

Figure 2. (A) The dissection of the posterior mediastinal lymph nodes was extended towards the caudal side from the crura of the diaphragm to the celiac artery. (B) The left gastric artery was exposed from the left side and the lymph nodes along the left gastric artery were dissected. (C) An incision was made in the right mediastinal pleura and was extended to the level of the arch of the azygos vein. (D) Reconstruction via the posterior mediastinal route with a gastric tube and anastomosis in the thoracic cavity were performed using a circular stapler (CDH25) via the thoracic approach.

left side, clipped and divided and the lymph nodes along the left gastric artery were dissected (Fig. 2B). Thus, the posterior mediastinal and celiac lymph nodes that were located around the border between the thoracic and the abdominal cavity were continuously dissected with the LTHA.

Dissection of the posterior and right sides of the distal esophagus was subsequently performed and an incision was made in the right mediastinal pleura to allow ablation. The right mediastinal pleural incision was then extended to the level of the arch of the azygos vein (Fig. 2C). Thus, the middle and lower thoracic esophagus was completely detached from the surrounding tissue.

Subsequently, in the left semilateral-decubitus position, the operating table was rotated to the left, a small right thoracotomy was performed (~10 cm) and a rib retractor was used to maintain the small surgical field. The middle mediastinal lymph nodes, including subcarinal and bilateral main bronchial lymph nodes, were resected via the thoracic approach. Following division of the azygos vein, the upper thoracic esophagus was divided.

The operating table was then rotated to the right and the middle and lower thoracic esophagus was extracted via an upper abdominal incision. Finally, reconstruction via the posterior mediastinal route with a gastric tube and anastomosis in the thoracic cavity were performed using a CDH25 circular stapler (Ethicon Endo-Surgery) via the thoracic approach (Fig. 2D).

**Patients.** We started to routinely perform LTHA-preceded middle and lower esophagectomies in patients with distal

esophageal cancer in December, 2009. Between January, 2005 and December, 2012, a total of 21 patients with esophageal cancer underwent middle and lower esophagectomy combined with lymph node dissection and gastric tube reconstruction via the posterior mediastinal route (anastomosis in the thoracic cavity) at the Division of Digestive Surgery, Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine. The patients were retrospectively divided into two groups according to the operative method, with and without LTHA (10 patients from December, 2009 to December, 2012; and 11 patients from January, 2005 to November, 2009, respectively). The two groups were compared with respect to the perioperative treatment outcome. The operative indication was identical in the two groups, namely clinical T1-3, N0-3, M0 esophageal cancer, staged according to the International Union Against Cancer TNM classification of malignant tumours, 7th edition (12). All patients were treated by two highly skilled surgeons and informed consent was obtained from each participant.

**Surgical procedure without LTHA.** For the 11 patients who underwent middle and lower esophagectomy without LTHA the procedure was as follows: the patient was placed in the left semilateral-decubitus position, the operating table was rotated to the right and abdominal surgery was performed first via laparotomy (~20 cm). The operating table was then rotated to the left and thoracic surgery (including middle and lower mediastinal operation) was performed via thoracotomy (~20 cm). Finally, reconstruction via the posterior mediastinal route with a gastric tube and anastomosis in the thoracic

cavity were performed using a CDH25 circular stapler, via the thoracic approach.

All the patients underwent two-field lymphadenectomy. A total of 6 patients (3 patients with and 3 without LTHA) received preoperative chemotherapy, including 2 courses of cisplatin (80 mg/m<sup>2</sup>/day on day 1) plus 5-fluorouracil (800 mg/m<sup>2</sup>/day on days 1-5) (13).

**Clinicopathological characteristics.** To compare the backgrounds of the two groups, we analyzed their clinicopathological characteristics, such as age, gender, primary tumor location, histological type, TNM category and pathological stage. Histopathological examinations were performed on the primary lesions and all the dissected lymph nodes using serial sections. The histopathological diagnoses were confirmed by experienced pathologists. The TNM category and pathological stage were classified according to the pTNM pathological classification (12). The effects of preoperative comorbidities were analyzed using the Charlson comorbidity index (14).

