

## 脳実質内腫瘍の化学治療

### —最近の薬物治療の動向—

田中 実\* 藤堂具紀\*

脳実質性腫瘍は治療困難な腫瘍であり集学的治療が必要である。テモゾロミドはアルキル化剤の内服薬で副作用も少ない。膠芽腫では術後放射線治療とテモゾロミド併用療法が標準的治療と考えられる。また、退形成性乏突起神経膠腫では1番染色体短腕と19番染色体長腕の欠失があると予後良好であることが示された。このことから退形成性乏突起神経膠腫への第一選択薬が、従来のPCV(プロレバジン, ロムスチン, ビンクリスチン)療法からテモゾロミドに替わりつつある。しかし、テモゾロミドで悪性グリオーマが治癒するわけではない。既存の治療アプローチには限界があり、新たな治療法の開発が必要である。

#### はじめに

脳実質内腫瘍は浸潤性に発育する悪性腫瘍であり、その多くは手術、放射線治療、化学療法を組み合わせた集学的治療を必要とする。ここでは化学療法を中心に最近の動向を述べる。

一般に腫瘍細胞の発育は、試験管内では指数関数的に増加するが、実際の臨床では腫瘍サイズの増大に伴い遅くなる。これをGompertz<sup>1)</sup>の増殖曲線<sup>2)</sup>という。腫瘍サイズが小さいとき、すなわち増殖する細胞の割合が多いときは化学療法の殺細胞力が強まるが、再増大する腫瘍の割合も増える。一方、腫瘍サイズが大きいと増殖する細胞が少なくなり再増大する腫瘍の割合が減るが、化学療法の殺細胞力も弱まる。化学療法剤の効果を高めるには、Gompertzの増殖曲線を考慮すると、腫瘍サイズが小さいときに感受性のある薬剤を使用し、かつ腫瘍が再増大する時間を与えない工夫が必要になる。

腫瘍が小さいときに投与量を上げるdose intensified chemotherapyは、骨髄抑制の問題があるため限界がある。それよりは投与間隔を短縮して投与回数を

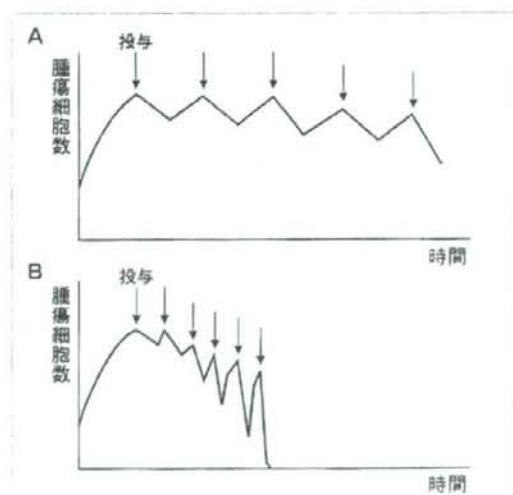


図1 Norton-Simon理論に基づくdose dense chemotherapy

A: 感受性のある化学療法剤を用いても投与間隔が長いと腫瘍が再増大してくるため腫瘍が縮小しにくい。

B: 投与間隔を半分にすると腫瘍が再増大する時間を与えないため腫瘍サイズが縮小する。再増大する速度も速まるが、その分化学療法剤の殺細胞力も高まる。

\* Tanaka M, Todo T. 東京大学医学部附属病院脳神経外科

表1 テモゾロミドの投与方法例

<p>初期治療：放射線照射開始日よりテモゾロミド75mg/m<sup>2</sup>/日を1日1回(空腹時)連続42日間経口投与する。その後4週間休薬する。</p> <p>維持療法：開始量150mg/m<sup>2</sup>/日、1クール(28日間)につき1日1回(空腹時)連続5日間経口投与する。1クールは28日間で、5日間の連続投与と23日間の休みから成る。</p> <p>標準量200mg/m<sup>2</sup>/日、1クール終了後の採血の結果、好中球&gt;1500/<math>\mu</math>l、血小板&gt;10万/<math>\mu</math>lであれば、2クールめ以降は200mg/m<sup>2</sup>/日に増量する。</p> <p>注意：ニューモシスチス肺炎予防として、放射線治療中はバクタT 1×を連日投与する(ベンタミジン吸入300mg 1~2回/月でも可)。なお、本レジメンは退形成性星細胞腫や退形成性乏突起膠腫にも用いられる。</p>
--

増やすdose dense chemotherapyのほうが有用である(図1)。これをNorton-Simon<sup>2)</sup>の理論<sup>†2</sup>という。

感受性薬剤を用いてもいずれば獲得耐性(使っているうちに効かなくなる)が生じて、治療抵抗性の腫瘍が残り治療困難となる。また、1つの薬剤に耐性を獲得すると、作用機序の異なる薬剤にも耐性を獲得する多剤耐性が起ることもある。多剤併用療法が有効となるためには、1)各薬剤の抗腫瘍効果が同等で、2)非交差耐性(多剤耐性化しない薬剤)であって、3)骨髄抑制が克服できることが必要である。脳腫瘍領域では胚腫など一部の腫瘍で高い有効性が示されている。

脳実質性腫瘍の化学療法の場合は、薬が脳血液関門を通過することも重要であり、それが大きく薬剤の選択を狭めている。また、脳腫瘍患者は抗痙攣薬を服用していることが多いため、肝酵素の誘導により化学療法剤が速やかに代謝されてしまうこともあり、抗痙攣薬との相互作用にも注意を要する。

## 1. 膠芽腫(glioblastoma)

膠芽腫はわが国の脳実質性腫瘍の9%、グリオーマの36%を占める最も悪性度の高い腫瘍である。生存期間中央値は50~60週で、5年生存率は8%以下である<sup>3)</sup>。手術では神経症状を悪化させない範囲で可及的広汎に摘出する。

化学療法剤はアルキル化剤が主体である。わが国では最近までニムスチン(ACNU)が用いられてきたが、2006年9月にテモゾロミドが発売されて以来、欧米での第III相臨床試験結果を踏まえて、現在では局所分割放射線照射60Gyと同時にテモゾロミド投与が標準治療となっている<sup>4)</sup>。しかし、生存期間を少しでも延長するために、局所総線量を80Gyまで上げたり<sup>5)</sup>、ホウ素中性子捕捉療法<sup>6)</sup>(熱外中性子によりホウ素化合物を取り込んだ腫瘍細胞に選択的に140Gy相当程度の高線量が照射可能)が行われたりしている。

### ◆アルキル化剤◆

アルキル化とは、核酸の電気陰性基を一般式C<sub>n</sub>H<sub>2n+2</sub>で表される鎖式飽和炭化水素から水素原子1個を取り除いた原子団C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>(アルキル基)で置換してDNA合成を阻害する反応のことである。アルキル化剤は、DNAの陰性荷電部分、主にグアニンN-7位をアルキル化して二重鎖のグアニル塩基どうしを架橋したり、異常塩基対(C-Gに変わってT-G)を形成したりしてDNAの複製やRNAの転写を阻害する。

a. テモゾロミド[temozolomide: C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>  
(イミダゾテトラジン誘導体)](表1)

テモゾロミドは内服薬で、経口後速やかに吸収され加水分解を受けて5-(3-methyltriazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide(MTIC)を介して5-aminoimidazole-

#### †1 Gompertzの増殖曲線 ▶▶▶

多くの固形癌では、腫瘍のサイズが増大すると分裂する腫瘍が静止し、静止期の腫瘍が分裂しにくくなるという現象が見られる。Gompertzの増殖曲線は、この仮定を基に想定された数学的モデルであり、

$Y=c \cdot \exp[-\exp(a-b \cdot X)]$  (a, b, cはパラメーター)で表されるなだらかなS字状曲線のことである。

#### †2 Norton-Simon理論

Gompertzの増殖曲線をモデルとして考えられた化学療法剤の投与方法を示したものの、腫瘍サイズが小さくなると腫瘍の増殖速度が速まるが、化学療法剤の投与間隔を短くすればその用量は同じであっても再増殖するための期間が短くなり治療効果が高まるという考えのこと。

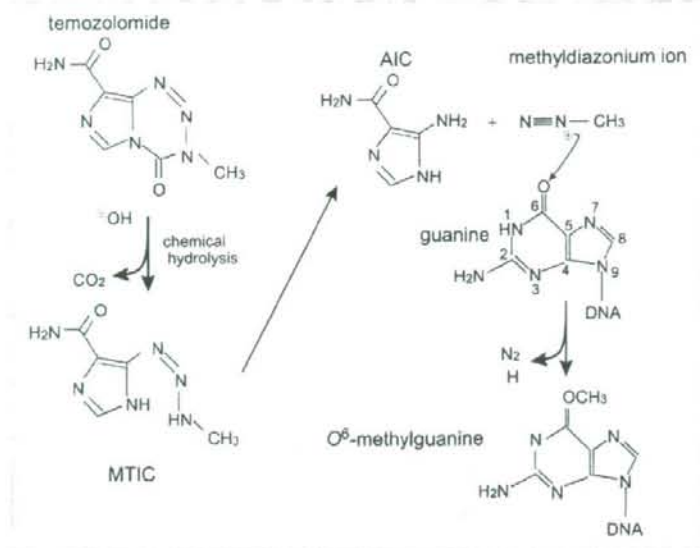


図2 テモゾロミドの作用機序

テモゾロミドはMITCを経てAICとメチルジアゾニウムイオンとなり、このうちメチルジアゾニウムイオンがアルキル化剤としてDNAのグアニン6位の酸素原子をメチル化する。

