

自家がんワクチン

大野忠夫¹、林隆志²、中根一樹²、倉根修二³

¹ セルメディシン株式会社代表取締役社長、² たけだ免疫・遺伝子クリニック医長、同科長、³ 文京クリニック院長

要旨

- ・ホルマリン固定がん組織を抗原とした“自家がんワクチン(AFTVac)”を開発した。
- ・AFTVacは、肝がんを対象としたランダムイズドスタディで、高い頻度の術後再発を有意に抑制、全生存率も有意に高く維持できた。
- ・肝がん術後で再発を5回繰り返しながら、AFTVac接種後は約1年再発を抑制している症例がある。
- ・AFTVacにはBRM(生物反応修飾)作用もあり、末期がん症例でリンパ球数を有意に増加させ、Th1/Th2比を有意に改善する。
- ・他のがん種でもAFTVacによる症状改善例が多数報告されており、がん種全体では36%に達する。
- ・これまでに問題となる有害事象は全く認められていない。

はじめに

がん治療のために、従来手術・放射線・化学療法の三大治療法では不十分であることから、長らくがん免疫療法が注目され、さまざまな角度から研究されてきた。しかし、本邦で実用化されているものは、クレスチン、レンチナンを初めとするBRM(生物反応修飾物質)、インターフェロン(IFN)、インターロイキン-2(IL-2)のサイトカイン等、自然免疫反応の非特異的免疫賦活剤に属する少数例と、ハーセプチン・リツキサンの抗体療法であり、抗原特異的免疫反応を担う獲得免疫機構の体内活性化を狙った養子免疫療法、ワクチン療法は、いまだ確立している状況ではない。

すでにメラノーマだけに注目しても多数の腫瘍ペプチド抗原が単離同定されており(1)、それらのうち単一のペプチド抗原によるがんワクチン療法は、多数の試みがなされた結果から、はっきりと腫瘍塊の縮小が認められる有効症例はわずか2.6%にすぎないとされている(2)。

また、体外で増殖培養したキラーリンパ球、あるいは、それらを活性化できる樹状細胞に腫瘍抗原を付加して体内に戻す養子免疫療法も、本邦では民間療法として自由診療制度下で実施されているものの、固形癌について明瞭な縮小効果を示す成績は期待できない状況である。

そこで、米国国立がん研究所の Rosenberg らのグループでは、体内の既存リンパ球を抗がん剤で殺しておいて体外で増殖培養した自家腫瘍内浸潤 T リンパ球 (TIL) にほとんど入れ替えるという、実にドラスティックな方法を開発している (3)。これによれば、転移性メラノーマで 51% の奏効率 (RECIST 法で評価) を示すが、TIL 大量培養や大用量 IL-2 の 8 時間おき投与等に要する高額のコストや厳密な患者管理を考えれば、一般に普及し得る治療法にはなっていない。また、キラー活性のある自家 TIL の安定的な大量増殖が困難と考えられ、彼らはすでに遺伝子組み換えによる他家 T リンパ球の応用検討に踏み込んでいる (4)。

ここでは、このような現状を踏まえた上で、筆者らが開発した術後ホルマリン固定がん組織を抗原として応用した「自家がんワクチン (AFTVac)」について紹介したい。

1. 自家がんワクチンの開発

体内のがん細胞を殺せる主たるキラーリンパ球は、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) とナチュラルキラー細胞 (NK) である。上述の TIL はその中に CTL を含むが故にキラー活性を示すと考えられている。

筆者の一人 (T.O.) は、1992 年以来、理化学研究所・細胞開発銀行で、ヒトリンパ球無血清培養培地とリンホカイン活性化キラーリンパ球 (LAK) 細胞培養技術の開発 (5, 6)、がん細胞特異的ヒト CTL の誘導培養 (7)、ヒト NK 細胞による安全性試験法の開発 (8)、そして病理切片上のヒトがん細胞に対する自家 CTL の誘導培養法の開発 (9, 10) を行ってきた。しかし、生きている細胞の体外培養というプロセスを経る以上、高コストとなる点は避けられない。そこで、筆者らは 2001 年 7 月、理研ベンチャー・セルメディシン株式会社を設立、生きている細胞を含まない「自家がんワクチン療法」の開発を行ってきた。動物実験では、ホルマリン固定したマウス肝がん細胞 Hepa 1-6 から作成したオリジナルワクチンをあらかじめマウスに投与した後、Hepa 1-6 細胞をマウス肝内に直接チャレンジした結果、腫瘍の増殖は阻止されることが明らかになっている (表 1)。このときの splenocyte を培養したところ、Hepa 1-6 肝がん細胞特異的な CTL 活性と YAC-1 細胞を殺せる NK 細胞活性の上昇が観察されている (図 1)。

