

表1 遺伝子操作を加えた増殖型ウイルス

			増殖時期	投与方法
悪性神経膠腫	HSV-1	ICP6/ γ 34.5	第1相	腫瘍内
			第1b相	腫瘍抽出腔室内
膠芽腫, 悪性黒色腫	HSV-1	γ 34.5	第1相	腫瘍抽出腔室内 腫瘍内
			第II~III相	腫瘍内
大腸直腸癌肝転移	HSV-1	γ 34.5(1コピーのみ), 内部繰り返し配列 (inverted repeat), HSV-2 糖蛋白・ α 4-TK 挿入	第I~II相	肝臓内
悪性黒色腫, 乳癌皮膚転移	HSV-1	γ 34.5/ α 47, GM-CSF 挿入	第I~II相	腫瘍内
頭頸部癌, 大腸直腸癌, 卵巣癌, 肺癌	アデノウイルス	E1B 55K(-), E3B(-)	第I~III相	腫瘍内, 腹腔内, 経動脈, 経静脈
頭頸部扁平上皮癌, 鼻咽腔癌	アデノウイルス	E1B 55K(-), E3(-)	第I~III相	腫瘍内
前立腺癌	アデノウイルス	PSE-E1A, E3(-)	第1相	前立腺内
前立腺癌	アデノウイルス	PB-E1A, PSE-E1B	第1相	前立腺内, 経静脈
前立腺癌	アデノウイルス	E1B 55K(-), E3-ADP(-), E3(-), CD/TK 挿入	第1相	前立腺内
悪性黒色腫, 前立腺癌, 原発性肝癌・転移性肝癌	ワクシニアウイルス	TK(-), GM-CSF 挿入	第I~II相	腫瘍内, 筋肉内
			第1相	腫瘍内

ICP6: infected cell protein 6(リボヌクレオチド還元酵素大サブユニット), 内部繰り返し配列(inverted repeat): α 0, α 4, γ 34.5, ORF P, ORF Q の5遺伝子を含む, GM-CSF: 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子, PSE-E1A: prostate-specific antigen promoter/enhancer(PSE)-driven E1A, PB-E1A: rat probasin-driven E1A, PSE-E1B: PSE-driven E1B, CD: シトシンデアミナーゼ, TK: チミジンキナーゼ

開発を展開していく。

1716は γ 34.5遺伝子の欠失のみを有する第一世代のHSV-1で、再発膠芽腫や悪性黒色腫を対象とした第I相臨床試験が英国で行われた¹⁵⁾(表1)。脳腫瘍摘出腔壁への投与や腫瘍内投与が試された。有害事象の報告はなく、試験で用いられたウイルス量の範囲(1×10^8 pfu まで)の安全性が確認されている。第I相臨床試験では、明らかな効果も遠隔病変での反応も認めなかった。第一世代の病原性の減弱の程度が少ないことから、最大投与量はG207の1万分の1にとどまっている。第II相臨床試験の結果が公表されていないが、現在膠芽腫に対する第III相臨床試験に進んでいる。

NV1020(R7020)は、元来ワクチンとして開発されたが、ワクチンとしては臨床試験で有効性を認めなかった。しかし、癌治療用ウイルスとして試したところ種々のヒト癌細胞で高い殺細胞効果を示し、前立腺癌や膀胱癌、頭頸部癌などで研究が進められている。NV1020は、 γ 34.5遺伝子の2コピーのうち1コピーが欠失しており、HSV-2のエンペローブの糖蛋白遺伝子などが挿入されている。NV1020を用いた第I相臨床試験は、大腸直腸癌の肝転移を対象に肝動脈内投与で行われ、 1×10^8 pfu という投与量ではウイルスに起因する明らかな有害事象は認めなかった¹⁶⁾(表1)。現在、大腸直腸癌肝転移の抗腫瘍薬無効例に対して、肝動脈内投与にて第I/II相臨床試験が進行中である。

また、 γ 34.5/ α 17欠失HSV-1にGM-CSF遺伝子を組み込んだOncoVEX^{GM-CSF}の第I相臨床試験が固形癌の皮膚転移や悪性黒色腫を対象に行われた¹⁷⁾(表1)。重篤な有害事象はなく、投与局所での炎症は用量依存的であった。ウイルス排出は潰瘍化した腫瘍の皮膚から認められ、投与局所の病理組織は炎症と壊死を示していた。遠隔部位での効果は認められなかった。悪性黒色腫などの固形癌を対象に、腫瘍内投与の第II相臨床試験も実施された。なお、OncoVEX^{GM-CSF}は、実験室で継代された株ではなく、ヘルペス患者の臨床検体から単離されたHSV-1を親株として作製された点で特徴がある。

2. アデノウイルス

アデノウイルスはヒトの呼吸器疾患や流行性結膜炎などの原因ウイルスとして知られる。アデノウイルスの最大の利点は、高濃度のウイルスを産生し、 10^{13} pfu/mL程度にまで濃縮することが可能な点である。さらにゲノムサイズが約36 kbのため遺伝子操作が容易で、小さな外来遺伝子ならば組み込むこともできる。また、アデノウイルスのDNAはHSV-1同様、宿主細胞のゲノムに組込まれず染色体外にとどまる。欠点としては、ウイルス自体の免疫原性と毒性が比較的高いこと、殺細胞作用が弱く高いMOIが必要なこと(培養細胞でHSV-1と同じ効果を出すにはHSV-1のおよそ1000倍量の感染性ウイルスが必要)、感染が受容体の有無に依存するため感染できる細胞の種類が限られること、宿主の免疫反応で治療効果が下がる可能性などが挙げられる。