**Perioperative factors.** To determine the efficacy of LTHA, the two groups were compared with respect to several perioperative factors, such as total operative time, duration of one-lung ventilation, operative blood loss, number of resected lymph nodes, duration of management by respirator, frequency of postoperative respiratory complications, number of white blood cells, serum C-reactive protein (CRP) level, duration of thoracic drainage, frequency of anastomotic leakage and postoperative hospital stay. The number of peripheral white blood cells and the serum CRP level were measured on days 2 and 7 following surgery. According to our criteria, the thoracic drainage tube was removed when the amount of thoracic discharge was reduced to <150 ml/day. Postoperative respiratory complications were defined as those involving major respiratory insufficiency; such as, a need for reintubation or severe pneumonia.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using the Student's t-test and Fisher's exact test. P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. All analyses were performed using JMP statistical software, version 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## Results

**Patients.** A total of 21 patients with esophageal cancer who underwent middle and lower esophagectomy combined with gastric tube reconstruction in the thoracic cavity were divided into two groups according to the operative procedure, such as, with and without LTHA (10 and 11 patients, respectively). Although the percentage of female patients was significantly higher in the LTHA group, there were no significant differences in the other clinicopathological parameters (age, primary tumor location, histological type, TNM category, pathological stage or Charlson comorbidity index) between the two groups (Table I). Two patients (one with and one without LTHA) were pathologically diagnosed as pT4 (invasion of the diaphragm).

**Intraoperative factors.** We performed a comparison of the intraoperative factors between the two groups. The total operative

Table I. Comparison of clinicopathological parameters of the patients who underwent middle and lower esophagectomy (anastomosis in the thoracic cavity) with and without preceding laparoscopic transhiatal approach (LTHA).

Variables	LTHA		P-value
	With	Without	
Age, years (mean ± SEM)	66.1±3.2	67.4±3.2	0.781
Gender			
Male	6	11	0.035 <sup>a</sup>
Female	4	0	
Location of primary tumor			
Distal thoracic esophagus	5	8	0.387
Abdominal esophagus	5	3	
Histological type			
SCC	5	8	0.387
Other	5	3	
pT category			
pT0-1	3	3	1.000
pT2-4	7	8	
pN category			
pN0	4	6	0.670
pN1-3	6	5	
Pathological stage			
0-II	4	6	0.670
III-IV	6	5	
Charlson comorbidity index (mean ± SEM)	2.0±0.1	2.2±0.1	0.172

SEM, standard error of the mean. <sup>a</sup>P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. SCC, squamous cell carcinoma.

time was significantly shorter in the group treated with compared to that in the group treated without LTHA (mean ± SEM: 304.3±23.3 vs. 485.0±22.3 min, respectively) (Table II). The duration of one-lung ventilation was significantly shorter in patients treated with compared to that in patients treated without LTHA (mean ± SEM: 144.4±16.5 vs. 212.5±16.0 min, respectively) (Table II). The total operative blood loss was significantly reduced in patients treated with compared to those treated without LTHA (mean ± SEM: 272.9±101.4 vs. 567.7±98.6 ml, respectively) (Table II). The total number of resected lymph nodes did not differ significantly between the two groups (24.3±3.6 and 27.4±3.3 with and without LTHA, respectively) (Table II). The total number of resected thoracic lymph nodes did not differ significantly between the two groups (5.3±1.9 and 8.7±1.9 with and without LTHA, respectively). These results suggest that LTHA-preceded esophagectomy may be used to reduce the total operative time, the duration of one-lung ventilation and total operative blood loss, without compromising the quality of lymph node dissection.

**Postoperative factors.** We then performed a comparison of the postoperative factors between the two groups (Table III).

Table II. Comparison of intraoperative factors between patients who underwent middle and lower esophagectomy (anastomosis in the thoracic cavity) with and without laparoscopic transhiatal approach (LTHA).

Variables	LTHA		P-value
	With	Without	
Total operative time (min)	304.3±23.3	485.0±22.3	<0.001 <sup>a</sup>
Duration of one-lung ventilation (min)	144.4±16.5	212.5±16.0	0.008 <sup>a</sup>
Total operative blood loss (ml)	272.9±101.4	567.7±98.6	0.049 <sup>a</sup>
Total number of resected lymph nodes	24.3±3.6	27.4±3.3	0.503
Thoracic lymph nodes	5.3±1.9	8.7±1.9	0.206
Abdominal lymph nodes	16.9±2.5	18.6±2.4	0.622

Data are presented as the means ± SEM. <sup>a</sup>P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Table III. Comparison of postoperative factors between the patients performed middle and lower esophagectomy (anastomosis in thoracic cavity) with and without laparoscopic transhiatal approach (LTHA).

