

MHC (HLA)	Epitope peptide	Position	References
Class I			
A*0101	EVDPASNTY	169-177	Kobayashi, 2003
A*0201	GVYDGREHTV	230-239	Duffour, 1999
A*2402	NYKRCPVI	143-151	Miyahara, 2005 Ottaviani, 2006
B*3701	SESLKMIF	156-163	Zhang, 2002
B*4002	WEELGVMGV	223-231	Naota, 2006
Class II			
DPB1*0501	AETSYVKVLE HVVVRNARVR	280-299	Ohguri, 2009
DPB1*0901	VRVNRVRIAY	292-302	Naota, not published
DRB1*0403	EHVVRNARVRIAYP	289-303	Hirayama, not published
DRB1*0803	EHVVRNARVRIAYP	289-303	Hirayama, not published
DRB1*0901	IFGKASESLKM	151-161	Naota, not published
DRB1*1403	AETSYVKVLE HVVVRNARVR	280-299	Ohguri, 2009

表 2. これまでに報告されている MAGE-A4 エピトープ

として MAGE-A4 特異的な免疫反応誘導能、臨床効果について検証した。MAGE-A4 の発現評価は MCV-1 抗体を 1 次抗体として用いて免疫染色を施行した。

III. 結果

III-1 患者背景

登録患者 22 名の原疾患は大腸癌 13 例、乳癌 3 例、胆道癌 2 例、食道癌、膵癌、乳頭部癌、悪性中皮腫各 1 例であり、年齢中央値は 63 歳(34-79 歳)。全例で切除検体または生検検体での MAGE-A4 抗原発現が確認された。

III-2 ワクチン投与による有害事象の評価

第 1 相試験での CHP-MAGE-A4 用量増加投与 (Group1:CHP-MAGE-A4 100ug, Group2: CHP-MAGE-A4 300ug, Group3:CHP-MAGE-A4 300ug+ピシバニール 0.5KE)では、いずれも Grade3(CTCAE ver.3)以上の有害事象を認めなかった。また第 1 相部分のワクチン投与用量増加により早期より特異的免疫反応が誘導される傾向を認めたことから、至適投与用量を CHP-MAGE-A4:300ug+ピシバニール 0.5KE とし第 2 相部分の同一投与量による特異的免疫反応誘導能の評価に移行した。

III-3 ワクチン投与症例における MAGE-A4 抗原特異的免疫反応の解析

臨床研究期間中に 6 回の同一ワクチン投与 (CHP-MAGE-A4: 300ug+ピシバニール 0.5KE) を完遂し得た症例 12 例を特異的免疫誘導の解析対象とした。内訳は、男性 10 例、女性 2 例。年齢中央値 63 歳。疾患内訳は大腸癌 7 例、胆道癌 2 例、膵癌 1 例、乳癌 1 例、悪性中皮腫 1 例。RECIST 分類による臨床効果は SD 7 例、PD 5 例であった。12 例中 11 例で MAGE-A4 特異的 IgG サブクラス (IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) のいずれかの陽転化が認められ、特異的免疫反応が誘導されたと考えられた。MAGE-A4 特異的 IgG 及び IgG サブ

3 進行・再発癌に対する新規癌ワクチン CHP-MAGE-A4 の臨床応用と特異的免疫反応の解析

クラスの抗体価はワクチン接種回数を経るとともに有意に増加したが、患者予後とは相関しなかった。また、MAGE-A3、NY-ESO-1 抗原の発現と抗体反応の推移も同時に検証し、CHP-MAGE-A4 の投与によりこれらの癌抗原に対する抗体反応も誘導されていた。

IV. がんワクチン投与後の抗原特異的抗体価上昇の意義

T. Boon (4)らにより癌抗原が発見されて以降、担癌宿主内での腫瘍に対する免疫反応の推移や癌ワクチン投与による特異的免疫反応の誘導が研究され、同時に施行されてきた臨床研究の結果と相まってその安全性や有効性についての知見が集積されてきている⁵⁾。我々が施行した CHP-MAGE-A4 に関する研究では第 1 相部分でその安全性が確認され、また容量増加試験の結果から至適投与量として CHP-MAGE-A4: 300ug+ピシバニール 0.5KE であることが示された。引き続き行われた第 2 相部分の結果からワクチン投与を受けた生体内では高率に MAGE-A4 特異的な抗体反応が生じていること、さらに MAGE-A3, NY-ESO-1 など他の癌精巢抗原に対する抗体反応も出現することがわかった。このような液性免疫の誘導³⁾や antigen spreading(6)は NY-ESO1 や HER2 など他のがんワクチン臨床試験でも報告されており、特異抗原を用いたがんワクチン投与により抗原特異的免疫反応が高率に誘導されると考えられる。しかしながら、このように生体内で腫瘍特異的免疫反応が誘導されるにもかかわらずがんワクチン単独では有意な臨床効果が得られるまでには至っていない。この理由としては HLA-class I down regulation による腫瘍の免疫逃避機構⁷⁾や MDSC、Treg などの抑制性細胞の存在などが知られている。一方で、今回の登録症例の中でも MAGE-A4 特異的抗体価の上昇とともに約 5 か月間の長期 S D が得られた症例も実際に存在し、またがんワクチンが無再発生存期間や全生存期間の延長に寄与するとする報告もあり、今後はこのようながんワクチン反応例を予測するバイオマーカーの検索により適格症例を選択する試み⁸⁾や、より強力な免疫反応を誘導するアジュバントの開発と検証が必要であると考えられる⁹⁾。

おわりに

メラノーマに対して骨髄抑制をきたすような前治療を加えたうえでの養子免疫治療の良好な治療成績や(10)、PD-1 抗体をはじめとする checkpoint block 製剤の認可と臨床導入など¹¹⁾、ここ数年で免疫治療は格段に進歩している。がんワクチンとこれらの抗原特異的リンパ球治療や PD-1 製剤と併用することで治療成績の上乗せ効果が期待できるとする報告もあり¹²⁾、これからは製剤自体の工夫はもとより、どんな免疫治療を(がんワクチン、特異的リンパ球など)、どのような適格症例に(バイオマーカーによる患者選択)、いつ導入するか(術前 or 術後補助療法)、そしてどのように投与するのか(化学放射線療法や CTLA-4 阻害薬などと併用して)を組み合わせた集学的な治療が必要であると考えられる。

■ References ■

1. Gu XG, Schmitt M, Hiasa A, et al: A novel hydrophobized polysaccharide/oncoprotein complex vaccine induces in vitro and in vivo cellular and humoral immune responses against HER2-expressing murine sarco-

- mas.Cancer Res 58: 3385-90, 1998
2. Kageyama S, Wada H, Muro K, et al: Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients. *J Transl Med.*2013;doi: 10.1186/1479-5876-11-246.
 3. Aoki M, Ueda S, Nishikawa H, et al: Antibody responses against NY-ESO-1 and HER2 antigens in patients vaccinated with combinations of cholesteryl pullulan (CHP)-NY-ESO-1 and CHP-HER2 with OK-432. *Vaccine* 2009: doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.018.
 4. 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: 1643-7.1991
 5. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines.*Nat Med.* 10:909-15.2004
 6. von Boehmer L, Mattle M, Bode P, et al: NY-ESO-1-specific immunological pressure and escape in a patient with metastatic melanoma.*Cancer Immun* 13: 2013.
 7. Chang CC, Campoli M, Ferrone S.:HLA class I defects in malignant lesions: what have we learned-.*Keio J Med.* 52:220-9.2003
 8. Yoshida K, Noguchi M, Mine T, et al:Characteristics of severe adverse events after peptide vaccination for advanced cancer patients: Analysis of 500 cases. *Oncology Reports.* 25:57-62.2011.
 9. Kawakami Y: Cancer treatment by comprehensive regulation of anti-tumor immune network. *Nihon Rinsho.* 68:1094-9. 2010
 10. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA.: Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response.*Nat Rev Immunol.* 12:269-81. 2012
 11. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR: Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med.* 366: 2443-2454.2012
 12. Yuan J, Ginsberg B, Page D, et al: CTLA-4 blockade increases antigen-specific CD8(+) T cells in prevaccinated patients with melanoma: three cases.*Cancer Immunol Immunother.* 60:1137-46. 2011

[Doctoral Treatise]**Association of NY-ESO-1 expression with T cell infiltration in the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma and survival****Yoshihiro MURAKAMI**

Department of Gastroenterological Surgery II
Hokkaido University Graduate School of Medicine
Sapporo 060-8638, Japan
[Director: Prof. Satoshi Hirano]

Introduction

Esophageal carcinoma remains a disease with poor prognosis. Advances in surgical techniques and perioperative management have improved survival to some extent. The overall 5-year survival rate, however, generally remains less than 50%, even with the use of multimodality therapy [1-3]. Therefore, a novel therapeutic modality is needed, and cancer vaccination is an excellent candidate[4].

A number of human tumor antigens have been identified since the MAGE-A antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) was first identified in malignant melanoma [5][6]. Among these antigens, the cancer/testis antigens (CTAs) have received particular attention as potential vaccine targets because of their unique tissue expression. NY-ESO-1 was originally discovered in esophageal carcinoma [7] and is frequently expressed in a variety of cancers but not normal adult tissues except testis [8]. Spontaneous humoral and cellular immune responses against NY-ESO-1 can occur in patients with NY-ESO-1 positive tumors [8]. NY-ESO-1 mRNA and protein expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) has been found in 32% of patients, with 13% having NY-ESO-1 antibody production [9]. A correlation between the level of NY-ESO-1 mRNA expression and the degree of immunohistochemistry positivity has been confirmed, and the prognosis of patients with NY-ESO-1 positive tumors is better

compared with those with NY-ESO-1 negative tumors [10]. Furthermore, clinical trials of cancer vaccination against NY-ESO-1 have been performed for patients with advanced tumors, and NY-ESO-1 specific immune responses have been confirmed. However, only a few patients have shown objective responses such as tumor regression [11-13], and the trials have so far been disappointing [14][15].

We previously reported that infiltration of tumor-infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (TILs) into tumors caused a favorable prognosis in 122 patients with ESCC [16]. In the present study, we have established standardized diagnostic methods to evaluate NY-ESO-1 expression in ESCC. Immunohistochemical analysis was then performed in the same cohort of 122 surgical specimens reported previously, and correlations with clinical and histopathologic factors were assessed. In particular, we examined the correlation between CD4⁺ or CD8⁺ T cell infiltration and NY-ESO-1 expression in the tumor microenvironment of ESCC. Thus, we have obtained beneficial information to develop a strategy for cancer vaccination.

