様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19390341
研究課題名（和文）　消化器癌微小環境理論に立脚した新規免疫・ウイルス治療の開発

研究課題名（英文）　Development of newly immuno-viral therapy incorporated in tumor microenvironment theory for gastrointestinal cancer

研究代表者
山上　裕機（Yamaue Hiroki）
和歌山県立医科大学　医学部・教授
研究者番号：20191190

研究成果の概要（和文）：腫瘍微小環境に着目し，新しい免疫療法の臨床研究とウイルス療法の開発を行った．ペプチドワクチン療法開発では，膵癌に対する化学療法剤として認可され，腫瘍免疫系を抑制しないと考えられている gemcitabine を使用し，併用するワクチン製剤には VEGFR2 由来で HLA-A2402 拘束性のエピトープペプチド RFVPDGNRI を用いた．臨床研究の予定症例数の登録を終了し，追跡調査中である．さらに，BAC（bacterial artificial chromosome）システム、Cre-loxP 組換えおよび FLP/FRT 組換えを用いて TSP-1(thrombospondin-1)発現型第 3 世代 HSV-1(T-TSP1)を作成し、遺伝子発現のない第 3 世代 HSV-1(T-01)との抗腫瘍効果と遺伝子発現による効果を比較検討し，血管新生抑制作用等による抗腫瘍効果の増強・今後の臨床応用が期待される．

研究成果の概要（英文）：Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) is an essential factor in tumor angiogenesis and in the growth of pancreatic cancer. Immunotherapy using epitope peptide for VEGFR2 (VEGFR2-169) that we identified previously is expected to improve the clinical outcome. Therefore, a phase I clinical trial combining of VEGFR2-169 with gemcitabine was conducted for patients with advanced pancreatic cancer. Patients with metastatic and unresectable pancreatic cancer were eligible for the trial. In addition, we developed newly oncolytic herpes simplex viruses (HSV). This virus can produce human thrombospondin-1 (TSP-1) and induce apoptosis for human gastric cancer cell lines. In vivo experiments, our virus could suppress tumor angiogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総　計	7,300,000	2,190,000	9,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：消化器癌，免疫療法，腫瘍抗原ペプチド，ウイルス療法

１．研究開始当初の背景

我が国の悪性腫瘍に対する治療成績は一定の向上はしたものの，plateau に達してきているのも認めざるを得ないのが現状である．事実，厚生労働省の第 3 次対がん 10 か年総合戦略「がんの罹患率と死亡率の激減を目指して」に照らし合わせれば，基礎研究の成果を臨床にいかに生かせるかが極めて重要である．我々は現在までに，消化器癌の治療成績向上のために，臨床面では，進行消化器癌に対する補助化学療法の感受性試験を用いた際の有用性(Yamaue H et al. Dis Colon Rectum, 1996, Yamaue H et al. Pancreas, 2002. Iwahashi M et al. Anticancer Res, 2005, Nakamori M et al. J Surg Oncol, 2003)，消化器間葉系腫瘍(GIST)に対する画像診断(Iwahashi M et al. World J Surg, 2006)，浸潤性膵癌に対する切除再建の工夫，ドレーン管理における新たな提言(Tani M et al. Ann Surg, 2006, Kawai M et al. Ann Surg, 2006)を報告してきたのと同時に，癌に対する新しい治療法の開発として，生体の免疫応答を惹起させる免疫遺伝子治療(Terasawa H et al. Jpn J Cancer Res, 1999, Nakamori M et al. Clin Cancer Res, 2003)や，薬剤感受性遺伝子を用いた自殺遺伝子治療の研究開発(Ueda K et al. Cancer Res, 2001，Nakamori M et al. Jpn J Cancer Res, 2002）を行ってきた．

また，腫瘍抗原提示能に優れている樹状細胞(DC: dendritic cell)を用いた免疫(遺伝子)治療の臨床開発に重点を置いた(Nakamura M et al. Clin Cancer Res, 2002．Nakamura M et al. Oncology, 2005, Ojima T et al. Int J Oncol, 2006, Ojima T et al. Int J Cancer, 2006).

