

進行消化器癌に対する癌ワクチン療法の tumor dormancy therapy としての可能性

京都府立医科大学消化器外科学教室

上田 祐二 伊藤 剛 奥川 郁 藤原 斉
藤 信明 吉村 哲規 山下 哲郎 藤木 博
原田佐智夫 山岸 久一

我々の施設において施行している，進行固形癌患者に対する HLA-A24拘束性 CTL 誘導性 CEA ペプタイドと末梢血単球由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法の tumor dormancy therapy としての可能性を検討した。対象症例は15例であるがそのほとんどが消化器癌患者である。6例に治療開始後血清 CEA 値の低下あるいは上昇の抑制が認められた。これら血清 CEA 値の変動から判断した有効症例においては，無効例に比べ平均生存期間が延長する傾向が認められ，tumor dormancy から long NC を経て，治療開始後 1 年半を経過している長期生存例も得ている。特異的能動免疫療法である本療法が有効に作用するためには，PHA 幼若化反応に代表される患者末梢血 T リンパ球の反応性が保たれている事が必要であった。今後は bulky tumor mass から開放された外科手術後，あるいは化学，放射線療法後の微小残存病変からの再発を予防するために臨床応用されていくべきものであり，そこに本療法の tumor dormancy therapy としての意義も見出されるであろう。

緒 言

我々の施設では，1998年10月から進行消化器癌，肺癌患者を対象として，癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen：以下，CEA と略記)由来ペプタイドと樹状細胞 (dendritic cell：以下，DC と略記)を用いた癌ワクチン療法の臨床応用を開始している¹⁾。

本療法の進行癌治療における意義と tumor dormancy therapy としての可能性を検討したので報告する。

対象と方法

対象：HLA-A24陽性かつ CEA 陽性の化学療法，放射線療法不応性の再発転移巣を有する進行癌症例15例を対象とした。全症例が前治療として手術と化学療法あるいは放射線療法を受けていた。治療開始時期は1998年10月から1999年8月の間である。原疾患の内訳は結腸，直腸癌10例，胃癌2例，肺癌3例であり，組

織型はすべて腺癌である。再発転移巣は肺，肝，骨を中心に多臓器にわたっている (Table 1)。

本臨床研究は，京都府立医科大学倫理委員会申請要旨に沿い，癌ワクチン療法の第1相試験的な位置づけで，以下の3項目を検討する事を目的とした。①安全性(副作用)，②治療前後の抗原 (CEA)特異的免疫学的応答性の変化，③腫瘍縮小効果 (付随的評価項目)。

方法：

①DC の *in vitro* 誘導と CEA-DC ワクチンの調製：治療には末梢血単球由来 DC と HLA-A2402拘束性の CTL 誘導性 CEA エピトープペプタイド (CEA652) を用いた²⁾。

治療開始前に血球分離装置 (CS3000, Baxter) を用いて末梢血単核細胞を多量に採取し，液体窒素中に凍結保存した。治療ごとに細胞を解凍し，ディッシュ付着分画として単球を豊富に含む細胞群を分離した。この細胞群を granuloocyte/macrophage-colony stimulating factor (以下，GM-CSF と略記) と interleukin-4 (以下，IL-4 と略記) 存在下に 7 日間培養し，DC を誘導した³⁾。誘導された DC を回収後，CEA652 を室温で 4 時間パルスした後に 2cc 前後の生理食塩水に浮遊し，

* 第55回日消外会総会シンポ9・消化器癌における tumor dormancy therapy

<2000年12月19日受理> 別刷請求先：上田 祐二
〒602 8566 京都市上京区河原町広小路上の梶井町
465 京都府立医科大学消化器外科

Table 1 Patient characteristics and clinical outcome(Oct. 1998 ~ Mar. 2000)