表1 ホルマリン固定肝がん (Hepa 1-6 細胞) ワクチン投与後、生きている肝がん細胞を肝内チャレンジしたマウスにおける肝がん形成阻害

	Tumor-free/total	Tumor volume (mm ³) (Mean ± SD)
Control	0/15	307 ± 206
Vaccine	13/15	2 ± 6

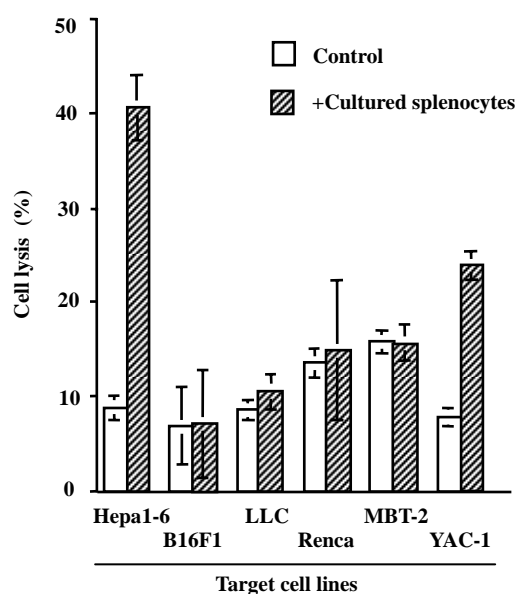


図1 ホルマリン固定 Hepa 1-6 細胞ワクチン接種後のマウス由来培養 splenocyte 中の CTL 活性と NK 細胞活性

培養 splenocyte は抗原とした Hepa 1-6 肝がん細胞を殺したが、B16F1 メラノーマ細胞、LLC 肺がん細胞、Renca 腎がん細胞、MBT-2 膀胱がん細胞には、対照に比べて強い殺傷活性を示さない。すなわち、Hepa 1-6 細胞特異的な CTL がいることがわかる。しかし、NK 細胞に感受性のある YAC-1 細胞も殺しているため、培養 splenocyte 中には活性化 NK 細胞も含まれていることを示している。

このような基礎研究の結果をうけて、自家がんワクチン療法の概念を確立 (図2)、倫理審査を経た後に、臨床研究 Phase I/IIa を開始した。術後肝癌患者からインフォームドコンセントを得た上で、ホルマリン固定してある摘出組織 (病理検査用標本の残り) から「自家がんワクチン (AFTVac)」を作製し、当該患者 (自家) 上腕皮内 5ヶ所に投与したところ、注射部位の紅斑と、12 例中 2 例でわずかに投与部位の表皮落屑が見られたが、問題となるレベルの有害事象 (米国 CTC 基準で grade 3 以上) は何ら認められなかった。しかも、歴史対照群に比べ有