Variables	LTHA		P-value
	With	Without	
Extubation time after surgery (days)	0.9±1.1	4.1±1.0	0.044 <sup>a</sup>
Postoperative respiratory complications [n/total (%)]	1/10 (10.0)	4/11 (36.3)	0.311
White blood cells (n/μl)			
2 days after surgery	9,820±1,749	12,718±1,710	0.245
7 days after surgery	7,422±1,204	8,782±1,106	0.413
Serum CRP (mg/dl)			
2 days after surgery	19.1±2.2	21.7±2.1	0.397
7 days after surgery	7.2±2.3	6.6±2.1	0.843
Duration of thoracic drainage (days)	6.9±2.9	19.2±2.7	0.006 <sup>a</sup>
Anastomotic leakage (cases/total)	1/10 (10.0%)	1/11 (9.1%)	1.000
Postoperative hospital stay (days)	25.7±5.3	40.7±5.2	0.025 <sup>a</sup>

Data are presented as the means ± SEM. <sup>a</sup>P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. CRP, C-reactive protein.

The extubation time after surgery was significantly shorter in the patients treated with compared to that in patients treated without LTHA (mean ± SEM: 0.9±1.1 vs. 4.1±1.0 days, respectively). Postoperative respiratory complications occurred in 10.0% of the patients treated with the LTHA (pneumonia in 1 patient), whereas they occurred in 36.3% of the patients treated without LTHA (pneumonia in 4 patients), without a statistically significant difference. We analyzed the number of peripheral white blood cells and the serum CRP level at 2 and 7 days after the operation. Although the elevation in the number of peripheral white blood cells at 2 days after the operation tended to be more limited in patients treated with compared to that in patients treated without LTHA (mean ± SEM: 9,820±1,749 vs. 12,718±1,710/μl, respectively), the differences were not considered to be significant. The duration of thoracic drainage was significantly shortened in patients treated with compared to those treated without

LTHA (mean ± SEM: 6.9±2.9 vs. 19.2±2.7 days, respectively), suggesting that this method decreased the amount of postoperative thoracic discharge by preventing damage to the thoracic and mediastinal tissues. The frequency of anastomotic leakage did not differ significantly between the two groups. The postoperative hospital stay was significantly shortened in patients treated with compared to those treated without LTHA (mean ± SEM: 25.7±5.3 vs. 40.7±5.2 days, respectively). These results suggest that LTHA-preceded esophagectomy may be used to improve postoperative care without increasing the risk of major complications.

#### Discussion

The surgical trauma caused by esophagectomy is greater compared to that caused by any other general surgical operations. Therefore, pulmonary complications remain the most common

and serious complications following esophagectomy (2-4). It was recently demonstrated that thorascopic (15-19) or mediastinoscopic esophagectomy (20,21) minimizes injury to the chest wall and reduces surgical invasiveness. Furthermore, the duration of one-lung ventilation is known to affect postoperative immune reactions and cause respiratory complications (6,7). We were able to perform middle and lower thoracic mediastinal surgery from the abdominal side of the diaphragm via LTHA and the subsequent thoracic operations, which were performed via a right thoracotomy, were markedly simplified. Therefore, the thoracic trauma was minimized and the duration of one-lung ventilation was reduced. Furthermore, our results demonstrated that the total intraoperative blood loss was significantly decreased and the duration of thoracic drainage was significantly shortened using LTHA. We consider that one of the reasons is that this method enables dissection of the appropriate layer under a magnified videoscopic view and, therefore, damage to the microvessels and lymphatic ducts is avoided (8,9). In our experience, there were no problems associated with applying a 10-mmHg pneumomediastinum pressure for intraoperative respiratory care. All these factors may contribute to improved postoperative outcome, regarding the extubation time following surgery and the postoperative hospital stay.

