

図6-2 遺伝子改変T細胞輸注療法

T細胞受容体 (TCR) は腫瘍細胞上のHLA クラス I 分子とペプチドの複合体を認識する。TCR 遺伝子を導入されたリンパ球が抗腫瘍効果を発揮するためには、患者とHLAの型が一致していること、およびがん細胞にHLA分子が発現していることが条件となる。キメラ抗原受容体 (CAR) は抗体の重鎖可変領域 (V_H) と軽鎖可変領域 (V_L) を一本鎖で繋いで単鎖Fvフラグメント (scFv) とし、さらにCD3 ζ 鎖またはFc ϵ R1 γ 鎖の細胞内シグナルドメインを融合したものである。TCRと異なり、CARはがん細胞表面のタンパク質を直接認識できるため、HLAの拘束性を受けない。抗原に対する親和性もTCRと比較すると数十倍から数千倍と非常に強い。CH1-3: constant region of heavy chain, CL: constant region of light chain, scFv: single chain of variable fragment, VH: variable region of heavy chain, VL: variable region of light chain

MAGE-A4抗原を標的とした食道がんに対する試験を行っている。

TCR 遺伝子導入T細胞療法の問題点の1つとして、遺伝子導入した腫瘍特異的TCRの α 鎖 β 鎖と患者T細胞がもともと持っている内在性TCRの α 鎖 β 鎖との間のハイブリッド形成があげられる。ハイブリッドTCR形成により、期待される腫瘍特異的TCR形成の確率が低下するだけでなく、予測不可能な特異性をもつTCRが出現する。最近、マウスを用いたTCR改変T細胞療法のモデルにおいて、導入TCRと内在性TCRの α 鎖 β 鎖のハイブリッドの結果、形成されたTCRヘテロダイマーが自己抗原反応性を獲得し、輸注療法後に致死的な移植片対宿主病を引き起こすことが報告され、注意喚起されている¹⁸⁾。ハイブリッド形成を防ぐための戦略もいくつか報告されており¹³⁾、著者らも内在性TCRの定常域に対するsiRNAを組み込み、内在性TCRの発現を抑える新しいベクターを開発中である¹⁹⁾。

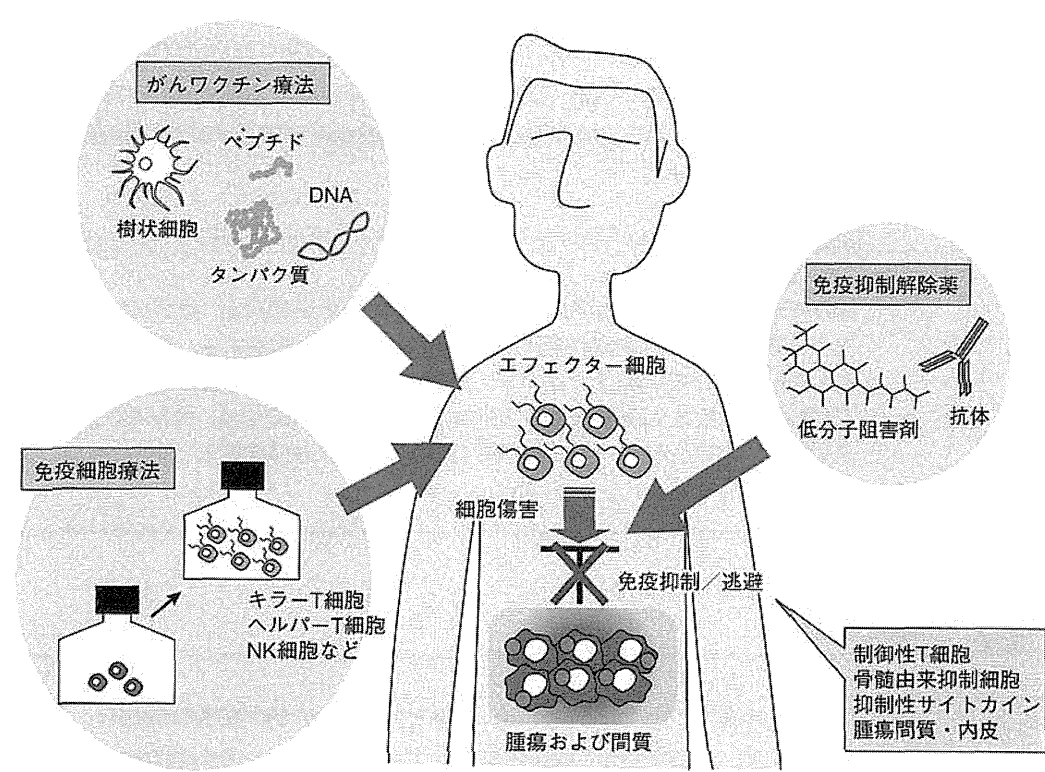


図6-3 複合的がん免疫療法

腫瘍の微小環境は、制御性T細胞や骨髄由来抑制性細胞を誘導し、抑制性サイトカイン類を産生するなど、担がん生体ではさまざまな免疫抑制機構が働いている。がん免疫療法をより効果のあるものにするためには、エフェクターT細胞の直接的な投与（免疫細胞療法）、生体内での増幅・活性化（がんワクチン療法）および免疫抑制解除薬などを組み合わせた複合的免疫療法を行うことが必要と考えられている

ii) キメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞療法

キメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor：CAR）遺伝子導入T細胞療法とは腫瘍細胞表面に発現する抗原に対する抗体分子とT細胞活性化に必要な分子の細胞内ドメインとの融合分子の遺伝子を、患者末梢血リンパ球に導入する方法である²⁰⁾。前述のTCRと異なりHLAによる拘束を受けないので、患者のHLA型や、腫瘍細胞のHLA分子の発現低下による腫瘍の免疫エスケープ機構の影響を受けないこと、CD8⁺キラーT細胞だけでなくCD4⁺ヘルパーT細胞にも抗原特異性を付与可能であることが特徴である。CARは、抗体のFabフラグメントまたは単鎖Fvフラグメント（scFv）にCD3と鎖またはFcεRIγ鎖の細胞内シグナルドメインを繋いだものが第一世代として考案された。このCAR遺伝子導入T細胞は抗原特異的に活性化され、*in vitro*で抗原陽性腫瘍細胞を傷害することが示されたが、臨床試験（α-Folate receptorを標的とした卵巣がんに対する試験、carbonic anhydrase IXを標的とした腎細胞がんに対する試験、CD20を標的としたリンパ腫に対する試験）における効果は非常に限られたものであった。これは、共刺激分子からの適切な刺激が入りにくい第一世代のCARでは、T細胞の不完全な活性化により、*in vivo*におけるT細胞の増殖と生存性が限られることが原因と考えられる。この問題点の解決法として、CD28、OX40、4-1BBといった共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインをベクターに組み込んだ第二世代CAR、さらにこれらの共刺激分子を複数もつ第三世代CARが開発され、臨床試験が行われている。

TCRおよびCAR遺伝子導入T細胞療法は大きく期待される新規治療法であり、本治療法を安全に発展させるために、今後、標的抗原、前処置の方法、輸注T細胞の量の問題を慎重に段階的に評価していくとともに、自殺遺伝子 (suicide gene) を遺伝子改変に組み込む工夫などの対策が検討される必要がある。

Memo

《自殺遺伝子》

HSV-TK (単純ヘルペスウイルスがもつチミジンキナーゼ) は、ガンシクロビルなどの抗ウイルス剤をリン酸化してDNA合成阻害作用を有する最終産物を生成する。遺伝子改変細胞療法を行う場合、この遺伝子を同時に導入しておけば、患者にガンシクロビルを投与することにより、遺伝子導入細胞を自殺させることが可能となり、副作用対策として利用できる。HSV-TK以外にも、プロアポトーシス遺伝子であるカスパーゼ9を発現させアポトーシスを誘導する、即効性のある自殺遺伝子も開発されつつある。