ONYX-015(d11520)は、最初に臨床応用された遺伝子組換えアデノウイルスである。1987年にBarkerとBerkによって、E1B領域にコードされる55 kDのp53結合蛋白(E1B 55K)を欠失変異させたウイルス(d11520)として作製された。1996年にBischoffらが、このウイルス(ONYX-015)が癌抑制遺伝子p53を欠損した細胞で特異的に増殖して殺細胞効果を示すことを発表した¹⁸⁾。E1B 55Kは宿主細胞のp53と結合し不活化させてアポトーシスを抑制し、ウイルス複製を可能にする。そのためE1B 55Kを欠失したONYX-015は、正常細胞ではp53を不活化できずにウイルス複製ができないが、元来正常p53がないような癌細胞では複製可能となる。50%以上の癌がp53遺伝子の異常を有しているため、この治療法は当時注目を浴びた。その後、p53が正常な癌細胞においてもこのウイルスが増殖可能であるという報告がなされた。ONYX-015に関しては、15以上の臨床試験がすでに報告されており(表1)、頭頸部癌および肺癌、再発膠芽腫に対して腫瘍内投与で臨床試験が行われた。多く認められた有害事象は、感冒様症状と投与局所での疼痛で、重篤なものはなかった。頭頸部癌に対する臨床試験では、ウイルスDNAは投与部位に10日目まで

認められたが、投与周囲の正常組織ではウイルスの増殖は認めなかった。また、中和抗体はウイルス複製にも抗腫瘍効果にも影響を与えなかったと報告されたが、抗腫瘍効果は14%に一時的に認められたにすぎない、抗腫瘍効果はもっぱら化学療法との併用で観察された。頭頸部癌などを対象とした臨床試験では、シスプラチン(cisplatin)および5-フルオロウラシル(5-fluorouracil)と併用され、化学療法単独群が反応率30%なのに対し、併用群では65%もの症例が治療に反応した¹⁹⁾。消化器癌の肝転移27症例に対しては5-フルオロウラシルと併用した肝動脈内投与が行われ、化学療法無効の2例において著明な腫瘍の消退を認めた。有害事象として炎症性のサイトカインの上昇がみられたほか、2例でgrade 3~4の高ビリルビン血症が認められた。

H101はONYX-015とほぼ同じ構造をもつE1B 55K 欠失アデノウイルスであり、頭頸部の扁平上皮癌や鼻咽腔癌、肺癌に対して、腫瘍内投与による臨床試験が中国で行われた。局所浸潤頭頸部癌に対して、抗腫瘍薬単独群 vs 抗腫瘍薬・ウイルス併用群の無作為化第III相臨床試験が行われ、40% vs 79%の治療反応率を得たとされる。論文未発表のため詳細不明だが、2005年に中国で医薬品として承認された。

ウイルスを腫瘍特異的に複製させるための手段として、ウイルスの必須遺伝子を腫瘍/組織特異的プロモーターで制御する試みもなされている。たとえば、前立腺癌をターゲットとするアデノウイルスとして、prostate-specific antigen(PSA)のエンハンサー・プロモーターでウイルス必須遺伝子E1Aの転写制御を行うもの(CG7060; CN706)や²⁰⁾、ヒトのカリクレイン(kallikrein)プロモーターを使用してE1Aの転写制御を行うもの(CV764)、ラットのプロバシンプロモーターでE1Aを、PSAプロモーターでE1Bを転写制御するもの(CG7870; CN787)、オステオカルシン(osteocalcin)プロモーターでE1Aを制御するもの(Ad-OC-E1a)が開発されている。CG7060とCG7870については、局所再発前立腺癌を対象に前立腺内投与の第I相臨床試験が行われ、重篤な有害事象をみてい

ない(表1)。また、CG7870を用いてウイルス抗体陰性の局所再発前立腺癌23症例を対象に、静脈内投与の臨床試験が行われ、一時的なPSA値の低下が認められた。静脈内投与の有害事象としてgrade 2~3の肝酵素の上昇を認めた。このほか、Ad5-CD/TKrepは、E1B 55Kの欠失に加え、シトシンデアミナーゼ(cytosine deaminase; CD)とチミジンキナーゼ(thymidine kinase; tk)の2つの自殺遺伝子の融合蛋白を発現するアデノウイルスであり、再発前立腺癌を対象に複数の臨床試験が行われ安全性が確認された(表1)²¹⁾。

アデノウイルスは、遺伝子組換えや生産が比較的容易であることから、一時は急速に臨床開発が広がり、多くの臨床試験が実施されたが、期待ほど大きな治療効果が得られていない。その最大の原因は、*in vivo*におけるウイルス複製能が低く、癌組織に複製したウイルスが迅速に広がらないことにある。ONYX-015やH101のようにE3を欠失しているアデノウイルスでは特に、投与した癌からウイルスが消失するのが早いとされる。ウイルスゲノムに挿入できる外来遺伝子の大きさに制限があるため適用がきわめて限られていることや、静脈内投与で効果を出せないこと、遠隔腫瘍に効果がないこと、反復投与時に効果が減弱することなど、実用性の面で課題が多い。

3. そのほかのウイルス

遺伝子組換えワクシニアウイルス(JX-594)は、ワクチンに用いていたウイルス株をもとに、ウイルスtk遺伝子を欠失させてtk活性の高い細胞(癌細胞)のみでウイルス複製が起こるようにし、さらにGM-CSF遺伝子を組み込んで作製された。転移性の悪性黒色腫を対象に臨床試験が行われた²²⁾(表1)。31週間反復投与を繰り返すと、7症例中5例(71%)で投与部位での腫瘍の縮小がみられ、2例でCRを認めた。さらに、1例ではその後の外科切除によって完全治療となった。重篤な有害事象は認められなかった。GM-CSFのmRNAが生検検体で認められ、Tリンパ球やBリンパ球と同様に好酸球の著明な浸潤を認め、

GM-CSFの影響が示唆された。増殖したウイルスは7カ月経過しても検出された。4例では、注射部位以外に遠隔皮膚転移を有していたが、すべてに腫瘍の消退を認めた。原発性肝癌もしくは転移性肝腫瘍14例を対象とした第I相臨床試験では、JX-594が3週おきに腫瘍内投与された(平均3.4回)²¹⁾。全例がgrade 1~3の感冒様症状を呈し、4例がgrade 1~3の血小板減少を示した。最高投与量の 3×10^8 pfuでは投与した2例ともに用量制限毒性となるgrade 3の高ビリルビン血症を呈したため、最高耐用量は 1×10^8 pfuとなった。放射線学的評価が可能であった10症例のうち、1例がPD(progressive disease)であったが、3例がPR(partial response)、6例がSD(stable disease)であった。遠隔腫瘍にも抗腫瘍効果を認めた。