An additional advantage of this surgical procedure is that it enables easy access to the posterior mediastinal lymph nodes, including the paraaortic and left pulmonary ligament lymph nodes (9). The left side of the mediastinum is a difficult space to approach via a right thoracotomy. In particular, complete resection of the left pulmonary ligament lymph nodes via a right thoracic approach carries an increased risk of serious complications. Furthermore, when performing thorascopic esophagectomy in the left lateral decubitus position, it is difficult to maintain the surgical field in the lower mediastinum (15-17). With this method, the gas supply during dissection of the mediastinum makes the layers between the esophagus and the surrounding organs easy to identify and the separation of these layers helps minimize bleeding. Accordingly, the separation of the anterior and posterior sides of the posterior mediastinal lymph nodes is easy to perform and, by lifting up these lymph nodes like a membrane, the border of the left mediastinal pleura may be clearly identified, enabling en-bloc dissection (9). Furthermore, by exposing the adventitia of the thoracic aorta and the crura of the diaphragm, the appropriate layer for the dissection of the celiac lymph nodes may be clearly identified and the lymph nodes along the celiac artery may be dissected continuously.

We previously demonstrated the efficacy of LTHA-preceded subtotal esophagectomy with gastric tube reconstruction via the retrosternal route with regard to the perioperative outcomes of patients with esophageal cancer (8). Namely, LTHA-preceded esophagectomy shortened the intrathoracic operative time, decreased intraoperative bleeding and reduced the amount of postoperative thoracic discharge, without increasing the risk of major postoperative complications (8). In the present study, similar tendencies were observed in patients treated with LTHA-preceded middle and lower esophagectomy. In both studies, the elevation in the number of peripheral white blood cells 2 days after the operation tended to be more limited in patients treated with LTHA, suggesting that this method downregulated excessive immune responses (8). As previously

demonstrated, we performed operations using HALS to avoid injury of the reconstructed organ (8-10). The abdominal and the mediastinal operation may be easily performed and, thus far, there has been no report of reconstructed organs suffering intraoperative injuries. Furthermore, we have mainly been using the EnSeal device to avoid damaging the surrounding organs (8-10). The tip of the EnSeal blade is not too sharp and is therefore suitable for safe dissection. In the present study, the same procedure was used for distal esophageal cancer and the extubation time following surgery and postoperative hospital stay were significantly shortened, suggesting that the advantages of the LTHA-preceded method are more distinct in middle and lower esophagectomy.

In conclusion, LTHA-preceded middle and lower esophagectomy, significantly shortened the total operative time and the duration of one-lung ventilation and decreased intraoperative blood loss. Furthermore, the extubation time after surgery, the duration of thoracic drainage and postoperative hospital stay were significantly shortened. Additionally, this procedure ensured a good surgical view of the posterior and left mediastinum, enabling safe en bloc lymph node dissection around these areas, without increasing the risk of major perioperative complications.

## References

1. Tachibana M, Kinugasa S, Yoshimura H, *et al*: Clinical outcomes of extended esophagectomy with three-field lymph node dissection for esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Surg* 189: 98-109, 2005.
2. Whooley BP, Law S, Murthy SC, Alexandrou A and Wong J: Analysis of reduced death and complication rates after esophageal resection. *Ann Surg* 233: 338-344, 2001.
3. Law S, Wong KH, Kwok KF, Chu KM and Wong J: Predictive factors for postoperative pulmonary complications and mortality after esophagectomy for cancer. *Ann Surg* 240: 791-800, 2004.
4. Ferguson MK and Durkin AE: Preoperative prediction of the risk of pulmonary complications after esophagectomy for cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123: 661-669, 2002.
5. Bailey SH, Bull DA, Harpole DH, *et al*: Outcomes after esophagectomy: a ten-year prospective cohort. *Ann Thorac Surg* 75: 217-222, 2003.
6. Zingg U, Forberger J, Frey DM, *et al*: Inflammatory response in ventilated left and collapsed right lungs, serum and pleural fluid, in transthoracic esophagectomy for cancer. *Eur Cytokine Netw* 21: 50-57, 2010.
7. De Conno E, Steurer MP, Wittlinger M, *et al*: Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation. *Anesthesiology* 110: 1316-1326, 2009.
8. Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, *et al*: Perioperative outcomes of esophagectomy preceded by the laparoscopic transhiatal approach for esophageal cancer. *Dis Esophagus*: Oct 22, 2012 (Epub ahead of print).
9. Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, *et al*: Posterior mediastinal lymph node dissection using the pneumomediastinum method for esophageal cancer. *Esophagus* 9: 58-64, 2012.
10. Shiozaki A, Fujiwara H, Daisuke I, Okamoto K, Komatsu S and Otsuji E: Pneumomediastinum method for esophageal cancer. *Operation* 65: 1277-1280, 2011.
11. Shiozaki A, Fujiwara H, Murayama Y, *et al*: Hand-assisted laparoscopic transhiatal approach for mediastinal esophageal duplication cyst resection. *Esophagus* 9: 247-251, 2012.
12. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C (eds). *TNM Classification of malignant tumors. 7th edition*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2009.
13. Ando N, Kato H, Igaki H, *et al*: A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG9907). *Ann Surg Oncol* 19: 68-74, 2012.