| Case No. | Age | Sex | Disease | Metastases | Beginning time of therapy | No. of Vac. | Prognoses | Serum CEA |
|----------|-----|-----|---------|---------------|---------------------------|-------------|-----------|-----------|
| F23 | 54 | F | RK | Lung, Pelvis | Oct./ 98 | 7 | dead | (394 42) |
| F27 | 57 | F | RK | Lung, Adrenal | Oct./ 98 | 31 | alive | |
| F32 | 56 | M | RK | Liver | Nov./ 98 | 10 | dead | |
| F37 | 52 | F | LK | Bone | Dec./ 98 | 22 | dead | |
| F38 | 28 | F | CK | Peritoneum | Jan./ 99 | 8 | dead | |
| F40 | 42 | F | CK | Liver | Apr./ 99 | 15 | alive | |
| F41 | 33 | F | MK | Peritoneum | Mar./ 99 | 8 | dead | |
| F42 | 61 | F | CK | Liver | Mar./ 99 | 6 | dead | |
| F43 | 64 | F | CK | Liver, LN | Mar./ 99 | 5 | dead | |
| F44 | 69 | M | LK | Pleura | Apr./ 99 | 22 | alive | |
| F45 | 46 | F | CK | Bone | Jun./ 99 | 12 | dead | |
| F46 | 53 | M | MK | Lung, Brain | Jun./ 99 | 8 | dead | |
| F47 | 65 | F | CK | Liver, Lung | Jun./ 99 | 5 | dead | |
| F48 | 56 | M | LK | Bone, LN | Aug./ 99 | 10 | alive | |
| F49 | 51 | M | CK | Liver | Aug./ 99 | 6 | alive | |

RK : rectal cancer, CK : colon cancer, MK : gastric cancer, LK : lung cancer
LN : lymphnode, Vac. : vaccination

CEA-DC ワクチンとして2週間ごとに鼠径部へ皮内注射した¹⁾。最低5回の治療を目標とし、臨床効果の推移と患者の希望により可及的に治療を継続した。

治療前患者免疫能の評価：治療前の患者免疫能の評価として、末梢血リンパ球数と末梢血リンパ球/好中球比の算出を行い、PHA 刺激によるリンパ球幼若化反応を計測した。また、フローサイトメトリーにより、末梢血リンパ球サブセット (CD3, CD4, CD8, CD16) を解析した。

③抗腫瘍効果の評価：単純 X 線あるいは CT, MRI 検査による腫瘍縮小効果の検討を継続的に行った。CEA を含めた血清腫瘍マーカー値を2週間ごとに検査した。

④生存期間の評価：おのおのの症例において、ワクチン療法開始後から2000年3月末時点までの間の生存期間を算出した。また血清 CEA 値の変化により、対象症例を以下の基準で有効群と無効群に分け、おのおのの群で平均生存期間とワクチン投与回数を算出した。

有効群；1)治療開始後血清 CEA 値が明らかに低下し(治療前の50%未満)、尚かつその効果が4週間以上持続した症例。2)治療開始後血清 CEA 値の一過性の上昇を認めたと、その後低下に転じ、4週間以上再上昇をきたさなかった症例。

無効群；治療開始後血清 CEA 値が一度も低下する事なく上昇を続けた症例。

結 果

①腫瘍縮小効果と血清 CEA 値の変化に基づいた有効群と無効群の平均生存期間：画像検査上明らかな腫瘍縮小効果の認められた症例は、残念ながら1例も存在しなかった。no change (以下, NC と略記) を4例 (F27, F37, F40, F48) に得たが、他の症例はすべて progressive disease (以下, PD と略記) であった。

2000年3月末日時点で、治療開始後の血清 CEA 値の変化に基づいて有効群と無効群とに分け、平均生存期間を算出した。有効群が6例、無効群が9例であった。有効群の平均生存期間は 10.8 ± 4.0 (mean \pm SD) か月であり、無効群の 6.3 ± 2.6 か月より延長する傾向を認めた。有効群では自ずと治療期間が延長し、無効群の約2倍の回数のワクチン投与がなされていた (有効群16.3回 VS 無効群8.6回 (Table 2))。

②有効群と無効群の治療開始前免疫能：有効群と無効群に分け治療開始前に行った免疫能検査の比較検討を行った。末梢血リンパ球数、リンパ球/好中球比、リンパ球サブセットのすべてに有意差を認めなかったが、唯一、末梢血リンパ球 PHA 刺激幼若化能試験において、有効群が無効群に比べ有意に高い数値 (刺激係数) を示した (Table 3)。

その他リンパ球/単球比、免疫抑制性酸性蛋白 (IAP) などの比較検討を行ったが、すべて有意差を認めなかった。

Table 2 Survival time after initiation of cancer vaccine therapy(Mar. 2000)