5 今後の展望

これまで述べてきたように、がん抗原を標的とした特異的免疫療法は、その効果が期待されているものの、いまだ十分な臨床効果を示すものは少ない。その理由の1つとして、担がん生体における免疫抑制機構の存在があげられる。腫瘍の微小環境は、制御性T細胞や骨髄由来抑制性細胞を誘導し、IL-10, TGF- β , VEGF, IL-13などの抑制性サイトカイン類を産生する。これらは、抗原提示細胞や抗腫瘍性エフェクター細胞を不活性化することにより抗腫瘍免疫応答を負に制御していると考えられる。がん免疫療法をより効果のあるものにするためには、エフェクターT細胞の直接的な投与 (細胞療法)、生体内での増幅・活性化 (がんワクチン療法) および免疫抑制解除などを組み合わせた複合的免疫療法を行うことが必要と考えられている (図6-3)。

(今井奈緒子, 池田裕明, 珠玖洋)

参考文献

- 1) van der Bruggen, P. et al. : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254 : 1643-1647, 1991
- 2) Van den Eynde, B. J. & van der Bruggen, P. : T cell defined tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.*, 9 : 684-693, 1997
- 3) Cancer Immunity Peptide Database : <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>
- 4) Dunn, G. P. et al. : The three Es of cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.*, 22 : 329-360, 2004
- 5) Wang, R. F. : Tumor antigens discovery : perspectives for cancer therapy. *Mol. Med.*, 3 : 716-731, 1997
- 6) Cheever, M. A. et al. : The prioritization of cancer antigens : a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.*, 15 : 5323-5337, 2009
- 7) Caballero, O. L. Chen, Y. T. : Cancer/testis (CT) antigens : potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.*, 100 : 2014-2021, 2009
- 8) Almeida, L. G. et al. : CTdatabase : a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res.*, 37 : D816-819, 2009 : <http://www.cta.incc.br/>
- 9) Neller, M. A. et al. : Antigens for cancer immunotherapy. *Semin. Immunol.*, 20 : 286-295, 2008
- 10) June, C. H. : Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J. Clin. Invest.*, 117 : 1466-1476, 2007
- 11) Dudley, M. E. et al. : Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma : evaluation of

- intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol.*, 26 : 5233-5239, 2008
- 12) Hawkins, R. E. et al. : Development of adoptive cell therapy for cancer : a clinical perspective. *Hum. Gene Ther.*, 21 : 665-672, 2010
 - 13) Brenner, M. K. & Heslop, H. E. : Adoptive T cell therapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 22 : 251-257, 2010
 - 14) Morgan, R. A. et al. : Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 314 : 126-129, 2006
 - 15) Johnson, L. A. et al. : Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114 : 535-546, 2009
 - 16) Parkhurst, M. R. et al. : T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther.*, 19 : 620-626, 2011
 - 17) Robbins, P. F. et al. : Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol.*, 29 : 917-924, 2011
 - 18) Bendle, G. M. et al. : Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat. Med.*, 16 : 565-570, 2010
 - 19) Okamoto, S. et al. : Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.*, 69 : 9003-9011, 2009
 - 20) Sadelain, M. et al. : The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 21 : 215-223, 2009

2

消化器癌克服のための癌治療用
ヘルペスウイルスの現状と展望

中森 幹人 (和歌山県立医科大学外科学第2講座)

Nakamori Mikihiro

山上 裕機 (和歌山県立医科大学外科学第2講座 教授)

Yamaue Hiroki

— Summary —

近年、癌治療用ウイルス療法が注目されてきている。これは、ウイルス療法に関する前臨床的研究により、その認容性、腫瘍内でのウイルス増殖に加えてウイルス製剤による腫瘍免疫応答などが証明されたためである。さらに、欧米における転移性悪性黒色腫に対する癌治療用ヘルペスウイルス製剤 OncoVEX を用いた第3相試験の終了も大きく後押ししている。ようやく、我が国においても、食道癌に対する OBP-301 によるアデノウイルス療法や、G47Δによる脳腫瘍に対するヘルペスウイルス療法の臨床試験も開始された。癌治療用ウイルス療法は着実な第一歩を踏み出した。

和文キーワード：癌治療用ウイルス、ヘルペスウイルス療法

はじめに

癌治療用ウイルス (oncolytic virus) は、悪性腫瘍患者の初期臨床研究においてウイルス感染又は生ウイルスワクチン接種に伴い、悪性腫瘍の退縮が認められたことにより初めて見出された。これらの初期の報告以来、癌治療用ウイルスの研究は、個別のウイルス感染の経験や意図的に感染させた事例から、癌治療のために特別に選択したウイルスや遺伝子改変を施したウイルスを使用するものへと進歩してきた。癌治療用ウイルスは、正常組織に過度の損傷を与えることなく腫瘍組織内で選択的に増殖、拡散し、腫瘍組織を破壊することを目的としている。¹⁾

癌治療用ウイルスには、癌細胞で選択的に複製しこれを溶解させる固有の性質を持つ野生型ウイルスや弱毒化ウイルスがある。加えて、癌細胞で選択的に複製し、細胞を溶解させるよう遺伝子改変されたウイルスもある。ウイルスの改変には、1)正常細胞でのウイルス複製に不可欠なウイルス遺伝子の変異、2)腫瘍特異的のプロモーターを利用した初期遺伝子発現の制御、3)ウイルスの組織指向性(トロピズム)や細胞内への侵入過程の改変、4)ウイルスゲノムへの目的遺伝子の組み込みなどがある。癌治療用ウイルスには、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、ワクシニアウイルス、水胞性口内炎ウイルス、レオウイルス、ニューキャッスル病ウイルス、センダイウイルスなどがある。

それらの臨床応用に関する最近の成果としては、2011年に癌治療用ワクシニアウイルスに

関する報告²⁾があり、さらに、本年に入り、組換え癌治療用ウイルス製剤を用いた進行肝細胞癌(HCC)患者を対象にした無作為化第2相臨床試験 HEP007 で有望な結果が報告された³⁾。この臨床試験で用いられたワクシニアウイルスのチミジンリン酸化酵素遺伝子欠失株に顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) 遺伝子を挿入した組み換えウイルス製剤 JX-594 は、癌細胞でのみ増殖し細胞を溶解させるとともに、GM-CSF が免疫反応を刺激するよう設計されていた。このウイルスは、複製による癌細胞の溶解、血管破壊による腫瘍への血液供給の遮断、身体の癌細胞に対する免疫反応の誘導という3つの作用を有し、溶解した癌細胞から放出された JX-594 は、体内の局所および遠隔部位に残存する癌細胞に感染し、体内の癌細胞を根絶させると考えられている。このように、海外では着実に癌治療用ウイルスの臨床応用が始まっており、我が国でもその動向が注目されている。本稿では、日本における癌に対する癌治療用ウイルス療法の実況に関して述べるとともに、我々の施設の取り組みについても紹介することとする。

I. 我が国における癌治療用ウイルス療法的位置づけと現況

まず、我が国の癌治療用ウイルス療法に関する指針として、文部科学省・厚生労働省の「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成14年3月27日)(平成16年12月28日全部改正)(平成20年12月1日一部改正)によれば、遺伝子治療とは、「疾病の治療を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること」と定義されている。つまり、遺伝子の働きによって治療を行う方法と解釈でき、遺伝子を細胞や体内に運ぶ手段としてウイルスを用いられることになる。

しかし、ウイルス療法は、ウイルスを癌細胞に感染させて、ウイルス自体が直接癌細胞を破壊することから、癌細胞は、遺伝子の働きではなく、ウイルスがそこで増える過程で死滅するため、ウイルス療法は厳密には遺伝子治療とは区別されなければならない。欧米では、どのようなウイルスを用いたウイルス療法でも、臨床試験を行う場合は、遺伝子治療と同じように規制当局の審査を受けることが必要で、日本では、ウイルス療法の臨床研究に関する指針がまだないために、癌治療用ウイルスの臨床研究の実施計画書は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に則って厚生労働省の審査を受けなければならない。