14. Charlson ME, Pompei P, Ales KL and MacKenzie CR: A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chron Dis* 40: 373-383, 1987.
15. Osugi H, Takemura M, Lee S, *et al*: Thoracoscopic esophagectomy for intrathoracic esophageal cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 11: 221-227, 2005.
16. Osugi H, Takemura M, Higashino M, Takada N, Lee S and Kinoshita H: A comparison of video-assisted thoracoscopic oesophagectomy and radical lymph node dissection for squamous cell cancer of the oesophagus with open operation. *Br J Surg* 90: 108-113, 2003.
17. Thomson IG, Smithers BM, Gotley DC, *et al*: Thoracoscopic-assisted esophagectomy for esophageal cancer: analysis of patterns and prognostic factors for recurrence. *Ann Surg* 252: 281-291, 2010.
18. Noshiro H, Iwasaki H, Kobayashi K, *et al*: Lymphadenectomy along the left recurrent laryngeal nerve by a minimally invasive esophagectomy in the prone position for thoracic esophageal cancer. *Surg Endosc* 24: 2965-2973, 2010.
19. Cadière GB, Dapri G, Himpens J and Rajan A: Thoracoscopic esophagectomy in prone position. *Ann Surg Oncol* 18: 838, 2011.
20. Tangoku A, Yoshino S, Abe T, *et al*: Mediastinoscope-assisted transhiatal esophagectomy for esophageal cancer. *Surg Endosc* 18: 383-389, 2004.
21. Mimatsu K, Oida T, Kawasaki A, *et al*: Mediastinoscopy-assisted esophagectomy is useful technique for poor surgical-risk patients with thoracic esophageal cancer. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 19: e17-e20, 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。<sup>1)</sup>

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

## 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

関する報告<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>。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の位置づけと現況

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に、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