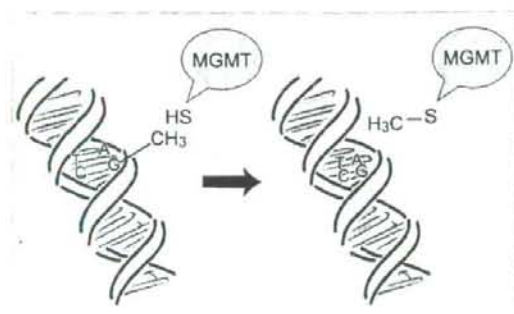


図3 MGMTによる耐性獲得の機序

MGMTはO<sup>6</sup>メチルグアニンからメチル基を除去してDNAを修復する。

4-carboxamide (AIC) とメチルジアゾナトリウムイオン (methyl diazonium ion) が生成する (図2)。このうちメチルジアゾナトリウムイオンがアルキル化剤として作用し、DNAのグアニン6位の酸素原子がメチル化される。これが修復されないかぎりチミンのミスマッチが繰り返され、抗腫瘍効果を発揮する。

副作用：1) 骨髄抑制は比較的軽度 (リンパ球減少や血小板減少など)、2) ニューモシスチス肺炎。

テモゾロミドに対する耐性化の機序：O<sup>6</sup>-methyl-guanine-DNA methyl transferase (MGMT) は、テモゾロミドにより形成されたO<sup>6</sup>メチルグアニンからメチル基を除去してDNAを修復する (図3)。し

たがって、MGMTを発現している腫瘍細胞はアルキル化剤に対する耐性を獲得していると言える。事実、テモゾロミドを用いた第III相臨床試験では、MGMT遺伝子のプロモーター領域がメチル化を受けてMGMTが不活化されている症例群の生存期間中央値は18.2か月であったが、メチル化していない症例群は12.2か月と有意な差があった<sup>7)</sup>。そこで、腫瘍細胞MGMTを枯渇させるために、O<sup>6</sup>ベンジルグアニンを取り込ませて、薬剤耐性を回避しようという試みも行われている。

b. ニムスチン [nimustine hydrochloride :

C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub> · HCl (ニトロソウレア系)]

ニムスチンは日本で開発され、ACNUと略称される。DNAのグアニン6位にクロロエチル基を付加してDNAの合成を阻害する。

副作用：1) 骨髄抑制、2) 間質性肺炎、肺線維症。

c. 塩酸プロカルバジン [procarbazine hydrochloride : C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O · HCl (メチルヒドラジン系)]

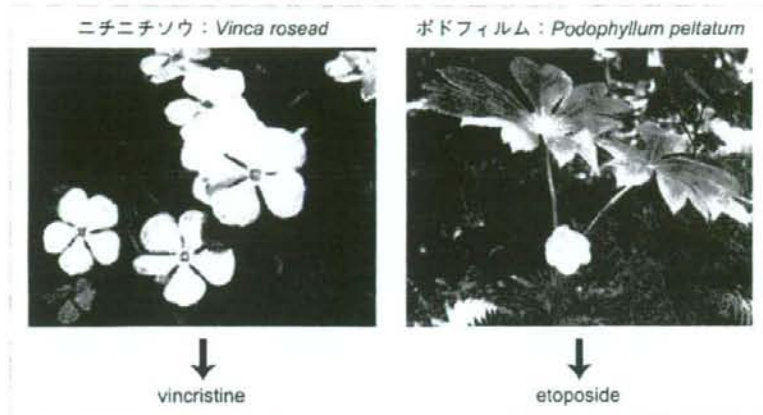
塩酸プロカルバジンはtransfer-RNAのメチル化により、核酸および蛋白合成を抑制する内服薬である。特に乏突起膠腫成分を有するグリオーマに適応がある。

禁忌：飲酒。

表2 ロムスチン (CCNU) の代わりにニムスチン (ACNU) を用いる PAV療法の施行法例

day 1: ACNU (ニドラン) 80mg/m <sup>2</sup> .
day 2~15: 塩酸プロカルバジン内服 100mg/m <sup>2</sup> 3× (通常は 150mg 3×となる).
day 8, day 15: ビンクリスチン 1mg/m <sup>2</sup> (1回投与量は 2mg を超えないこと).
2~3か月おきに行い、合計 8クールを行う。

図4 植物アルカロイド



## 2. 退形成性乏突起膠腫

### (anaplastic oligodendroglioma)

退形成性乏突起膠腫は、かつて原発性脳腫瘍の 0.2%とされたが、ヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity: LOH)<sup>†3</sup>解析が多用されるようになり、近年その診断率が増加した。これは、1番染色体短腕 (1p) と 19番染色体長腕 (19q) の欠失例は、化学療法、特に PCV療法 [塩酸プロカルバジン、ロムスチン (lomustine: CCNU)、ビンクリスチンの併用療法] が有効であると報告されたことに基づいている (表2)。

しかし、最近放射線単独治療と PCV療法併用とを比較した第 III 相臨床試験で、両群で生存期間に有意差がなく (放射線単独群の生存期間中央値 4.7年 vs. PCV療法併用群 4.9年)、1p と 19q の欠失そのものが退形成性乏突起膠腫の予後良好因子であることが判明した<sup>3)</sup>。このことから、LOH解析は化学療法の適否よりもむしろ乏突起膠腫の診断確定の一助に用いられるようになっていく。また、初発の退形成性乏突起膠腫に対しては、骨髄抑制の強い PCV療法を第一選択とせず、より副作用の少ないテモゾロミドを第一選択とする傾向にある。PCV療法の 3剤のうち、ビンクリスチンは植物アルカロイドの一種である。2年生存率 57%で、5年生存率は 33%である<sup>3)</sup>。

### ◆植物アルカロイド◆

植物アルカロイドには、有糸分裂阻害薬のビンカアルカロイドとエトポシド (etoposide) などのトポイソメラーゼ阻害薬がある (図4)。

a. ビンクリスチン [vincristine (VCR): C<sub>46</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> · H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ビンカアルカロイド)]

ビンクリスチン (vincristine) はツルニチニチソウ由来である。微小管の構成成分である微小管 (tubulin) と結合して紡錘糸機能を阻害し、細胞周期 M 期の中期で細胞分裂を阻止する。

副作用: 末梢神経障害。

b. エトポシド [etoposide (VP-16): C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub> (ポドフィロトキシン)]

エトポシドはポドフィラム (*Podophyllum peltatum*) から抽出されたポドフィロトキシン (podophyllotoxin) の誘導体である。エトポシドは DNA トポイソメラー

### †3 LOH (ヘテロ接合性の消失) ▶▶▶

Loss of heterozygosity (LOH) とは、通常一対ある染色体のある領域のうち、片方の対立遺伝子 (allele) が消失した状態のことで、もしその領域に癌抑制遺伝子 (p53 など) が含まれていて、残る allele に点変異や欠乏、メチル化が生じれば、癌抑制遺伝子が不活化され癌化につながる。

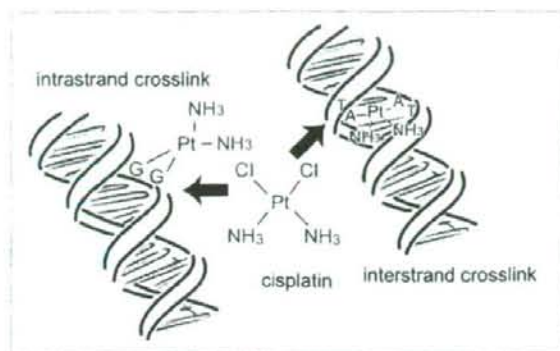


図5 シスプラチンの架橋形成

シスプラチンは、塩素分子の加水分解により活性化され、官能基を2個持つアルキル化剤として作用する。DNAの同一鎖内 (intrastrand crosslink) または異なるDNA鎖間での架橋 (interstrand crosslink) を起してDNA合成を阻害する。

ゼIIを阻害しDNAを切断し、細胞傷害をもたらす。細胞周期のS期後半からG2期に強い作用を示し、効果は作用濃度と作用時間に依存する。

### 3. 胚腫 (germinoma)

胚腫は東アジアに多く、小児から青年期に発生する。原発脳腫瘍の2.8%を占め、松果体部と視床下部から下垂体後葉が好発部位である。胚腫の5年生存率は91%<sup>3)</sup>で、治療が期待できる。手術は病理診断の確定に留め、化学療法を放射線治療に先行して行う。化学療法は白金化合物と植物アルカロイドから成る多剤併用療法を施行し、化学療法3コースめと同時に、拡大局所 (全脳室を含む) に24Gyの分割放射線照射を行う<sup>9)</sup>。なお、卵黄嚢腫瘍や絨毛癌の成分を含む胚細胞腫瘍 (germ cell tumor) ではICE療法 (イホスファミド (ifosfamide)、シスプラチン、エトポシド) を行う。

#### ◆白金化合物◆

白金化合物は細菌に対する電場の影響を検討している際に、白金電極の分解産物が大腸菌の分裂を阻害していることから発見された。白金化合物は、アルキル化剤に分類される。

#### a. シスプラチン [cisplatin (CDDP) : $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ]

白金原子に2つの塩素とアンモニアが配位した化合物 (図5)。2つの塩素部位でDNAのグアニン、アデニンのN-7位に結合するため、架橋が形成される。立体化学でいうトランス型は架橋形成しないため、

表3 シスプラチン-エトポシド (CDDP-VP-16) の投与方法例

day 1~5: シスプラチン20mg/m <sup>2</sup> , エトポシド100mg/m <sup>2</sup> .
3~4週毎に計3コースを行う。胚腫では維持療法は行わない。
注意: カリウム、マグネシウムを適宜加える。

表4 カルボプラチン-エトポシド (CBDCA-VP-16) の投与方法例

day 1: カルボプラチン 450mg/m <sup>2</sup> .
day 1~3: エトポシド150mg/m <sup>2</sup> .
3~4週毎に計3コース。維持療法は行わない。
注意: カルボプラチンは骨髓抑制が強く、3週毎に遂行できない場合がある。

シス型のみが抗癌剤として用いられる。シスプラチンのシスはこれに由来する。

シスプラチンに対する耐性化の機序: 架橋形成などの広汎なDNA損傷は、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) 反応により鎖内架橋が除去され、修復される。シスプラチン耐性はこのNER反応によって生じる。