意に肝がん再発抑制効果が観察された(11)。

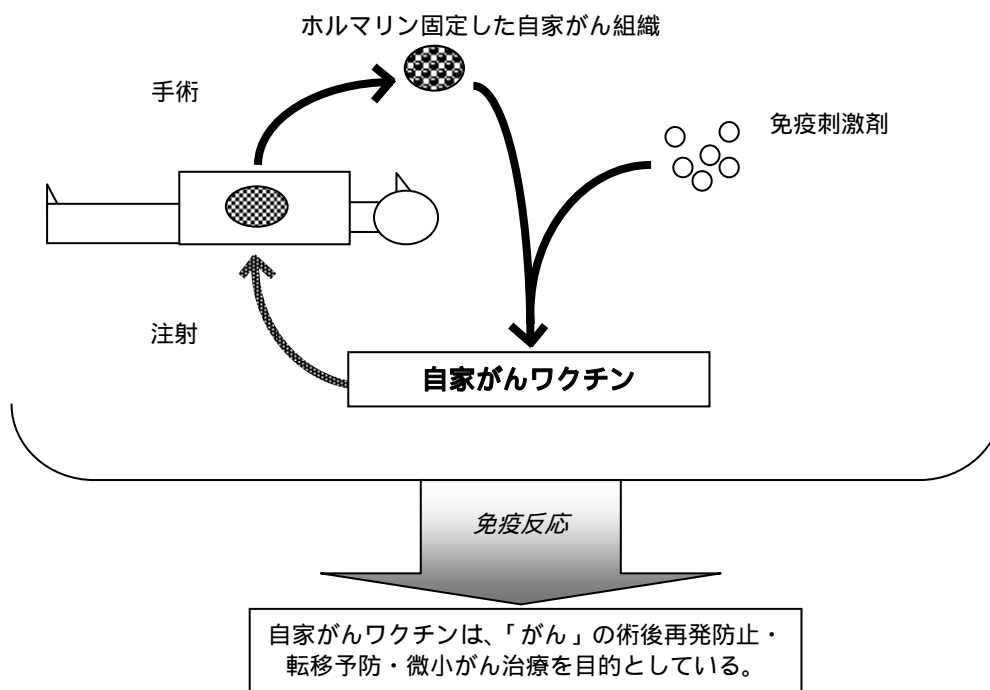


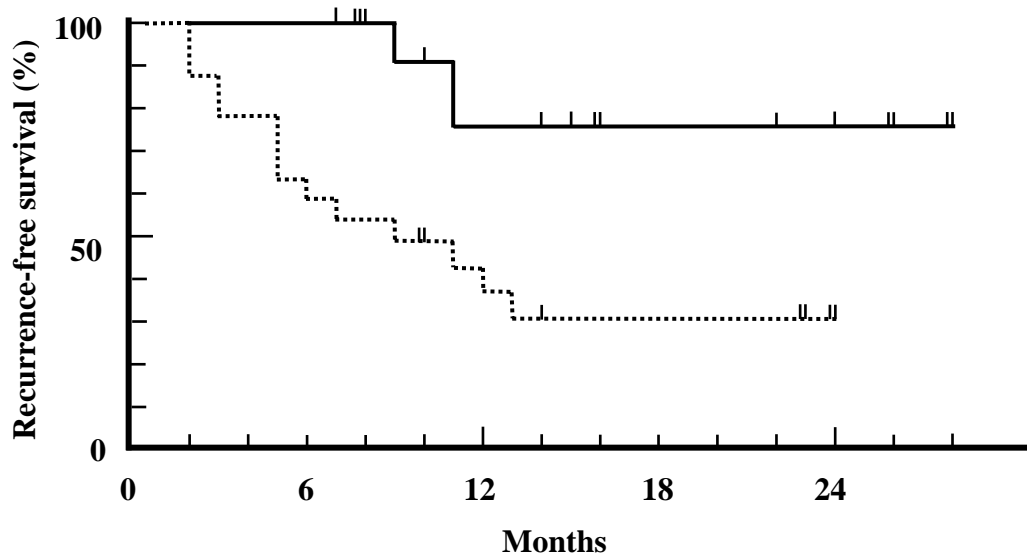
図2 自家がんワクチン療法の概念図

2. AFTVacによる術後肝がん再発抑制効果 -- ランダムイズドスタディ

臨床研究 Phase I/IIa の結果、AFTVac の安全性に問題がなかったため、肝がん術後症例をランダムに2群にわけ、Phase IIb 試験で再発抑制効果を観察した。図3がその結果である。図中の実線は、AFTVac 接種症例(18例)で、点線は同一病院の同一外科のランダムに選ばれた対照群(21例)である。いずれもB型肝炎の既往歴が高い症例だが、2群の間のベースラインデータには差がないことを確かめてある(12)。