CHAPTER 3 ウイルス治療

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。<sup>4)</sup>

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

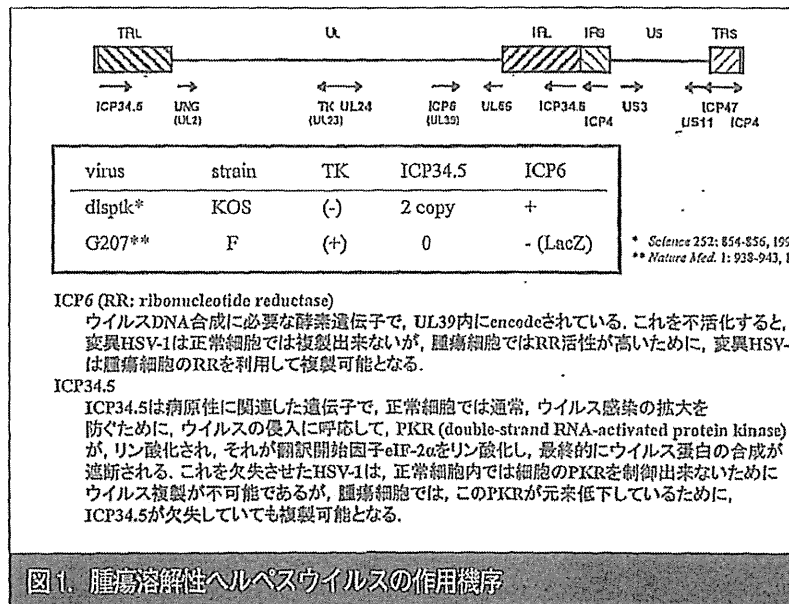


図1. 腫瘍溶解性ヘルペスウイルスの作用機序



## 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

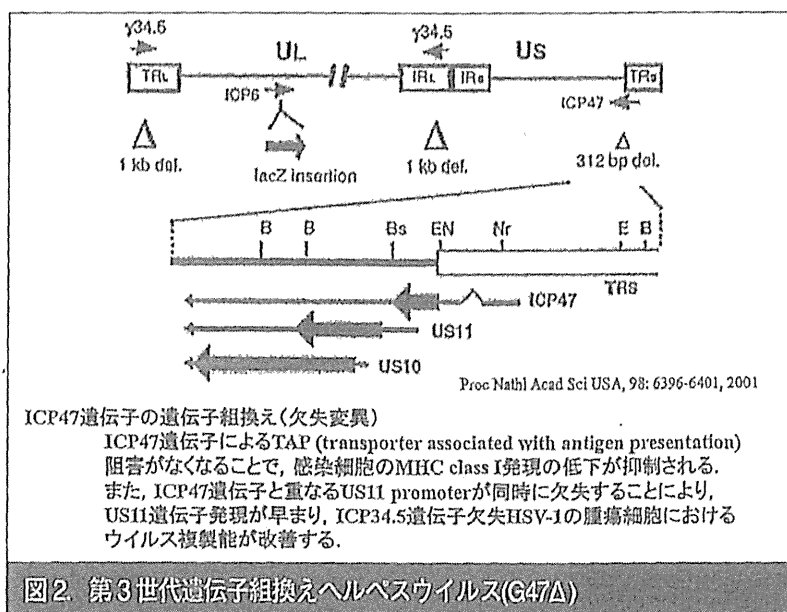
ウイルス遺伝子の改変を利用して開発されたものである。(図1)

$\gamma$ 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。 $\gamma$ 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、 $\gamma$ 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  $\gamma$ 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、 $\gamma$ 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。 $\gamma$ 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。

G207<sup>9)</sup>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、 $\gamma$ 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  $\alpha$ 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。 $\alpha$ 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、 $\alpha$ 47 遺伝子は US11 遺伝子プロモーター部分と重なるため、 $\alpha$ 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  $\gamma$ 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。 $\gamma$ 34.5 と  $\alpha$ 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<sup>9)</sup>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 $\Delta$ <sup>10)</sup>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<sup>9)</sup>やナビゲーション外科<sup>9)</sup>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

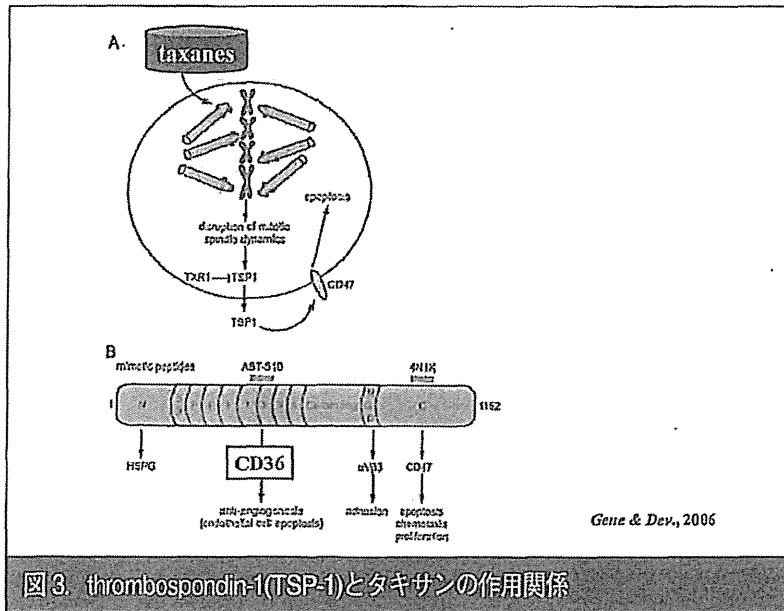


図3. thrombospondin-1(TSP-1)とタキサンの作用関係

亜系の Fu-10<sup>10)</sup>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<sup>11,12)</sup>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<sup>13)</sup>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。<sup>14)</sup>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 に様々形で関連していることがわかった。<sup>15)</sup>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。<sup>16)</sup>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

