提示され、将来の医療イノベーションにつながる可能性が示されたと考えられる。

また、PMDA 相談結果を踏まえ、中国での開発に可能性を見いだしており、今後、LAP 陽性細胞吸着性能等の規格化や動物での評価系の工夫を推し進め、臨床試験の早期実施に向けて、開発をさらに進めることが期待できる。