その結果、AFTVac 接種群では、15ヶ月間の観察期間(中央値)で対照群に比し、log-rank test で $p=0.003$ と、明らかに再発抑制効果があることが示され(図3a)、全生存率でも $p=0.01$ と明瞭な有意差があった(図3b)(12)。しかも、全症例中、手術時の腫瘍径が50mm以上あった症例では、対照群では91%が再発したのに対し、ワクチン接種群では33%に抑制された(Logrank test、 $p=0.003$ 、表2)。これらの結果はEvidence-Based Medicineを追求する上では初期の段階ながら、確かな効果を示す基本的な臨床データとなっている。

a



b

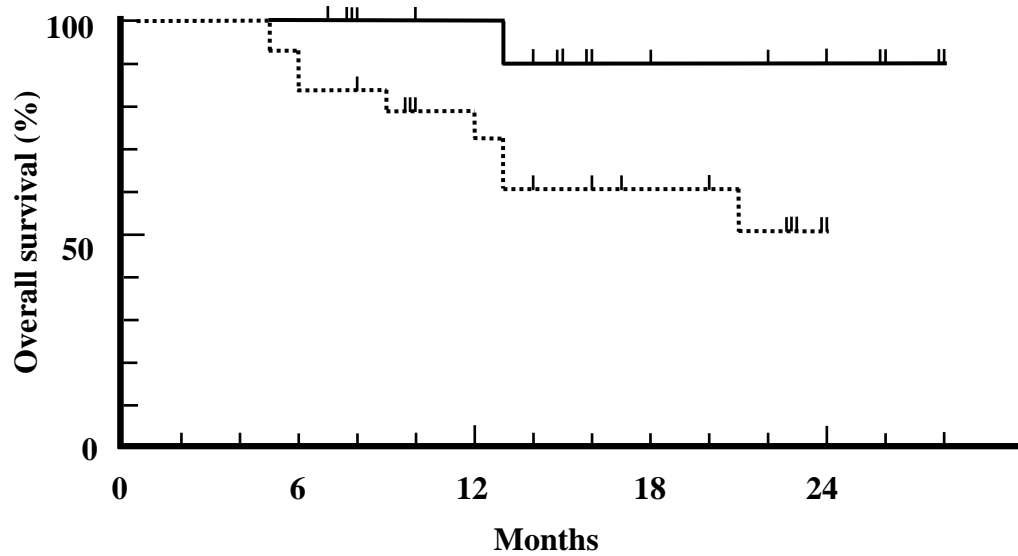


図3 AFTVacによる術後肝がん再発抑制効果

ランダム化対照比較試験。実線はAFTVac群 (n=18)、点線は対照群 (n=21)。a. 再発抑制効果 (p=0.003)。b. 全生存率 (p=0.01) 明瞭な延命効果を示している。

表2 手術時に大型腫瘍径であった症例でも再発を抑制した

Patient group	Vaccine	Control	<i>P</i> value ^b	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> value ^c
All patients	3/18 (17%)	13/21 (62%)	0.003	0.19 (0.05-0.67)	0.01
Tumor size 50 mm ^a	3/9 (33%)	10/11 (91%)	0.003	0.19 (0.05-0.69)	0.01

^a Included multiple tumors. ^b Log-rank test. ^c Wald test.

3. 術後再発を繰り返した肝がん症例における再発抑制効果

上述の術後再発予防効果は、AFTVacによって体内で誘導されたCTLが、微小転移した肝がん細胞を殺傷したためと推定される。そうであるならば、術後再発を繰り返している肝がん症例（すなわち肝全体に微小転移巣が広がっていると推定される症例）でも、自家がんワクチン療法は有効となると想定される。しかし、AFTVacを皮内接種したときわずかな紅斑のみしか惹起せず、一見弱々しい作用から使用している免疫賦活剤が弱すぎるのではないかとの指摘が図3の臨床試験の担当医からあった。そこで、免疫賦活剤中のツベルクリンタンパク量を強化した改良型AFTVacを開発し、我々はこれを用いて、術後がん患者のために自由診療ベースで治療を開始した。

そのなかで観察された典型例が図4の症例である。HbsAg(-)、HCVAb(-)のアルコール性肝硬変患者で、初発S6肝がんに対し2001年4月にTAE施行、5月25日に肝後区域を切除している。以後、2003年2月再発S3にTAE施行、6月再発S4にTAE、12月S2など左葉に再発TAE、2004年4月再発S4にTAE、CTガイド下PEIT施行、9月S3の新たな場所に再発TAE施行した。2003年2月の初回再発後の再発イベントは4-6ヶ月ごとに4回あった。これだけ再発を繰り返していれば、全肝に微小転移巣が広がっていると考えられる。そこで、2004年11月～2005年1月にかけて自家がんワクチン療法を施行した結果、2005年1、5、9、12月のCT検査で再発は確認されず、2006年2月に肝左葉外側（新たな部位）に再発をきたしている。ワクチン接種開始後からこれに至る間（15ヶ月）、AFTVacは有効であったと考えられる。なお、最後の再発部位は放射線照射で治癒、その後腫瘍マーカーも落ち着いており再発は2006年12月現在も認められていない。