Materials and Methods**1. Cell lines and culture conditions**

Human esophageal squamous cell carcinoma cell lines TE2, TE5, TE8, TE10 and TE13 were generously provided by Dr. Nishihira T (University of Tohoku,

Japan). HEC46 was provided by Dr. Toge T (University of Hiroshima, Japan), and SGF7 was provided by Dr. Saito T (Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan). The human embryonic kidney cell line HEK293 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA), TE2, TE5, TE8, TE10, TE13, and HEC46 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Sigma-Aldrich Co., Ltd., Irvine, CA) with 10% fetal bovine serum (FBS), and 1% penicillin/streptomycin (p/s). SGF7 cells were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich Co., Ltd.) with 10% FBS and 1% p/s. All cell lines were maintained in a humidified incubator with 5% CO₂ in air at 37°C.

2. Mice and tumor xenograft models

CB17/SCID mice were obtained from Charles River Japan (Yokohama, Japan). All mice were female and were used at 4–6 weeks of age. Esophageal cell lines (5 × 10⁶) were subcutaneously injected in a volume of 100 µl PBS into the left flank region of each CB17/SCID mouse. When tumor diameter exceeded 10 mm, mice were sacrificed and tumors were separated into 2 blocks; one block was frozen using liquid nitrogen to extract mRNA for RT-PCR, and the other was immersed in formalin for immunohistochemical analysis. TE8 and HEC46 tumors could be established but the other lines could not.

3. Tissue samples

Tumor and normal tissue samples were snap-frozen and stored at –80°C. The samples were obtained in 2002 from resections directly after surgery. Five-micrometer frozen sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) to verify ESCC and approximately 100 mm³ (100 mg) of the tumor block was processed for RNA extraction using the TRIZOL Reagent (GIBCO BRL, Grand Island, NY). As biopsy specimens, 1-mm³ (1 mg) frozen sections were processed for RNA extraction.

4. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total cellular RNA was isolated with the TRIZOL Reagent (GIBCO BRL) from each cell line. Each 20-µl cDNA synthesis reaction contained 1 µg of total RNA, 1 × First Strand Buffer (GIBCO BRL); 50 mM Tris-HCL, pH 8.3, 75 mM KCL, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 200 units of

SUPERSCRIPT II (GIBCO BRL), 10 mM dithiothreitol, and 0.5 µg oligo (dT) (GIBCO BRL). The reverse transcription (RT) reaction was carried out for 50 min at 42°C and inactivated by heating at 70°C for 15 min. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was performed as described previously [17]. Briefly, each 25-µl reaction contained 1 µl of RT reaction products, 1 unit of Taq-Gold DNA polymerase (Boehringer, Mannheim, Germany), 1 × PCR buffer (Boehringer), 160 mM of each deoxynucleotide, and 20 pmol of each 3' and 5' primer specific for NY-ESO-1 (sense, 5'-CAGGGCTGAATGGATGCTGCAGA-3'; antisense 5'-GCGCCTCTGCCCTGAGGGAGG-3'), GAPDH (sense, 5'-ACCCCTTCA TTGACCTCAACT-3'; antisense 5'-TGAGTCCTTCCACGATACCAA-3').

NY-ESO-1 and GAPDH cDNA were amplified for 35 cycles. Conditions for NY-ESO-1 PCR were 95°C for 1 min, 62°C for 1 min, then 72°C for 1 min. Conditions for GAPDH PCR were 94°C for 30 sec, 51°C for 30 sec, then 72°C for 30 sec. All PCR products were electrophoresed in a 2.0% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Human testis cDNA was used as a positive control.

5. Real-time quantitative PCR assay

A reaction mixture containing 250 ng TaqMan probe, 25 µg qPCR Mastermix Plus (Eurogentec, Liege, Belgium), and cDNA in a total reaction volume of 50 µl was prepared. After enzyme activation for 10 min at 95°C, 50 two-step cycles were performed (20 sec at 95°C and 60 sec at 64°C) by an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster, CA). Primers and TaqMan probe were designed as follows: NY-ESO-1-forward, 5'-GGCTGAATGGATGCTGCAGA-3'; NY-ESO-1-reverse, 5'-CTGGAGACAGGAGCTGATGGA-3'; and TaqMan probe, 5'-FAM-TGTGTCCGGCAACATACTGACTATCCGA-TAMRA-3'. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was measured by GAPDH genomic control (Eurogentec) for normalization. To transform the cycle threshold (Ct) values into absolute mRNA copy numbers, we used a dilution series of linearized plasmid containing the NY-ESO1 insert and constructed a calibration curve. Wells with no template were used for negative control.

6. Patients and esophageal specimens for immunohistochemistry

Surgical specimens from 122 patients who had undergone radical esophagectomy were included in the current study, and findings were referred to the patients' clinical records. To assess the correlation between NY-ESO-1 expression and immune response of the host, the same cohort as reported previously [16] was used. All informed consent processes for this study were conducted in accordance with the guidelines of the Hokkaido University Institutional Review Board.

7. Antibodies

Mouse monoclonal antibody (mAb) against NY-ESO-1 protein (clone E978) was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Clone E978 (IgG1) was generated against a 23 kD NY-ESO-1 recombinant protein and specifically detects NY-ESO-1 as described previously [7]. The human CD4-specific mAb [Histofine CD4 mouse immunoglobulin (Ig)G1 mAb], the human CD8-specific mAb (Histofine CD8 mouse IgG1k mAb) were purchased from Nichirei Corporation (Tokyo, Japan) and the human NK cell-specific mAb (Leu 7) were purchased from Becton Dickinson Immunocytometry System (San Jose, CA, USA).

8. Immunohistochemical staining

Immunohistochemical reactions were carried out using the streptavidin-biotin-peroxidase method. The staining methods for CD4, CD8 and NK cell have been described previously [16]. In the case of staining with E978, paraffin-embedded sections were stained with 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ E978 at a 1:500 dilution in PBS. Each sections were deparaffinized in xylene, washed in PBS (pH 7.4), and rehydrated in a graded series of ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked by a 10-min incubation with 3% hydrogen peroxide in methanol. After washing in PBS, specimens were saturated with 10% normal goat serum (Histofine SAB-PO kit; Nichirei Corp., Tokyo, Japan) for 5 min and then incubated at room temperature for 30 min with primary antibody. After washing in PBS, a biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin antibody (Histofine SAB-PO kit; Nichirei Corp.) was applied for 60 min at room temperature. Immunohistochemical reactions were visualized with

freshly prepared 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Histofine SAB-PO kit; Nichirei Corp.). Slides were counterstained with hematoxylin and mounted on coverslips. The negative reagent control for NY-ESO-1 consisted of serial tissue sections of each sample, in which isotype-matched negative control mouse IgG1 was used as a primary antibody. A positive or negative tissue control for NY-ESO-1 is described later. The number of stained cells was determined under a microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) in three visual fields, at 200 \times magnification. When more than 1% of the cytoplasm of all the tumor cell population were stained, the tumor was considered NY-ESO-1 positive. The current study was performed in a retrospective manner, while all specimens were evaluated by three investigators who were blinded to the patients' clinical information.

9. Evaluation and classification of CD4⁺ T Cells, CD8⁺ T cells, and NK cells

The immunostained sections were evaluated under a microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Immunohistochemistry and evaluation of immune cells were done according to the previous reports of Naito *et al.* [18] and Schumacher *et al.* [19], with some modifications. The degree of immune cell infiltration was observed in more than 10 independent high-power ($\times 200$) microscopic fields for each tissue sample. The five areas with the most abundant distribution were selected. The number of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and NK cells was counted both in the mesenchymal stroma and within the cancer cell nest. In the present study, the threshold values used to demarcate group boundaries were selected such that each group contained equal numbers of patients.

10. Statistical analysis

Either the chi-square test or extended Fisher's exact test were used to analyze the correlation between NY-ESO-1 expression and patients' parameters, including histopathological findings. The Mann-Whitney U test was used for statistical significance between the number of immune cells divided on the basis of NY-ESO-1 expression. The Kaplan-Meier method was used to generate survival curves, and survival differences were analyzed with the log-rank test, based

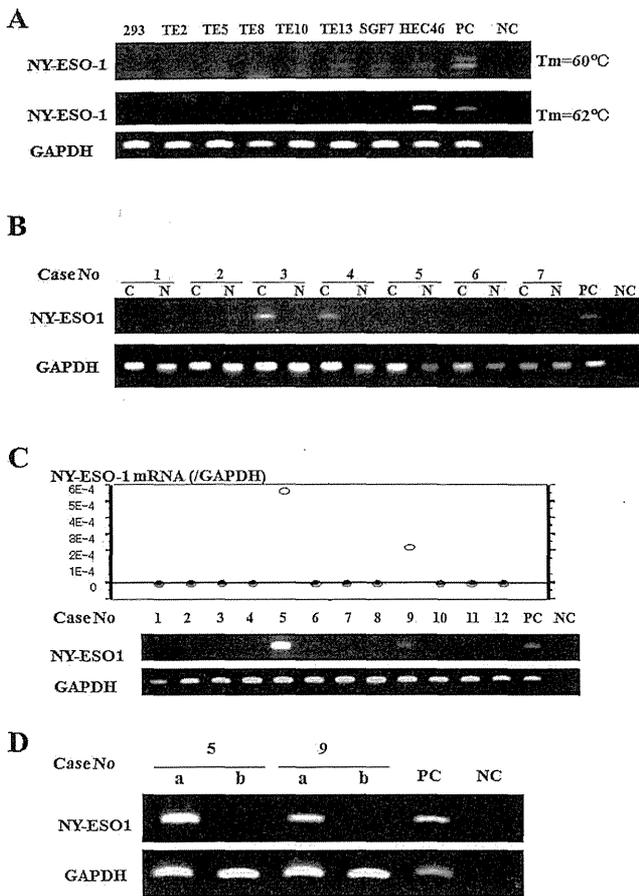


Fig. 1 A) RT-PCR analysis of NY-ESO-1 mRNA expression in human HEK293 cell and ESCC cell lines. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the control. Only HEC46 cells express NY-ESO-1 mRNA. B) RT-PCR analysis of NY-ESO-1 expression in six different samples of normal esophageal mucosa (N), tumor tissues (C), and positive control are shown. C) Real-time-PCR analysis of NY-ESO-1 expression levels in twelve different samples of esophageal tumor tissues are shown. D) RT-PCR analysis of NY-ESO-1 expression in two different samples of esophageal tumor tissues, from which 0.1 g of the tumor block (a) or biopsy specimen (b), and positive control are shown.

on the status of NY-ESO-1 expression. Univariate and multivariate analyses of NY-ESO-1 immunoreactivity and clinicopathological features were performed using the Cox proportional hazard regression model. Probability values of less than 0.05 were regarded as indicating significance. These analyses, except the extended Fisher's exact test, were performed using statistical analysis software (Statview J version 5.0; SAS Institute Inc., Cary, NC), and free software from a website (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/exact.html>) was used for the extended Fisher's exact test.