さらに，進行再発大腸癌症例に対して，DC に癌胎児性抗原の CEA (carcinoembryonic antigen) ペプチドでパルスして進行消化器癌患者に投与する臨床第 I 相試験を行ったが，一部の症例には腫瘍抗原特異的免疫応答を認めたものの臨床効果を得るには至らなかった（Matsuda K et al. Cancer Immunol Immunother, 2004）．これを糧に，この現状を打破するためには(1)腫瘍特異的で強い免疫原性を有する腫瘍抗原を用いること，(2)免疫監視機構からの逃避メカニズムを克服する強力な adjuvant の選択が極めて重要であるとの認識から以下の点において臨床研究プロトコールを作成すべきと考えた．

まず，腫瘍抗原は現在まで種々の手法により同定が試みられ報告されているが，近年 cDNA microarray 技術の開発により，腫瘍における数多くの遺伝子発現を網羅的に探索することが可能となり，腫瘍の性質や特徴が遺伝子レベルで解析できるようになった．この手法により同定される腫瘍抗原ペプチドはより高い腫瘍特異的免疫応答を誘導するものと期待出来る．さらに，担癌患者においては，腫瘍細胞の免疫監視機構からの様々な逃避メカニズムが働いているものと考えられ，これと克服する強力な adjuvant を腫瘍抗原ペプチドを用いた免疫療法には不可欠であると考えられる．そこで，近年，自然免疫(innate immunity) 担当細胞には，Toll-like receptor (TLR)と呼ばれる一群の膜タンパク質が存在し，微生物特有の成分を認識すると抗原提示細胞内のシグナル伝達機構を介して自然免疫系が活性化するとともに獲得免疫(acquired immunity)を誘導させることが明らかとなってきた．そこで，我々は，過去に我々が研究開発した免疫（遺伝子）治療の成果を照らし合わせることにより，この治癒しない創傷である腫瘍微小環境を破壊する治療開発が今後の癌治療を展開するうえで重要であると考えた．

２．研究の目的

近年，骨髄由来の造血系細胞の血管新生組織への浸潤が血管新生に重要な役割を演じていることが注目されている．これは腫瘍組織が何らかの走化因子を分泌し，それに反応して造血炎症性細胞のストローマ組織への動員が起こると考えられる．腫瘍周囲のストローマを形成する炎症性細胞の動員（走化）の責任因子ならびのその機構についていくつかの知見があきらかにされている．その一例として，VEGF (vascular endothelial growth factor)の場合，これは腫瘍血管新生にとって重要であることは間違いな

いが，その際 VEGF を発現する間質細胞が腫瘍周囲に集積する．腫瘍が VEGF 発現細胞を動員する機能を有する．腫瘍は PDGF-A (platelet-derived growth factor)を産生して VEGF を発現する間質細胞を動員することが明らかにされ(EMBO J., 2004)，その中でも，線維芽細胞は腫瘍関連間質細胞の中でも重要な要素であると考えられている．また，VEGF の発現がケモカイン(chemokine)の発現を誘導し，それにより骨髄由来細胞が間質に動員されることが明らかとなった(Cell, 2006)．この骨髄由来細胞の遺伝子発現 profile の分析では，ほぼすべてに chemokine receptor のひとつである CXCR4 が発現していることが明らかにされ，VEGF が，血管を取り巻く細胞（線維芽細胞や平滑筋細胞）で CXCR4 の ligand である CXCL12/SDF-1 経路を誘導しており，VEGF の発現を阻害することで，骨髄細胞の recruitment が消失した．また，VEGF の存在下で CXCR4 と CXCL12 との結合を阻害しても骨髄由来細胞の動員が阻害された．このように腫瘍微小環境における signal を阻害する治療方法を開発することは理論的であると考えられる．これに対する臨床応用としての VEGF 阻害剤の開発は分子標的治療としての新たな展開の典型例である．これは VEGF または VEGF 受容体に対する中和抗体と VEGFR-2(KDR)の tyrosine kinase のリン酸化阻害剤に大別される．これらのうち，ヒト型抗 VEGF 抗体 bevacizumab, Avastin®)は進行大腸癌において抗癌剤との併用で生存期間の延長効果が示され，欧米では標準治療として認知されており，我が国でも臨床応用が期待されている．しかし，基礎研究レベルで抗VEGF 治療の中止により急速な腫瘍血管再新生が生じる現象が報告され(J Clin Invest. , 2006)，分子標的治療の難しさが示唆されたばかりである．そこで，VEGF を代表とする血管新生分子を標的とした腫瘍特異的免疫療法の開発とともに，