MV-CEAはcarcino-embryonic antigen(CEA)を発現する遺伝子組換え麻疹ウイルスで、卵巣癌を対象に経腹腔投与の第I/II相臨床試験が進行中である。血中CEA値を測定することにより、ウイルス複製の状態が把握できる仕組みとなっている。麻疹ウイルスは、長年使用されてきたワクチン株の安全性が確立されている利点があり、ワクチン株は癌細胞で過剰発現しているCD46受容体を介して癌細胞特異的に感染する。また、再発芽腫に対する腫瘍内投与や、多発性骨髄腫に対する静脈内投与の臨床試験が別の麻疹ウイルスを用いて実施されている。

おわりに

ウイルス療法は、「抗腫瘍薬=ウイルス」自体が癌のなかで増幅して抗腫瘍作用を示すという新しい発想に基づく治療法である。HSV-1やワクシニアなどゲノムサイズの大きい遺伝子組換えウイルスならば任意の外來遺伝子を発現させることも可能で、遺伝子治療の利点もあわせもつ。すでに数多くの臨床試験が実施され、一部は無作為化第III相臨床試験まで進んでいる。これまで癌治療用ウイルスが投与された500例以上の症例のうち、脳梗塞などの他要因を除けば、死亡例はニューカッスル病ウイルスPV701の経静脈投与による1例のみであり、安全性の面で大きな問題は生じて

いない。一方、臨床データが蓄積するにともない、さまざまなウイルスの利点・欠点も明らかになってきている。中国におけるH101の承認は、世界で初めて癌治療用ウイルスが医薬品になったという点で大きな朗報であったが、欧米では癌治療用ウイルスとしてのアデノウイルスの限界がみえて、ほかのウイルスに期待が移ってきた時期でもあった。ONYX-015の開発をしていた米国企業は、数多くの第II相までの臨床試験を行いながら、第III相臨床試験開始を断念し、ONYX-015の権利をH101を開発する中国企業に譲渡した。

知見の積み重ねと遺伝子工学技術の進歩などから、近い将来、ウイルス療法が難治性癌や転移に対する有効な治療法となることに対する期待は大きい。特に、ウイルス遺伝子の機能を応用して合理的にデザインされた遺伝子組換えウイルスは、高い安全性と実用性、そして信頼性を担保している。将来ウイルス療法が普及した際の環境への影響を考慮すると、ヒト以外を宿主とするウイルスをそのまま用いるよりも、ヒトを宿主とするウイルスを用いて、その複製能を人為的に制御するほうが望ましい。わが国は、臨床研究実施における制度の違いもあり、欧米に比べ大幅にウイルス療法の臨床開発が遅れている。癌死亡率の増加に少しでも早く歯止めをかけるためには、安全性の確認を最大限に重視しつつ産官学共同でわが国での臨床実績を積み上げていくことが急務であり、今後特に「官」と「産」の貢献に大きく期待したい。

References

- 1) Martuza RL: *J Clin Invest* 105: 841-846, 2000
- 2) 福原 浩, 藤堂具紀: 分子細胞治療 2: 62-68, 2003
- 3) 福原 浩, 藤堂具紀: 先端医療シリーズ 24 泌尿器科(吉田 修ほか編). 先端医療技術研究所, 東京, 2003, pp.7-13
- 4) Martuza RL et al: *Science* 252: 854-856, 1991
- 5) Pecora AL et al: *J Clin Oncol* 20: 2251-2266, 2002
- 6) Freeman AI et al: *Mol Ther* 13: 221-228, 2006
- 7) Fukuhara H, Todo T: *Drugs Future* 28: 43-49, 2003
- 8) Mineta T et al: *Nat Med* 1: 938-943, 1995
- 9) Todo T et al: *Tumor-Suppressing Viruses, Genes, and Drugs-Innovative Cancer Therapy Approaches*. Academic Press, San Diego, 2002, pp.45-75

- 10) Hunter WD et al: *J Virol* 73: 6319-6326, 1999
 11) Todo T et al: *Mol Ther* 2: 588-595, 2000
 12) Markert JM et al: *Gene Ther* 7: 867-874, 2000
 13) Todo T et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6396-6401, 2001
 14) Fukuhara H et al: *Clin Cancer Res* 11: 7886-7890, 2005
 15) Rampling R et al: *Gene Ther* 7: 859-866, 2000
 16) Kemeny M et al: *Hum Gene Ther* 17: 1214-1224, 2006
 17) Hu JC et al: *Clin Cancer Res* 12: 6737-6747, 2006
 18) Bischoff JR et al: *Science* 274: 373-376, 1996
 19) Khuri FR et al: *Nat Med* 6: 879-885, 2000
 20) Rodriguez R et al: *Cancer Res* 57: 2559-2563, 1997
 21) Freytag SO et al: *Cancer Res* 63: 7497-7506, 2003
 22) Mastrangelo MJ et al: *Cancer Gene Ther* 6: 409-422, 1999
 23) Park BH et al: *Lancet Oncol* 9: 533-542, 2008

遺伝子医学 MOOK 10号

トランスレーショナルリサーチを支援する

「DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用の実際 —基礎、最新技術、臨床・創薬研究応用への 実際から今後の展開・問題点まで—」

編集：油谷浩幸(東京大学先端科学技術研究センター教授)

2008年6月30日発行、B5判、408頁
 定価：6,100円(本体5,810円+税)
 ISBN: 978-4-944157-40-2
 発行：株式会社メディカル ドゥ



マイクロアレイ解析は基礎研究から臨床研究まで今や不可欠のリサーチツールとなりつつある一方、臨床の現場での診断機器としても実用化されつつある。本書では、基礎的な技術解説から、実際の応用例までを網羅できるよう各分野で研究開発に取り組まれている先生方に執筆いただいております。