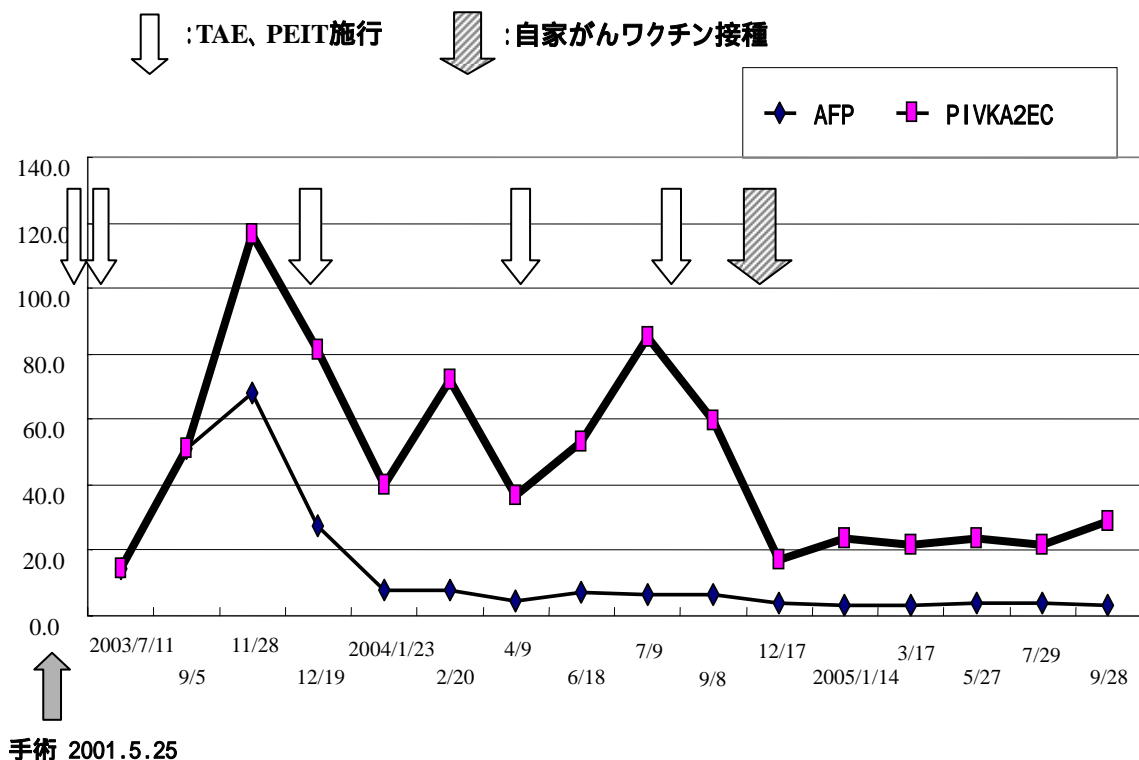


図4 術後肝がん再発を5回繰り返した症例における自家がんワクチン接種後の腫瘍マーカーの変化

4. 自家がんワクチンのBRM作用

図1に示した動物実験では、NK細胞の活性化が示されており、AFTVacには非特異的なBRM(生物反応修飾物質)作用があることが予測される。実際、我々は、2004年11月から2006年10月までの間に東京・文京クリニックにて自家がんワクチン療法を受診し、その前後で各種免疫パラメータの検査を実施し得た9症例(併用療法なし)について解析したところ、図5の結果を得た。

対象は、がん種が肝2、大腸3、腎2、胃1、肺1例という末期がん症例群である。年齢は40~77才、性別(M/F):4/5、Karnofsky Performance Scale 70~100%、がん再発あり/なしの比が8/1である。

結果は、まず、固定自家がん組織自体に対するdelayed-type hypersensitivity(DTH)反応(固定自家がん組織のみの断片を皮内接種し判定)の強さを、ツベルクリン反応にならって皮膚紅斑の最大径が10mm以上となった場合を陽転したと定義すると、陽転例は55%であったが、詳細に観察すると、AFTVac接種前後で、全例でDTH反応は亢進していた。この結果