Results

1. Expression of NY-ESO-1 in ESCC cell lines

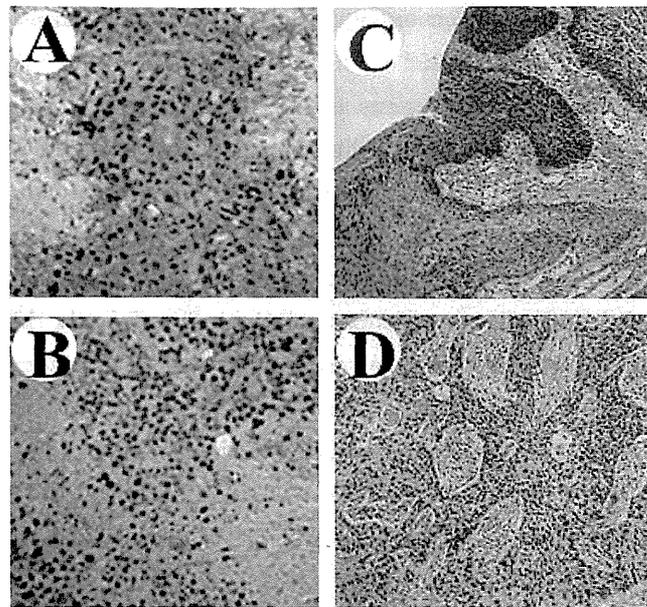


Fig. 2 Immunohistochemical staining for NY-ESO-1 of xenograft tumors and human ESCC samples using E978 antibody. A) HEC46 xenograft tumor from SCID mice. B) TE8 xenograft tumor. C) A case with 5% of cancer cell cytoplasm stained. D) No cancer cells stained.

NY-ESO-1 RT-PCR fragments were amplified using mRNA of HEC46 but not of the other 7 cell lines (Fig. 1A). Nonspecific bands were observed under the condition of Tm 60°C, but they disappeared at Tm 62°C. Hereafter, HEC46 cell line was utilized as NY-ESO-1 positive control.

Table 1. Relationship between clinicopathologic features and NY-ESO-1 expression in surgical specimens of ESCC

variables		Number of cases	NY-ESO-1		p-value
			negative (n=100)	positive (n=22)	
Gender	male	105	88	17	0.1891
	female	17	12	5	
Age	≥60	79	60	19	0.0252*
	<60	43	40	3	
p-stage	I	38	30	8	0.9200*
	II	36	29	7	
	III	27	23	4	
	IV	21	18	3	
Grade	1	32	27	5	0.3885*
	2	62	48	14	
	3	28	25	3	
p-T	1	54	41	13	0.3547*
	2	13	10	3	
	3	43	38	5	
	4	12	11	1	
p-N	N0	60	50	10	0.6994
	N1	62	50	12	
p-M	M0	101	82	18	0.6235*
	M1	21	19	3	
TIL	CD4/8(+/+)	44	30	14	0.0029
	Others	78	70	8	

* Extended Fisher's Exact Test

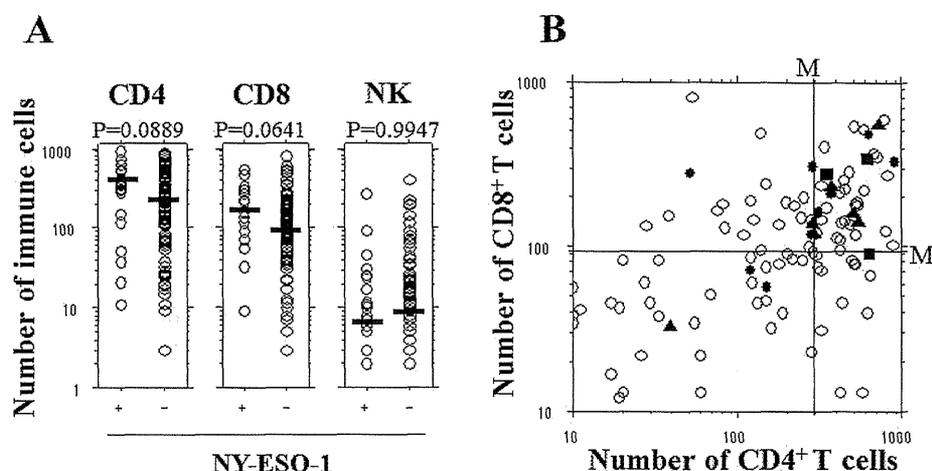


Fig. 3 Correlation between NY-ESO-1 expression and the number of TILs in patients with ESCC. **A)** Comparison of the number of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells divided on the basis of NY-ESO-1 expression. The p-values were calculated by Mann-Whitney U test. The bars show the median number of each TIL. **B)** Correlation among the number of CD4⁺/CD8⁺ T cells and NY-ESO-1 expression in patients with ESCC. Open circles: NY-ESO-1 negative patients; filled circles: 0 < NY-ESO-1 positive cells ≤ 10%; filled triangles: 10% < NY-ESO-1 positive cells ≤ 50%; filled squares: 50% < NY-ESO-1 positive cells ≤ 100%. M: median. Higher frequency of NY-ESO-1 positive patients was observed in the CD4/CD8(+ / +) group ($p=0.0029$; chi-square test).

2. RT-PCR of NY-ESO-1 in human tissues

In esophageal sample tissues, NY-ESO-1 RT-PCR fragments were amplified from 10 out of 42 tumor tissues, but not from any normal esophageal mucosa (Fig. 1B).

In the Q-PCR assay, mRNA of NY-ESO-1 was detected from NY-ESO-1 positive cases in the RT-PCR assay, but not from NY-ESO-1 negative cases (Fig. 1C). NY-ESO-1 RT-PCR fragments were not amplified in any biopsy specimens even if the samples were from NY-ESO-1 positive patients (Fig. 1D).

3. NY-ESO-1 expression in xenografts

By the present method, both HEC46 and TE8 tumors obtained from SCID mice showed nuclear staining (Fig. 2A, B). As cytoplasmic staining was observed in HEC46 (Fig. 2A) but not TE8 (Fig. 2B), we defined cytoplasmic staining as a positive control for NY-ESO-1 immunoreactivity.

4. Immunohistochemical analysis in human tissues

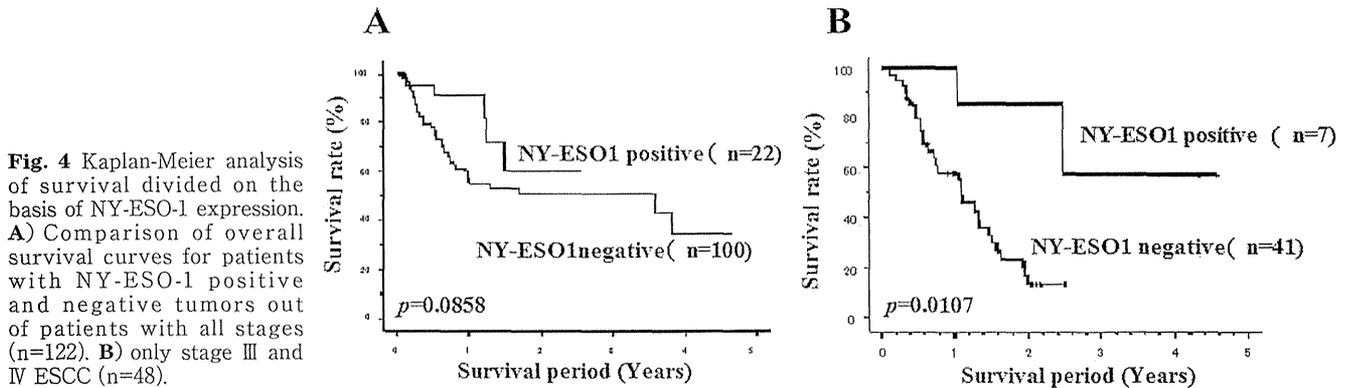
We subsequently performed immunohistochemical analysis on the 122 ESCC specimens. NY-ESO-1 immunoreactivity was observed in the cancer cell cytoplasm, as seen in a previous study [10]. Tumor cells of 22 patients (18.0%) were categorized as positively stained for NY-ESO-1 (Fig. 2C) and 100 patients (82.0%) were negatively stained (Fig. 2D). Nuclear staining was observed in all patients (Fig. 2C, D). In about half of patients expressing the NY-ESO-1 antigen,

immunohistochemistry stained less than 10% of tumor cells. Dysplasia was found in 45 of 122 specimens; however, NY-ESO-1 expression was not observed in any samples (data not shown).

5. Statistical analyses for NY-ESO-1 expression and clinicopathological data

Correlations between NY-ESO-1 expression and various clinicopathological features are summarized in Table 1. NY-ESO-1 expression was found to correlate with age ($p=0.0252$). However, no significant correlation was found between NY-ESO-1 expression, gender, pathological data on T classification, N classification, M classification, p-stage grouping, or histopathological grading. The numbers of tumor-infiltrating CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and natural killer (NK) cells divided on the basis of NY-ESO-1 expression were plotted on a scatter plot graph (Fig. 3A). Although no significant correlation was observed between NK cells and NY-ESO-1 expression ($p=0.9947$), CD4⁺ T cells ($p=0.0889$) and CD8⁺ T cells ($p=0.0641$) tended to be increased in NY-ESO-1 positive patients. The numbers of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were plotted, and the distribution from NY-ESO-1 positive patients is shown as filled marks in Fig. 3B. A higher frequency of NY-ESO-1 expression was found in the CD4/8(+ / +) group and a significant correlation was observed ($p=0.0029$) by chi-square test.

A tendency for favorable prognosis was found in



NY-ESO-1 positive patients compared to NY-ESO-1 negative patients ($p=0.0858$, Fig. 4A). Among stage III or IV disease patients, the overall survival rate was significantly better in patients with NY-ESO-1 positive tumors than in those with NY-ESO-1 negative tumors ($p=0.0107$, Fig. 4B). Univariate analysis using the Cox proportional hazard model identified NY-ESO-1 expression ($p=0.0212$) and the status of CD4/8 ($p=0.0028$) as prognostic predictors. Multivariate analysis indicated that NY-ESO-1 expression ($p=0.0058$) and CD4/8 status ($p=0.0399$) were independent prognostic factors in patients with stage III or IV ESCC (Table 2).

Discussion

In planning clinical trials of cancer vaccines against NY-ESO-1 expressing tumors, standardization of diagnostic modality for gene expression is critical for finding suitable patients. We initially confirmed the suitability of RT-PCR as a diagnostic for NY-ESO-1

expression in ESCC cell lines and in samples resected from patients.