現在、国の承認を受けて行われているウイルス療法としては、アデノウイルス療法、ヘルペスウイルス療法の2種類であり、これらについて以下に概説する。

II. 我が国の癌治療用アデノウイルスを用いた臨床試験

染色体末端のテロメア長を保つ作用を持つ酵素テロメラーゼは極めて多くのがん細胞でその活性の上昇が知られており、現在、癌治療のターゲットとして最も注目を浴びている分子の一つである。岡山大学において開発されたテロメライシン(Telomelysin、開発コード:OBP-301)は、テロメラーゼ構成成分であるhTERT(human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子のプロモーターを用いて作成した癌治療用アデノウイルスである。テロメラーゼは85%以上のヒト癌でその活性の上昇が知られており、テロメライシンは広範な癌細胞で選択的に増殖

し、細胞融解を誘導する。腫瘍内に投与された場合、このウイルスは三次元的に腫瘍組織内に拡散して、連鎖的に細胞死を誘導することで広範囲の腫瘍壊死を生じると考えられる。また、テロメラーゼ活性を持たない正常細胞ではその増殖は制限され、安全性が担保される。

現在、このテロメラシンをコア技術として岡山大学発バイオベンチャーを設立し、癌の治療用・診断用医薬品としての臨床開発を推進している。岡山大学病院から厚生労働省に申請していた遺伝子治療臨床研究「頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する癌治療用アデノウイルス Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究」の実施がようやく承認され、Telomelysin (OBP-301) は米国での第 I 相臨床試験での安全性の検証に基づき、今回は放射線治療と併用で主に食道癌を対象に行われる予定である。⁴⁾

III. 我が国の癌治療用ヘルペスウイルスを用いた臨床試験

癌治療用に開発された遺伝子組換えヘルペスウイルスは、ウイルスの遺伝子の働きを一つだけ止めた第 1 世代から、現在の第 3 世代まで、主なだけでも世界中に 30 近く存在し、それぞれ臨床試験が行われている。そこで、ヘルペスウイルスの正常細胞に対する病原性を低く抑えて安全性を担保することは臨床応用に必須である。しかし、ウイルスを弱毒化したからと言っても、癌治療のために安全なウイルスになるとは必ずしも限らない。しかも、ウイルスはゲノムに変異が生じると必ず弱毒化するという性質を持つ。癌細胞は、元来ウイルス感染に対する防御機構が障害されているため、いかなる弱毒化ウイルスでも正常細胞と比較すると、癌細胞では多少とも高いウイルス複製が得られる。さらに、癌治療用ヘルペスウイルス開発において重要なことは、正常細胞に対する病原性を最小限に保ち、癌細胞に対するウイルス複製能を最大限に生かして治療域を意図的に広くすることである。そのためには、腫瘍生物学とウイルス学の知識に基づいて癌特異的なウイルス複製能が獲得できるように遺伝子工学を駆使したウイルスゲノムを設計することが極めて肝要である。癌治療用ヘルペスウイルスは以下のような

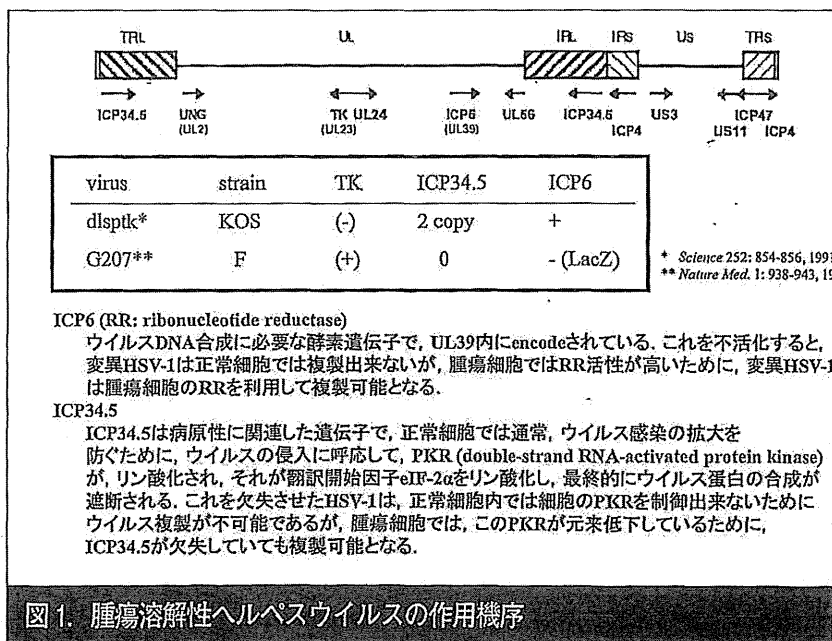


図1. 腫瘍溶解性ヘルペスウイルスの作用機序

2 消化器癌克服のための癌治療用ヘルペスウイルスの現状と展望

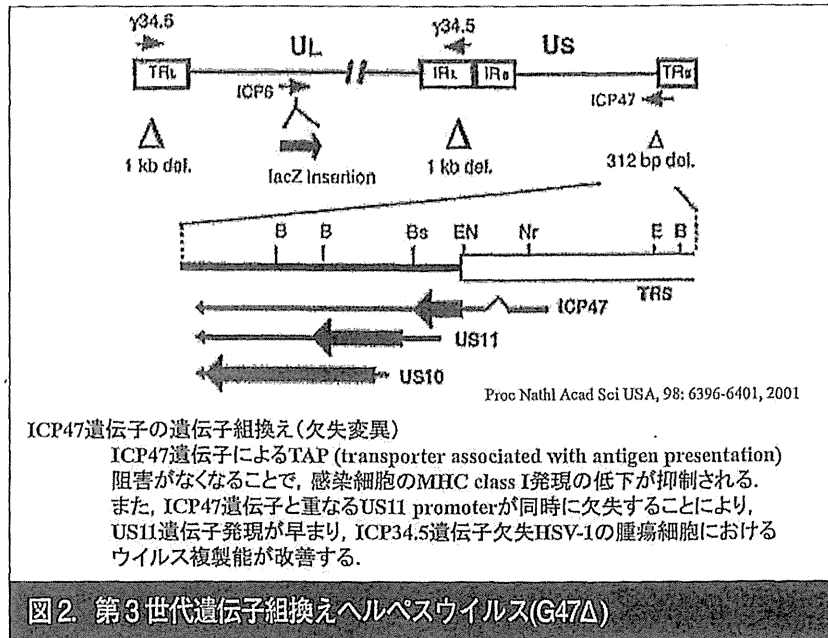
ウイルス遺伝子の改変を利用して開発されたものである。(図1)

γ 34.5 遺伝子はヘルペスウイルスの病原性に関連した遺伝子である。これを欠失させた変異株は正常細胞でのウイルス複製能が著しく減弱する。正常細胞では、ウイルスが感染すると、二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ(double stranded RNA-activated protein kinase: PKR) がリン酸化され、その翻訳開始因子 eIF-2a をリン酸化し、結果として、ウイルスのタンパク合成が遮断される。 γ 34.5 遺伝子産物は PKR 機能に拮抗してウイルスのタンパク合成を可能にするが、 γ 34.5 遺伝子欠失ヘルペスウイルスは正常細胞では複製を不可能である。しかし、癌細胞では、PKR 活性が低下しているために γ 34.5 遺伝子欠失ヘルペスウイルスでも複製可能である。この機構により、 γ 34.5 遺伝子欠失ヘルペスウイルスが癌細胞を破壊できることになる。 γ 34.5 の働きのみを欠失させた第1世代の「1716」と呼ばれる癌治療用ヘルペスウイルスは、悪性腫瘍を対象に、イギリスで第3相臨床試験まで進んでいると言われている。