は、AFTVac には、確実に体内免疫系の刺激効果があることを示している。

また、この末期がん症例群においては、末梢血リンパ球数 (mean ± SD) が、接種前 845 ± 188 、接種後 1077 ± 173 と有意に増加した (図 5 a、 $P=0.027$)。しかも、Th1/Th2 比 (mean ± SD) が接種前 8.96 ± 1.45 、接種後 10.89 ± 1.85 と有意に高くなっていた (図 5 b、 $P=0.03$)。このとき、有意差はなかったものの IFN 産生能、NK 活性および IL-12 産生能は接種後の上昇傾向が観察されている (図 5 b)。

なお、Th1/Th2 比とは、末梢血 T 細胞群のなかで、細胞性免疫反応の活性化を示す CTL 誘導に強く働くヘルパー型 T 細胞 (Th1) と、液性免疫反応を刺激するヘルパー型 T 細胞 (Th2) の存在比を、血中サイトカインレベルの測定値から算出したものである。この比が高くなるということは、細胞性免疫反応 (すなわち、キラー T 細胞誘導につながる) に対して有利に働くことを示唆している。すなわち、AFTVac には非特異的にキラー細胞誘導を強化する BRM 作用があると考えられる。

これらのデータは、実験動物ではなくヒト臨床で、しかもがん種が多岐にわたる末期がん症例群であるにも関わらず、一部とはいえ統計学的な有意差がある点で、AFTVac には強力な免疫刺激効果があることを示しており、大きな意義があると思われる。