副作用: 1) 腎毒性: 主に近位尿管を傷害する。腎組織内のシスプラチン濃度を低下させる目的で水分負荷や強制利尿を行う。2) 耳鳴、難聴 (高音域): 蝸牛の外側有毛細胞が傷害される。難聴は不可逆的である。特に総投与量が300mg/m<sup>2</sup>以上では注意が必要 (表3)。

#### b. カルボプラチン [carboplatin (CBDCA) :



シスプラチンの腎毒性を軽減する目的で開発された薬剤。腎毒性は軽いので水分負荷は必要ないが、骨髓抑制はシスプラチンより強い (表4)。

### 4. 中枢神経系原発悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma : PCNSL)

中枢神経系原発悪性リンパ腫は、原発性脳腫瘍の3%程度であったが、近年増加傾向にある<sup>3)</sup>。リンパ組織のない脳に発生する理由は明らかでない。化学療法は、葉酸拮抗剤であるメトトレキサート (methotrexate) の大量療法を放射線治療 (全脳30Gy + 局

図6 葉酸とメトトレキサートの構造式

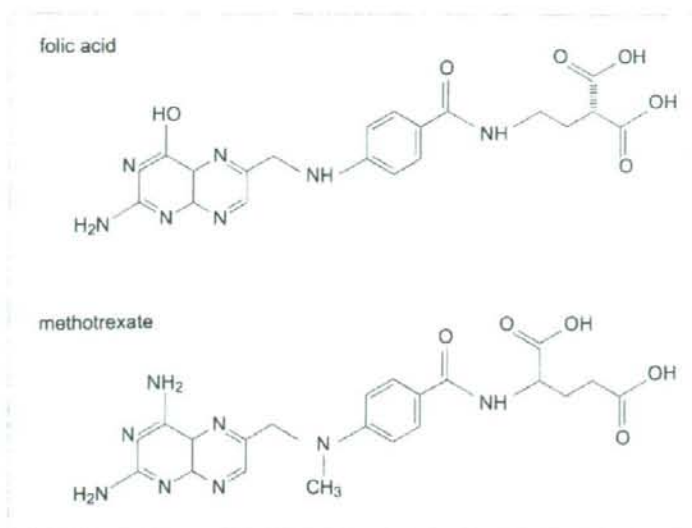


図7 ロイコボリンの構造式

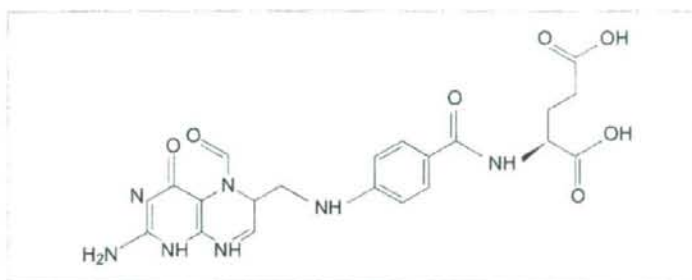


表5 大量メトトレキサート療法の施行法例

day 1 : MTX 3.5g/m <sup>2</sup> を3時間で静注する。
day 2 : MTX投与24時間後から生理食塩水50ml+ロイコボリン15mg/30分を3時間毎。
day 3~5 : 生理食塩水50ml+ロイコボリン15mg/30分を6時間毎(day 5以降もMTX血中濃度0.1 μM未満になるまでロイコボリンは継続する)。
注意 : 尿量は約100ml/時を維持し、尿量60ml/時以下ではダイアモックスを投与する。尿はアルカリ性に保ち、尿pH7.5以下でメイロン1A (20ml)を投与する。また、ループ利尿剤[ラシックスなど(尿を酸性にする)]や非ステロイド系炎症剤(ボルタレン、ロキソニンなど)、プロトンポンプインヒビター(タケプロンなど)の使用は控える。

所10Gy, ただし残存腫瘍あれば局所を30Gyまで追加可能)に先行して行う<sup>10)</sup>。中枢神経系外の悪性リンパ腫に用いられる多剤併用化学療法は一般に有効ではなく、脳血液関門の存在のためと考えられている。かつては生存期間中央値が1年程度であったが、メトトレキサート大量療法により42.5か月に延長した。ただし、70歳以上の高齢者では副作用の頻度が高いため、メトトレキサート大量療法の施行は困難である。

#### ◆葉酸拮抗剤◆

葉酸[folic acid(プテロイルグルタミン酸)]は、ホウレンソウから発見されたビタミンB<sub>9</sub>であり、メチル基(-CH<sub>3</sub>)などをドナー分子から受け取り、核酸やアミノ酸合成の中間体へ渡す役割を担っている(図6)。葉酸が不足すると悪性貧血などを起す。

a. メトトレキサート[methotrexate (MTX) : C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>NaO<sub>5</sub>(葉酸拮抗剤)]

メトトレキサートは2水素葉酸還元酵素(dihydrofolate reductase : DHFR)を競合阻害してテトラ

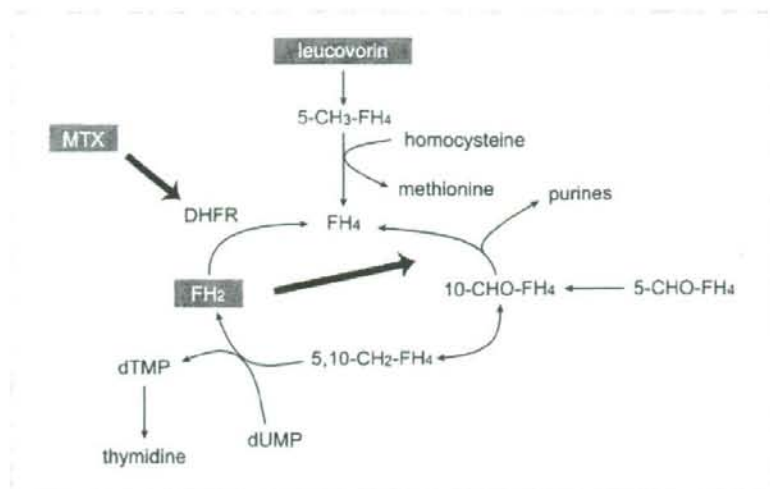


図8 葉酸の代謝系

MTXはDHFRを抑制しFH<sub>2</sub>の産生が抑制される。これによりFH<sub>2</sub>が蓄積し、FH<sub>2</sub>自体がプリン合成を抑制する。腫瘍細胞はロイコボリンを取り込まず、正常細胞のみが取り込む。ロイコボリンはDHFRとは無関係に5-CH<sub>3</sub>-FH<sub>4</sub>などの活性型葉酸に変換され、プリン合成などが再開され正常細胞が救援される。

ヒドロ葉酸 (tetrahydrofolate : FH<sub>4</sub>) の生成を低下させる。これにより2水素葉酸 (dihydrofolates : FH<sub>2</sub>) が蓄積して2水素葉酸自体がプリン合成を阻害する。また、還元型葉酸である10ホルミル4水素葉酸 (10-CHO-FH<sub>4</sub>) と5,10メチル4水素葉酸 (5,10-CH<sub>2</sub>-FH<sub>4</sub>) が枯渇する。これらの還元型葉酸は、プリン塩基であるアデニンやグアニンの合成と、デオキシウリジン1リン酸 (deoxyuridine monophosphate : dUMP) からデオキシチミジン1リン酸 (deoxythymidine monophosphate : dTMP) への転換に必要な物質であって、これらが阻害されることでDNA合成が停止して細胞死に至る。

中枢神経系原発悪性リンパ腫でメトトレキサートを大量に投与するのは、メトトレキサートが中等度に脳血液関門を通過するため、脳組織の濃度を上げるために大量投与が必要であることと、能動的なメトトレキサートの取込み機能が欠落している腫瘍細胞に、受動的に取り込ませるためである。一定時間後にメトトレキサートの解毒薬である活性葉酸補酵素ロイコボリン (leucovorin : C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>CaN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>) (図7) を投与して、能動的にロイコボリンを取り込むことのできる正常細胞を救援する(表5)。ロイコボリンは2水素葉酸リダクターゼとは無関係に活性型葉酸 (N<sup>5</sup>-methyl-FH<sub>4</sub> など) に変換され、プリン合成、核酸合成が再開される(図8)。

## おわりに

脳実質性腫瘍における化学療法最近のトピックスは、テモゾロミドの出現である。初発の膠芽腫を対象としたrandomized controlled studyで、初めて放射線療法と併用した化学療法の有効性を証明し、新たな標準的治療となった。テモゾロミドは副作用の頻度や程度、蓄積が他のアルキル化剤に比べて少ないため、間断なく継続できるという点が効果を出しやすい大きな理由と考えられる。とはいえ、膠芽腫に対するテモゾロミドの使用は、治療はおろか、数か月の生存期間の上乗せが期待できるにすぎない。

この40年間、悪性グリオーマの生存期間にほとんど改善が見られないということは、放射線治療や化学療法といった既存の治療アプローチを組み合わせたり、用法を変えたりする“工夫”だけでは悪性グリオーマの治療を目指すことが到底できないことを示している。腫瘍特異的に増殖する遺伝子組換えヘルペスウイルスを脳腫瘍に感染させて、ウイルスの作用で腫瘍細胞を破壊するウイルス療法の臨床開発が進んでいる。脳実質性腫瘍の治療成績向上には、革新的な治療アプローチの開発をますます推進することが重要である。

## ■文献

- 1) Gyllenberg M, Webb GF: Quiescence as an explanation of Gopertzian tumor growth. *Growth Dev Aging* 53: 22-33, 1989.
- 2) Simon R, Norton L: The Norton-Simon hypothesis: designing more effective and less chemotherapeutic regimens. *Nat Clin Pract Oncol* 3: 406-407, 2006.
- 3) Report of brain tumor registry of Japna (1969-1996) 11th edition. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 43, 2003.
- 4) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996, 2005.
- 5) Tanaka M, Ino Y, Nakagawa K, et al: High-dose conformal radiotherapy for supratentorial malignant glioma: a historical comparison. *Lancet Oncol* 6: 953-960, 2005.
- 6) Miyatake S, Kawabata S, Kajimoto Y, et al: Modified boron neutron capture therapy for malignant gliomas performed using epithermal neutron and two boron compounds with different accumulation mechanisms: an efficacy study based on finding on neuroimages. *J Neurosurg* 103: 1000-1009, 2005.
- 7) Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 997-1003, 2005.
- 8) van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, et al: Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progress-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma and anaplastic oligoastrocytoma: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 24: 2715-2722, 2006.
- 9) Matsutani M, Japanese Pediatric Brain Tumor Study Group: Combination chemotherapy and radiation therapy for CNS germ cell tumors: the Japanese experience. *J Neurooncol* 54: 331-316, 2001.
- 10) Poortmans PM, Kluin-Nelemans HC, Haaxma-Reiche H, et al: High-dose methotrexate-based chemotherapy followed by consolidating radiotherapy in non-AIDS-related primary central nervous system lymphoma: European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Group Phase II Trial 20962. *J Clin Oncol* 21: 4483-4488, 2003.