G207⁹⁾は、世界でも最も早く臨床に応用された増殖型遺伝子組換えウイルスの1つで、第2世代の遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス型である。遺伝子操作により、 γ 34.5 と ICP6 という二つのウイルス遺伝子が働かないように設計されている。ICP6 遺伝子は、ヘルペスウイルスの DNA 合成に必要なリボヌクレオチド還元酵素を作る遺伝子で、ICP6 遺伝子が働かないと、ヘルペスウイルスは細胞に感染しても DNA 合成ができないため、増えることが不可能となる。しかし、癌細胞には ICP6 遺伝子の代わりとなる酵素が豊富にあるために、ICP6 遺伝子が機能しなくてもヘルペスウイルスは癌細胞では増殖可能となる。G207 は、安全性を重視して臨床応用のために開発された遺伝子組換えヘルペスウイルスで、動物実験における有効性と安全性を徹底的に確認されたことから、再発悪性グリオーマ患者を対象とした第I相臨床試験が行われ、G207 の腫瘍内投与が高力価でも安全であることが認められた。しかし、その抗腫瘍効果に対して改良の余地を残した。

さらに、ヘルペスウイルスの α 47 遺伝子のコードするタンパク質は、宿主細胞の抗原提示関連トランスポーター (TAP) を阻害することで、細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体抗原 (major histocompatibility complex: MHC) class I の発現を抑制する。このことは感染細胞のウイルスタンパク質の提示を抑制し、宿主のウイルス感染に対する免疫監視機構から逃れる作用を有する。 α 47 遺伝子を欠失させたヘルペスウイルスでは、宿主細胞の MHC class I 発現が保持され、免疫細胞に対する応答が増強されると推察出来る。また、 α 47 遺伝子は US11 遺伝子プロモーター部分と重なるため、 α 47 遺伝子の欠失により、US11 遺伝子発現時期が早まることになる。これは γ 34.5 遺伝子欠失ヘルペスウイルスにおいて、減弱したウイルス複製能を腫瘍細胞に限り復元することになる。 γ 34.5 と α 47 を欠失させた「OncoVEX」と呼ばれる癌治療用ヘルペスウイルス⁹⁾は、欧米で固形癌を対象にした第3相臨床試験が現在行われており、OncoVEX に関しては最近、アメリカの大手製薬企業がこれを買収することで、製薬としての腫瘍溶解性ウイルスの価値が認められつつあると解釈もでき、我が国でも癌治療用ウイルスが製薬企業にとって魅力ある治療薬となることを願う。

そして、東京大学で臨床試験が開始された G47 Δ ¹⁰⁾は、第3世代遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス (図2) で、このウイルス療法は、2004年度の文部科学省「がんのトランスレーショナ



ルリサーチ事業」のプロジェクトとして臨床開発が推進され、2009年度より「進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47Δを用いた遺伝子治療ウイルス療法」の臨床研究」の被験者登録が開始された。

G47ΔはG207に改良を加えた遺伝子組換えヘルペスウイルスで、遺伝子操作によって、先に述べたγ34.5とICP6に加えてα47の3つのウイルス遺伝子が働かないように設計されている。α47遺伝子は、ヘルペスウイルスが感染した細胞の表面の組織適合性抗原クラスIの量を減らす作用があり、MHC class I抗原が、癌抗原やウイルス蛋白を免疫細胞に提示する役割を果たすと考えられている。従って、α47遺伝子がないと、MHC class I抗原の量が減らないので、癌細胞では、抗腫瘍免疫を担う免疫細胞をより強く刺激すると考えられる。基礎実験では、G47ΔはG207に比べておよそ10倍の抗腫瘍効果を発揮することが確認されており、また、G47ΔはG207に比べて濃度が約10倍高いウイルス製剤を作ることが可能となっている。動物実験による安全性試験では、G47ΔはG207と少なくとも同等の安全性が確認されている。G47Δを用いた臨床試験は今回が世界で初めてであり、OncoVEXが先に製剤化へのレールを敷いてくれることになれば、このG47Δの製剤化への可能性は十分あると考えられる。

IV. 我々の効果増強を目指したウイルス療法の開発

我が国では臨床試験が始まった癌治療用アデノウイルスやヘルペスウイルスに関しては更なる改良が着々と進んでいる。まず、アデノウイルスでは、化学療法の効果判定⁹⁾やナビゲーション外科⁹⁾が可能となるような製剤としての可能性がすでに報告されている。ヘルペスウイルス研究開発においても、我々の施設ではG47Δを用いた消化器癌に対する臨床試験を目指しながら、基礎研究開発も行っている。まず、ヘルペスウイルスには感染の際に宿主細胞を周囲の細胞と融合させる性質を有するいわゆるサブタイプが存在する。G207から選別された融合

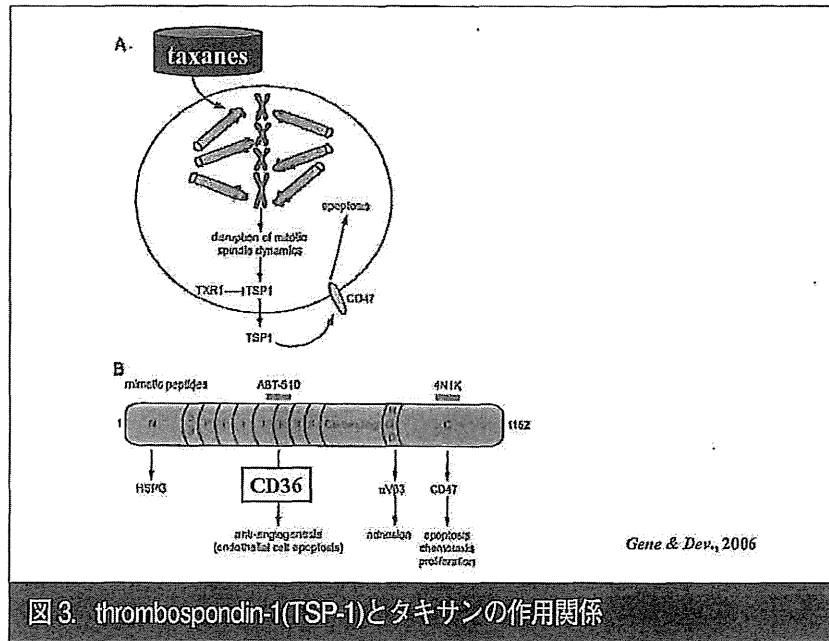


図3. thrombospondin-1(TSP-1)とタキサン作用関係

亜系の Fu-10¹⁰はそのひとつである。また、syncytiumと呼ばれる細胞融合を誘導する遺伝子を発現するように遺伝子組換えした Synco-2D^{11, 12}は殺細胞効果が増強することを確認した。最近では、G47Δの改良型である T-01 のゲノムに治療遺伝子を直接組み込み、増幅型遺伝子発現ベクターの機能を持たせて治療に応用する試みを行っている。具体的には、bacterial artificial chromosome (BAC)を利用し、第3世代腫瘍溶解性ヘルペスウイルスである T-01 のゲノムに治療戦略に応じた遺伝子をと組み込むシステム¹³を取り入れ、研究開発に努めている。その理由として、ウイルス療法は化学療法や放射線治療との併用により相乗効果が期待できるためである。例えば、低線量の放射線照射が RR 活性を上昇させ、その結果、ヘルペスウイルスの複製能を増強させたという報告や、ある種の抗癌剤が癌細胞の Growth Arrest and DNA damage inducible Protein 34 (GADD34)を誘導させることで腫瘍内でのウイルスの複製能を増強させることがわかっている。¹⁴そこで我々は、胃癌に感受性を有するタキサン (taxane) 系抗癌剤に注目し、これに関連する分子を T-01 に組み込む研究を行っている。タキサン系抗癌剤は tubulin 重合形成や細胞周期に関連して抗癌作用を有することはよく知られているが、近年、タキサンによる thrombospondin-1 (TSP-1)が介する CD family に様々な形で関連していることがわかった。¹⁵そこで、TSP-1 を癌治療用ヘルペスウイルスに遺伝子組み込みすることで TSP-1 発現 oncolytic HSV-1 として機能する T-TSP-1 の開発した。¹⁶ T-TSP-1 は癌治療用ヘルペスウイルスに感受性が低い胃癌細胞に関しても TSP-1 を介した抗腫瘍血管新生抑制効果を有することがわかり、このシステムを応用した新しいヘルペスウイルス開発を行っているところである。