本研究では，腫瘍微小環境破壊を誘導する治療方法の開発をもうひとつの重点目標とする．そのために分子生物治療のひとつであるウイルス療法を応用する．本法は理論的には腫瘍への標的化(targeting)が可能な方法論で，その中でも腫瘍特異的増殖可能型ウイルス(oncolytic virus)は腫瘍細胞に特異的に感染もしくは増幅が可能な魅力ある分子である．本研究では oncolytic virus のうち，oncolytic herpes simplex virus-1 (oncolytic HSV-1)を用いる． oncolytic HSV-1 では安全性を保持しながら virus の増幅能力つまり治療効果を高めることは困難で，中でも消化器癌の腫瘍微小環境破壊を目標とした場合，ウイルスの複製能を上げることに加えて，VEGF のような分子を潰す(silencing)出来るように virus を改良する必要があると考える．そこで腫瘍微小環境崩壊から誘導される一連の殺腫瘍効果と効率の良い腫瘍免疫の誘導効果を証明し，その機序についても解明することで，免疫・ウイルス療法 (Immuno-viral biotherapy)という新しい治療概念を確立することを目的とした．

３．研究の方法

(1)消化器癌に対するワクチン治療の臨床研究

①[臨床研究-H19-TR-1]切除不能進行再発膵癌に対する腫瘍血管を標的とした HLA-A2402 拘束性エ-ピトープペプタイドと gemcitabine 併用による第 I 相臨床試験

「方法」腫瘍新生血管および前述の VEGFR2(KDR)は，多くの固形腫瘍の腫瘍(微小)組織に発現していることが知られており，VEGFR2 の発現が，癌細胞の増殖と強く相関していることも明らかとなっている．VEGFR2 が免疫療法の標的となり得るか？に関しては，VEGFR2 蛋白および DNA をワクチンとした基礎研究の結果，腫瘍新生血管を抑制することで抗腫瘍効果を誘導し，これは VEGFR2 特異的細胞傷害性 T 細胞が担っていることが確認されている．更に，共同研究施設（東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター）において，強力な細胞傷害性 T リンパ球(CTL: cytotoxic T lymphocyte)を誘導できる数種類の HLA-A2402 拘束性のエピトープペプチドが同定された(Cancer Res 65, 2005)．そこで，膵癌に対する化学療法剤として認可され，腫瘍免疫系を抑制しないと考えられている gemcitabine を使用し，併用するワクチン製剤には VEGFR2 由来で HLA-A2402 拘束性のエピトープペプチド RFVPDGNRI を用いた．

「評価項目」Primary endpoint：安全性について臨床検査値異常変動を含むすべての有害事象の検討 Secondary endpoint：免疫反応をペプチド刺激による in vivo CTL 誘導能と HLA tetramer による TCR (T cell receptor)の量的解析で確認する．臨床的有効性を腫瘍縮小効果，time to progression (TTP)で評価する．

②[臨床研究-H19-TR-2]進行・再発食道癌

に対する新規癌関連抗原遺伝子由来エピトープペプチドを用いた腫瘍特異的ワクチン療法(第 I/II 相臨床試験「方法」cDNA array 法による腫瘍における遺伝子発現の網羅的解析により，予後不良である進行食道癌に対する特異的免疫療法の候補ペプチドとして，URLC10 (up-regulated lung cancer 10), TTK (TTK protein kinase)が同定された．これらはそれぞれ, 食道癌細胞株の 93%に高発現している．さらに URLC10 および TTK について，日本人に最も頻度が高い(60%)HLA-A24 に結合能を持つペプチドを同定し，このペプチドを用いて健常人末梢血 CD8 陽性 T 細胞を刺激したところ，ペプチドをパルスした標的細胞に強力な細胞障害活性を持つ T 細胞クローンが樹立され，URLC10 あるいは TTK を内因性に発現かつ HLA-A24 を有する食道扁平上皮癌細胞株に対して強い細胞障害性を有することが判明している．このペプチドに強力な adjuvant として期待されている CpG-ODN (oligodeoxynucleotides) を併用する．CpG-ODN は TLR9 の ligand で，これにより生体内の形質細胞様 DC と B 細胞が特異的に活性化され，腫瘍免疫系における Th1 優位な環境を誘導すると報告されている．我々は，CpG-B である CpG7909 (J Immunother, 2004)を用いた．「評価項目」Primary endpoint : 安全性について臨床検査値異常変動を含む有害事象，有効性評価を RECIST で判定する．Secondary endpoint : 免疫反応をペプチド刺激による in vivo CTL 誘導能と HLA tetramer による TCR (T cell receptor)の量的解析で確認する．臨床的有効性を腫瘍縮小効果，time to progression (TTP)で評価する．