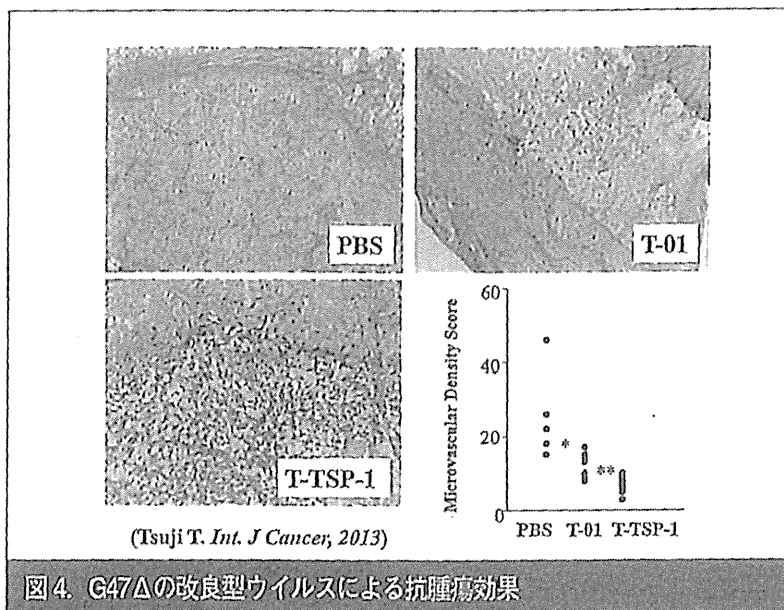


図4. G47Δの改良型ウイルスによる抗腫瘍効果

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.

# 分子細胞治療 フロンティア2015

編集：外科分子細胞治療研究会

外科分子細胞治療研究会  
外科遺伝子治療研究会

2015年 4月(木) 18:30~20:30  
名古屋国際会議場(名古屋)〒466-0801  
名古屋国際会議場 大ホール

「分子細胞治療の臨床応用に向けて」  
—— 山中 伸弥 (iPS細胞の発見者) ——  
—— 田嶋 真司 (iPS細胞を用いたがん治療) ——



外科分子細胞治療研究会  
〒466-0801 名古屋国際会議場 大ホール  
TEL: 052-733-1111 FAX: 052-733-1112  
http://www.fscj.or.jp/

第13回 Special Session for Molecular and Cellular Therapy  
外科分子細胞治療研究会  
4000 岡野 光夫 (MD, PhD, FRCR, FRCR(C), FRCR(O))

Innovationへの  
挑戦

5月26日(木) 18:00~19:15  
東京国際フォーラム 5A4層G402  
東京都千代田区有明2-2-1  
TEL: 03-5561-3111 FAX: 03-5561-3112




第14回 外科分子細胞治療研究会  
Surgical Society for Molecular and Cellular Therapy

Be outstanding!  
前へ進もう!

1. 中川 英刀 (MD, PhD)  
遺伝子編集ツール「CRISPR/Cas9」による分子細胞治療の普及と応用  
2. 久保 秀則 (MD, PhD)  
Adventure of gene therapy with adenovirus

2015年4月12日(木) 18:30~20:00  
会場 森田メッセ  
〒100-0001 東京都千代田区千代田1-1-1  
森田メッセ 大ホール  
TEL: 03-5561-3111 FAX: 03-5561-3112



第15回  
Surgical Society for Molecular and Cellular Therapy  
外科分子細胞治療研究会

4月11日(木)  
2015年4月11日  
18:30~19:30  
会場 森田メッセ  
〒100-0001 東京都千代田区千代田1-1-1  
森田メッセ 大ホール  
TEL: 03-5561-3111 FAX: 03-5561-3112