V. 臨床試験を行ううえでの留意すべき点

癌治療用ウイルスの複雑性および動物モデルの有用性に限界があることにより、初期臨床試

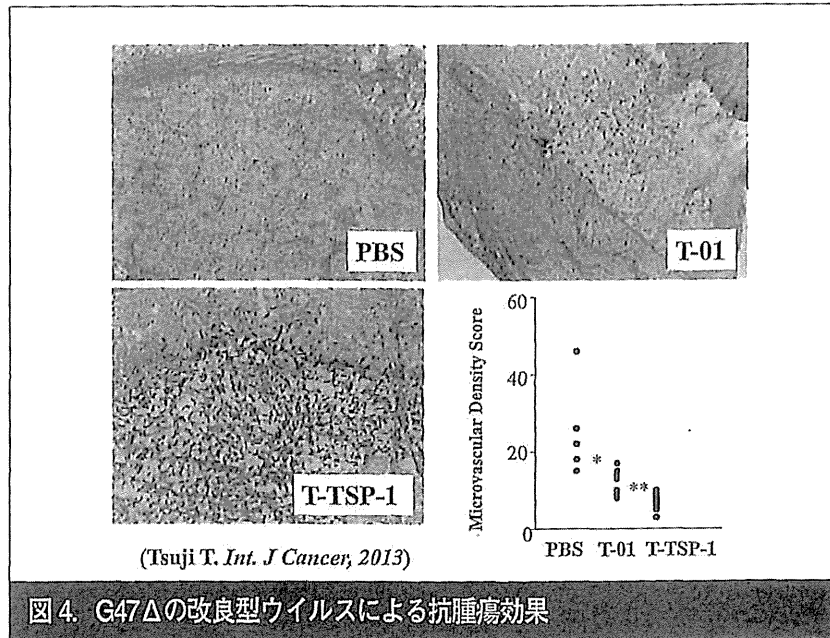


図4. G47Δの改良型ウイルスによる抗腫瘍効果

験で残される多くの課題が明らかにされる必要がある。特に、投与レジメンや投与経路に関しては注意が必要である。動物での投与情報からは十分な安全性情報が得られない場合があることから、安全な開始用量の決定に関しては、癌患者における用量設定試験を実施する必要がある。また、適切な投与経路を決定する際には、腫瘍内投与から開始し、局所投与、そして全身投与へと段階的なステップを踏む必要がある。さらに、選択された投与経路の妥当性を示すことや、非標的部位におけるウイルスの複製も可能性についても十分考慮すべきである。

また、可能であれば、癌治療用ウイルスまたは、分子変異体などの望ましくない複製に対処するための抗ウイルス療法も考慮すべきで、これに関しては、癌治療用ヘルペスウイルス療法におけるガンシクロビルによる制御が担保させていることは大きなアドバンテージであると考えている。

おわりに

癌治療用ウイルス療法は近い将来、特に分子標的治療とカップリングしながらトランスレーショナルリサーチと共存していかなければならない。ウイルス療法の発展は、癌の分子機構の解明と呼応した形で展開されていくのは異論のないところであり、今後は臨床試験での安全性と治療効果が確認されたうえではあるが、やがては個別化医療への道程をたどることになる。その個別化医療の行き着く先は EBM (evidence-based medicine) に基づくものになるはずであり、ウイルス治療が EBM を生み出さないと社会的にも科学的にも認知されない。このウイルス治療がトランスレーショナルリサーチとして展開され、いつかは EBM として評価を受けることを切に願う。

■ References ■

1. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. : Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnol.* 30: 658-670, 2012.
2. Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, et al: Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477: 99-102, 2011.
3. Heo J, Reid T, Ruo L, et al: Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nature Med.* in press.
4. Kuroda S, Fujiwara T, Shirakawa Y, et al: Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery. *Cancer Res.* 70: 9339-48, 2010.
5. Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, et al: Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nature Med.* 1:938-943, 1995.
6. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, et al: Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpes virus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 27: 5763-71, 2009.
7. Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, et al: Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:6396-6401, 2001.
8. Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, et al: A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *J Clin Invest.* 119: 3172-81, 2009.
9. Kishimoto H, Zhao M, Hayashi K, et al: In vivo internal tumor illumination by telomerase-dependent adenoviral GFP for precise surgical navigation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 14514-7, 2009.
10. Fu X, Zhang X: Potent systemic antitumor activity from an oncolytic herpes simplex virus of syncytial phenotype. *Cancer Res.* 62: 2306-2312, 2002.
11. Nakamori M, Fu X., Meng F, et al.: Effective therapy of metastatic ovarian cancer with an oncolytic herpes simplex virus incorporating two membrane fusion mechanisms. *Clin Cancer Res.* 9(7):2727-2733, 2003.
12. Nakamori M., Fu X, Rousseau R, et al: Destruction of nonimmunogenic mammary tumor cells by a fusogenic oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity. *Mol Ther.* 9: 658-665, 2004.
13. Fukuhara H, Ino Y, Kuroda T, et al: Triple gene-deleted oncolytic herpes simplex virus vector double-armed with interleukin 18 and soluble B7-1 constructed by bacterial artificial chromosome-mediated system. *Cancer Res.* 65:10663-10668, 2005.
14. Adusumilli PS, Chan MK, Chun YS, et al: Cisplatin-induced GADD34 upregulation potentiates oncolytic viral therapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Biol Ther.* 5:48-53, 2006.
15. Lih C, Wei W, Cohen SN: Txr1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes. *Genes and Dev.* 20: 2082-2095, 2006.
16. Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, et al: An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. *Int. J. Cancer* 132: 485-494, 2013.

1

がんペプチドワクチン療法
開発の現状と展望

勝田 将裕 (和歌山県立医科大学外科学第2講座)
Katsuda Masahiro

山上 裕機 (和歌山県立医科大学外科学第2講座 教授)
Yamaue Hiroki

— Summary —

がんペプチドワクチン療法は、手術療法、化学療法、放射線療法といった既存の治療法とは全く異なるメカニズムでがんを治療する。がんペプチドワクチン療法の開発を成功させるためには適切なペプチドの選択が重要であるが、現在 Oncoantigen 由来エピトープペプチドおよび腫瘍新生血管関連遺伝子由来エピトープペプチドを用いたがんペプチドワクチン療法の開発が進んでおり、様々な癌腫に対して創薬化に向けた治験が行われている。今後は、癌の微小環境における免疫抑制を打破する新規アジュバントや免疫チェックポイントに対する抗体などの併用によるがんペプチドワクチン療法の効果増強が期待される。また、創薬化にはがんペプチドワクチンの効果を適切に評価する評価基準の確立が重要であり、サロゲートマーカーの確立が必要である。

和文キーワード：がんペプチドワクチン療法、アジュバント、がん治療用ペプチドワクチンガイドライン、免疫モニタリング

はじめに

1991年、ベルギーのグループによるがん抗原遺伝子が同定され¹⁾、免疫系による抗原蛋白認識の分子レベルでのメカニズムが明らかとなったことで、がんワクチンを用いた臨床研究がスタートした。しかし、その後のがんワクチン臨床研究において、抗癌剤の開発研究と同様の腫瘍縮小による効果判定を指標とした臨床試験デザインでは効果を証明できず、2004年には National Cancer Institute(NCI)の Rosenberg 博士によりがんワクチンの効果について否定的な見解が報告された²⁾。