(2)腫瘍微小環境破壊を誘導する治療方法の開発

腫瘍微小環境を破壊出来るならば，overexpression 出来るシステムを作成する必要性がある．そこで，SV-01（東京大学脳神経外科藤堂具紀博士より供与）expression cassette を用いて taxan 系抗癌剤の耐性機構獲得分子として注目されている Txr1 遺伝子の repression molecule である thrombospondin-1 (Gene and Dev., 2006)の expression cassette を作成する．これをヒト胃癌細胞株を用いて，In vitro でのそれぞれの expression cassette の胃癌細胞に対する特性について検討する．さらに，Arming oncolytic HSV-1 の作成とその機能解析を行う．本研究では，より安全性の高い oncolytic HSV である G47Δ (Proc Natl Acad Sci, 2001)を基本骨格とする BAC(bacterial artificial chromosome)の T-BAC system (Cancer Res, 2005)を用いて機能遺伝子搭載型ウイルス (Arming oncolytic HSV-1)を作成して腫瘍微小環境におけるウイルス治療の治療効果について検討する．治療モデルのは，胃癌の再発形式のひとつである腹膜播種に対する治療を想定し，ヒト胃癌細胞株 MKN-45, TMN-1 を用いて，我々がすでに報告した方法 (Ueda K et al. Eur J Cancer, 2004)を用いて腹膜播種モデルを作成する．このモデルに対して，我々が開発してきた Baco-1 (EGFP 発現 oncolytic HSV-1), fusogenic Baco-1 (cell fusion induced oncolytic HSV-1), Synco-2D (Nakamori M et. al. Clin Cancer Res, 2003) との比較として，それぞれの新しいウイルスを腹腔内投与し，その治療効果を比較する．

４．研究成果

(1) 消化器癌に対するワクチン治療の臨床研究

和歌山県立医科大学外科学第 2 講座における切除不能膵癌症例を本試験に登録した. 選択基準は, HLA-A*2402 陽性で，基本的に前治療のない局所進行で切除不能，肝転移などの遠隔臓器への転移を有する 20-80 歳までの膵癌，または再発膵癌症例を対象とした．ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) の PS (Performance Status)が 0-2 まで, かつ，予測生命予後が 3 ヶ月以上を期待でき，臓器機能が保たれていることも適応条件とした．研究デザインは，非無作為化オープンラベル第 I 相臨床試験 (non-randomized, open-label, phase I clinical trial)とし，VEGFR2-169 ペプチドのドーズエスカレーションは, Level I: 0.5mg(6 例), Level II: 1.0mg(6 例), Level III: 2.0mg(6 例）とし，不完全フロイントアジュバント(IFA : incomplete Freund's adjuvant)とともに 1 週間ごとに皮下投与した．gemcitabine (GEM)は 1 週間ごとに 1,000mg/m^2 で 3 週投与（点滴）1 週休薬の標準的投与量とした．primary endpoint は VEGFR2-169 ペプチドと GEM 併用投与の安全性とし, secondary endpoints は，このペプチドに反応する CTL の interferon-γ (IFN-γ)の産生量，制御性 T 細胞 (Treg)分画, ワクチン接種部位の反応などの免疫学的応答，CT 検査による RECIST (Response Evaluation

Criteria in Solid Tumors)を用いた効果判定，time to progression (TTP), overall survival (OS)による臨床効果，および第II 相臨床試験の推奨投与量の決定とした．また,