In the present study, nonspecific bands were observed at the theoretical T_m as reported previously [10], but only specific bands remained when the T_m was raised. In comparing RT-PCR and Q-PCR, we found that the sensitivity of RT-PCR is suitable to detect the expression of NY-ESO-1 when sufficient mRNA is obtained for RT-PCR performed under a condition of higher T_m . We adopted a higher T_m and confirmed that NY-ESO-1 is expressed specifically in tumor cells and that its frequency is consistent with previous data [10].

The detection of NY-ESO-1 mRNA from biopsy samples would be useful for selecting patients with unresectable tumors to enter clinical trials for a cancer vaccine. The present data, however, suggest that this is not the case, since only a small quantity of NY-ESO-1 mRNA, which is less than 0.1% of beta-actin mRNA could be obtained from the samples, meaning that most NY-ESO-1 mRNA from a biopsy specimen would be lost through the process of RNA extraction. Interestingly, we could not always detect NY-ESO-1 expression by RT-PCR using biopsy specimens from a HEC46 xenograft tumor; such tumors seldom have heterogeneity in contrast to the human tumor tissues, so this is best explained by the reason mentioned above. The other reason is apparent from our immunohistochemical data.

We evaluated the legitimacy of the detection of NY-ESO-1 expression and confirmed the consistency of RT-PCR with immunohistochemistry. We found that the E978 antibody works high specificity and that the results of immunohistochemistry reflect those of RT-PCR.

Table 2. Univariate and multivariate analysis of NY-ESO-1 and pathologic parameters in patients with stage III or IV ESCC (n=48).

Variabes	Hazard ratio	p-value
Univariate		
Sex (male/female)	5.356	0.0933
Age (≥ 60 y/ <60 y)	0.757	0.4572
Grade (2/3/1)	1.004	0.9945
PT (2/4/1)	2.217	0.2779
pN (1/0)	4.711	0.1284
pM (1/0)	0.988	0.9740
Adjuvant therapy (no/yes)	1.957	0.0648
Performance status (1,2/0)	1.536	0.4325
CD4/8 [CD4/8(+/+)/others]	0.196	0.0028
NY-ESO-1 (+/-)	0.178	0.0212
Multivariate		
CD4/8 [CD4/8(+/+)/others]	0.213	0.0058
NY-ESO-1 (+/-)	0.197	0.0399

In the HEC46 xenograft tumor, since a necrotic region did not show staining for NY-ESO-1, we could not detect NY-ESO-1 expression by RT-PCR using a biopsy specimen from the necrotic area. However, we could detect it by RT-PCR using mRNA derived from paraffin embedded sections that were confirmed to contain viable tumor cells. Therefore, the extraction of sufficient mRNA from viable and NY-ESO-1 expressing regions would be critical for correct diagnosis. Heterogeneity was always seen in NY-ESO-1 expression, the same as in many other genes in tumors resected from ESCC patients. Several previous studies [10][20] have shown that RT-PCR results do not always accord with those of immunohistochemistry, and authors speculate that heterogeneity causes the inconsistency. In the present study, it was strongly shown that one of the reasons for this contradiction is heterogeneity. Although RT-PCR is a useful and sensitive modality to diagnose NY-ESO-1 expression, the ability of detection depends on several factors such as the quantity of mRNA, the size of the specimen, and the viability of tumors. Biopsy sized specimens could be utilized for detecting NY-ESO-1 expression after overcoming several problems described above and obtaining stable and consistent data. Therefore, we should adopt immunohistochemistry for detecting NY-ESO-1 expression using HEC46 as a tissue positive control while referring to data from RT-PCR. HEC46 xenografts from SCID mice could be used as a positive control for NY-ESO-1 immunohistochemistry and TE8 used as a tissue negative control. Xenografts of cancer cell lines would be better controls because the staining intensity of NY-ESO-1 using testis varied in each patient's sample, but the intensity using HEC46 is stable.

Finally, we assessed the significance of NY-ESO-1 expression and antitumor immunoresponse of the host by immunohistochemistry in the same cohort as that used in a previous report that clarified the significance of infiltrating CD4 or CD8 positive T lymphocytes [16]. From this, we obtained good information for planning immunotherapy. In this cohort of 122 patients, the frequency of NY-ESO-1 expression was almost the same as in a previous study [10]. Even for NY-ESO-1

positive cases, the ratio of cells expressing NY-ESO-1 was several percent in about half of cases. Interestingly, most NY-ESO-1 positive cases belonged to the CD4/8(+ / +) group, which did not depend on the ratio of NY-ESO-1 positive cells. These results suggest that host antitumor immunity might recognize NY-ESO-1 expression even in a few cells, and moreover, it could improve postoperative prognosis of the patients. Besides, we should also take into consideration about the tumor-antigen diversity other than NY-ESO-1 antigen [21]. Moreover, various types of immune cells take part in the host immune balance between immune promoting status and immune regulatory status [22–24].

Our previous study showed that the prognosis of ESCC patients with CD4/8(+ / +) status is remarkably better than that of other patients [14]. Therefore, antitumor immunity is obviously an important factor. Moreover, this is critical for advanced ESCC patients because all long-term survivors belonged to CD4/8(+ / +) group and no long-term survivors were seen in other groups. It was previously reported that patients with NY-ESO-1 positive tumors survived longer; however, the mechanism was still unclear [10]. Our data support the previous report and demonstrate for the first time that there is a correlation between NY-ESO-1 expression and CD4⁺ or CD8⁺ T cell infiltration. In the present study, significant differences between survival curves show that antitumor immunity is more critical especially in advanced cases than in earlier cases. Interestingly, there was no significant difference in tumor progression between the CD4/8(+ / +) group and the other groups in this cohort. Therefore, we should pay attention to the fact that antitumor immunity neither always has sufficient effect to suppress tumor growth nor improve patient prognosis if the tumor has already grown significantly [25]. However, this also means that the immune effect improves prognosis most strongly after tumor resection even if the tumor stage is III or IV. These data strongly suggest that immunotherapy against cancer, such as a cancer vaccine, should be applied as an adjuvant therapy to patients who undergo surgical operations and who have few residual tumors.

Conclusions

NY-ESO-1 expression should be detected by using immunohistochemistry with suitable positive or negative controls. In patients with ESCC, NY-ESO-1 might be recognized by the immune system of the host and the best response of antitumor immunity is shown after resection. Therefore, a cancer vaccine applied to ESCC patients as a post-operative adjuvant therapy, if NY-ESO-1 expression is adequately detected using resected tumors, should improve prognosis dramatically.

Acknowledgments

We appreciate professor Satoshi Hirano, M.D., Ph.D. (Department of Gastroenterological Surgery II, Division of Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine) for the guidance and mentorship of this research.

We also thank Dr. Satoshi Kondo and Dr. Masaki Miyamoto (Department of Gastroenterological Surgery II, Division of Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine) for the extremely high contribution to this research, and thank Dr. Hiroaki Ikeda, Dr. Tomoo Ito for the advices and technical assistances to this research. And the author special thanks to Dr. Takahiro Tsuchikawa. Without his support, submission of this manuscript would not have been reality.

We thank Hikaru Shida, Rika Shirakawa and Akiko Yagi for their technical support in immunohistochemical analyses. The author also thank the many physicians who cared for these patients at the affiliated hospital's Department of Surgical Oncology. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from Japan Society for the Promotion of Science.

References

- Ando N, Iizuka T, Kakegawa T, Isono K, Watanabe H, Ide H, Tanaka O, Sinoda M, Takiyama W, Arimori M, Ishida K, Tsugane S. A randomized trial of surgery with and without chemotherapy for localized squamous carcinoma of the thoracic esophagus: the Japan Clinical Oncology Group Study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; **114**: 205–209.
- Ando N, Ozawa S, Kitagawa Y, Shinozawa Y, Kitajima M. Improvement in the results of surgical treatment of advanced squamous esophageal carcinoma during 15 consecutive years. *Ann Surg* 2000; **232**: 225–232.
- Collard JM, Otte JB, Fiasso R, Laterre PF, De Kock M, Longueville J, Glineur D, Romagnoli R, Reynaert M, Kestens PJ. Skeletonizing en bloc esophagectomy for cancer. *Ann Surg* 2001; **234**: 25–32.
- Karbach J, Neumann A, Brand K, Wahle C, Siegel E, Maeurer M, Ritter E, Tsuji T, Gnjatic S, Old LJ, Ritter G, Jager E. Phase I Clinical Trial of Mixed Bacterial Vaccine (Coley's Toxins) in Patients with NY-ESO-1 Expressing Cancers: Immunological Effects and Clinical Activity. *Clinical Cancer Res* 2012; **18**: 5449–5459.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; **254**: 1643–1647.
- Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ohta N, Old L, Boon T. Transfection and expression of gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 1992; **35**: 145–152.
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 1914–1918.
- Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004; **4**: 1–15.
- Akakanat A, Kanda T, Koyama Y, Watanabe M, Kimura E, Yoshida Y, Komukai S, Nakagawa S, Odani S, Fujii H, Hatakeyama K. NY-ESO-1 expression and its serum immunoreactivity in esophageal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; **54**: 95–100.
- Fujita S, Wada H, Jungbluth AA, Sato S, Nakata T, Noguchi Y, Doki Y, Yasui M, Sugita Y, Yasuda T, Yano M, Ono T, Chen YT, Higashiyama M, Gnjatic S, Old LJ, Nakayama E, Monden M. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in esophageal cancer. *Clinical Cancer Res* 2004; **10**: 6551–6558.
- Jger E, Karbach J, Gnjatic S, Neumann A, Bender A, Valmori D, Ayyoub M, Ritter E, Ritter G, Jger D, Panicali D, Hoffman E, Pan L, Oettgen H, Old LJ, Knuth A. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**: 14453–14458.
- Uenaka A, Wada H, Isobe M, Saika T, Tsuji K, Sato E, Sato S, Noguchi Y, Kawabata R, Yasuda T, Doki Y, Kumon H, Iwatsuki K, Shiku H, Monden M, Jungbluth AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Nakayama E. T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immunity* 2007; **7**: 9–21.
- Tsuji K, Hamada T, Uenaka A, Wada H, Sato E, Isobe M, Asagoe K, Yamasaki O, Shiku H, Ritter G, Murphy R, Hoffman EW, Old LJ, Nakayama E, Iwatsuki K. Induction of immune response against NY-ESO-1 by CHP-NY-ESO-1 vaccination and immune regulation in a melanoma patient. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57**: 1429–1437.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; **10**: 909–915.
- Muranski P, Boni A, Wrzesinski C, Citrin DE, Rosenberg SA, Childs R, Restifo NP. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy—how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol* 2006; **3**: 668–681.
- Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, Hida Y, Oshikiri T, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Murakami S, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD4⁺ and CD8⁺ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 1555–1559.
- Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the “primer-dropping” method. *Anal Biochem* 1994; **223**: 251–258.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, and Ohtani H. CD8⁺T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; **58**: 3491–3494.