一方、2006年になって肺癌や乳癌に対する術後補助療法のがんペプチドワクチンが再発抑制効果を認めることが相次いで報告され³⁾⁴⁾、遂に2010年には前立腺がんに対するがんワクチンの Sipuleucel-T (Provenge) が生命予後の延長効果を示したことで⁵⁾、米国食品医薬品局 (FDA) によって初めてがんワクチン治療として承認された。その後、手術後の再発予防や腫瘍縮小にとらわれない延命効果こそががんワクチンの治療効果であるという新しい考え方でがんワクチン研究はますます活性化しており、現在世界中で数多くの第Ⅲ相試験が展開されている。

I. がんペプチドワクチン療法

がんペプチドワクチン療法は、手術療法、化学療法、放射線療法といった既存の治療法とは全く異なるメカニズムでがんを治療する。つまり、がん細胞表面のヒト白血球型抗原 (HLA) Class I 分子に提示される 9~10 アミノ酸残基からなるがん細胞に特有のペプチドを化学的に合成し、これを投与することでペプチド特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) を大量に誘導して抗腫瘍効果を発揮する。従って、がんペプチドワクチン療法を成功させるためには適切なペプチドの選択が重要である。

II. Oncoantigen 由来エピトープペプチド

ペプチドの選択においては、一般にがん抗原由来のエピトープペプチドが用いられる。我々は、種々のがん抗原の中でも、①発現ががん細胞に特異的であり、②がん細胞の増殖に不可欠なたんぱく質であり、③免疫原性が高い「Oncoantigen」がペプチドワクチン療法の標的として適していると考えている。cDNA マイクロアレイを用いたがん細胞の遺伝子解析により多くの Oncoantigen が同定され、その成果を基に多くの Oncoantigen 由来エピトープペプチドが同定された。中でも、KIF20A (kinesin family member 20A)⁶⁾、URLC10 (LY6K; lymphocyte antigen 6 complex, locus K)⁷⁾、DEPDC1 (DEP domain containing 1)⁸⁾、RNF43 (ring-finger protein43)⁹⁾、TOMM34 (translocase of outer mitochondrial membrane 34)¹⁰⁾、MPHOSH1 (M phase phosphoprotein 1)¹¹⁾などの Oncoantigen は HLA-A24 および HLA-A2 拘束性のエピトープペプチドが次々と同定されており、様々な癌腫における臨床研究においても有望な臨床効果が得られている。

III. 腫瘍新生血管関連遺伝子由来エピトープペプチド

一方、癌免疫療法の問題点として癌の免疫逃避機構が挙げられる。すなわち、癌細胞の heterogeneity によるがん抗原及び HLA Class I の発現低下、癌の微小環境における免疫抑制因子 (Interleukin-10, transforming growth factor (TGF)- β などの免疫抑制性サイトカインや制御性 T 細胞) による抗腫瘍免疫の抑制がある。癌免疫療法の臨床応用を考えるうえで、癌の免疫逃避の克服は必須である。そこで、HLA Class I の安定した発現が期待できる腫瘍周囲の新生血管を標的とするペプチドの開発が行われた。VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) は腫瘍新生血管に高発現するため Class I の低下がなく、VEGFR に対する特異的 CTL は腫瘍新生血管を攻撃して腫瘍を兵糧攻めにする。現在、VEGFR1¹²⁾ および VEGFR2¹³⁾ に対するエピトープペプチドが同定されている。

上記のがん免疫逃避機構を克服する為、複数の Oncoantigen 由来エピトープペプチドと腫瘍新生血管関連遺伝子由来エピトープペプチドを混合したマルチペプチドカクテルワクチンが開発の主流となってきており、現在は膀胱癌、食道癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌、肝癌などで創薬化に向けた治験が行われている。こうした創薬化の研究の多くは All Japan 体制におけるアカデミアが主導しているものが多いが、胃癌のペプチドワクチン開発においては、和歌山県立医

科大学とシンガポール国立大学、韓国のヨンセイ大学による医師主導国際共同治験として開発がすすめられ、国際的な枠組みでの開発に発展している。

IV. がんペプチドワクチンアジュバント

癌の微小環境における免疫抑制を打破する為には、適切なアジュバントの開発も重要である。現在のがんペプチドワクチン開発においてはモンタナイドをアジュバントとして用いエマルジョン化してから投与するのが一般的である。一方、近年がんペプチドワクチンの効果を増強する新しいアジュバントの探索が様々に行われている。特に、パターン認識受容体アゴニストとして、Toll-like receptor (TLR) を刺激するアジュバントはがんワクチンの効果を適切に増強すると考えられ、Poly-IC (TLR3 agonist)、MPL (TLR-4 agonist)、イミキモド (TLR-7/8 agonist)、CpG-ODN (TLR-9 agonist) 等が、がんワクチンアジュバントとして開発中である。

我々は、in vitro におけるペプチド特異的 CTL の誘導において、CpG-ODN を添加することで効率よく CTL が誘導されることを基礎的検討にて明らかにし¹⁴⁾、この成果を基に進行食道癌患者に対して複数の Oncoantigen 由来エピトープペプチドと CpG-ODN をアジュバントとして併用する臨床研究を施行した¹⁵⁾。安全性を示すと共に、CpG-ODN 併用により早期から強力な特異的 CTL が誘導される傾向を認め、本治療法による全生存期間の延長が示唆されたことから CpG-ODN のがんペプチドワクチン療法におけるアジュバントとしての有用性が示唆され、今後の発展が期待される。

また、近年、抗 CTLA-4 抗体である Ipilimumab¹⁶⁾ が転移性悪性黒色腫の患者に対して承認された。Ipilimumab は T 細胞活性化経路を down-regulate する免疫チェックポイント分子である Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) を阻害することで、CTL の抗腫瘍効果を高める作用がある。さらに、同じく免疫チェックポイントを標的とする PD-1 (Programmed Cell Death-1) に対する抗体を用いた悪性黒色腫や非小細胞肺癌、腎細胞癌などに対する臨床研究においてもその有用性が示されており¹⁷⁾、作用メカニズムからがんペプチドワクチンとの併用による効果増強の可能性が期待されている。

V. がん治療用ペプチドワクチンガイダンス

さて、これまでの 20 年のがんワクチン開発に関する Translational Research を通して、がんワクチンの効果判定法についての方向性が明らかになってきた。つまり、がんワクチンの作用機序が患者自身の CTL の活性化を介しており、ワクチンによる抗原提示・抗原処理・リンパ球の活性化・がん細胞の死滅といった一連の過程には生体内で相当な時間を要することから、がんワクチン効果は、緩やかに、長期間にわたって現れる。従って、比較的速やかに効果が確認される従来の抗癌剤の評価法では、がんワクチン療法の臨床効果の評価は困難であり、がんワクチン開発における独自の評価方法が必要であると考えられる。

米国の FDA は、2011 年 11 月に「Guidance for Industry: Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines (企業向けガイダンス・がん治療用ワクチンのための臨床学的考察)」