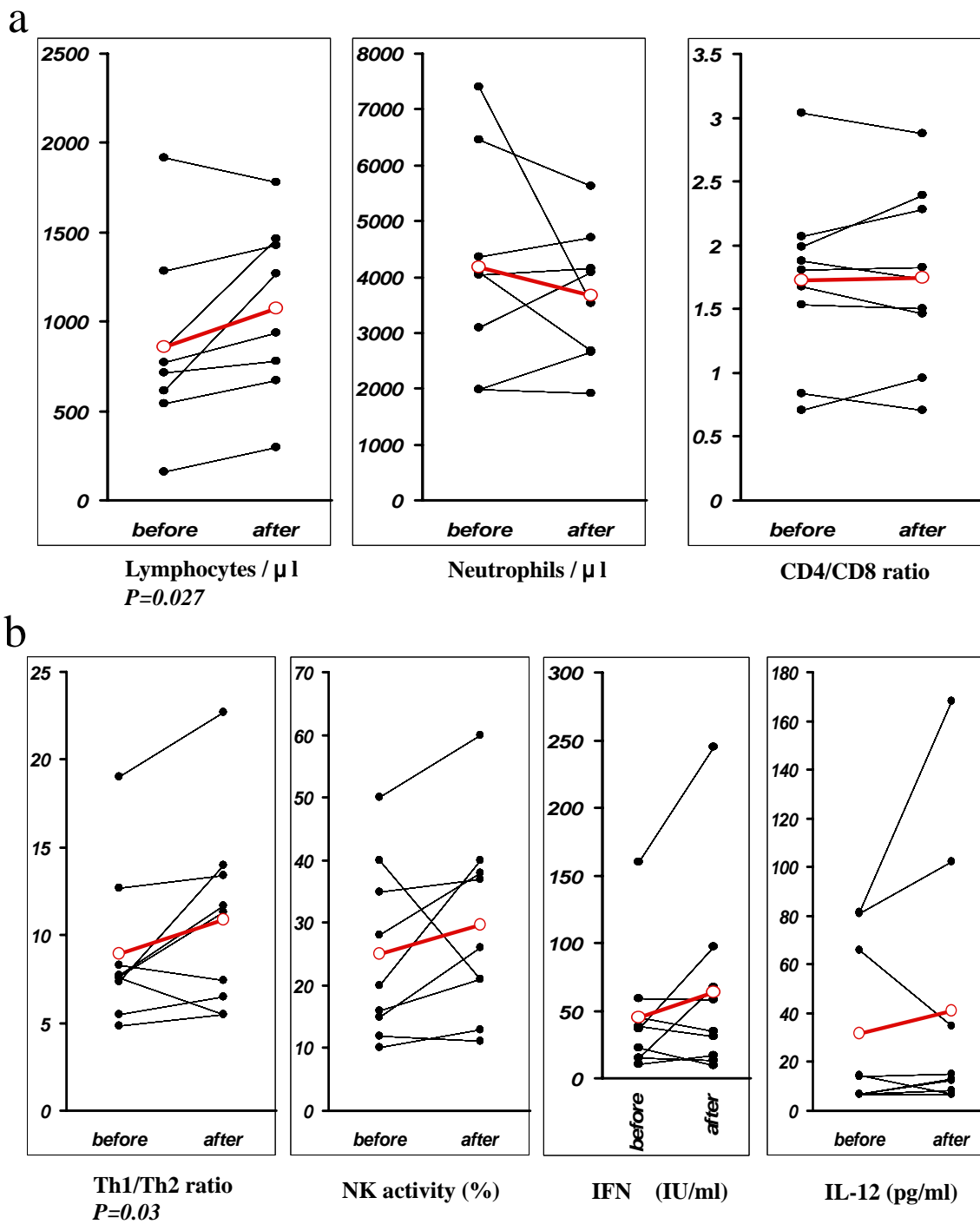


図5 末期がん症例における自家がんワクチンのBRM効果
末梢血リンパ球数 (a) と Th1/Th2 比 (b) で有意差がある。

5 . 他のがん種に対する AFTVac の効果

いかなるがん種であれ、患者自身のがん組織と当該患者自身の正常組織とは、組織としての差がある以上、発現分子の差が必ずある。発現分子の差が質的差であれ量的差であれ、それががん抗原として体内の免疫機構に認識されれば、原理的には、がん免疫反応が成立するはずである。したがって、がん抗原(ここではホルマリン固定がん組織 1g 以上)さえあれば、AFTVac はいかなるがん種にたいしても作成可能である。

上述のように、AFTVac には術後肝がん再発抑制効果、BRM 作用があることは判明したが、他のがん種に対する効果はどうであろうか。

この点について、脳腫瘍では高難治性で最悪中の最悪のがんとされ、従来手術・放射線療法・化学療法を組み合わせても治療不可能と言われる多型神経膠芽腫(グレード IV)について、筑波大脳神経外科では、初発・再発症例 11 例中、完全寛解(CR)1 例、部分寛解(PR)2 例、奏効率 27%という治療効果を観察している(投稿中)。また、これを受けて多型神経膠芽腫(グレード IV)に関する多施設臨床研究も始まっている(UMIN-CTR 試験 登録 ID C000000002)。

その他のがん種については、このようなまとまった臨床研究は未だ行われていないが、自由診療ベースで「自家がんワクチン療法」を受診した症例で任意に予後報告を受けた症例について、セルメディシン株式会社が“ソフトクライテリア”の観点からまとめた表が公開されている(13)。

“ソフトクライテリア”とは、全生存率(overall survival)や腫瘍縮小効果を表す奏効率(response rate)により統計学的に厳密な評価を下すことができる評価基準(“ハードクライテリア”)に対し、臨床的に見て明らかになんらかの改善効果が認められた症例の割合を表したもので、筆者の一人(T.O.)が創案した。ここでいう“なんらかの改善効果”とは、CR・PRに代わる評価法として、「がんの一部縮小(MR)」、「長期不変(long SD)」、「生活の質(QOL)の明瞭な改善(Karnofsky Performance Scale 値の上昇)」、「痛みの消失等の臨床症状の大幅改善」、「医師の予測よりも2倍以上の期間生存」、「腫瘍マーカーの明瞭な低下」等の、ややあいまいな評価基準を集め合算したものである。

評価基準がややあいまいなため厳密な学術的批判に耐え得るハードなものではないが、ある治療法について、対象とした症例全体としての反応傾向をソフトに推測するには簡便な方法である。実は QOL のように“ヒトでなければわからない効果”を推測するには有用で、特にまだ少数例の臨床経験しかない状況では、がんに対する何らかの改善効果を集めてみると、新しいがん免疫療法が望ましいものであるか否かという全体の傾向がつかめる。

「自家がんワクチン療法」を受診した全 275 症例中、経過報告があった 84 例について、2006 年 5 月 23 日時点の集計結果を表 3 に示した。35.7%でなんらかの改善効果が認められている。これに短期不変例(WHO 基準でいう治療開始後 4 週間不変の症例)も加えると 54.8%に達する。