## Summary

### Treatment of Intra-axial Brain Tumors: Recent Trend

Minoru Tanaka\*, Tomoki Todo\*

Intra-axial brain tumors are recalcitrant tumors that require multidisciplinary treatment approaches. For the patients with glioblastoma, post-operative radiotherapy plus chemotherapy with temozolomide is currently considered as the standard therapy. Temozolomide is an oral alkylating agent with a relatively low rate of side effects. Recently, the loss of chromosomes 1p and 19q has been shown to be a predictor of good prognosis for anaplastic

oligodendroglioma irrespective of chemotherapy. Thus, also for anaplastic oligodendroglioma, temozolomide is currently more often selected as the first-line chemotherapy instead of once-prevalent PCV therapy (procarbazine, lomustine, vincristine). Despite the prevalence of temozolomide, there is still no expecting of cures for malignant gliomas. In order to improve the outcome of intraaxial tumors, we believe it is important to facilitate the development of new therapeutic approaches such as oncolytic virus therapy.

\*Department of Neurosurgery, The University of Tokyo





available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejca



## Pilot study of anti-angiogenic vaccine using fixed whole endothelium in patients with progressive malignancy after failure of conventional therapy

Yurai Okaji<sup>a,b,\*</sup>, Nelson H. Tsuno<sup>a,b</sup>, Minoru Tanaka<sup>a,c</sup>, Satomi Yoneyama<sup>b</sup>, Mika Matsushashi<sup>a</sup>, Joji Kitayama<sup>b</sup>, Shinsuke Saito<sup>b</sup>, Yutaka Nagura<sup>a</sup>, Takeshi Tsuchiya<sup>b</sup>, Jun Yamada<sup>b</sup>, Junichiro Tanaka<sup>b</sup>, Naoyuki Yoshikawa<sup>a</sup>, Takeshi Nishikawa<sup>b</sup>, Yasutaka Shuno<sup>b</sup>, Tomoki Todo<sup>c</sup>, Nobuhito Saito<sup>c</sup>, Koki Takahashi<sup>a</sup>, Hirokazu Nagawa<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Transfusion Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>b</sup>Department of Surgical Oncology, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>c</sup>Department of Neurosurgery, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 September 2007

Received in revised form

16 October 2007

Accepted 22 October 2007

Available online 3 December 2007

#### Keywords:

Angiogenesis

Blood supply

Colorectal cancer

Endothelium

Malignant brain tumour

Immunotherapy

Vaccine

### ABSTRACT

Vaccines targeting tumour angiogenesis were recently shown to inhibit tumour growth in animal models. However, there is still a lack of information about the clinical utility of anti-angiogenic vaccination. Therefore, here, we aimed to test the clinical effects of a vaccine using glutaraldehyde-fixed human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Six patients with recurrent malignant brain tumours and three patients with metastatic colorectal cancer received intradermal injections of  $5 \times 10^7$  HUVECs/dose (in total 230 vaccinations). ELISA and flow cytometry revealed immunoglobulin response against HUVECs' membrane antigens. ELISPOT and chromium-release cytotoxicity assay revealed a specific cellular immune response against HUVECs, which were lysed in an effector-targets ratio-dependent manner. Gadolinium-contrasted MRI showed partial or complete tumour responses in three malignant brain tumour patients. Except for a DTH-like skin reaction at the injection site, no adverse effect of vaccination could be observed. Our results suggest that the endothelial vaccine can overcome peripheral tolerance of self-angiogenic antigens in clinical settings, and therefore should be useful for adjuvant immunotherapy of cancer.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Angiogenesis, the growth of new blood vessels, is essential for tumour growth and metastasis.<sup>1–5</sup> Whereas angiogenesis occurs minimally in normal adult tissues, it is intensive in developing tumours, enabling them to grow over the diameter of a few mm, the so called 'angiogenic limit'. Angiogenesis-

associated antigens over-expressed on tumour endothelium are specific molecular addresses targeted by anti-angiogenic therapy.<sup>6–10</sup> Therapeutic damage of tumour endothelium activates the coagulation cascade, and consequently results in the obstruction of tumour vasculature, with hypoxia and shrinkage of tumours due to necrosis, whereas it does not affect blood supply in normal adult tissues.<sup>11</sup> As a result, cancer

\* Corresponding author. Address: Department of Transfusion Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. Tel.: +81 3 3815 5411x35165; fax: +81 3 3816 2516.

E-mail address: okaji-tky@umin.ac.jp (Y. Okaji).

0959-8049/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ejca.2007.10.018

patients coexist with small tumours that can neither grow nor metastasise, under the condition called 'tumour dormancy'<sup>12</sup> or 'cancer without disease'.<sup>13</sup>

Vaccines targeting tumour angiogenesis were recently shown by us and others to inhibit tumour growth in animal models.<sup>14,15</sup> However, there is still a lack of information about the clinical utility of anti-angiogenic vaccination. Therefore, here, we aimed to test the clinical effects of a vaccine using glutaraldehyde-fixed human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

## 2. Patients and methods

### 2.1. Eligibility criteria

Patients with a recurrent malignant brain tumour or a metastatic colorectal cancer, previously treated in our hospital, were eligible. Eligibility criteria were as follows: A progressive disease resistant to conventional therapy, as assessed by contrasted computer tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI), and classified according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours<sup>16</sup>; at least a 1 month period after finishing prior therapy; WHO performance status 0-3 (malignant brain tumours) or 0-2 (colorectal cancer); haemoglobin  $\geq 8$  g/dL; bilirubin  $\leq 2.0$  mg/dL; serum glutamic oxaloacetic transaminase  $\leq 100$  IU/L; serum glutamate pyruvate transaminase  $\leq 100$  IU/L; creatinine  $\leq 2$  mg/dL; blood urea nitrogen  $\leq 30$  mg/dL; creatinine clearance  $\geq 90$  ml/min; ejection fraction by echocardiography  $\geq 70\%$  and prothrombin time  $\geq 70\%$ . In addition, patients with a psychiatric disorder, extensive cachexia, multiple cancer types, active infection, autoimmune disease or myocardial ischaemia were excluded. The Institutional Review Board of the University of Tokyo approved this protocol. All patients provided written informed consent before enrolment on protocol, in accordance with the Declaration of Helsinki.

### 2.2. Study design

This single arm phase I study was carried out between August 2003 and August 2007 to assess the clinical utility of a vaccine using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The enrolled patients were given intradermal injections of  $5 \times 10^7$  HUVECs/dose, first month weekly, and then every 2 weeks. Immune response was evaluated by examining patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and sera, which were isolated monthly and frozen until being tested in immunological assays later at the same time. Tumour response was assessed monthly by contrasted computer tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours.<sup>16</sup> Adverse effects were evaluated by monitoring the patients according to the Common Toxicity Criteria.<sup>17</sup>

### 2.3. Vaccine preparation and quality control

HUVECs were isolated from healthy donors as described,<sup>14</sup> and cultured on 0.1% gelatin (w/v)-coated dishes in EC-SFM (Life Technologies, Grand Island, NY), according to the manu-

facturer's recommendations. Specific properties of angiogenic endothelium were confirmed by measuring the expression of CD31, CD51, CD105, CD146, and binding of UEA (*Ulex europaeus*) lectin by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA; antibody concentration was 5  $\mu$ g/ml). Negative presence of endotoxin in the cell cultures was confirmed by Toxicolour test (Seikagaku Co., Tokyo, Japan). HUVECs of up to ten passages were harvested, and fixed with 0.025% glutaraldehyde (v/v) as described,<sup>14</sup> and stored at  $-80$  °C in single dose aliquots, containing  $5 \times 10^7$  cells/ml physiological saline for injection.

### 2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

96-well immunoplates (NUNC, Roskilde, Denmark) were coated with 10  $\mu$ g/ml HUVECs' membrane proteins overnight at 4 °C, and blocked with 1% BSA (w/v), for 2 h at 37 °C. Patients' sera, diluted 2x, were used in duplicates as the primary antibody, and horseradish peroxidase conjugate of anti-IgG (Zymed, San Francisco, CA), diluted 2000x, as the secondary antibody. Colour-development by ABTS (ICN, Aurora, OH) was followed by determining optical density (O.D.) at 405 nm. For negative control, wells coated with K-562 (ATCC, Manassas, VA) were used. IgG reactivity was expressed as the ratio to the values measured in the pre-vaccination samples that were considered 100%.

### 2.5. Isolation of patients' B cells and flow cytometry

Patients' PBMC were cultured first in the supernatant of B95-8 (cotton-top tamarine lymphocyte cell line secreting Epstein-Barr virus, obtained from Japanese Collection of Research Bioresources, and cultured in RPMI - 10%FCS) supplemented with 5  $\mu$ g/ml CpG-B-DNA (HyCult Biotechnology, Uden, The Netherlands), 10 ng/ml IL-6 (Strathmann Biotec, Zurich, Switzerland) and 2  $\mu$ g/ml membrane proteins of HUVECs for 1 week, and then in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS (v/v), 10 ng/ml IL-6, and 1% antibiotic/antimycotic (v/v; at final concentration of 100 U/ml penicillin G, 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulphate and 250 ng/ml amphotericin B; Life Technologies) for 3 weeks. Specific phenotype of selectively immortalised B cells was confirmed by analysing their expression of CD19 (B cell marker) and CD138 (plasmatic cells marker) by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences).