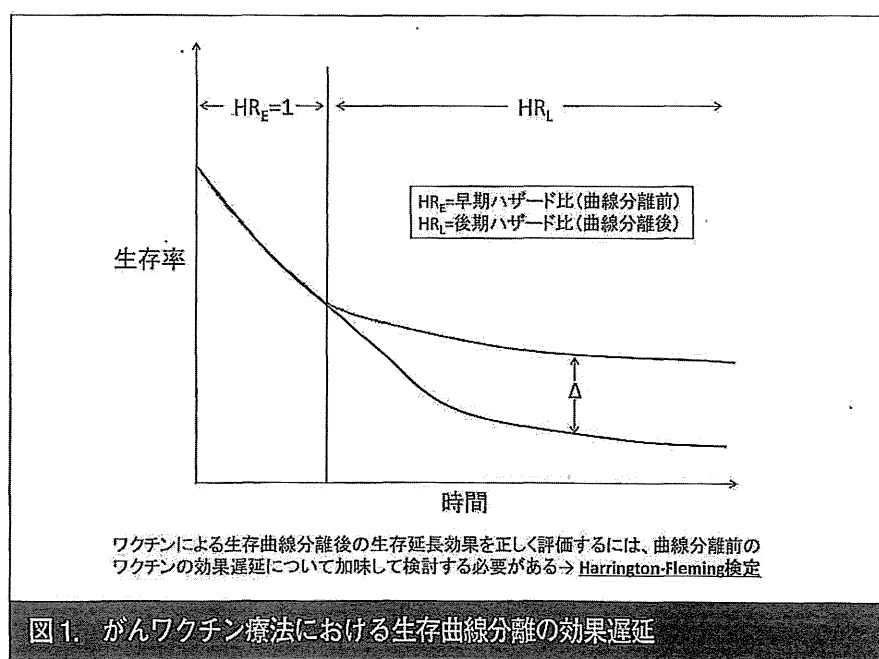
として企業向けのワクチンガイダンスを発行した (<http://www.fda.gov/downloads/Biologics-BloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM278673.pdf>)。この中でFDAは、がんワクチンの開発において従来の細胞傷害性薬剤や生物製剤の開発とは異なった臨床試験デザインを考慮する必要がある、と明記している。

一方、FDAによるガイダンスが発行された後においても日本にはがんワクチン治療薬に関するガイダンス・ガイドラインが存在せず、ワクチン新薬開発に関する正当な評価が出来ない状況であった。そこで我々は日本バイオセラピー学会主導で、日本におけるがんワクチン領域の新薬開発の考え方を示し、その創薬を活性化すべく、わが国独自のガイダンスを作製した。このガイダンスはFDAのガイダンスと異なり、日本において現在創薬化に最も近い段階の研究がおこなわれているがんペプチドワクチンに特化したガイダンスとなっている。2011年11月に原案が作成されパブリックコメントを受けた後、2012年12月に「がん治療用ペプチドワクチンガイダンス」として発行された (<http://jsbt.org/guidance>)。

バイオセラピー学会ガイダンスにおいても、FDAのガイダンス同様にごがんペプチドワクチンの免疫系を介した遅発性効果を考慮し、適切な対象を選択すること、長期にわたる継続的投与による腫瘍縮小にとらわれない生命予後を主目的とした研究デザインを立案すること、遅発性効果を解析可能な科学的手法で評価することなどを推奨している。

VI. Harrington-Fleming 検定

バイオセラピー学会ガイダンスでは、検証試験における有効性の効果判定に用いる統計学的解析について特に踏み込んで記載している。Kaplan-Meier法により算出した生存割合の解析



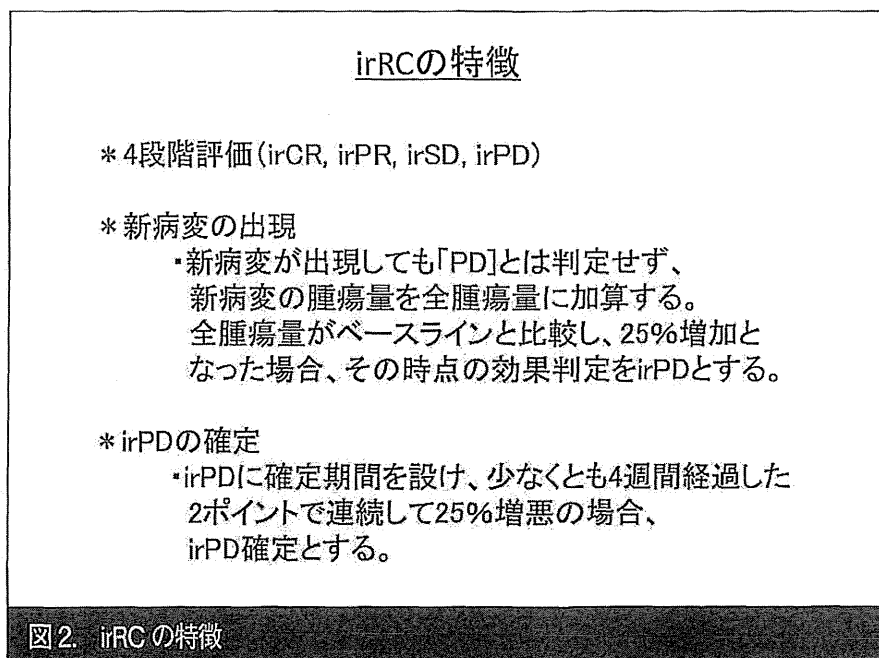
Kaplan-Meier法により算出した生存割合の解析において一般に用いられるのは、ハザード比が一定であることを想定したLog-rank検定であるが、がんペプチドワクチンでは遅発性の効果を想定し、観察期間後期に重みを置くHarrington-Fleming検定が必要と考えられる。

において一般に用いられるのは、ハザード比が一定であることを想定した Log-rank 検定であるが、がんペプチドワクチンでは遅発性の効果を想定し、観察期間後期に重みを置く Harrington-Fleming 検定¹⁸⁾の必要性について触れられている (図1)。

実際、これまでに報告されているがんワクチンの生存における効果は、ワクチン投与開始の最初の3~6ヵ月では差がなく、その後徐々に生存曲線の分離が起こっているものが多い³⁾⁴⁾⁵⁾。日本初のがんワクチンにおける Pivotal study となった PEGASUS-PC Study (進行膵癌に対するゲムシタビン併用ペプチドワクチン療法の第Ⅱ/Ⅲ相治験)において、Harrington-Fleming 法を初めて統計学的解析法に採用したことに引き続き、現在施行中の様々な Pivotal study において Primary endpoint の統計学的解析方法として選択されている。

VII. irRC (Immuné-related Response Criteria)

FDA ガイダンスにおいてもバイオセラピー学会ガイダンスにおいても、前述のようにがんワクチンの遅発性の効果について強調されている。これは、一般に抗癌剤の臨床的有用性を予見する為の代替評価項目として腫瘍縮小の評価に用いられる RECIST (Response evaluation criteria in solid tumours) ガイドラインが、がんワクチンの効果判定法として必ずしも適さないことを示している。つまり、RECIST では一旦病勢が悪化するとその後抗腫瘍反応がみられても病勢進行 (PD) と評価され、ワクチン治療でしばしば認められる遅発性の効果については評価されないのである。そこで、がんワクチン療法の臨床効果評価における PD 基準をより緩和した基準として irRC が提唱された¹⁹⁾。irRC は、WHO の基準をもとに、がんワクチン投与後の腫瘍特異的な CTL が誘導されるまでの猶予期間などを考慮して修正されている (図2)。ただし、irRC が生存延長の surrogate marker になるかについては、今後の臨床研究を通して irRC による効果判定と生存の相関関係に関する評価を継続し、有用性に関するエビデンスを構築していくことが肝要である。