また、重要な点は、どのがん種であれ、ワクチン接種局所の発赤紅斑や一過性発熱があるも

の、これまでに問題となるレベルの有害事象（米国 CTC 基準で grade 3 以上）は全く認められなかったことである。もちろん自己免疫疾患様の症状を示したという報告例もない。AFTVac の安全性は高いと考えられる。

表3 “ソフトクライテリア”による自家がんワクチンの効果

2006年5月23日時点

がん種	全症例数	経過報告		経過報告ありの症例中		
		あり	なし	改善	不変	悪化
大腸	47	16	31	6	1	9
脳	53	21	32	5	2	14
乳	24	10	14	4	4	2
肺	22	9	13	2	4	3
胃	21	10	11	1	2	7
肝	19	7	12	5	2	
腎臓	10	2	8	2		
子宮	9		9			
膵臓	8	1	7	1		
卵巣	6	2	4	1		1
甲状腺	3	1	2	1		
胆管	9	1	8	1		
リンパ腫	2		2			
口腔	2		2			
骨肉腫	2		2			
筋肉腫	2	1	1		1	
尿管	2		2			
メラノーマ	2		2			
原発不明	4	2	2			2
その他 *1	10	1	9	1		
未投与 *2	18		18			
合計	275	84	191	30	16	38
		経過報告症例中の改善率		35.7%		
		経過報告症例中の「改善+不変」では			54.8%	

注： *1：腹膜、食道、胸腺、皮膚、脊髄、喉頭、陰茎、膀胱、前立腺、鼻腔/中耳

各1例

*2：投与前死亡など

おわりに

がんの新規治療法の可否を評価しようとするれば、厳密な“ハードクライテリア”によらねばならない。“ソフトクライテリア”を用いて科学的な評価を行うのは困難だが、ヒトは実験動物のように扱うわけにはいかないがゆえに、わずかの症例を対象に慎重に新しい治療法を適用し、安全性を確かめつつ、効果の有無を丁寧に調べていくのが常道となっている。このような場合に、“ソフトクライテリア”で見た場合でさえ効果がない治療法は論外である。

“ソフトクライテリア”でみた場合の効果は、がん患者の傍で常に患者を見ている家族の実感をよく反映するのではなかろうか。CT画像上は長期不変で結果的に再発をきたし永眠した症例であっても、遺族から「これほど良くしていただいた」と深い謝意を表される経験が多いことから、そう推察されるのである。

文献

1. Slingluff CL Jr, Engelhard VH, Ferrone S.: Peptide and dendritic cell vaccines. *Clin Cancer Res.* 12(7 Pt 2):2342s-2345s, 2006.
2. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 10:909-15, 2004.
3. Dudley ME, et al.: Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 23:2346-57, 2005.
4. Muranski P, et al.: Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy – how far can we go? *Nature Clin. Pract. Oncol.* 3:668-681, 2006
5. Kawai K, et al.: Additive effects of antitumor drugs and lymphokine-activated killer cell cytotoxic activity in tumor cell killing determined by lactate-dehydrogenase-release assay. *Cancer Immunol. Immunother.* 35:225-229, 1992.
6. Liu SQ, et al.: Long-term serum/plasma-free culture of human cytotoxic T lymphocytes induced from peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 39:279-285, 1994.
7. Liu SQ, et al.: Intelligent matrices for tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Materials Sci. Engineer.* C2:61-65, 1994.
8. Kobayashi Y, et al.: Evaluation of in vitro toxicity of 12 MEIC compounds on human natural killer cell function. *In Vitro Toxicol.* 8:31-36, 1995.
9. Liu SQ, et al.: Induction of human autologous cytotoxic T lymphocytes on formalin-fixed and paraffin-embedded tumour sections. *Nat. Med.* 1: 267-271, 1995. (Corrigendum, *ibid.*, 2:476, 1996)
10. Liu SQ, et al.: Tumor-specific autologous cytotoxic T lymphocytes from tissue section. *Nat. Med.* 2:1283-1283, 1996.
11. Peng BG, et al.: Autologous fixed tumor vaccine: a formulation with cytokine-microparticles for protective Immunity against recurrence of human hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 93:363-368, 2002.
12. Kuang M, et al.: Phase II randomized trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for post-surgical recurrence of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10:1574-1579, 2004.
13. <http://www.aftvac.com/vaccine2-2efficacy.htm>