目次

- 総論 マイクロアレイ解析(総論)監修にあたって
- 第1章 DNA チップ/マイクロアレイの基礎
 1. 発現解析 2. 配列解析 3. SNP解析
 4. コピー数解析
- 第2章 DNA チップ/マイクロアレイの最新技術
 1. エピジェネティクス 2. 最新技術/システム
- 第3章 データ解析法
 1. 発現マイクロアレイデータ解析(概論)
 2. マイクロアレイデータ解析法
 3. 遺伝子発現データベース
- 4. 遺伝子セットを使った発現情報の解析(GSEA解析)
- 5. インタラクトームからのパスウェイ解析
- 第4章 DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用への実際
 1. 疾病の解析—発現解析各論—
 2. 個別化医療
- 第5章 DNAチップ/マイクロアレイ創薬研究応用への実際
 1. 創薬研究応用
 2. トキシコゲノミクス
- 資料

〈問い合わせ先〉

株式会社メディカル ドゥ

〒550-0004 大阪市西区靉本町1-6-6 大阪華東ビル5F

TEL▶06-6441-2231 FAX▶06-6441-3227 E-mail▶home@medicaldo.co.jp

URL▶http://www.medicaldo.co.jp

5. 悪性脳腫瘍に対する樹状細胞療法

田中 実, 藤堂具紀

悪性脳腫瘍患者は、中枢神経系外への転移がなく比較的良好な全身性免疫が保たれていることが多いため、有効な抗腫瘍免疫の惹起が期待でき、さまざまに工夫した樹状細胞療法が臨床で試されている。悪性グリオーマに広く共通する腫瘍関連抗原が同定されていないため、樹状細胞のバルスには、手術で採取した自己腫瘍組織から得られる腫瘍由来タンパク質を用いることが多い。脳が免疫特権環境にあるにもかかわらず、再発悪性脳腫瘍に対する樹状細胞療法は、他の進行がんに比べ有効例が多くみられる。しかし治療効果はほとんど一時的で、生存期間の延長に結びついていない。今後のさらなる改良と、他の新規治療アプローチとの組み合わせが期待される。

はじめに

悪性脳腫瘍の患者を救うことは難しい。特に悪性グリオーマ¹⁾は、手術、放射線、化学療法からなる集学的治療を行っても腫瘍は必ず再増大し、患者は腫瘍死を免れない。近年、悪性脳腫瘍に対する免疫療法が

手術、放射線、化学療法にならぶ第4の治療法として期待される。腫瘍免疫の研究は、腫瘍関連抗原の探索、樹状細胞 (dendritic cell: DC) やT細胞の機能解析により著しく進歩した。腫瘍関連抗原が次々と同定されるなか、それらをそのままワクチンとして用いても腫瘍を征圧できないことがわかってきた。一方、

[キーワード&略語]

樹状細胞療法, がんワクチン, 免疫療法, 悪性グリオーマ, グリオーマ関連抗原

CTL : cytotoxic T lymphocyte
(細胞傷害性T細胞)

DC : dendritic cell (樹状細胞)

DTH : delayed-type hypersensitivity

EGFR : epidermal growth factor receptor
(上皮増殖因子受容体)

ELISpot : enzyme-linked immunospot

FACS : fluorescence-activated cell sorter

IL : interleukin (インターロイキン)

KPS : Karnofsky performance scale

LAK : lymphokine-activated killer
(リンフォカイン活性化キラー)

MAGE : melanoma antigen-encoding gene

MGT : malignant germcell tumor

(悪性胚細胞腫瘍)

NK cell : natural killer cell (NK細胞)

Treg : regulatory T cell (制御性T細胞)

VEGF : vascular endothelial growth factor

(血管内皮細胞増殖因子)

Dendritic cell vaccination for patients with malignant brain tumors

Minoru Tanaka¹⁾/Tomoki Todo^{1) 2)} ; Department of Neurosurgery, The University of Tokyo¹⁾/Translational Research Advancement Center, The University of Tokyo²⁾ (東京大学医学部附属病院脳神経外科¹⁾/東京大学医学部附属病院トランスレーショナルリサーチセンター²⁾)

表1 脳腫瘍に対する樹状細胞療法

腫瘍	DCバルスに 用いる抗原	投与する細胞など	投与経路	症例数	治療効果	文献
再発膠芽腫	腫瘍由来タンパク質	単球由来成熟DC/ 腫瘍由来タンパク質	皮内	56	再発後無増悪生存期間9.6か月 2年生存率14.8%	13
再発悪性 グリオーマ	腫瘍由来タンパク質 +アジュバント (KLHとOK-432)	単球由来成熟DC (皮内・腫瘍内) 単球由来未成熟DC (腫瘍内)	皮内あるいは 皮内+腫瘍内	24	腫瘍由来タンパク質+KLH群 MR 2, NC 6, PD 9 腫瘍由来タンパク質+KLH+ OK-432群 MR 2, NC 4, PD 1	8
悪性脳腫瘍	自己腫瘍細胞を DCと融合	融合細胞+IL-12	皮内	16	12例で評価可能 PR 3, MR 1, NC 3, PD 5	9
再発悪性 グリオーマ	腫瘍由来タンパク質	IL-4を発現する線維芽 細胞とDCの混合	皮内	6	5例で治療完遂 レトロウイルスベクターの 安全性確認 無増悪生存期間の延長なし	15
再発悪性 グリオーマ	腫瘍由来タンパク質	単球由来成熟DC	皮内	9	平均生存期間455日 (対照群では257日)	1
再発悪性 グリオーマ	腫瘍由来タンパク質	単球由来成熟DC	皮内	14	平均生存期間133週 (対照群では30週)	5

PR: partial response (部分寛解), MR: mixed reaction (退縮と増殖), NC: no change (変化なし), PD: progressive disease (病態増悪)