- 19 Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001; **61**: 3932–3936.
- 20 Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the “primer-dropping” method. *Anal Biochem* 1994; **223**: 251–258.
- 21 Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int J Oncol* 2006; **28**: 1089–1098.
- 22 Kawada J, Wada H, Isobe M, Gnjjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Okazaki N, Uneaka A, Nakamura Y, Fujiwara S, Mizuno N, Saika T, Ritter E, Yamasaki M, Miyata H, Ritter G, Murphy R, Venhaus R, Pan L, Old LJ, Doki Y, Nakayama E. Heteroclitic serological response in esophageal and prostate cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int J Cancer* 2012; **130**: 584–592.
- 23 Yoshioka T, Miyamoto M, Cho Y, Ishikawa K, Tsuchikawa T, Kadoya M, Li L, Mishra R, Ichinokawa K, Syoji Y, Matsumura Y, Shichinohe T, Hirano S, Shinohara T, Ito T, Kondo S. Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2008; **98**: 1258–1263.
- 24 Tsuchikawa T, Ikeda H, Cho Y, Miyamoto M, Shichinohe T, Hirano S, Kondo S. Association of CD8+ T cell infiltration in oesophageal carcinoma lesions with human leucocyte antigen (HLA) class I antigen expression and survival. *Clin Exp Immunol* 2011; **164**: 50–56.
- 25 Enomoto K, Sho M, Wakatsuki K, Takayama T, Matsumoto S, Nakamura S, Akahori T, Tanaka T, Migita K, Ito M, Nakajima Y. Prognostic importance of tumour-infiltrating memory T cells in oesophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 2012; **168**: 186–191.
- 26 Wada H, Sato E, Uenaka A, Isobe M, Kawabata R, Nakamura Y, Iwae S, Yonezawa K, Miyata H, Doki Y, Shiku H, Jungbluth AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman EW, Old LJ, Monden M, Nakayama E. Analysis of peripheral and local anti-tumor immune response in esophageal cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int J Cancer* 2008; **123**: 2362–2369.

【第92回 北海道医学大会総会トピックス】

膵・胆道癌治療の新たな展開—非手術療法後のAdjuvant surgery—

平野 聡

北海道大学大学院医学研究科 消化器外科学分野Ⅱ 教授

Novel development in multimodal therapy for advanced pancreatic and biliary cancer: Adjuvant surgery for initially unresectable lesion

Satoshi HIRANO

Gastroenterological Surgery II
Hokkaido University Graduate School of Medicine
Sapporo 060-8638, Japan

要 旨

教室ではこれまで、診断時に非切除と判断された膵癌・胆道癌に対する集学的治療の一環として、化学(放射線)療法などの非手術治療が奏効した症例に限って手術を行い、その後さらに非手術療法を継続するいわゆる adjuvant surgery を提唱してきた。これまで22症例を対象として本法を行ったが、それらの手術後の3年全生存率は57%で、生存期間中央値(MST)は48ヶ月と良好な結果であった。

はじめに

膵癌、胆道癌は消化器癌の中でも予後不良な疾患であり、切除不能例の予後は極めて不良である。たとえ化学療法など非手術療法が施行されても生存期間中央値はそれぞれ6ヶ月[1]、8ヶ月[2]程度であり、長期生存は極めてまれである。ところが、最近の化学療法あるいは化学放射線療法の進歩により、それらの治療が奏効した症例に対して手術治療を追加するいわゆる adjuvant surgery を行って良好な結果が得られたという報告が散見されるようになった[3][4]。今回、膵・胆道癌に対する新たな治療戦略の一つとして期待される adjuvant surgery について、これまでの自験例の成績を紹介する。

I. 対象と方法

2005年1月から2011年8月までの間に切除不能と診断され、化学(放射線)療法を施行した症例のうち、それらの

治療が奏効した後に根治切除を施行した膵・胆道癌22症例を対象とした。

化学療法は原則として6か月以上行い、最終的に stable disease (SD) 以上の効果を維持している症例に対して根治手術の可能性を検討した。手術は①診断時に腫瘍が存在していた部位は非手術治療で画像上消失したように見えても切除範囲に含め、②R0手術を達成するため血管合併切除・再建を積極的に行い、③肝転移巣は画像等で確認できる場合のみ切除する、の3項目を遵守して行った。

II. 結果

1. 患者背景(表1)

全症例の年齢中央値は53歳で、男女比は10:12であった。疾患の内訳は膵癌14例、胆道癌8例で、それぞれの発生部位に特徴はなかった。診断時の非切除因子は局所過進展例が10例(主要血管(神経叢)浸潤8例、門脈内腫瘍栓1例、胆管癌の広範囲進展1例)であり、遠隔転移例は12例(肝転移8例、傍大動脈リンパ節転移4例)と、差はなかった。また、これらの非切除因子が重複した症例はなかった。

2. 術前治療(表2)

術前治療期間の中央値は5.5(5-44)ヶ月で、治療の最終効果は partial remission (PR) が12例、SDが10例であった。投与方法は静注化学療法が11例と最も多く、放射線療法併用療法が7例であった。使用薬剤はGEM単剤が5例、

表1. 患者背景 (n=22)

年齢中央値(歳)	55 (43-75)		
性別(男性/女性)	10/12		
疾患	膵癌		胆道癌
	膵頭部	5例	肝内胆管 3例
	膵体部	6例	胆嚢 2例
	膵尾部	3例	肝外胆管 2例
	乳頭部	1例	
非切除因子	局所進行	遠隔転移	
	主要血管(神経叢)浸潤	8例	肝転移 8例
	門脈内腫瘍栓	1例	PALN転移 4例
	広範囲進展	1例	

PALN: paraaortic lymph node

GEMを基本とした多剤併用療法は15例であり、GEMを使用していなかったのは2症例のみであった。

3. 施行術式と術後短期成績(表3)

膵癌に対する術式では亜全胃温存膵頭十二指腸切除術(Subtotal stomach preserving pancreatoduodenectomy; SSPPD)5例、腹腔動脈合併尾側膵切除術(Distal pancreatectomy with celiac axis resection: DP-CAR)5例、同じく腹腔動脈合併膵全摘術(Total pancreatectomy with celiac axis resection: TP-CAR)1例など、高度侵襲手術が14例中11例を占めた。また、胆道癌に対してもSSPPDに肝切除を付加した術式(前区域切除1例、部分切除1例)や肝右葉・尾状葉・胆管切除2例など、通常の初回手術と同様の定型切除を行った。全体で腹腔動脈合併切除6例を含めた動脈合併切除を7例に、門脈合併切除を10例に施行した。全体で血管合併切除を併施したものは12例(55%)に達した。

合併症は11例(50%)に発生したが、化学療法が原因と思われるものはなく、入院期間の中央値は25日(17-64)で術後在院死亡例はなかった。

4. 病理組織学的検索

病病理組織学的に腫瘍細胞の50%以上の変性・壊死を認

表2. 術前治療 (n=22)

術前治療期間中央値	5.5ヶ月		
最終効果(PR/SD)	12/10		
投与方法	Regimen		
静注化学療法	11例	GEM	5例
動注化学療法	4例	GEM+TS-1	9例
化学放射線療法	7例	GEM+5FU	4例
		GEM+TS-1+CDDP	1例
		GEM+CDDP	1例
		5FU+CDDP	1例

GEM: gemcitabine, TS-1: ティーエスワン™, CDDP: cisplatin

表3. 施行術式と周術期成績 (n=22)

膵癌		胆道癌	
SSPPD	5例	SSPPD	3例(2例は+肝切)
DP-CAR	5例	肝拡大右葉切除	2例
TP-CAR	1例	拡大胆摘	1例
DP	3例	肝部分切除+胆管切除	1例
		姑息的胆管切除	1例
合併症* (11例50%)			
膵液瘻	5例		
創感染	3例		
血栓症	3例		
高ビリルビン血症	1例		
腹腔内膿瘍	1例		
カテーテル感染	1例		

* 重複あり、SSPPD: 亜全胃温存膵頭十二指腸切除術、DP-CAR: 腹腔動脈合併尾側膵切除、TP-CAR: 腹腔動脈合併膵全摘術、DP: 尾側膵切除術

めたものは9例(41%)であった。切除標本上、組織学的に癌の遺残を認めないR0手術が16例(73%)に行われ、組織学的に癌遺残ありとするR1が4例、肉眼的に癌が遺残したと判断されたR2手術は高度進展例と腹膜転移例が各1例ずつ、合計2例あった。

5. 遠隔成績

全症例のadjuvant surgery後の3年全生存率は57%で、生存期間中央値(MST)は48ヶ月(観察期間の中央値は27ヶ月)と良好な結果であった。疾患別の3年全生存率、MSTは膵癌、胆道癌でそれぞれ50%、44ヶ月、62%、48ヶ月であった。初回治療からの観察期間の中央値は49ヶ月で、全症例の5年全生存率は53%でMSTは62ヶ月(図1)、疾患別の5年生存率は膵癌、胆道癌でそれぞれ61%、44%とかなり良好であり、疾患による生存率の差はなかった。

観察期間中の再発を12例に認めたが、肝転移再発が7例(全例、術前に肝転移を有した症例)と最多であった。肝再発7例とそれ以外の再発5例の診断時期はそれぞれ術後131日、512日(中央値)であり、症例数が限られるため統計学的には有意差を認めないものの、肝再発は他の再発より早期に発生する可能性を示唆した。

III. 考察

従来、切除不能膵・胆道癌のMSTはそれぞれ6ヶ月[1]、12ヶ月[2]程度と極めて不良であった。しかし、近年、膵・胆道癌領域における化学療法を中心とした非手術療法の進歩により、たとえ切除不能とされた症例でもそれらの治療に反応し、これまでの切除不能例の予後をはるかに越えた長期にわたり進行がなく、あるいは腫瘍や転移巣の画像上

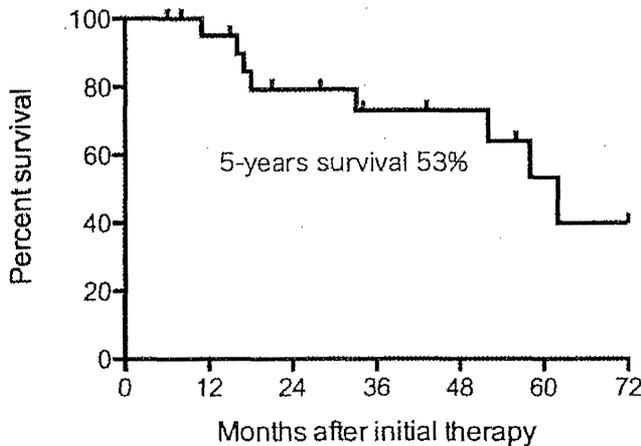


図1. 全症例の全生存曲線. 初回治療からの全症例の5年全生存率は53%でMSTは62ヶ月であった.