The supernatants of B cell media were added in the amounts of 200  $\mu$ l to  $2 \times 10^5$  HUVECs for 30 min at 4 °C. The cells were washed two times, incubated with FITC-labelled antibodies against human IgM or IgG (Zymed), diluted 40x, for another 30 min at 4 °C. Finally, the cells were washed two times, and their fluorescence measured in the flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences).

### 2.6. IFN- $\gamma$ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay

Human IFN- $\gamma$  ELISPOT kit (BD Biosciences) was used for the detection of patients' PBMC secreting IFN- $\gamma$  in the presence or absence of HUVEC membrane proteins, according to the manufacturer's recommendations. The numbers and areas of colour-developed IFN- $\gamma$  immunospots were determined by

KS ELISPOT system (Carl Zeiss Microimaging, Goettingen, Germany). The results were expressed as % IFN- $\gamma$  spots, calculated as the ratio to the values measured in the pre-vaccination samples that were considered 100%.

### 2.7. Intracellular cytokine flow cytometry (CFC) assay

Re-stimulated patients' PBMC were carefully removed from the immunoplates at the end of ELISPOT assays, cultured for another 6 h in a medium supplemented with 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A (Sigma, Saint Louis, MO), fixed with 3% paraformaldehyde (v/v), permeabilised with 0.5% Tween-20 (v/v), and stained with 5  $\mu$ g/ml FITC-PE-labelled monoclonal antibodies against IFN- $\gamma$  and CD3 (BD Biosciences). % CD3(+)IFN- $\gamma$ (+) cells were determined by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences), and expressed as the ratio to the values obtained in the pre-vaccination samples that were considered 100%.

### 2.8. Cytotoxicity T lymphocyte (CTL) assay

Patients' PBMC were used as effectors against HUVECs or K562 at effectors:targets ratios 100:1, 30:1 and 5:1, in a  $^{51}$ Cr-release cytotoxicity assay as described,<sup>14</sup> with some modifications as follows. Medium used for re-activation culture was RPMI-1640 - 10% FCS (v/v) - 100 U/ml recombinant human IL-2 (Sigma) - 1% antibiotic/antimycotic (v/v). % specific lysis was calculated using the formula (experimental release - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release)  $\times$  100. The results were expressed as the ratio to the values of the pre-vaccination samples that were considered 100%.

## 3. Results

### 3.1. Patient characteristics

Nine patients with a progressive malignancy, i.e. six patients with a recurrent malignant brain tumour and three patients with a metastatic colorectal cancer (median age: 53 years, range: 43-68 years), were enrolled in this study.

### 3.2. Properties of vaccine endothelium

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from fresh umbilical cords, cultured with angiogenic stimulators, fixed, and used as vaccines (Fig. 1a). The cells expressed CD31, CD51, CD105 and CD146, as well as bound UEA lectin, suggesting they were angiogenic endothelium (Fig. 1b).

### 3.3. Safety of vaccination

The patients received intradermal injections of  $5 \times 10^7$  HUVECs/dose in the vaccination protocol (Fig. 1c), in a total amount of 230 vaccinations (Table 1; median number of vaccinations: 26 doses, range: 8-50 doses; median vaccination period: 12 months, range: 3-24 months). Except for a DTH-like skin reaction at the injection site, no adverse effect could be observed (data not shown).

### 3.4. Specific antibody response

Specific antibodies against HUVECs' membrane antigens were detected in the sera of eight patients (Fig. 2a), and could also be detected in the culture media of patients' B cells (Fig. 2b-d).

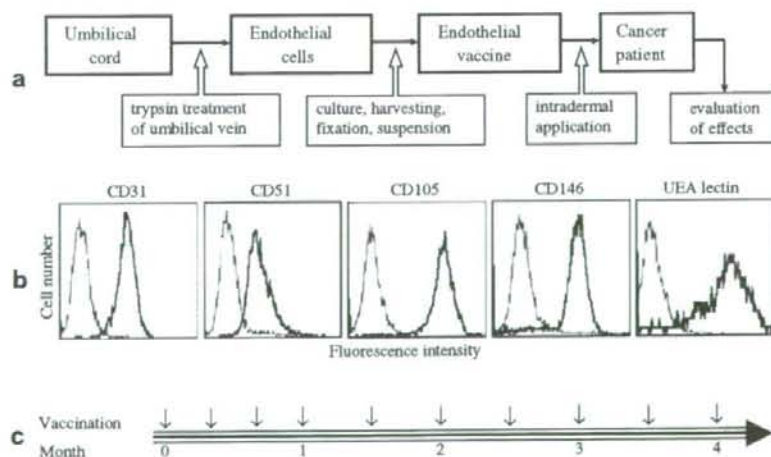


Fig. 1 - Study design. (a) Study protocol. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated, cultured, harvested, fixed, and periodically injected in cancer patients. Vaccination effects, i.e. immune and tumour responses were evaluated monthly. (b) Confirmation of specific properties of HUVECs by flow cytometry. The cells expressed CD31, CD51, CD105 and CD146, as well as bound UEA lectin, suggesting they were angiogenic endothelium. (c) Vaccination protocol. The patients received vaccinations first month weekly, and then every 2 weeks.

Table 1 - Patients' characteristics and clinical response

#	Age/sex	Diagnosis	Prior therapy	Period	Doses	Ab	Cell	Response
1	47/F	PBMrec	sur, cht, xrt	24*	50*	+	+	PR
2	47/F	GBMrec	sur, cht, xrt	24*	50*	+	+	PR
3	48/F	AODrec	sur, cht, xrt	21*	44*	+	nd	CR
4	66/F	CRCmet	none	11	24	+	+	PD
5	54/M	GBMrec	sur, cht, xrt	8	18	+	+	PD
6	57/F	CRCmet	cht	7	16	+	+	PD
7	68/M	CRCmet	sur, cht, xrt	4	10	+	+	PD
8	46/M	GBMrec	sur, cht, xrt	4	10	+	nd	PD
9	43/F	AODrec	sur, cht, xrt	3	8	-	-	PD

Abbreviations: M, male; F, female; PBMrec, recurrent pinealoblastoma; GBMrec, recurrent glioblastoma multiforme; AODrec, recurrent anaplastic oligodendroglioma; CRCmet, metastatic colorectal cancer; sur, surgical therapy; cht, chemotherapy; xrt, radiation therapy; Period, vaccination period in months; Doses, number of vaccination doses; Ab, antibody response; Cell, cellular response; nd, not determined; Response, clinical tumour response; PR, partial response; CR, complete response; PD, progressive disease.  
a Still in progress.

These antibodies reacted neither with non-endothelial control cells K-562 by ELISA and flow cytometry, nor with human leucocyte antigens of platelets pooled from multiple donors by mixed passive haemagglutination as described<sup>18</sup> (data not shown).

### 3.5. Specific cellular response

Increased secretion of IFN- $\gamma$  as a response to the stimulation with HUVECs' membrane antigens was detected in six patients (Fig. 3a-c). Patients' cellular effectors specifically lysed HUVECs (Fig. 3d), but not K-562 (data not shown).

### 3.6. Clinical tumour response

Two partial and one complete tumour responses were observed on gadolinium contrasted MRI scans after 9 months of vaccination in three patients with recurrent malignant

brain tumours (Fig. 4). In detail, in the patient #1 with pinealoblastoma, a recurrent disease accompanied by dissemination in the cerebrospinal fluid space that resulted in multiple new tumour lesions outside the post-operative radiation field (including one lesion being localised near the brain stem) was first detected 2 years after completed prior therapy. In the patient #2 with glioblastoma multiforme, and patient #3 with anaplastic oligodendroglioma, recurrences were first detected 9 and 20 months after completed prior therapy, respectively. Recurrent disease was treated first by chemotherapy with temozolomide, but without any effect, and therefore the patients were enrolled in the present study. After 9 months of subsequent endothelial vaccination, partial tumour responses lasting over 12 months were observed in the patients #1 and #2, and a complete tumour response lasting over 9 months was observed in the patient #3 (the protocol was still in progress at the time of manuscript preparation).