DCを介した治療戦略はなお盛んで、大腸がんや肺がんなどさまざまながん種を対象に、現在100を超えるDC療法の臨床研究が試されている。脳腫瘍患者は、強力な化学療法を実施することが少ないため比較的良好的な全身免疫が保たれていることが多い。脳が免疫特権 (immune privileged) の環境と考えられていたにもかかわらず、免疫療法が奏効する悪性脳腫瘍例がみられ、DC療法についても治療効果改善の工夫がなされている。

1 脳における免疫療法

脳は眼、生殖器官などとともに免疫特権を有する組織とされる。その意義は、脳が重篤な炎症によって破壊されないための炎症抑制機構であるとも言われる。このため脳腫瘍は免疫療法に不向きであると永く考えられていた。しかし近年、脳腫瘍の血管周囲にエフェ

クター細胞が存在することが確認され、いくつかの臨床試験で免疫療法の有効性が示されたことから、脳腫瘍を積極的に免疫療法の対象とするようになってきた (表1) [1]~[10], [13], [15]。

多くのがん患者ではがん組織による免疫抑制機構や化学療法・放射線治療に伴う免疫抑制により抗腫瘍免疫の惹起・成熟が阻害されている。そのためにT細胞を活性化するだけでは十分な抗腫瘍効果が得られず、エフェクター細胞を体外で作製して体内に戻す (ex vivo) などして治療効果の増強をはかる。例えばLAK療法 (活性化NK細胞療法) では、患者から得たNK (natural killer) 細胞をinterleukin (IL)-2を用いて体外で活性化し、細胞傷害活性を増強してから患者へ戻す。かつて脳腫瘍でも腫瘍摘出腔にカテーテルを留置し、そこからLAK細胞とIL-2を投与する臨床研究が行われたが、有効性が低く、炎症による脳浮腫などの有害事象が必発したため現在ではほとんど行われていない。

一般にがん患者では全身状態が悪くCD4とCD8の比率は低下し、腫瘍から分泌されるIL-6やIL-10、VEGFにより機能的なDCの動員や成熟も阻害されている。しかし悪性脳腫瘍患者では、脳脊髄腔内を越えた多臓器への転移がきわめて稀であり、腫瘍自体によ

*1 グリオーマ

グリオーマは、脳に発生する悪性腫瘍で原発性脳腫瘍の約30%を占める。腫瘍を構成する細胞から、星細胞腫、星状細胞腫、上皮腫などに分類される。グリオーマのなかで最も多いのは星細胞腫で、その悪性度によって4段階 (グレード1~4) に分けられる。最も悪性度の高い膠芽腫は、集学的治療を行っても平均余命約1年で非常に治療困難な腫瘍である。

る免疫系への影響が少なく、また化学療法による重篤な免疫抑制状態に陥ることも稀で全身状態は良好である。したがって悪性脳腫瘍はDC療法のよい対象と考えられる。

2 悪性脳腫瘍の腫瘍関連抗原

悪性脳腫瘍で最も多いのはグリオーマである。グリオーマ関連抗原の候補としては、悪性黒色腫 (malignant melanoma) と共通するものが多く、MAGE-1、MAGE-E1、MAGE-3、gp240 glycoproteinの他、細胞外マトリックス糖タンパク質であるtenascin、EGFR variant III、転写因子のSOX6などがあげられる^{11,12)}。しかし、いずれもグリオーマに共通する腫瘍抗原として確立しておらず、グリオーマを対象としたDC療法の多くは自己グリオーマ細胞を抗原の供給源として用い、パルスの方法としては腫瘍由来タンパク質 (tumor lysate) を利用することが多い。他の方法として腫瘍細胞由来RNAも用いられている⁷⁾。また、グリオーマ細胞に腫瘍関連抗原が存在していてもその発現量は低く、免疫原性も弱いと考えられるため、免疫系に抗原を認識させるには工夫が必要である。

3 悪性脳腫瘍を対象としたDC療法の実際

悪性脳腫瘍を対象としたDC療法では、DCに効率よく抗原を提示させ、より効果的な臨床反応を得るためにさまざまな手法がとられている。1回に投与するDC数の最適投与量についての検討は行われていないが、 $10^6 \sim 10^8$ 細胞を実際に用いている報告が多い。

1) 腫瘍由来タンパク質で単球由来DCをパルスする方法

再発膠芽腫 (glioblastoma) 56例を対象とした臨床研究結果が報告されている¹³⁾。再発時に摘出術を行って腫瘍組織を得て、アフエレーシス (apheresis) で血液から単球を分離する。体外で単球からDCを誘導して腫瘍由来タンパク質をパルスした後に、DCを成熟させてから患者の皮内に投与した。この研究では3つの異なる投与レジメが試された。(A群: 2週ごと×2回、その後4週ごと。B群: 2週ごと×5回、その後4週ごと。C群: 毎週×4回、その後4週ごとにDCではなく腫瘍由来タンパク質だけを皮内投与。)

研究者らは、C群を実施した根拠として、①マウスのグリオーマモデルにおいてDCを最初のプライミン

グに利用し、その後は腫瘍由来タンパク質のみを投与したところDC単独より治療効果が高かったこと、および②腎がんなどを対象とした他の臨床研究で腫瘍由来タンパク質のみを皮内投与して生存期間の延長が認められていたこと、をあげている¹⁴⁾。

その結果、A群、B群の再発からの無増悪生存期間中央値はそれぞれ24カ月、28カ月であったのに対し、C群のそれは4.4カ月と有意に延長した。56例の再発からの生存期間中央値は9.6カ月で、2年生存率は14.8%であった。しかし、C群の無増悪生存期間延長の規定因子は腫瘍摘出度であったとし、この治療法の有効性を実証するに至っていない。ただし、DCの投与間隔が2週ごとだとその間に病気が進行する例が多かったため、DCの投与間隔は短い方 (1週ごと) がよいと印象を述べている。