Cancer Research for Innovation

1. 藤井 隆 (MD, PhD)  
がん治療の最新動向  
2. 田嶋 真司 (MD, PhD)  
がん治療の最新動向



発行： 飯田橋パピルス      販売： 株式会社パピルス

分子細胞治療フロンティア 2015

定価 4,000 円  
(税別・送料込み)

2014年8月20日 第1版第1刷 発行

編 集 外科分子細胞治療研究会

発行者 中野 敏夫

発 行 飯田橋パピルス

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町 3-25-11

TEL 03-5215-7001 FAX 03-5215-7004

販 売：株式会社パピルス

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町 3-25-11

TEL 03-5215-7001 FAX 03-5215-7004

© 2014 Printed in JAPAN

印刷・製本 株式会社パピルス

乱丁・落丁本はお取り替えます。無断複写・転載は禁じます。

ISBN978-4-9902531-4-1 C3047 ¥4000E

## 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ンス、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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>。

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<sup>3)4)</sup>、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<sup>5)</sup>、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、一般にがん抗原因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)<sup>6)</sup>、URLC10 (LY6K; lymphocyte antigen 6 complex, locus K)<sup>7)</sup>、DEPDC1 (DEP domain containing 1)<sup>8)</sup>、RNF43 (ring-finger protein 43)<sup>9)</sup>、TOMM34 (translocase of outer mitochondrial membrane 34)<sup>10)</sup>、MPHOSH1 (M phase phosphoprotein 1)<sup>11)</sup>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)- $\beta$  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、VEGFR1<sup>12)</sup> および VEGFR2<sup>13)</sup> 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<sup>14)</sup>、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<sup>15)</sup>。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 Ipilimumab<sup>16)</sup> 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 の抗腫瘍効果をも高める作用がある。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<sup>17)</sup>、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)」

## CHAPTER 4 癌ワクチン・細胞治療

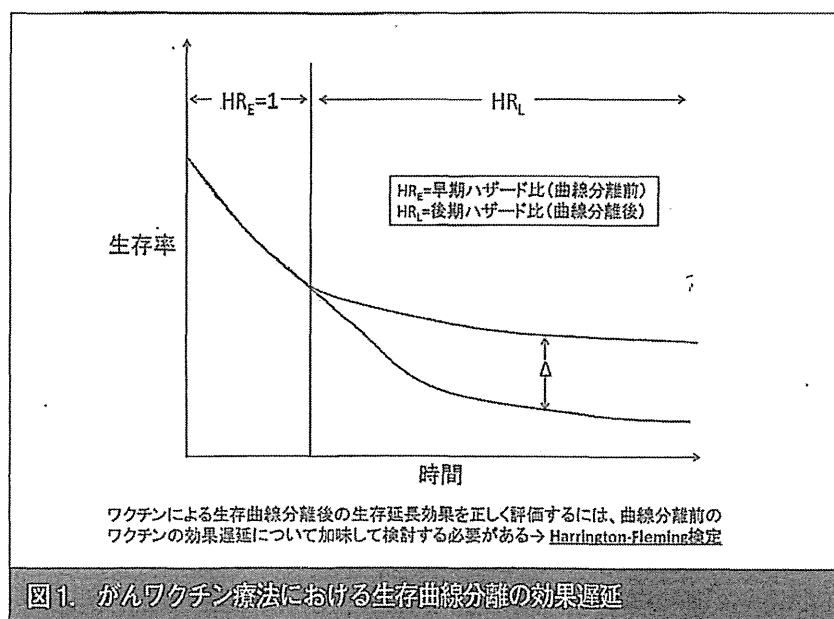
として企業向けのワクチンガイダンスを発行した (<http://www.fda.gov/downloads/Biologics-BloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM278673.pdf>)。この中でFDAは、がんワクチンの開発において従来の細胞傷害性薬剤や生物製剤の開発とは異なった臨床試験デザインを考慮する必要がある、と明記している。

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<sup>18)</sup>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<sup>3)4)5)</sup>。日本初のがんワクチンにおける Pivotal study となった PEGASUS-PC Study (進行膀胱癌に対するゲムシタピ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 (Immune-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に抗腫瘍反応がみられなくても病勢進行 (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<sup>19)</sup>。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。