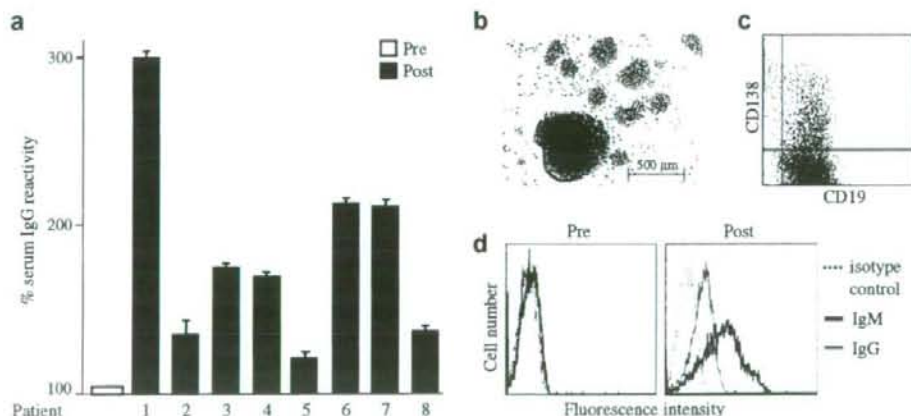
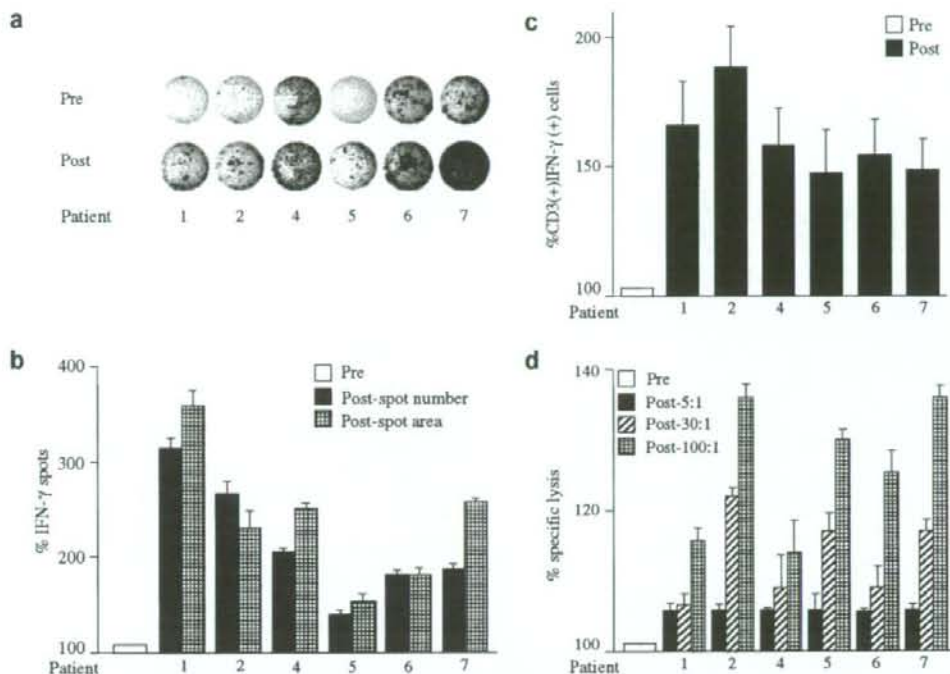


Fig. 2 - Specific antibody response. (a) Reactivity of patients' serum IgG with HUVECs' membrane antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. Representative relative reactivities (Post/Pre) determined during best responses are shown. (b) Patients' peripheral blood B cells. Representative growing colonies of patient #1 B cells, selectively immortalised and cultured, are shown. (c) CD19 and CD138 expression on patient #1 B cells measured by flow cytometry. (d) Reactivity of IgM and IgG secreted by patient #1 B cells with HUVECs measured by flow cytometry.



**Fig. 3** - Specific cellular response. (a) IFN- $\gamma$  secretion by patients' PBMC in the presence of HUVECs measured by enzyme-linked immunospot assay. Representative wells with stained immunospots are shown. (b) Relative numbers and areas of IFN- $\gamma$  immunospots (Post/Pre) obtained by image analysis. (c) Relative numbers of lymphocytes secreting IFN- $\gamma$  (Post/Pre) detected by intracellular cytokine flow cytometry assay. (d) Relative specific lysis of HUVECs by patients' cellular effectors in an effectors:targets ratio-dependent manner (at E:T ratios of 5:1, 30:1 and 100:1; Post/Pre), detected by a chromium-release cytotoxicity assay.

#### 4. Discussion

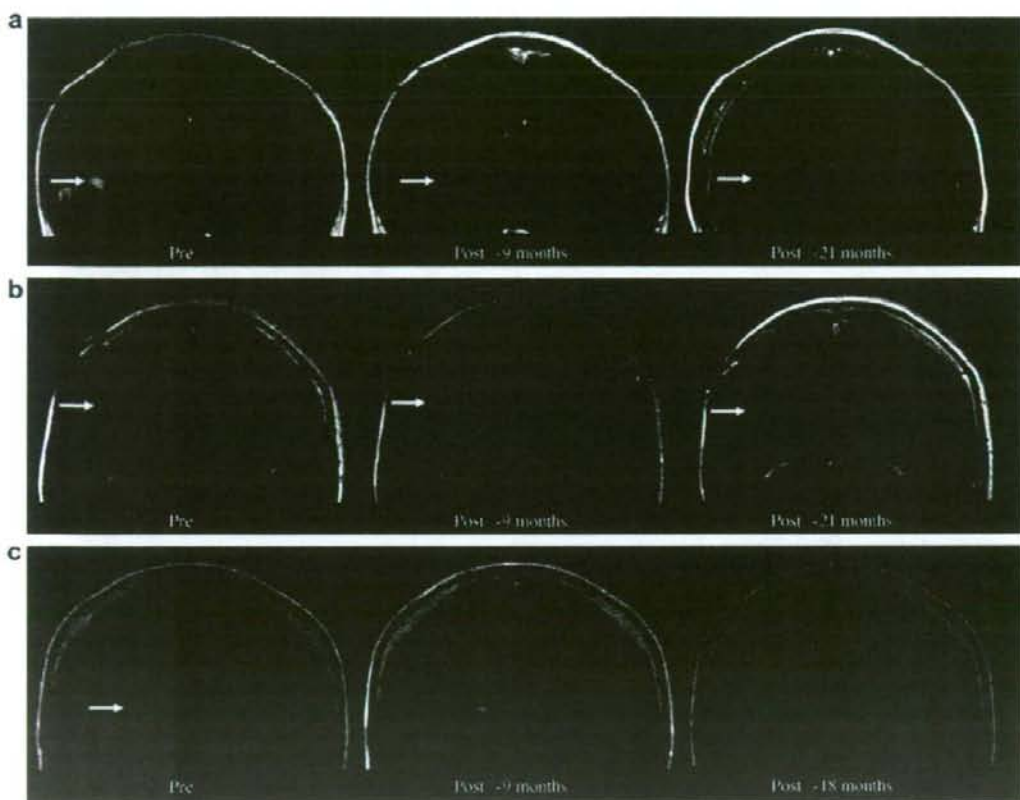
In this study, we tested the clinical utility of vaccination using glutaraldehyde-fixed human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in patients with a progressive malignancy. HUVECs share specific angiogenic properties with tumour endothelium such as the overexpression of angiogenic antigens CD51<sup>19</sup> and CD105,<sup>20</sup> and inhibit tumour growth in pre-clinical mouse models.<sup>14,21,22</sup> Therefore, we hypothesised that HUVECs could also be effective in clinical settings, especially in the patients with malignant brain tumours, which are known to be among the most vascularised tumours.<sup>23</sup> In addition, we were interested in whether HUVECs could work in the patients with colorectal cancer, which on the one hand still remains a difficult target for cancer immunotherapy,<sup>24</sup> but on the other hand was recently shown to respond to anti-angiogenic therapy.<sup>14,25</sup>

The vaccination protocol in this study was designed to provide strong antigenic stimulation to overcome the peripheral tolerance of angiogenesis. Therefore, the number of endothelial cells administered in one dose was  $5 \times 10^7$ , i.e. five times more than commonly used in the vaccines based on tumour cells, to ensure that the amount of administered anti-

gens is sufficient to induce a specific immune response. In addition, here, we decided to continue the vaccination protocol in a limited number of patients for long periods of time rather than to treat many patients with a limited number of doses; first, to reveal potential toxicity of the endothelial vaccine, and second, to ensure that the antigenic stimulation is sufficient for inducing a long lasting immune response. We found that except for a DTH-like skin reaction at the injection site, the endothelial vaccine caused no adverse effects to the recipients during a long term administration. In future studies, a minimum effective dose will be evaluated to improve the cost-to-performance ratio of the vaccination protocol.

One month after starting the vaccination protocol, specific antibodies and cellular effectors against HUVECs' membrane antigens were detected in the patients with recurrent malignant brain tumours as well as metastatic colorectal cancer. Analysis of candidate target antigens has recently been ongoing so as to get better insight into the mechanisms controlling immune tolerance of angiogenesis, and to develop more effective protocols for anti-angiogenic endothelial vaccination.

In three patients with recurrent malignant brain tumours, marked tumour shrinkage could be observed over an



**Fig. 4 - Clinical tumour response.** Partial tumour responses were observed in patient #1 with pinealoblastoma (a) and patient #2 with glioblastoma (b), whereas a complete tumour response was observed in patient #3 with anaplastic oligodendroglioma (c). Representative gadolinium contrasted magnetic resonance imaging scans taken before vaccination (Pre), after 9 months of vaccination (Post-9 months), and after an extended vaccination period (Post-21 months and Post-18 months) are shown. Main target lesions are indicated by arrows.

extended period of vaccination. Recently, it has been reported that in some patients with malignant brain tumours, immediate post-radiotherapy changes that mimic tumor progression on MRI, the so called 'pseudo-progression', can cause an overestimation of therapeutic results, and therefore the patients enrolled in a clinical study should be at least 3 months after completed radiation therapy.<sup>26-29</sup> In the present study, recurrent disease was first observed in our patients more than 9 months after completed post-operative radiation therapy of the original tumour, some of the recurrent tumours being localised outside the radiation therapy field, and therefore suggested to be true progression. Given that neither recurrent tumour was treated by radiation therapy, and chemotherapy with temozolomide was ineffective, we concluded that the tumour responses observed in this study should be attributed to the effects of endothelial vaccination.

Human tumour cells share some properties with the angiogenic endothelium, such as expression of CD51 and

CD105, and therefore it can be hypothesised that, theoretically, tumour cells might be potential co-targets of antiangiogenic endothelial vaccination. Although our preliminary data of *in vitro* immunological assays supported this hypothesis (data not shown), we suppose that under *in vivo* conditions, tumour endothelium should be a primary target. It is due to the fact that tumour endothelium is lining the intra-luminal surface of tumour vasculature, and consequently is first reached by immune effectors induced by endothelial vaccination. As mentioned in the Introduction section, therapeutic damage of tumour endothelium activates the coagulation cascade of tumour vasculature, and consequently is first reached by immune effectors induced by endothelial vaccination. As mentioned in the Introduction section, therapeutic damage of tumour endothelium activates the coagulation cascade, and consequently results in the obstruction of tumour vasculature that makes the immune effectors unable to sufficiently reach tumour cells.