悪性グリオーマ再発例24例を対象としたDC療法で、単球由来未熟DCを腫瘍由来タンパク質でパルスする際に、免疫原性の高いスカシ貝ヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin: KLH) と非特異的免疫反応物質であるOK-432 (Picibanil) をアジュバントとして用いた研究が報告されている (表1)⁸⁾。この研究では、DCの投与経路として皮内投与のほか、腫瘍内に投与用の管 (Ommaya reservoir) が留置してあった11例では腫瘍内投与を併用した。うち7例は腫瘍内には未熟DCを投与した。1人の患者に対し、皮内投与は最高22回、腫瘍内投与は最高18回まで行っている。この結果、膠芽腫の患者では、KLH単独よりもKLH+OK-432を用いてDCを成熟させた方が、投与経路では皮内投与単独より皮内+腫瘍内投与を行った方が、免疫反応の解析ではDTH反応やELISpotアッセイで反応を示した方が、有意に生存期間が延長した。

2) 腫瘍由来タンパク質で単球由来DCをパルスし、DC投与とサイトカイン投与を併用する方法

われわれの臨床研究では、DC療法にIL-2もしくはIFN- β の全身投与を併用した。再発悪性脳腫瘍5例 (膠芽腫4例、悪性胚細胞腫瘍1例) を対象とした (表2)。腫瘍摘出術を施行した後に、アフエレーシスで単球を分離し、体外でDCを誘導して腫瘍由来タンパク質でパルスして成熟させ、皮内に1回あたり 1×10^7 細胞/kgを投与した (図1)。さらにIL-2 (35万単位) を隔週に静注し、特に神経症状が進行していた

表2 DC療法の自験例

No.	診断	年齢	KPS	投与回数	臨床効果	生存期間
1	GB	70M	30	4	PR	2.2/4.9
2	GB	59F	70	10	NC	10.1/14.8
3	GB	55F	60	5	PD	3.5/7.9
4	GB	52F	80	20	NC	21.9/28.8
5	MGT	22M	30	4	PR	1.1/33.3

生存期間(カ月): DC療法開始後の生存期間/初回手術からの全生存期間, GB: glioblastoma, MGT: malignant germ cell tumor (悪性胚細胞腫瘍), PR: partial response, NC: no change, PD: progressive disease

3例(症例2, 3, 5)についてはIFN- β 300万単位を週1回静注した(図2)。その結果, 5例の画像診断上の効果判定はpartial response (PR) 2例, no change (NC) 2例, progressive disease (PD) 1例であった。しかし, このPR 2例は治療開始時からKPSが低く, 明らかな生存期間の延長には至らなかった。

FACS解析の結果, 最も腫瘍が縮小した症例5(図3)も含め各症例とも治療前後でCD4/CD8比, CD56⁺CD16⁺細胞数, CD83(成熟DCのマーカー)⁺DC数に大きな変化はなく, 全身的にはTh/CTL, NK細胞, DCの活性化について治療前後で有意な差はなかった。

ELISpotアッセイにて, 患者末梢血リンパ球(1×10^4 細胞)と腫瘍由来タンパク質でパルスしたDC(1×10^4 細胞)を24時間培養し, 治療前の患者末梢血リンパ球を対照としてDCに反応したIFN- γ 産生リンパ球の数を検出した。その結果, 調査した3例いずれにおいても, DC療法開始後, パルスDCに反応したIFN- γ 産生リンパ球の増加を観察した(図4)。なお, 経過中に自己免疫疾患などの重篤な有害事象は認めなかった。

NCを含めると5例中4例の客観的有効性を認めたものの, 症例4を除きその治療効果は持続しなかった。ELISpotアッセイの結果からもT細胞の活性化は持続せず, この手法によるDC療法の効果は一時的で, T細胞の活性の低下に伴って腫瘍が急速に再増大する傾向がみられた。

3) DCと腫瘍細胞を融合し, 融合細胞投与とサイトカイン投与を併用する方法

放射線を照射した培養腫瘍細胞と単球由来成熟DCをポリエチレングリコールで融合させた細胞を用いた

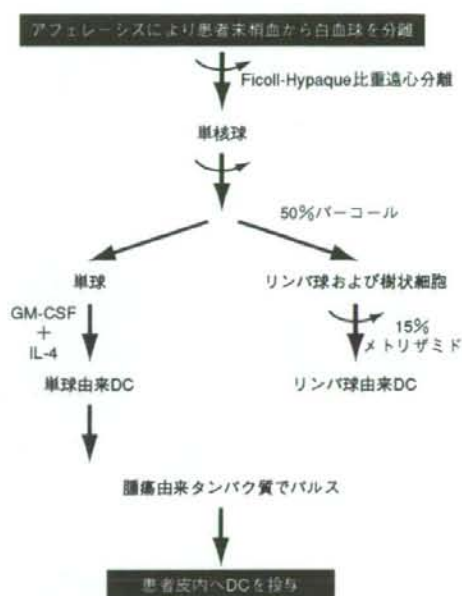


図1 単球由来DCの誘導

アフェレーシスで得た白血球からFicoll-Hypaque比重遠心分離で単核球を分離し, 50%パーコールで単球を分離する。単球はGM-CSFおよびIL-4で1週間培養して単球由来DCを誘導する。その後, 腫瘍由来タンパク質をパルスし, 24時間後に回収して患者皮内に投与する

臨床研究が報告されている(表1)⁹⁾。16例の悪性脳腫瘍患者を対象に, 融合細胞を1日目, IL-12を3日目と6日目に同じ部位に皮内投与し, これを隔週に3回実施した。12例の評価の結果, PR 3例, mixed reaction (MR) 1例, NC 3例, PD 5例であり, NC

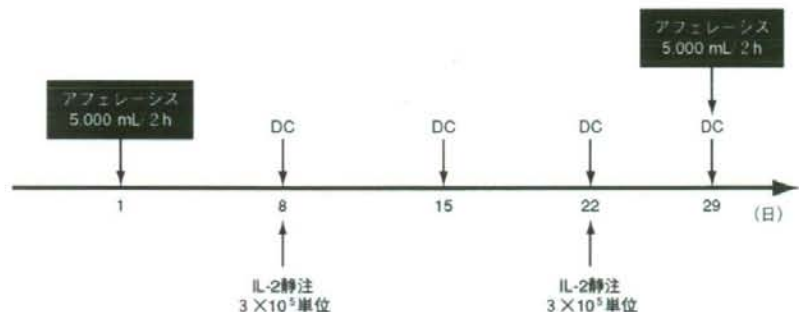


図2 再発悪性脳腫瘍治療プロトコル

アフエーシス1回で4回分のDCを得る。DCは週1回皮内投与する。DC治療を4回以上継続する場合は、その都度アフエーシスを追加する。IL-2は 3×10^5 単位を隔週に静脈内投与した。また、症例2, 3, 5は神経症状が進行したためIFN- β 3×10^6 単位を毎週静脈内投与している