| | Patient No. | Age | No. of Vac. | Survival time(months) |
|-------------------------|-------------|------|-------------|-------------------------|
| < Effective cases > | | | | |
| | F27(RK) | 57 | 31 | 18(alive) |
| | F37(LK) | 52 | 22 | 13 |
| | F40(CK) | 42 | 15 | 12(alive) |
| | F45(CK) | 46 | 12 | 8 |
| | F46(MK) | 53 | 8 | 6 |
| | F48(LK) | 56 | 10 | 8(alive) |
| | Mean | 51.0 | 16.3 | 10.8 ± 4.0 months |
| < Non-effective cases > | | | | |
| | F23(RK) | 54 | 7 | 4 |
| | F32(RK) | 56 | 10 | 8 |
| | F38(CK) | 28 | 8 | 6 |
| | F41(MK) | 33 | 8 | 5 |
| | F42(CK) | 61 | 6 | 7 |
| | F43(CK) | 64 | 5 | 3 |
| | F44(LK) | 69 | 22 | 12(alive) |
| | F47(CK) | 65 | 5 | 4 |
| | F49(CK) | 51 | 6 | 8(alive) |
| | Mean | 53.4 | 8.6 | 6.3 ± 2.6 months |

Vac. : vaccination

Table 3 Immune potentiality of patients before therapy

| | PHA blast transformation of PBMC | Number of PBL (/ μ l) | Ratio of PBL/Neut. |
|-------------------------------|--|-----------------------------|--------------------|
| Effective cases (n = 6) | 86,320 ± 27,637(cpm) * 148.5 ± 73.4(SI) | 1,372 | 0.46 |
| Non-effective cases (n = 9) | 73,985 ± 25,265(cpm) * 71.4 ± 27.3(SI) | 1,162 | 0.44 |
| | CD3(%) | CD16(%) | CD4/8 |
| Effective cases (n = 6) | 63.5 | 20.9 | 2.21 |
| Non-effective cases (n = 9) | 68.5 | 21.7 | 2.05 |

cpm : counts per minute(3 H-Tdr incorporation) SI : stimulation index

PBMC : peripheral blood mono-nuclear cells PBL : peripheral blood lymphocytes Neut : neutrophils

* p < 0.05 Student's t test)

③NC 症例 2 例の臨床経過 : 典型的な NC 症例 2 例の経過を示す .

F27は大腸癌の副腎 , 多発肺転移症例であり , 化学療法が無効であったためワクチン投与へ切り替えた . 1998年10月に治療を開始してから一過性に CEA 値の上昇を来したが , 翌年に入ってから低下に転じ , それ以後 1 年以上にわたってほぼ同等の数値を保っている . 画像上は最近になり副腎転移巣の増大傾向と新た

な肺転移巣の出現を認めるが , 長期にわたり tumor dormant な状態を維持することができ , long NC を得ることができた症例である . 2000年3月時点で治療開始後すでに17か月が経過し合計31回の CEA-DC ワクチンを投与している . なおこの症例では , 治療開始前に不可能であった CEA 特異的な CTL の *in vitro* 誘導がワクチン投与後に可能となり , 昨年6月に interleukin-2(IL-2)を併用した CTL の養子移入も施行

した (Fig. 1).

F37は肺癌の仙骨転移症例である。他院で化学療法と放射線療法を施行されていたが、無効であったため本院へ紹介された。1998年12月に治療を開始し、それ以後一度も CEA 値が上昇する事なく NC を維持していたが、1999年夏頃から骨転移巣の再増殖を認め、秋には新たに脳転移も出現し、2000年1月末に亡くなった。

腫瘍が再増殖を来たしだしてからワクチン投与を継続したが、その間も血清 CEA 値は低下を続け、21回のワクチン投与で394から42ng/mlにまで低下した。癌の免疫学的逃避機構により CEA 陰性腫瘍の増殖を来した可能性があり、単一の分子標的を想定した癌特異的免疫療法の限界が示唆された症例であった (Fig. 2)。

考 察

Tumor dormancy とは、腫瘍が長期間増殖せずに休止、静止している状態をさして言うが、消化器癌や非小細胞性肺癌などの化学療法が著効しづらい癌に罹患した患者に延命効果を得るには、一時的な腫瘍縮小効果より、長い腫瘍再燃抑制効果を有する治療、すなわち tumor dormancy therapy が必要である事が明らかにされている。

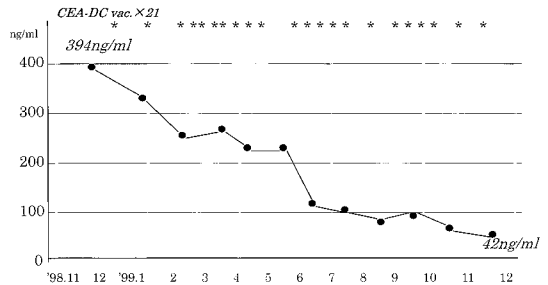
高橋は tumor dormancy になりやすい条件として、①宿主免疫能の賦活。②腫瘍の抗原性の変化。③内分泌系状態の変化。④腫瘍栄養血管の障害。⑤腫瘍の増殖能が低い。の5つをあげており⁴⁾、免疫療法はこのうち条件①②に作用すると考えられる。

サイトカイン製剤や免疫賦活剤を用いた非特異的免

Fig. 2 Clinical course of F37(bone metastasis of lung cancer)

Vertical axis indicates serum CEA level and horizontal axis indicates dates.