の縮小や消失を認める症例に遭遇するようになってきた。我々はこのような非手術療法が奏功した症例に対して根治的手術療法を行い、その後に非手術治療（化学療法）を継続するという治療法を試みてきた。この場合の手術は一連の集学的治療の中に組み込まれた治療の一つであるとの認識から、いわゆるadjuvant surgeryであると定義した[3]。

これまで非手術療法が奏効したと判定する期間を約6ヶ月とし、なおかつR0手術が可能と判断した場合にadjuvant surgeryを施行してきた。その結果、初回治療からの5年全生存率が53%と良好な成績が得られたが、これは非手術療法に対するsuper responderを選択しているという特殊性があり、他の治療成績と単純に比較することは困難である。ただし、一般的に非切除症例では5年以上の生存の可能性はほぼゼロである[1]ことを考えると、adjuvant surgeryによって予後が上乘せされる一群が確実に存在することを意味している。一方で、肝転移再発例に代表される術後早期の再発例も存在している。この事実は、病変の画像上の変化のみで手術適応を決定とすることの困難性を示すものであるとともに、手術侵襲による免疫能の低下や術後合併症による化学療法導入の遅延が早期再発の誘引になっている可能性などが問題点としてあげられる。その点からも、今後も個々の症例について慎重に手術適応を検討していく必要がある。さらには、6ヶ月の非手術療法期間、すなわちadjuvant surgery施行までの期間が果たして適正であるのか、切除術を併施せずに非手術治療のみを行った場合との長期成績の比較など、前向き試験による検討が必要である。

実際に化学療法など非手術療法がかなり奏功した場合でも、組織学的にviableな癌細胞が遺残し、また、一部の症例では癌細胞の集塊が散在性に存在していた（データ非掲載）。現在のmodalityではviableな癌細胞の有無やその分布を術前診断することは困難であるため、高いR0切除率を確保するためには、たとえ画像上病変の縮小が起こっていても、もとの腫瘍存在範囲を全て切除するべきと考える。進行した膵癌・胆道癌では腫瘍の神経浸潤が著明であるため、動脈そのものに腫瘍浸潤がなくとも、腫瘍に接する動脈の周囲神経叢には高率に浸潤が及んでいる。従って、手術は積極的に血管合併切除・再建を行う拡大切除となることが多い。前述のごとく手術侵襲が過大であれば早期の再発を惹起する可能性も考慮し、拡大切除を必要とする場合には症例をより厳選して行うか、患者の状態次第では手術を回避するなどの柔軟な姿勢で臨むべきと考えられる。

IV. まとめ

診断時切除不能とされた膵・胆道癌に対して化学（放射線）療法などの非手術療法を施行し、6ヶ月を超えてSD以上の効果を維持していれば、adjuvant surgeryを行うことによって予後延長効果が期待される。本治療法は未だpreliminaryな段階であり、今後、切除のタイミング、症例の選択、適正な術式の選択など解決すべき課題は多いものの、これまで治療効果が限定的であった膵・胆道の切除不能進行癌に対する新たな治療戦略となり得ると考えられた。

文 献

- 1 江川新一, 当間宏樹, 大東弘明, 奥坂拓志, 中尾昭公, 羽鳥 隆, 真口宏介, 柳澤昭夫, 田中雅夫, 日本膵臓学会膵癌登録委員会. 膵癌登録報告2007ダイジェスト. 膵臓 2008; 23: 105-123.
- 2 Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Yoshidome H, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Kimura F, Miyazaki M. Surgical resection after downsizing chemotherapy for initially unresectable locally advanced biliary tract cancer: a retrospective single-center study. Ann Surg Oncol 2013; 20: 318-324.
- 3 Kato K, Kondo S, Hirano S, Tanaka E, Shichinohe T, Tsuchikawa T, Matsumoto J. Adjuvant surgical therapy for patients with initially unresectable pancreatic cancer with long-term favorable responses to chemotherapy. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2011; 18: 712-716.
- 4 Gruenberger B, Schueller J, Heubrandtner U, Wrba F, Tamandl D, Kaczirek K, Roka R, Freimann-Pircher S, Gruenberger T. Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study. Lancet Oncol 2010; 11: 1142-1148.

肝門部胆管癌に対する門脈分岐部切除を伴う 肝右葉・尾状葉・胆管切除術

Right hemihepatectomy, caudate lobectomy, and extrahepatic bile duct resection combined with resection of portal bifurcation for hilar cholangiocarcinoma

平野 聡
Satoshi Hirano
加藤健太郎
Kenjiro Kato

田中 栄一
Eiichi Tanaka
海老原裕磨
Yuma Ebihara

土川 貴裕
Takahiro Tsuchikawa
中村 透
Toru Nakamura

松本 譲
Joe Matsumoto
七戸 俊明
Toshiaki Shichinohe

■北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野II

(イラスト/レオン佐久間)

● key words : 肝門部胆管癌, 肝右葉切除, 尾状葉切除, 門脈合併切除

□ はじめに

肝門部胆管癌の外科手術は広範囲肝切除を伴う手術の積極的施行により、切除率の向上が得られてきている¹⁾。従来は閉塞性黄疸に伴う肝予備能の低下から術後肝不全による死亡率が高かったが、最近の術前減黄管理の進歩や経皮的門脈塞栓術²⁾の導入により、その安全性も格段に向上した。

胆管癌は胆管に対する水平および垂直の2方向への進展が特徴であり、切除断端を癌陰性にするためにはこれら両方向性の進展に対処しなくてはならない。すなわち、肝側胆管は確実に「胆管分離限界点」³⁾で切除すべきであり、十二指腸側も病変の進展によっては深く臍内胆管まで追求して切除する技術が必要である。他方、垂直方向へ進展する癌を一括切除するためには積極的な血管合併切除が必要なことも多い。

これらの術式決定に際しては十分な術前診断が必須であるが、疾患の性質上、その診断精度は必ずしも高くないことから、根治切除率を高めるためには術前に病変の進展範囲を過小評価している可能性があること

を常に念頭におきながら手術に臨むべきである。

本稿では、肝門部胆管癌に対する術式の選択について述べるとともに、代表的手術である門脈分岐部切除を伴う肝右葉・尾状葉・胆管切除術について適応、周術期管理、手技の実際を解説する。

Ⅰ 術式の選択

解剖学的に左右肝管合流部は肝十二指腸間膜の右上部、すなわち右葉 Glisson の根部に位置し、肝左葉 Glisson 根部（門脈臍部の基部）とは離れて存在する。そのため肝門部胆管と周囲組織を en bloc に切除するためには、肝右葉切除を行うことが左葉切除を行うより有利であることが術後成績からも示唆されている⁴⁾。また、右肝動脈は胆管の背側を近接して走行するが、浸潤癌が肝動脈に接して存在する場合はその動脈周囲神経叢に perineural invasion が起こっている可能性が高いが、右側肝葉切除時には右肝動脈は分岐部のわずかな剝離・露出のみで切除が可能である⁵⁾。したがって、腫瘍が左肝管に優位な場合は左からの切除が望ましいが、それ以外は右からの

肝切除を第一選択とすべきである。

各種の肝切除術において Glisson 鞘内で胆管と動脈・門脈を分離できる固有の限界点（胆管分離限界点）は定まっており、この点が胆管を切除できるもつとも上流側である³⁾（図1）。表層拡大進展例⁶⁾に限らず、術前の胆管水平方向の進展度診断の精度は十分であるとはいえず、また、肝切除中に Glisson の外から胆管の切離位置を正確にコントロールすることは困難であることから、胆管肝側断端の癌陰性率を上げるためには常に「分離限界点」で切離すべきである³⁾。術中の胆管切離断端の迅速組織診の結果で切離位置を評価する施設も多いが、断端の組織診が癌陽性であった場合はすでに癌に切り込んでいることにはほかならないため、可能な限り上流側胆管で切離して、その機会は最小限にすべきである。

胆管は肝門部において門脈と近接して走行し、組織学的に浸潤のない場合でも癌と門脈外膜との距離は平均0.4mmにすぎないとされる⁶⁾。しかもこの間には反応性の線維化が起こっており、正確に剝離層を追求することは困難である。したがって、門脈剝離時にわずかでも周囲組織と

1

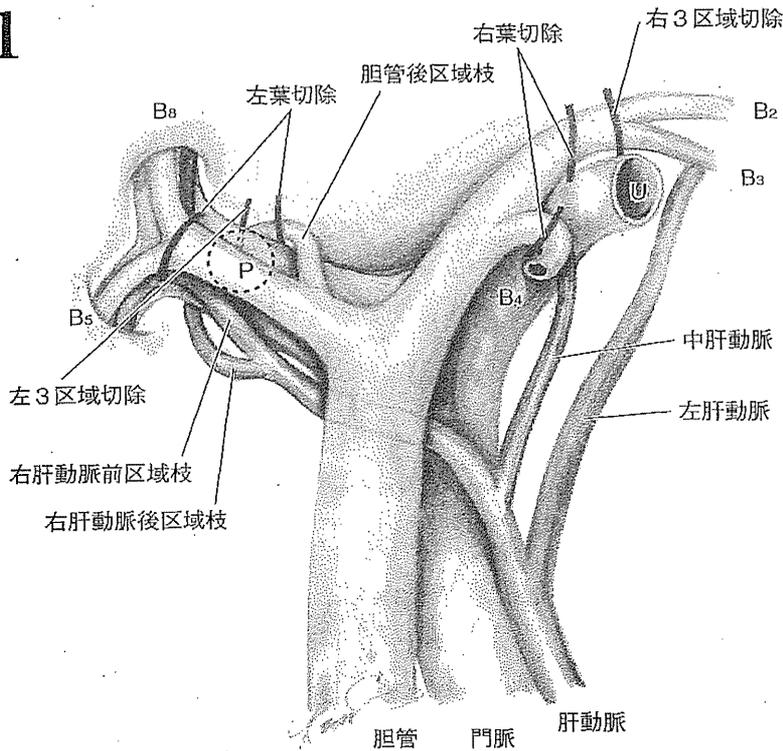


図1 各種肝切除術における胆管分離限界点

2

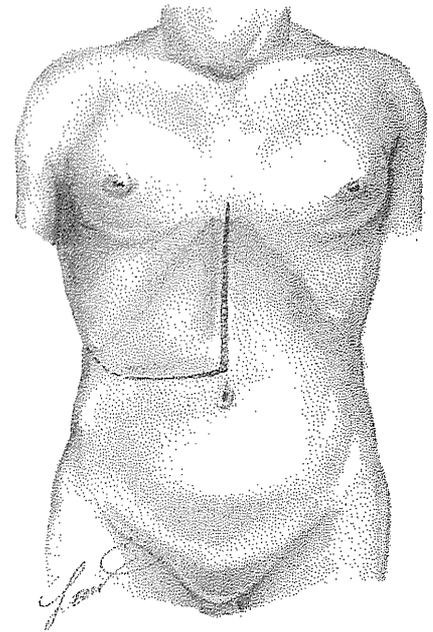


図2 皮膚切開

剣状突起下から臍上部までの正中切開に右横切開を加えた逆L字型の皮膚切開で開腹する。必要な場合、右上背側方向に延長し、肋間に切り込むとより良好な視野が得られる

の間に癒着を認めた場合は門脈の合併切除・再建を考慮すべきである⁷⁾。門脈合併切除を肝切除、胆管切離後に行おうとすると、胆管分離限界点の位置まで動脈・門脈を胆管から十分遊離することは技術的に困難であるため、門脈の合併切除・再建は肝切除に先行して行うべきである⁷⁾。