症例5 (悪性胚細胞腫瘍)

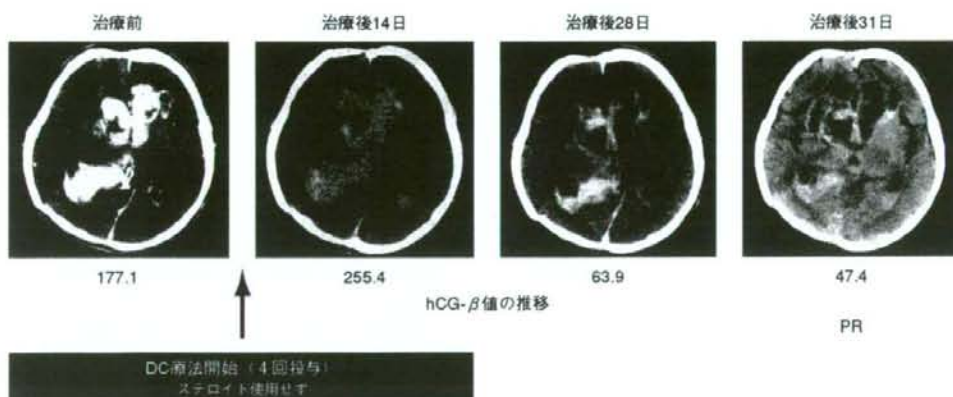


図3 DC療法の有効例

症例5は悪性胚細胞腫瘍再発例で、治療開始14日後の画像では腫瘍が増大し、腫瘍マーカーのhCG- β 値も255.4まで上昇したが、その後DC4回目投与時には腫瘍の著しい縮小とhCG- β 値の低下が認められ、DC療法が有効であった

を含めると12例中7例に客観的臨床効果を認めた。同じ治療を行った乳がん、胃がん、卵巣がん、黒色腫の患者合計12例は、NC4例、PD8例であり、脳腫瘍に比べ効果が低い傾向がみられた。

この手法は、培養腫瘍細胞を用いるため正常細胞の混入がなく、自己免疫反応を起こす可能性が低いという利点があるが、腫瘍細胞の培養に成功しないとい

えないのが欠点である。

4) 腫瘍由来タンパク質で単球由来DCをパルスし、DCとサイトカイン発現細胞を同時投与する方法
岡田ら¹⁵⁾は、IL-4を発現する自己線維芽細胞をDCと同時に投与した。レトロウイルスベクターTFG-IL4-Neo-TKを用いて、ヒトIL-4遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子および自殺遺伝子であるherpes

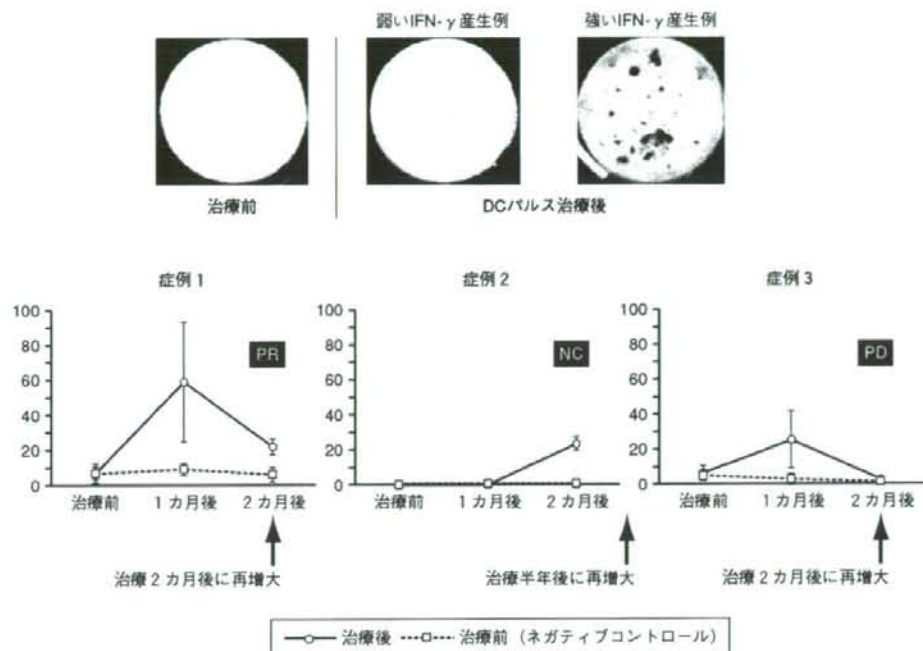


図4 IFN- γ ELISpotアッセイの結果

調査した症例1, 2, 3では、いずれもパルスDCに反応したIFN- γ 産生リンパ球が一時的に増加したが、それを維持できなかった

simplex virus-thymidine kinase 遺伝子を患者由来の線維芽細胞に導入した。線維芽細胞を用いるのは、グリオーマ細胞ではレトロウイルスベクターの感染率が低いためであるという。

第1相臨床試験では、再発悪性グリオーマ6例を対象として、腫瘍由来タンパク質でパルスしたDCをIL-4発現線維芽細胞と混合して皮内投与した(合計2回)。6例中5例が投与スケジュールを完遂した。重大な有害事象はみられず、DCは高レベルのIL-12を産生したが、IFN- γ ELISpotアッセイにおけるT細胞の反応や、無増悪生存期間の延長はみられなかった。