治療成績とこれまでの結果

1 コホート 6 例ずつの登録を行い，計 18 例で以下の解析を行った．①安全'性・有害事象：CTCAE(Common Terminology Criteria for Adverse Effect) version 3.0 による grade 4 以上の有害事象は認めなかった．本研究では腫瘍血管新生抑制の標的としたワクチン治療開発のコンセプトゆえ，血管障害に起因する心血管合併症(高血圧，出血，血栓・塞栓症など)は認めなかった．また，grade 3 の白血球または好中球減少をそれぞれ 2 例(11%)，10 例(56%)で認めたが，全例 GEM 投与後 1 週間を経過すると軽快した．いずれのコホートでも dose-limiting toxicity は出現しなかった．②局所皮膚反応と臨床効果：局所皮膚反応は delayed type hypersensitivity 型の免疫応答であり，18 例中 15 例 (83%)でペプチド投与局所の皮膚発赤または硬結を認めた．局所皮膚反応と臨床効果の相関をみると，局所皮膚反応陽性 15 例中，PR (partial response)または SD (stable disease）の抗腫傷効果が得られた症例は 12 例であり，PD (progressive disease)であったのは 3 例のみであった．逆に，皮膚反応陰性 3 例はすべて臨床効果が PD であり，局所皮膚反応と臨床効果はよく相関することが示唆され，理学的所見によるワクチン効果識別を行ううえでのひとつのサインでると考えられる．③ CTL の誘導：VEGFR2 ペプチドに対する細胞性免疫能の評価は，各投与量別にペプチド特異的 CTL の誘導を ELISPOT(enzyme-linked immunospot) assay, すなわち IFN-γ 産生で検討した．さらに，局所皮膚反応の陽性率も各投与量で検討した．局所皮膚反応陽性率は Level I: 0.5mg 投与群で 83%，Level II: 1.0mg 群で 67%であったが，Level III: 2.0mg 群では 6 例中全例で皮膚反応が陽性となった．また，CTL 誘導は 1.0mg, 2.0mg いずれの投与群においても皮膚反応陽性率が 67%と高い値を示した．また，Treg 細胞の検討では，CTL 反応を示した症例において，ワクチン治療後の Treg 細胞分画が減少する傾向を示した．臨床効果には各投与群間に大きな差は認めなかったが，2.0mg 投与群で全生存期間が 344 日と最も延長した．本療法の治療経過は予想を上回るものであった．以上の結果を踏まえ，次に進める第 II/III 相臨床試験の推奨投与量を 2.0mg と決定した．④ ペプチドワクチン療法による生存期間の延長効果：生存期間中央値(median survival time: MST)は 7.7 か月であり, 前治療歴のない 15 例の MST は 8.7 か月と極めて良好な生存期間であった．一般的に GEM 単独による MST は 6.0 か月前後であり，我々の第 I 相臨床試験の MST は，次の第 II 相臨床試験に進むうえで期待できるものである．

さらに注目すべきことは，本臨床試験における生存曲線である．通常の化学療法における臨床研究とは異なり，治療開始 6 か月前後までのハザード比と，それ以降のハザード比が変化していることである．この腫瘍学的意義は，現在行っている本ペプチドを用いた pivotal study である第 II/III 相臨床試験で明らかになると予想されるが，おそらく免疫療法で有効な免疫応答が発動するには，治療開始後一定の期間が必要であることが示唆される．したがって，このような生存期間の有意差検定には，従来の統計学的手法ではなく，新たな手法を用いる必要がある．

(2) 次世代 HSV-1 の分子標的となる分子の選択

BAC を利用し，第 3 世代 HSV-1 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を取り入れ，研究開発を行った．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．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，HSV-1 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た．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，taxanes と oncolytic HSV-1 の胃癌細胞に対する相乗効果，作用機序について検討を行い，これに関連する分子を HSV-1 に組み込む研究を行った．また，taxane の作用機序を有する arming oncolytic HSV-1 の開発において，taxane 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，taxane 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ている．そこで，TSP-1 を HSV-1 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の開発を完了した．TSP-1は腫瘍血管抑制分子としての機能は既知のごとくであり，このT-TSP-1の抗腫瘍効果の確認と, taxane系抗癌剤との併用効果について現在検討中である．現在，その結果について論文作成中である．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計75件）

① Miyazawa M, Ohsawa R, Tsunoda T, Hirono S, Kawai M, Tani M, Nakamura Y, Yamaue H.Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. Cancer Sci. 査読有, 101, 2010, 433-439
② 中森幹人,山上裕機 腫瘍溶解ウイルスの癌治療への応用 Biotherapy 査読無,23,2009,409-415
③ 山上裕機 次世代バイオセラピィの分子標的 Biotherapy 査読無 22, 2008,2 15-219
④ 中森幹人 Taxane の作用機序を標的とした arming oncolytic herpes virus の改良 Biotherapy, 22, 2008, 227-232

〔学会発表〕（計35件）

① 山上裕機 膵臓治療戦略-RCT 結果に基づいた手術術式の開発と集学的治療 第110回日本外科学会定期学術集会 2010年4月8日，名古屋
② 山上裕機 膵臓外科の Art と Science 第63回日本消化器外科学会総会 2008年7月17日 札幌

〔図書〕（計20件）

① 山上裕機，宮澤基樹，中森幹人 飯田橋パピルス 分子細胞治療フロンティア2010（分担執筆）2010年 232 pages

〔その他〕

ホームページ等

http://www.wakayama-med.ac.jp/med/2nd-surgery/

６．研究組織

(1)研究代表者

山上 裕機（Yamaue Hiroki）
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190

(2)研究分担者

中森 幹人（Nakamori Mikihito）
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：10322372

岩橋 誠(Iwahashi Makoto)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70244738

中村 公紀（Nakamura Masaki）
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80364090

(3)連携研究者なし