II 術前準備

1. 減黄処置

術前黄疸例はT. Bil値が2mg/dl以下となるまで十分に減黄を行う。ドレナージは温存側である左葉を選択的にドレナージするのみでよい。ドレナージ法としては、最近では門脈損傷や胆汁漏出に起因する腹膜播種の危険がある経皮経肝の胆道ドレナージ(PTBD)に代わって、内視鏡的経鼻胆道ドレナージ(ENBD)

が一般的になってきた。ただし、非ドレナージ領域に閉塞性胆管炎が起こった場合、重篤化させないためには準緊急的に追加ドレナージが必須である⁸⁾。また、右3区域切除が必要となるかどうかの進展度診断をENBDチューブ造影で正確に行う必要がある。

2. 術前門脈塞栓術

黄疸肝に対して右葉切除以上の切除を予定する場合は経皮経肝の門脈右枝塞栓術を行い、残肝機能を増強する。経皮的塞栓が困難である場合は、開腹下に回結腸静脈経由に門脈塞栓を行う。

III 手術手技

手術はおおよそ、①Kocher授動、②肝十二指腸間膜の郭清、③尾状

葉・肝右葉の授動、右肝静脈切離、④肝切離、胆管切離、⑤標本を摘出して胆道再建の順に進む。

1. 開腹、チューブマネジメント

剣状突起下から臍上部までの正中切開に右横切開を加えた逆L字型の皮膚切開で開腹する。横切開は術野確保のために十分な長さをとるが、必要に応じて右上背側に延長し、肋間に切り込むと良好な視野とworking spaceが得られる(図2)。肝転移や腹膜転移がないことを確認後、PTBDチューブがあれば、それを腹膜刺入部で切断してベニユーラ針と延長チューブを接続し、先端を手術用グローブなどに入れて術中の胆汁ドレナージを図る。チューブの肝への刺入部は実質に縫合固定し、逸脱を予防する。

2. Kocher 授動

はじめに十二指腸を露出する層で剝離を進め、大動脈左縁まで脾頭部を授動する。大動脈周囲リンパ節郭清が必要な症例では、左腎静脈および右腎動脈のテーピングを行い No. 16b1 領域リンパ節（尾側は下腸間膜動脈レベル、左側は精巣・卵巢静脈まで）を郭清する。左腎静脈より頭側では下大静脈（IVC）の外膜を露出する層で剝離し、左頭側は腹腔動脈起始部付近まで剝離し、必要な場合 No. 16a2 領域リンパ節のうち interaortocaval 部を中心に郭清する。続いて IVC の剝離層を頭側に延長し、尾状葉の短肝静脈のうち尾側に存在するものを可及的に切離しておく（図 3）。

3. 肝十二指腸間膜の郭清

小網を切開し、右胃動静脈、上十二指腸動静脈を切離して十二指腸を肝十二指腸間膜から遊離する。肝十二指腸間膜内で固有肝動脈～左肝動脈を pick-up し、右肝動脈を同定しながら左肝動脈、中肝動脈の両者が門脈臍部に入るまで十分に剝離・露出しておく。右肝動脈の剝離は最小限にとどめておく（図 4）。次に脾上縁で総肝動脈を神経叢ごと剝離・露出し、テーピングしながら No. 8a リンパ節を郭清する。総肝動脈のテーピングの際には門脈腹側が露出されるので、その層で門脈全周を剝離してテーピングを行い、No. 8a、

3

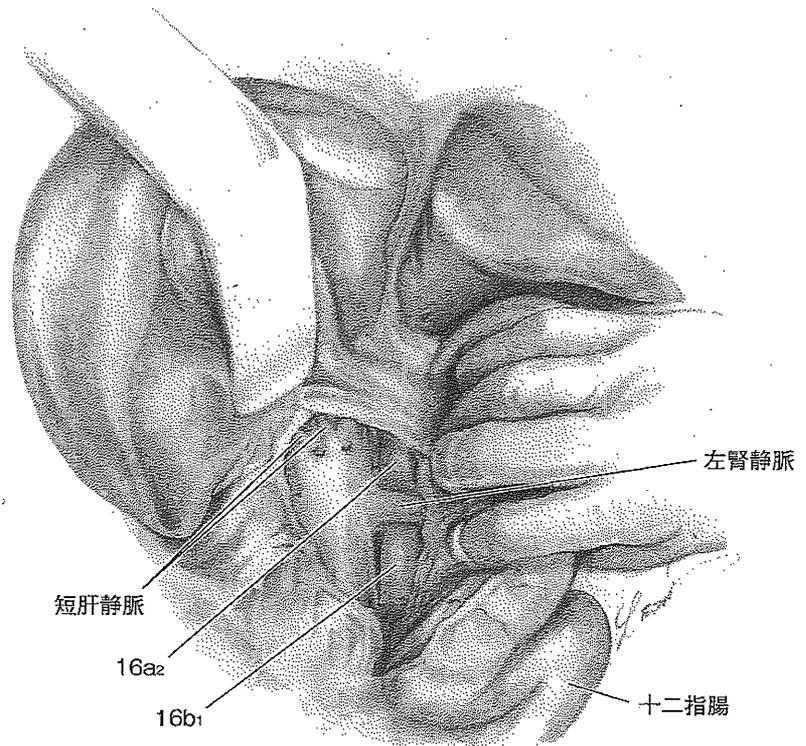


図 3 Kocher 授動術

大動脈左縁まで脾頭部を授動する。大動脈周囲リンパ節郭清が必要な症例では左腎静脈および右腎動脈のテーピングを行い No. 16b1, 16a2 領域リンパ節を郭清する。左腎静脈より頭側では下大静脈の外膜を露出する層で剝離し、尾状葉の短肝静脈のうち尾側に存在するものを可及的に切離しておく

4

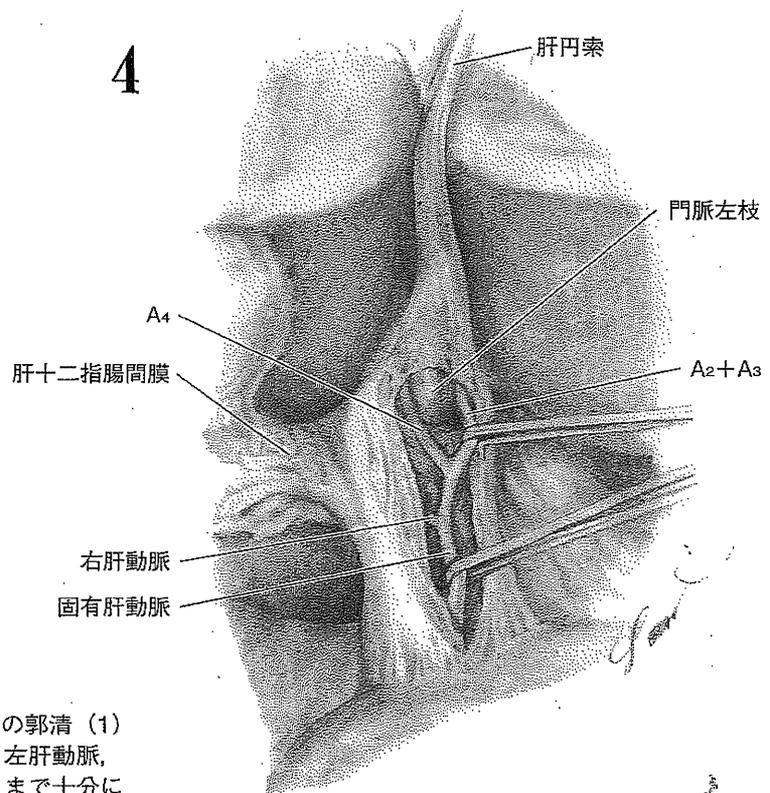


図 4 肝十二指腸間膜の郭清 (1)

肝十二指腸間膜内で右肝動脈を同定しながら左肝動脈、中肝動脈を pick-up し、両者が門脈臍部に入るまで十分に剝離・露出しておく

8p, 9 (右) リンパ節を順次郭清する。次に総肝動脈の右側寄り動脈周囲の神経鞘を切離して動脈の外膜を露出する層に入り、先に剝離・露出した固有肝動脈と連続させる。また、胃十二指腸動脈 (GDA)・後上臍十二指腸動脈 (PSPDA) を露出する (図 5)。

PSPDA の剝離を末梢に向かって進めるとその腹側に総胆管が同定できるので、これを確認しながら臍を左方に脱転し、臍背側面の脂肪を臍実質から剝離するようにして No. 13a, 12b₂, 12p₂ リンパ節を郭清する。郭清した組織を頭側に牽引しつつ胆管全周の剝離・露出を臍内に 1.5~2cm 程度進め、結紮・切離する。胆管断端は迅速組織診で癌陰性を確認する。さらに臍内胆管の切除が必要な際は PSPDA を総胆管の左右で切離し、総胆管を牽引しながら附着する臍実質を剝離することで、乳頭部直上までの臍内胆管を切離可能である (図 6)。