CEA-DC vac. : CEA peptide pulsed DC vaccine



疫療法は条件①に作用するが、今回我々が報告したような、ある特定の癌抗原を分子標的として治療を行う特異能動免疫療法である癌ワクチン療法は、宿主免疫能を賦活するとともに(条件①)、腫瘍の抗原性に变化をもたらし(条件②) tumor dormancy に導ける可能性がある。

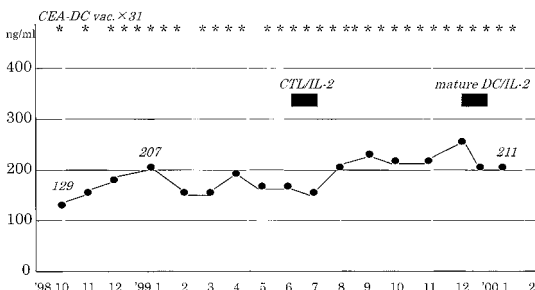
我々が本臨床試験を開始してからまだ日が浅く、対象症例数も少ない。また、症例の病理学的背景因子や治療歴が多様であり、現時点で生存期間を検討する事に臨床的意義は少ないと考えられる。しかし、血清 CEA 値の低下あるいは上昇の抑制を認めた症例(有効群)においては、無効群に比べ生存期間が延長する傾向が認められた。化学療法が無効で腫瘍の増大を続けていた F27は、治療に反応し、tumor dormancy を経て“腫瘍の縮小なき延命”を獲得していると考えられる。一方、腫瘍には宿主の免疫監視機構から逃れようとするさまざまなエスケープ機構が存在するため⁵⁾、単一の分子標的を想定した癌の特異免疫療法に盲点があるのも事実である。F37では、治療を開始してから順調に血清 CEA 値の低下を来したため、我々は腫瘍縮小効果も関連しているものと確信していた。しかし、CEA 値は低下するにもかかわらず、ある時を契機として腫瘍は顕著な再増殖を来した。腫瘍の抗原性の変化が tumor dormancy に結びつかずに tumor regrowth を誘導した可能性がある。このような事実を考慮すると、今後は複数の腫瘍抗原を標的とした特異免疫療法を臨床応用していく必要があり、現在その実践を開始している。

また、癌の免疫療法を有効に施行する上において、治療を受ける時点での宿主の免疫能は大変重要な因子

Fig. 1 Clinical course of F27(right adrenal and multiple lung metastases of rectal cancer)

Vertical axis indicates serum CEA level and horizontal axis indicates dates.

CEA-DC vac. : CEA peptide pulsed DC vaccine



である。なぜなら、極端に免疫能の低下した宿主においては、免疫療法に生体が反応できない可能性が高いからである。進行癌患者の免疫抑制には、腫瘍細胞から産生される免疫抑制性のサイトカインや化学療法、放射線療法に起因する免疫抑制など種々の因子が複雑に関与しているが、今回我々が検索した因子においては、唯一、末梢血リンパ球のPHA 幼若化反応でのみ、有効群と無効群との間で差があった。末梢血Tリンパ球のマイトージェン刺激に対する反応性が保たれている症例では、DCを用いた癌ワクチン療法に反応できることを示唆する結果である。しかし、実際的にはこれらの数値として出てくる免疫学的パラメーターで、治療効果を予測するのは、多くの場合困難である⁶⁷⁾。大変臨床家的な言い方であるが、見た目の患者さんの元気が一番大事な予測根拠となる。

近年の基礎医学研究の進展には進境著しいものがあり、分子生物学や免疫学の成果が臨床応用を目指した臨床研究の流れへと確実につながりつつある。罹患患者の多い消化器癌に対する癌拒絶抗原ペプチドも数多く同定されてきている⁵⁾。このような時代背景を考慮すると、もはや腫瘍外科医が、医学者としての生涯の中で自らの短い研究生活時代を利用して、深遠で日々目覚ましい進歩を遂げている基礎免疫学の全貌を把握した研究を行うことは不可能であろう。完全に“わらじを造る人と履く人は別”の時代の感がある。我々は、癌患者の生命予後の延長を目指して、基礎医学の進歩の恩恵により同定、開発された種々の道具（癌拒絶抗原ペプチド、新規抗腫瘍性サイトカイン・BRM製剤）を用いた適格な臨床研究、臨床試験を推進していくべきであろう。そのためには、免疫療法の特性に合わせた臨床試験のガイドラインを早期に整備する必要がある⁶⁾。