In contrast, with the three responding malignant brain tumour patients, neither tumour response nor other improvement of the clinical outcome could be observed in the other patients. The reason for the discrepancy between the immune response to vaccination and tumour response

in these patients is not yet known, but we can speculate that it might be caused by either strong immunosuppression in the tumour microenvironment,<sup>30-32</sup> or by possible adaptation of some tumour cells to the consequences of anti-angiogenic therapy, as was recently described by others.<sup>33</sup> Discrepancy between the immunological and anti-tumour effects was also reported by many other authors clinically investigating cancer vaccines,<sup>24,34</sup> and therefore we suppose that there is a strong need for studies searching for factors that make cancer patients responsive or resistant to active immunotherapy.

In summary, the present pilot study showed the safety and potential clinical utility of the anti-angiogenic vaccine using fixed whole endothelium. Immune response, involving activation of both specific humoral and cellular immunity, was observed in eight of nine patients. Partial or complete tumour responses were observed in three of six malignant brain tumour patients, but not in three colorectal cancer patients. To obtain further insight into the possibilities and limitations of this novel approach, another study employing different dose levels, adjuvants and combination with conventional therapy modalities against various tumour types is now ongoing.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Acknowledgement

The authors thank Ms. Michiru Kawabata and Ms. Madoka Nishimori from the Department of Transfusion Medicine (The University of Tokyo), and Dr. Tomoyuki Fujii from the Department of Gynaecology and Obstetrics (The University of Tokyo) for their kind advisory and technical assistance. This study was supported in part by the Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; in part by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; and in part by the Japan Society for the Promotion of Science.

#### REFERENCES

- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
- Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996;32A:2451-60.
- Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:795-803.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
- Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998;279:377-80.
- Kolonin M, Pasqualini R, Arap W. Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5:308-13.
- Liao F, Doody JF, Overholser J, et al. Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res* 2002;62:2567-75.
- Seon BK, Matsuno F, Haruta Y, Kondo M, Barcos M. Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. *Clin Cancer Res* 1997;3:1031-44.
- Shaheen RM, Ahmad SA, Liu W, et al. Inhibited growth of colon cancer carcinomas by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *Br J Cancer* 2001;85:584-9.
- Burrows FJ, Thorpe PE. Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8996-9000.
- Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 2006;5:1779-87.
- Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature* 2004;427:787.
- Okaji Y, Tsuno NH, Kitayama J, et al. Vaccination with autologous endothelium inhibits angiogenesis and metastasis of colon cancer through autoimmunity. *Cancer Sci* 2004;95:85-90.
- Okaji Y, Tsuno NH, Saito S, et al. Vaccines targeting tumour angiogenesis - a novel strategy for cancer immunotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:363-70.
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors, European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
- Trotti A, Byhardt R, Stetz J, et al. Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:13-47.
- Shibata Y, Juji T, Tohyama H, Sakamoto H, Ozawa N, Kano K. Mixed passive hemagglutination with soluble platelet antigens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984;74:93-6.
- Ruegg C, Dormond O, Foletti A. Suppression of tumor angiogenesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells: which side to target? *Endothelium* 2002;9:151-60.
- Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004;2:18.
- Chen XY, Zhang W, Wu S, et al. Vaccination with viable human umbilical vein endothelial cells prevents metastatic tumors by attack on tumor vasculature with both cellular and humoral immunity. *Clin Cancer Res* 2006;12:5834-40.
- Wei YQ, Wang QR, Zhao X, et al. Immunotherapy of tumors with xenogeneic endothelial cells as a vaccine. *Nat Med* 2000;6:1160-6.
- Kirsch M, Schackert G, Black PM. Anti-angiogenic treatment strategies for malignant brain tumors. *J Neurooncol* 2000;50:149-63.
- Nagorsen D, Thiel E. Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:3064-9.
- Iqbal S, Lenz HJ. Angiogenesis inhibitors in the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2004;31:10-6.
- Norris AM, Carrington BM, Slevin NJ. Late radiation change in the CNS: MR imaging following gadolinium enhancement. *Clin Radiol* 1997;52:356-62.
- de Wit MC, de Bruin HG, Eijkenboom W, Sillevius Smitt PA, van den Bent MJ. Immediate post-radiotherapy changes in

- malignant glioma can mimic tumor progression. *Neurology* 2004;63:535-7.
28. Mason WP, Maestro RD, Eisenstat D, et al. Canadian recommendations for the treatment of glioblastoma multiforme. *Curr Oncol* 2007;14:110-7.
  29. Taal W, Brandsma D, de Bruin HG, et al. The incidence of pseudo-progression in a cohort of malignant glioma patients treated with chemo-radiation with temozolomide. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007;25:2009.
  30. Evans C, Dalgleish AG, Kumar D. Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:1163-77.
  31. Muller AJ, Scherle PA. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2006;6:613-25.
  32. Roth P, Aulwurm S, Gekel I, et al. Regeneration and tolerance factor: a novel mediator of glioblastoma-associated immunosuppression. *Cancer Res* 2006;66:3852-8.
  33. van Kempen LC, Leenders WP. Tumours can adapt to anti-angiogenic therapy depending on the stromal context: lessons from endothelial cell biology. *Eur J Cell Biol* 2006;85:61-8.
  34. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NF. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10:909-15.





## 福原 浩, 藤堂具紀

東京大学大学院医学系研究科泌尿器科講師  
同 脳神経外科・トランスレーショナルリサーチセンター  
特任教授

### はじめに

癌治療の分野では、ウイルスは遺伝子治療において治療遺伝子を運ぶベクターとして活用されてきた。近年まで、遺伝子治療に使用するウイルスは安全性に留意して、複製できないように工夫されたものをもっぱら用いてきた。しかし原則として、感染した細胞でしか治療遺伝子の発現がみられないため、100%の感染効率を得ることが技術的に困難である以上、癌治療の方法論としては限界がある。そこで、複製が可能なウイルス(増殖型ウイルス)を用いた癌の治療(ウイルス療法)が注目を浴びてきている。

ウイルス療法は、癌細胞に感染させたウイルスが複製する過程で宿主細胞を破壊するという、ウイルスが本来有する直接的な殺細胞効果を利用する。また、ウイルス療法は、自殺遺伝子や免疫刺激遺伝子などの治療遺伝子の発現を必要としない点およびウイルス自体が腫瘍内で増幅する点で、遺伝子治療とは異なった癌治療法である。ウイルス療法概念そのものは古くか

ら存在し、100年前にはすでに野生型や自然弱毒株のウイルスが癌治療に試された。遺伝子工学技術の進歩にともなうウイルス療法開発は飛躍的に発展し、最近では第二世代や第三世代の遺伝子組換えウイルスも開発されている。本稿では、現在臨床試験にまで進んでいるウイルス療法を中心に最近の知見を紹介する。

### 癌のウイルス療法とは

癌に対する新規の治療として、小分子薬やモノクローナル抗体などが開発されているが、いまだに格段なる治療率向上に至っておらず、新しいアプローチの出現が待たれる。また、ひとつのアプローチによる治療法では、癌細胞が耐性を獲得してしまう場合が多い。そのため、望ましい新治療法とは、既存の治療法と作用機序が異なり、しかも相乗効果が期待できる治療法であるといえる。ウイルス療法は、そのような理想的

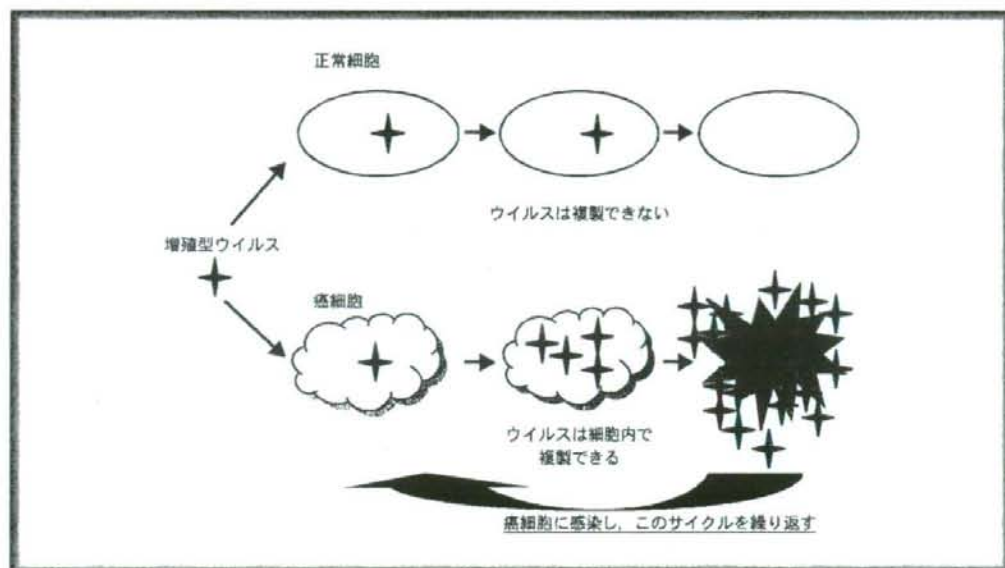


図1 ウイルス療法の原理

な新治療法となる可能性を秘めている。癌細胞に感染したウイルスは、複製の過程で宿主細胞を破壊しつつ周囲に拡散して再び癌細胞に感染するというサイクルを繰り返して抗腫瘍効果を発揮する<sup>1-3)</sup>(図1)。癌治療用のウイルスとしては、本来ヒトを宿主としないウイルスを用いる場合と、ウイルスゲノムの遺伝子工学的操作により癌細胞選択的に複製し正常細胞では複製できないように工夫されたウイルスを用いる場合がある。いずれの場合も、ウイルスは癌細胞に限定して殺細胞効果を示し、正常組織を傷害しない。ウイルス複製にともなう癌細胞破壊はアポトーシスとは異なる機序であり、また単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)のように、それとともなって癌細胞特異的な全身性免疫が惹起されて抗腫瘍効果に加担することも多い。さらに遺伝子組換えウイルスでは、ウイルスゲノムに外来遺伝子を組み込んで特殊な抗腫瘍機能を発揮させたり、放射線療法、化学療法など従来の癌治療法と併用したりすることが可能である。実用的なウイルス療法