VIII. 免疫反応モニタリング

がんワクチンの作用機序として癌抗原特異的免疫反応を惹起することで抗腫瘍活性を引き起こすと考えられることから、がんワクチンの薬力学的解析として免疫反応をモニタリングすることは極めて重要である。バイオセラピー学会ガイダンスでは、がんペプチドワクチンのモニタリングアッセイ法として、がんペプチドワクチンに対する Delayed type-hypersensitivity(DTH)反応(皮膚反応)、ペプチド特異的細胞傷害試験、ペプチド特異的 IFN- γ ELISPOT アッセイ、ペプチド特異的マルチマーフローサイトメトリー等が推奨される、と明記している。前述の PEGASUS-PC Study は、切除不能進行膵臓癌又は再発膵臓癌の患者 153 例を対象に、VEGFR2 由来のエピトープペプチド：エルパモチドとゲムシタピン併用投与群(実薬群)の安全性及び有効性を確認する目的で、プラセボ(偽薬)とゲムシタピンの投与群(プラセボ群)を対照として行った多施設共同の第 II/III 相二重盲検比較試験である。我々はこの PEGASUS-PC Study を施行する根拠となった第 I 相試験を施行したが²⁰⁾、この試験ではペプチドワクチンの注射部位反応が抗腫瘍効果および生存期間延長と相関することが示され(図 3)、皮膚反応と ELISPOT による免疫モニタリングの結果を指標として検証試験のワクチン投与量を決定した。そして、2013 年 1 月の ASCO-GI で報告した検証試験としての PEGASUS-PC Study の結果は、主要評価項目である全生存期間では実薬群とプラセボ群で統計学的有意差は認められなかったものの、注射部位反応によるサブグループ解析を行ったところ、強い皮膚反応(潰瘍)が認められた患者については、生存期間が延長している傾向があることが明らかとなった。特に、注射部位の潰瘍は実薬群においてのみ認められた事象であり、ワクチンにより誘導された特異的 CTL により引き起こされた事象と考えられた。さらに、注射部位反応の有無と生存期間には

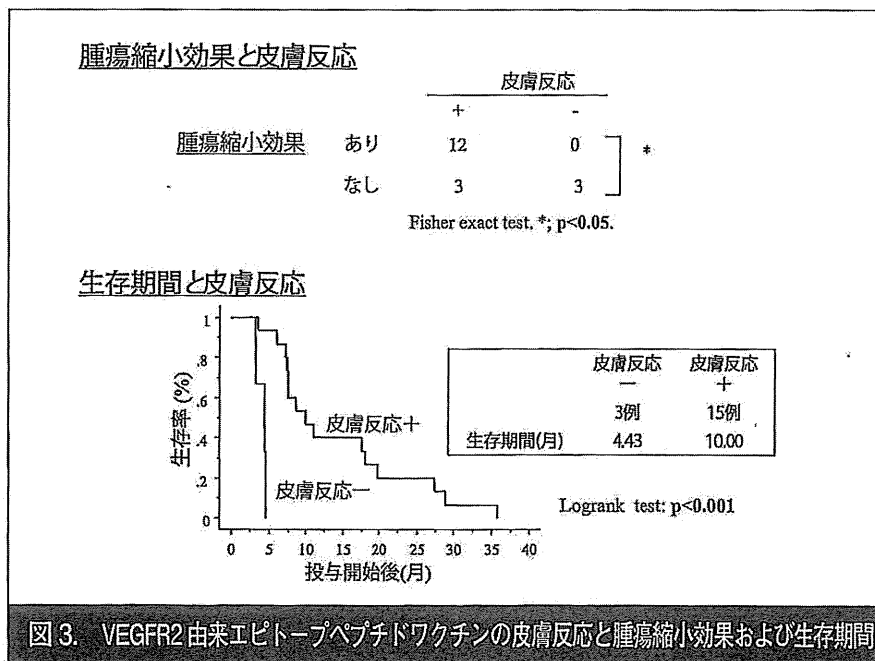


図 3. VEGFR2 由来エピトープペプチドワクチンの皮膚反応と腫瘍縮小効果および生存期間

ペプチドワクチンによる腫瘍縮小効果および生存期間の延長と投与部位の皮膚反応は、正の相関を認めた。

強い相関が認められ、ワクチン投与部位の皮膚反応は、ワクチン投与による生存期間延長の surrogate marker となりうる可能性が示唆された。現在は膀胱癌術後補助療法として複数のペプチドワクチンのカクテル製剤に Gemcitabine を併用した医師主導治験を多施設共同で実施しており（平成 23・24・25 年度厚労科研【難病・癌等の疾患分野の医療の実用化研究事業】研究代表者：和歌山県立医科大学外科学第 2 講座山上裕機）、その結果が期待される。また、今後このような臨床研究を進めていく中で、様々なモニタリングアッセイ法の標準化および結果の再現性についてのバリデーションを確実にを行い、がんペプチドワクチン療法の効果が最も期待できる患者群を探索することも重要である。

おわりに

近年のがんペプチドワクチン療法開発の現状と、臨床試験の推進により明らかになってきた、がんワクチンの抗癌剤治療とは異なる作用機序を考慮した開発の方向性について概説した。がんペプチドワクチン療法は創薬化に向けた最終段階にあるが、さらなる発展には、適切なペプチドの開発と選択、免疫逃避機構を打破するアジュバント等の開発、サロゲートマーカーの開発による適切な対象の選択などが重要であり、今後の更なる基礎研究、臨床研究の推進が必要である。

■ References ■

1. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P et al: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254(5038): 1643-1647, 1991.
2. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10(9): 909-915, 2004.
3. Vansteenkiste J, Zielinski M, Dahabre J et al: Multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy of recombinant MAGE-A3 vaccine as adjuvant therapy in stage I B/II MAGE-A3-positive, completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 24(18S): 7019, 2006
4. Holmes JP, Gates JD, Benavides LC et al: Optimal dose and schedule of an HER-2/neu (E75) peptide vaccine to prevent breast cancer recurrence: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group - 14 - Study I-01 and I-02. *Cancer* 113(7): 1666-1675, 2008
5. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND et al: Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363(5): 411-422, 2010
6. Osawa R, Tsunoda T, Yoshimura S et al: Identification of HLA-A24-restricted novel T Cell epitope peptides derived from P-cadherin and kinesin family member 20A. *J Biomed Biotechnol* 2012:848042, 2012
7. Suda T, Tsunoda T, Daigo Y et al: Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy. *Cancer Science* 98(11):1803-1808, 2007
8. Kanehira M, Harada Y, Takata R et al: Involvement of upregulation of DEPDC1 (DEP domain containing 1) in bladder carcinogenesis. *Oncogene* 26(44):6448-55, 2007
9. Uchida N, Tsunoda T, Wada S et al: Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 10(24):8577-8586, 2004
10. Shimokawa T, Matsushima S, Tsunoda T et al: Identification of TOMM34, which shows elevated expression

- in the majority of human colon cancers, as a novel drug target. *Int J Oncol* 29(2):381-6, 2006
11. Kanehira M, Katagiri T, Shimo A et al: Oncogenic role of MPHOSPH1, a cancer-testis antigen specific to human bladder cancer. *Cancer Res* 67(7):3276-85, 2007
 12. Ishizaki H, Tsunoda T, Wada S et al: Inhibition of tumor growth with antiangiogenic cancer vaccine using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 1. *Clin Cancer Res* 12(19):5841-5849, 2006
 13. Wada S, Tsunoda T, Baba T et al: Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Res* 65(11):4939-4946, 2005
 14. Katsuda M, Iwahashi M, Matsuda K et al: Comparison of different classes of CpG-ODN in augmenting the generation of human epitope peptide-specific CTLs. *Int J Oncol* 39(5):1295-302, 2011
 15. Iwahashi M, Katsuda M, Nakamori M et al: Vaccination with peptides derived from cancer-testis antigens in combination with CpG-7909 elicits strong specific CD8+ T cell response in patients with metastatic esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 101(12):2510-7, 2010
 16. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al: Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-23, 2010
 17. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366(26):2443-54, 2012
 18. Zucker DM, Yang S: Inference for a family of survival models encompassing the proportional hazards and proportional odds models. *Stat Med* 25(6):995-1014, 2006
 19. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S et al: Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin cancer Res* 15(23): 7412-20, 2009
 20. Miyazawa M, Ohsawa R, Tsunoda T et al: Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Sci* 101(2):433-9, 2010