現在、癌ワクチン療法はまだ実験的医療の段階であり、ヒト癌治療における科学的 evidence を集積する必要があるため、第1相試験的な位置づけで bulky mass

を有する進行癌症例を対象に試みられている。しかし、本来の目的は外科手術や化学、放射線療法後の微小残存病巣からの再発を予防することにあり、そこに本療法の tumor dormancy therapy としての意義もある。ワクチンの免疫学的効果を中心に evidence が集積された後は、再発予防効果を検討する臨床試験へと進んでいくことが望まれる。

文 献

- 1) 上田祐二, 山岸久一: 単球系樹状細胞の *in vitro* 誘導と腫瘍抗原ペプチドを用いた免疫細胞治療への応用. 医のあゆみ 192: 879-882, 2000
- 2) Nukaya I, Yasumoto M, Iwasaki T et al: Identification of HLA-A24 epitope peptides of carcinoembryonic antigen which induce tumor-reactive cytotoxic T lymphocyte. Int J Cancer 80: 92-97, 1999
- 3) Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage-colony stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor- α . J Exp Med 179: 1109-1115, 1994
- 4) 高橋 豊: 第1章 Tumor dormancy とは? .高橋豊編. Tumor Dormancy Therapy 癌治療の新たな戦略. 医学書院, 東京, 2000, p1-5
- 5) 伊東恭悟, 山名秀明, 七條茂樹ほか: 癌抗原ペプチドワクチン 遺伝子同定から臨床研究へ. 日外会誌 101: 612-617, 2000
- 6) Nakazato H, Koike A, Saji S et al: Efficacy of immunochemotherapy as adjuvant treatment after curative resection of gastric cancer. Lancet 343: 1122-1126, 1994
- 7) 佐治重豊, 杉山保幸, 国枝克行ほか: 胃癌の補助免疫化学療法. 消化器癌 5: 207-216, 1995
- 8) 上田祐二, 伊藤 剛, 山岸久一: III. 樹状細胞の臨床応用 D. 免疫療法の実際 5. 肺癌. 稲葉力ヨ, 瀧川雅浩編. 樹状細胞 基礎から臨床へ. 南江堂, 東京, 2000, p161-165

Cancer Vaccine Therapy as Tumor Dormancy Therapy against
Advanced Digestive Tract Cancer

Yuji Ueda, Tsuyoshi Itoh, Kaori Okugawa, Hitoshi Fujiwara,
Nobuaki Fuji, Tetsunori Yoshimura, Tetsuro Yamashita,
Hiroshi Fujiki, Sachio Harada and Hisakazu Yamagishi

Department of Digestive Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine

Cancer vaccine therapy using monocyte-derived dendritic cells (DC) and HLA-A2402 restricted carcinoembryonic antigen (CEA) derived peptide (CEA652) has been applied in advanced digestive tract and lung adenocarcinoma patients resistant to conventional chemotherapy or radiotherapy since October 1998 at our institute. Subjects were 10 patients with colo-rectal cancer, 2 with gastric cancer, and 3 with lung cancer. CEA652 pulsed DC vaccine was administered to patients once every 2 weeks in the inguinal skin at least 5 times. After therapy, 6 to the 15 showed decreased serum CEA or inhibited serum CEA increase (effective cases) In effective cases, patients tended to survive longer compared than in non-effective cases. 57-year-old female rectal cancer patient with right adrenal gland and multiple lung metastases has survived 18 months since the beginning of the vaccine therapy without significant tumor progression. This suggests that cancer vaccine therapy using CEA652 pulsed DC induce tumor dormancy in some advanced solid cancer patients resistant to conventional therapy. In future, this therapy should be applied to prevent cancer recurrence in minimally residual disease after surgery or chemotherapy.

Key words : cancer vaccine therapy, tumor dormancy therapy, carcinoembryonic antigen

[Jpn J Gastroenterol Surg 34 : 409 414, 2001]

Reprint requests : Yuji Ueda Department of Digestive Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine
465 Kajiicho, Kawaramachi, Kamigyoku, Kyoto, 602 8566 JAPAN