の開発には、癌細胞に対する強い殺細胞作用と同時に、「正常組織を傷害しない」安全性を確保することが非常に重要となる。

#### ウイルス療法の歴史

1904年に、インフルエンザ様の病気に罹患した慢性骨髄性白血病の患者の異常白血球数が減少したという報告があり、野生型ウイルスの感染が腫瘍を消退させた症例報告としては最も古いもののひとつである。1911年には、イタリア人医師が狂犬病の生ワクチンを頭頸部癌に接種したところ、腫瘍の縮小が認められたと報告している。癌がウイルス感染に弱いことが認識されてからは、実験室で継代中に変異した弱毒ウイルスの使用が盛んになり、1950年代には、主にウエストナイル病ウイルスやアデノウイルスが開発対象となった。1970年代に入ると、水痘ウイルスの直接投

与が急性リンパ性白血病を改善させたり、麻疹ウイルスの投与が白血病や Burkitt リンパ腫、Hodgkin リンパ腫を消退させたりした、などの報告がみられる。これら野生型や弱毒株を用いた研究は、ウイルスの病原性を人為的に制御することができず、癌の治療法として確立されるには至らなかった。

遺伝子工学技術が進歩してウイルスゲノムを操作することが可能になり、またウイルス学の発達によりウイルス遺伝子の機能が明らかになるにつれ、ウイルスの働きを人為的に制御することが可能となった。1991年に Martuza らが HSV-1 に遺伝子工学的に変異を加え、癌細胞に限定して複製できるウイルスを人工的に作製して悪性神経膠腫の治療に応用する概念を発表して以来<sup>4)</sup>、癌のウイルス療法の開発研究は飛躍的に進歩した。HSV-1 に続いて、アデノウイルスや麻疹ウイルスなどの遺伝子組換えウイルスの開発が進み、さらにはヒトを宿主としない種々のウイルスの利用に開発が広がって現在に至っている。

### 遺伝子操作を加えていないウイルスを用いたウイルス療法

ウイルス療法に用いられる増殖型ウイルスは、野生型ウイルスや継代中に自然に変異した弱毒株ウイルス(遺伝子操作を加えていないウイルス)と、癌細胞でのみ複製可能のようにウイルスゲノムに遺伝子操作を加えたウイルスの2つに大別することができる。現在開発中の遺伝子操作を加えていないウイルスは、原則としてヒトを本来の宿主としないウイルスであり、癌細胞が一樣にウイルス感染に対する防御機構を失っているために、癌細胞に限ってヒトの細胞でもウイルス複製が得られることを利用している。ヒトを宿主とするウイルスについては、前述のごとく1950年～1970年代に弱毒株ウイルスがすでに多く試されて、自然の弱毒化のみでは十分な治療域が得られないことがわかっており、遺伝子操作により癌細胞特異的なウイルス複製を獲得させることが実用化には必須であると開発研究者に広く認識されている。遺伝子操作を加えていな

いウイルスは、レオウイルス(reovirus)やニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)を代表とする少なくとも9種類のウイルスがこれまで臨床試験で試されている。

レオウイルスは、元来ヒトでは無症候性であるが、Ras シグナル経路が活性化している細胞ではヒトの細胞でもウイルス複製を行うことから、癌のウイルス療法に応用されている。癌治療用レオウイルス(Reolysin<sup>®</sup>)の腫瘍内投与の臨床試験において、 $1 \times 10^9$  pfu (plaque-forming units) 投与された局所で腫瘍縮小効果を認めたのは11%であった。それも一時的なもので、遠隔部位での効果は認められなかった。血中からはウイルスが検出されたが、尿中、便、脳脊髄液ではウイルス排出を認めなかった。ただ、重篤な有害事象は認めず、続いての経静脈投与による第1相臨床試験では、腫瘍マーカーの低下を認めたと報告された。

ニューカッスル病ウイルスは、元来鳥類の呼吸器、神経系に感染して症状を呈するウイルスで、ヒトには無症候もしくは弱毒性である。このウイルスも Ras シグナル経路が活性化している細胞ではヒトの細胞でもウイルス複製を行い、感染細胞で抗腫瘍効果を有するサイトカインを産生することが特徴である。ニューカッスル病ウイルスは繰り返し静脈内に投与することが多く、PV701を用いた転移固形癌を対象とした第1相臨床試験では、62症例中14例で4～30カ月にわたり癌の再発進行を認めなかった。投与12時間後に死に至った症例もあったが、急速な腫瘍溶解によるものと考えられた<sup>5)</sup>。悪性神経膠芽腫11例に対してHUJ株を用いた臨床試験では、1例で3カ月にわたりCR (complete response: 完全寛解)が認められた<sup>6)</sup>。有害事象はどの症例でも認めなかった。ウイルス排出は尿、血液、唾液中に認められ、腫瘍の生検検体からもウイルスが検出された。

HSV-1はヒトを本来の宿主とするウイルスであるが、わが国では、自然変異した弱毒型HF10が再発乳癌や膀胱癌に対して臨床研究に用いられた。皮膚転移乳癌の腫瘍内投与が行われた6症例では、重篤な有害事象を認めなかったという。

## 遺伝子操作を加えたウイルスを用いたウイルス療法

### 1. 単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)

HSV-1は癌治療用のウイルスとして臨床应用到有利な以下の特徴を有している<sup>7)</sup>。血液系を除くさまざまな種類のヒト細胞に感染可能であり、比較的低いMOI (multiplicity of infection)、つまり細胞数に比べて少ない割合のウイルスで癌細胞を全滅させることが可能である。血液中のウイルス抗体は隣接細胞へのウイルス伝播に影響を及ぼさないため、すでに抗HSV-1抗体を有する宿主に対してや反復投与でも抗腫瘍効果が減弱しない。HSV-1に感受性のあるマウスやサルを用いて、安全性や有効性についての前臨床評価が可能であるうえ、アシクロビル(aciclovir; ACV)やガンシクロビル(ganciclovir; GCV)などの抗ヘルペス薬が存在するため、必要であれば治療を中断することができる。また、HSV-1のDNAは宿主細胞のゲノムに組み込まれないため、ウイルス自体の影響が宿主に長く残ることがない。さらに、HSV-1のゲノムが大きく(約152 kb)、多くのウイルス遺伝子の機能がよく解明されているため、遺伝子操作による改良を加えたり、大きな外来遺伝子を挿入したりすることが可能である。

現在臨床試験に用いられている遺伝子組換え HSV-1 (G207, 1716, NV1020, OncoVEX<sup>GM-657</sup>など)はすべて神経病原性に関連する $\gamma 34.5$  遺伝子を欠失させている(ただし、NV1020は2コピーのうち1つのみ)。正常細胞では、ウイルス感染に応じて二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ(PKR)がリン酸化されウイルスの蛋白合成が抑制されるが、 $\gamma 34.5$  遺伝子産物はこれに拮抗する作用をもつ。 $\gamma 34.5$  欠失 HSV-1は、正常細胞ではリン酸化 PKR が阻害できず複製できないが、腫瘍細胞ではもともとリン酸化 PKR が低下しているため、ウイルス複製が可能となる。

ウイルス遺伝子を1つだけ変異させた第一世代に対し、安全性をさらに高めるべく開発されたのが第二世代の G207 で、 $\gamma 34.5$  遺伝子の欠失に加えて、*lacZ* 遺

伝子挿入による ICP6 遺伝子の不活化という二重変異を有する<sup>8)</sup>。G207は、悪性神経膠腫、悪性髄膜腫、乳癌、大腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、胃癌、卵巣癌、神経芽腫、肝癌、胆嚢癌、悪性黒色腫などさまざまな腫瘍で有効性が確認されている<sup>9)</sup>。徹底した非臨床安全性試験が実施され、マウスでは種々の投与経路(大脳、脳室、肝臓、前立腺、静脈)での安全性が確認された。HSV-1に感受性の高いサル(*Aotus nancymae*)への脳内投与の検証でも、野生型の親株 F が  $1 \times 10^6$  pfu の少量で5日以内に致命的な脳炎を起こしたのに対し、G207は  $1 \times 10^6$  pfu まで投与してもなんら症状を生じなかった<sup>10,11)</sup>。G207の第I相臨床試験は再発悪性神経膠腫を対象に米国のジョージタウン大学とアラバマ大学で行われた(表1)。 $3 \times 10^6$  pfu までの脳腫瘍内投与で、G207に起因する中〜重度の有害事象は認めず、高い安全性が証明された<sup>12)</sup>。MRIでの評価で、4日〜1カ月のあいだに20症例中8例に腫瘍の縮小を認めた。2例が治療後5年以上生存した。初発悪性神経膠腫を対象に放射線療法と併用した臨床試験が現在進行中である。

また、G207からさらに $\alpha 47$  遺伝子を欠失させた三重変異を有する第三世代の G47 $\Delta$ (デルタ)が開発された<sup>13)</sup>。これは G207の安全性を維持しつつも抗腫瘍効果を増強させ、さらに抗腫瘍免疫の強力な賦活も意図した癌治療用 HSV-1 である。 $\alpha 47$  遺伝子は HSV-1 が宿主免疫系から逃れる防御機構として機能するが、 $\alpha 47$  遺伝子を欠失させることにより、感染した腫瘍細胞の免疫原性低下を防ぎ、抗腫瘍免疫による効果を増強することができる。さらに、本来後期発現の *US11* 遺伝子が  $\alpha 47$  プロモーターの制御下となって複製最早期に発現するため、 $\gamma 34.5$  欠失で減弱したウイルスの複製能力が癌細胞に限って回復する。この G47 $\Delta$  は、安全性を犠牲にすることなく抗腫瘍効果を高めることに成功しており、動物実験にて悪性脳腫瘍や前立腺癌、乳癌などに対して G207 より高い治療効果を示すことが明らかとなっている<sup>14)</sup>。わが国で再発膠腫を対象にした第I-II相臨床研究がまもなくスタートする見通しであり、前立腺癌など多種の固形癌を対象に臨床