5

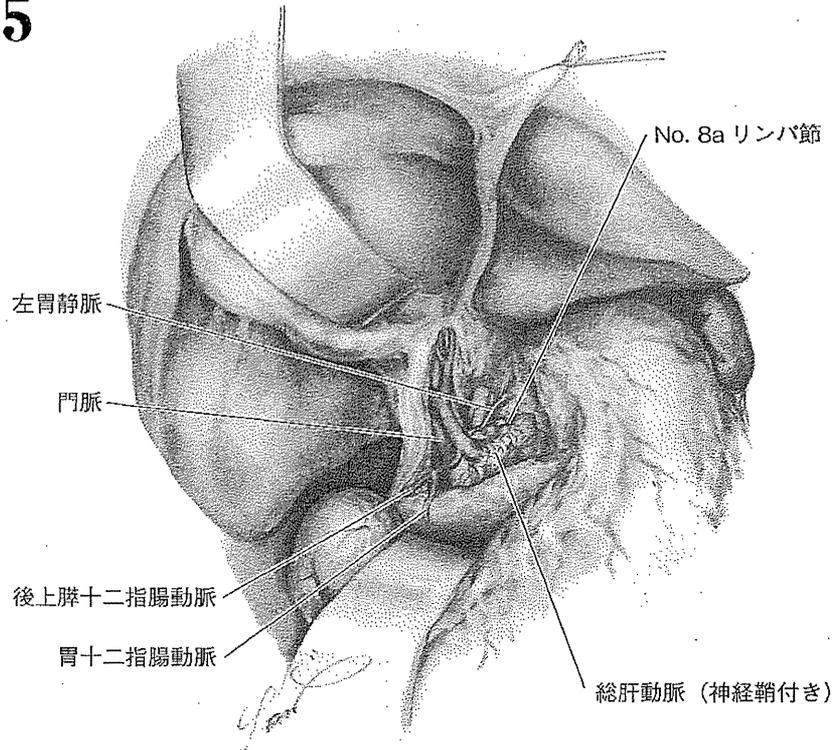


図 5 肝十二指腸間膜の郭清 (2)

臍上縁で総肝動脈を剝離・露出し、さらに総肝動脈の右側寄り動脈周囲の神経鞘を切離して動脈の外膜を露出する層に入り、胃十二指腸動脈・後上臍十二指腸動脈を露出する。門脈もテーピングを行い、No. 8a, 8p, 9 (右) リンパ節を郭清する

6

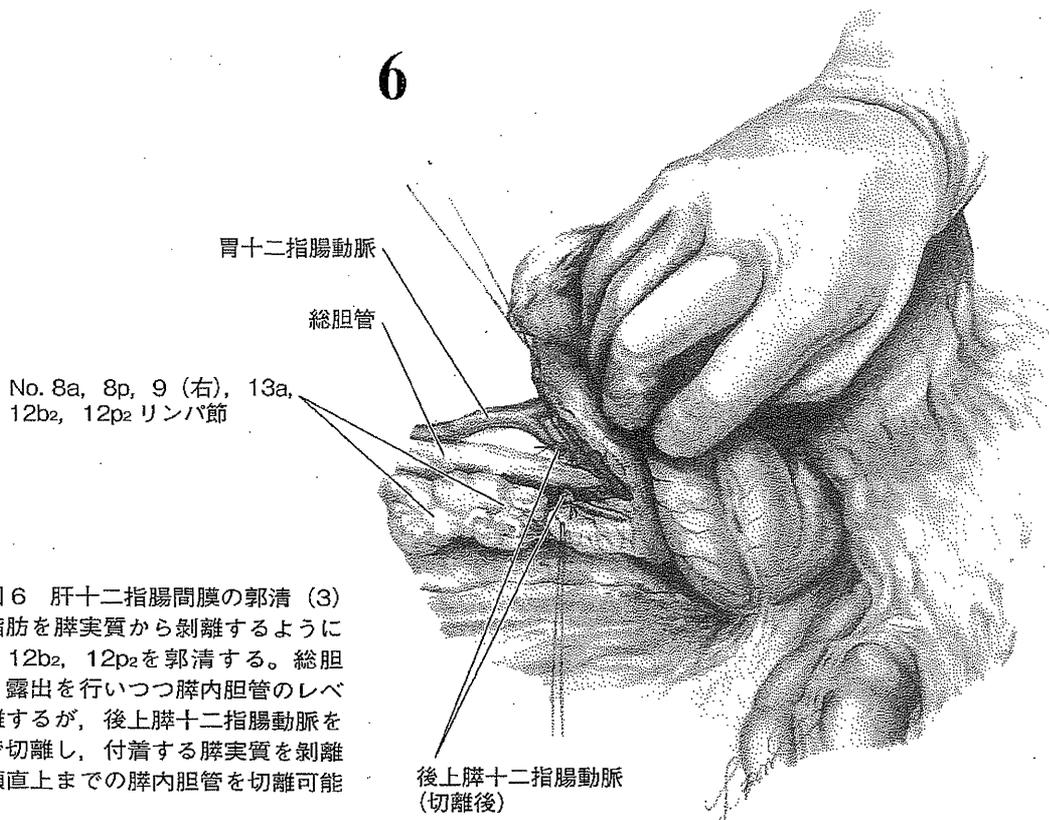


図 6 肝十二指腸間膜の郭清 (3)

臍背側面の脂肪を臍実質から剝離するようにして No. 13a, 12b₂, 12p₂ を郭清する。総胆管全周の剝離・露出を行いつつ臍内胆管のレベルで結紮・切離するが、後上臍十二指腸動脈を総胆管の左右で切離し、附着する臍実質を剝離することで乳頭直上までの臍内胆管を切離可能である

No. 13a, 12b2, 12p2リンパ節と総胆管断端を、門脈の背側を通して右側へ引き出しNo. 8a, 8p, 9 (右)リンパ節と連続させる。これら胆管および郭清リンパ節を右側上方に牽引しながら肝動脈・門脈のみを残して肝門側へ skeletonization を続け、左右門脈枝を剝離・同定する。右肝動脈を切離後、門脈右枝の切離を行う。

癌の浸潤が左右分岐部近くにある場合は、門脈左枝と本幹の間で環状に切除を行う。門脈切離の前に門脈左枝に流入する左尾状葉門脈枝を順次処理し、さらに門脈臍部基部に付着する Arantius 管を切離する。尾状葉枝は門脈の背側や頭側に複数本あり、剝離できる長さが限られるため、結紮・切離には相応のテクニックが求められる (図7)。

門脈左枝が十分に授動にされ、余裕をもって血管鉗子がかけられるようになったことを確認して門脈を切離する (図8)。吻合は2点支持にて後壁を intraluminal に、前壁を over and over で行うが、縫合糸の牽引をゆるく行うことが、吻合径を縮小させないためのコツである。通常、やや口径差はあるものの直接端々吻合が容易にできる。門脈の切除側はロック付きの血管用クリップ (Hemolok™) を用いることで結紮に必要な距離を節約できる。血管鉗子をできるだけ門脈切除断端から離してかけると、門脈が伸展して緊張がない吻合が可能となる (図9)。端々吻合が不能である場合には、左腎静脈や外腸骨静脈などの自家静脈グラフトを間置するため、切除距離が長くなる場合はあらかじめグラフト採取が即座に可能な状態にしてから門脈切離を行う必要がある。

7

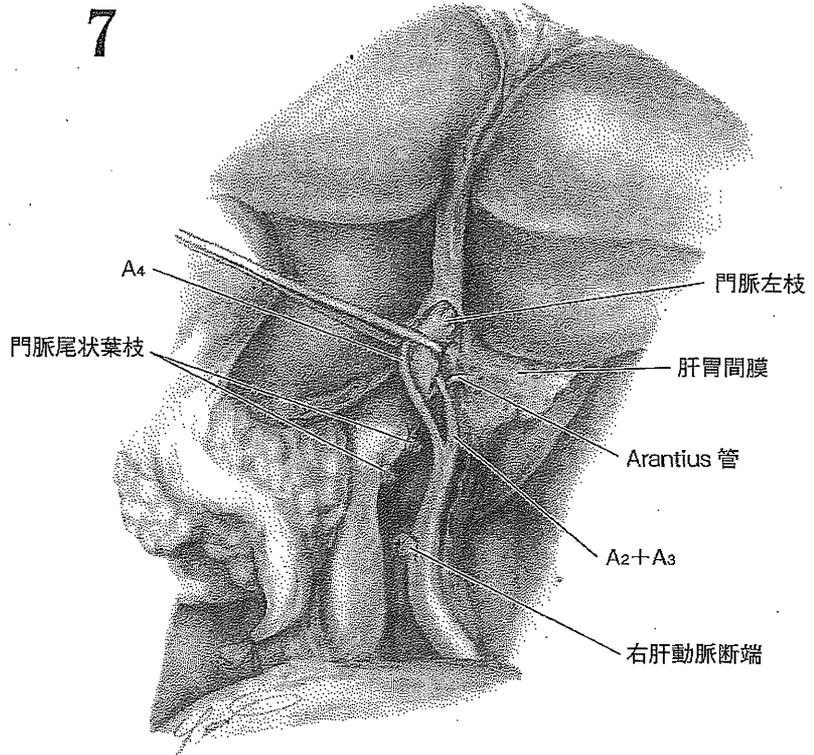


図7 門脈左枝の授動

門脈左枝に流入する尾状葉枝を順次処理し、さらに門脈臍部基部に付着する Arantius 管を切離して門脈左枝を十分に授動する。尾状葉枝は門脈の背側や頭側に複数本あり、慎重な処理が求められる

8

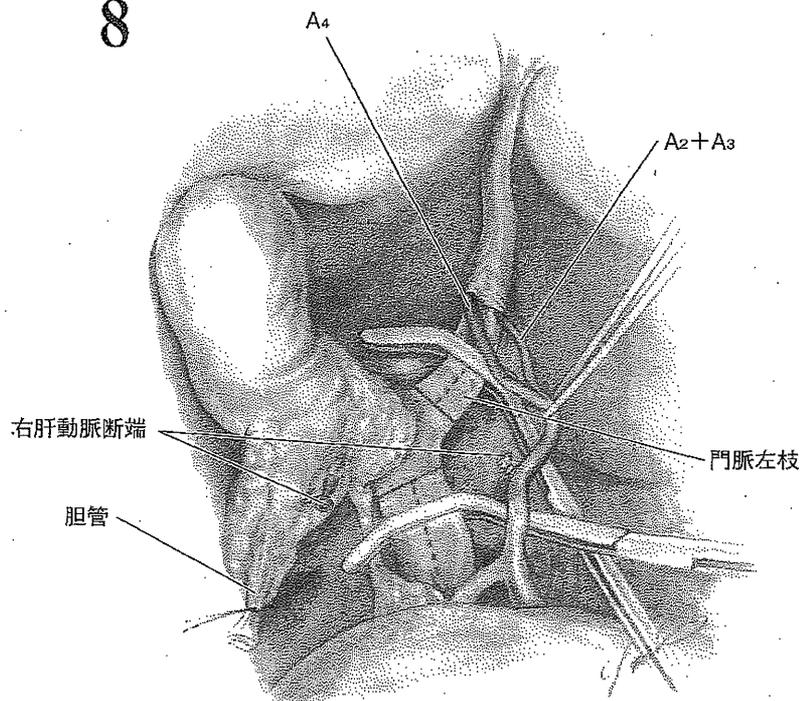


図8 門脈合併切除

癌の浸潤が左右分岐部近くにある場合は門脈左枝と本幹の間で環状切除を行う。吻合部の捻れの予防に、マーカーペンで門脈前面中央にマーキングを行っている