5) その他

この他の方法として、腫瘍関連抗原をコードするプラスミドDNAをDCに導入し、DC自体に腫瘍関連抗原ペプチドを発現させて抗腫瘍効果を発揮させるDNAワクチン療法が最近紹介されている¹⁰⁾。まだ臨床試験

が行われていないが、SOX6(転写因子)のDNAワクチン療法の有効性が*in vivo*で示されている¹²⁾。

4 悪性脳腫瘍におけるDC療法の現状と今後の展望

これまでのところ悪性脳腫瘍を対象としたDC療法は、いかにDCに効率よく腫瘍抗原を認識させるかが研究の主体であった。しかし、活性化したT細胞の標的細胞はMHCクラスI分子を発現している腫瘍細胞に限られている。脳腫瘍を含むさまざまな悪性腫瘍の15~50%はMHCクラスI分子の発現が低下または欠失しており¹⁷⁾、腫瘍細胞が宿主の免疫監視機構から逃避している一因となっている。一方、NK細胞はMHCクラスI分子をもたない腫瘍細胞を攻撃することができる。NK細胞はDCとのクロストーク(DC-NK相互作用¹⁸⁾)もある。今後は、T細胞およびNK細胞

の活性化を誘導できるペプチドを開発することにより、強力な抗腫瘍効果が期待できるかもしれない¹⁸⁾。

まだ症例数が少ないが、DCの脳腫瘍内投与での有効性も示唆されている。悪性脳腫瘍は遠隔転移をきたさないことから、それを対象とした免疫療法では、エフェクター細胞の効果が脳内に局限していても支障がない。腫瘍内投与は脳出血、脳浮腫などのリスクもあるが、DC療法ではLAK療法と異なり、少なくとも急性期の有害事象は報告されていない。今後臨床研究が進めば、DCの腫瘍内投与の有効性がより明確になるかもしれない。

悪性脳腫瘍のDC療法は他のがんと比較すると客観的有効例の割合が高いと言えるが、その効果は一時的である。また、DCによる腫瘍抗原の提示時に共刺激シグナルの伝達に失敗すると免疫寛容が誘導され、腫瘍がかえって増大することがわかっている。

現在、免疫寛容誘導にかかわるDCの作用機序や制御性T細胞 (regulatory T cell: Treg) とDCとのクロストークの機序も解明されつつある。今後は腫瘍特異的CTLを識別するTregを選択的に排除する手法を用いた新たなDC療法の開発が期待される¹⁹⁾。DC療法の改良が進めば、今後は自己免疫疾患などの慢性期有害事象の検討も充分に行っていかなければならない。

おわりに

究極の目標は、脳腫瘍を含む悪性腫瘍に対する有効な免疫療法の確立であるが、その達成は容易なことではない。新たなDC療法戦略への期待もあるが、DC療法単独での限界も垣間見えている。近年、腫瘍細胞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、ウイルスで直接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。増殖型遺伝子組換えヘルペスウイルスは腫瘍内で増殖して殺細胞効果を示すばかりでなく、特異的抗腫瘍免疫を効果的に惹起することがわかっている。悪性脳腫瘍の治療成

績向上には、DC療法とこのような革新的な治療アプローチとの組み合わせも視野に入れた治療法開発が重要かもしれない。

文献

- 1) Yu, J. S. et al.: *Cancer Res.*, 61: 842-847, 2001
- 2) Kikuchi, T. et al.: *Cancer Immunol. Immunother.*, 50: 337-344, 2001
- 3) Chang, A. E. et al.: *Clin. Cancer Res.*, 8: 1021-1032, 2002
- 4) Yamanaka, R. et al.: *Br. J. Cancer*, 89: 1172-1179, 2003
- 5) Yu, J. S. et al.: *Cancer Res.*, 64: 4973-4979, 2004
- 6) Kikuchi, T. et al.: *J. Immunother.*, 27: 452-459, 2004
- 7) Caruso, D. A. et al.: *Neuro. Oncol.*, 6: 236-246, 2004
- 8) Yamanaka, R. et al.: *Clin. Cancer Res.*, 11: 4160-4167, 2005
- 9) Homma, S. et al.: *Eur. J. Clin. Invest.*, 35: 279-286, 2005
- 10) Khan, J. A. et al.: *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 7: 114-117, 2006
- 11) Kurpad, S. N.: *Glia*, 15: 244-256, 1995
- 12) Ueda, R. et al.: *Int. J. Cancer*, 122: 2274-2279, 2008
- 13) De Vleeschouwer, S. et al.: *Clin. Cancer Res.*, 14: 3098-3104, 2008
- 14) Jochem, D. et al.: *Lancet*, 363: 594-599, 2004
- 15) Okada, H. et al.: *J. Transl. Med.*, 5: 67, 2007
- 16) McDonnell, W. M. et al.: *N. Engl. J. Med.*, 334: 42-45, 1996
- 17) Hicklin, D. J. et al.: *Mol. Med. Today*, 5: 178-186, 1999
- 18) Terme, M. et al.: *Nat. Immunol.*, 9: 486-494, 2008
- 19) Oliver, M. et al.: *Int. J. Cancer*, 122: 1794-1802, 2008

<筆頭著者プロフィール>

田中 実: 大分医科大学1991年卒。東京大学脳神経外科に入局。これまで悪性グリオーマに対する局所高線量放射線治療の臨床研究などを行ってきた。今行われている悪性グリオーマに対する酸素中性子捕捉療法や腫瘍新生血管を標的とした治療法もある程度は有効かもしれない。しかし、特に悪性度の高い膠芽腫に対しては腫瘍細胞で選択的に複製する増殖型ウイルスを用いたウイルス療法がbreak throughになるのではないかと期待している。

※2 DC-NK相互作用

NK細胞はタイプ1 IFNで活性化され腫瘍細胞を傷害する。傷害された腫瘍細胞は腫瘍抗原を放出し、これらを取り込んだ未熟DCはNK細胞との相互作用で成熟したり、逆にNK細胞が未熟DCを傷害したりして両方向の相互作用でDCの働きを調整している。