

平成21年 6月 8日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791097
 研究課題名 (和文) 腎細胞癌に対する免疫細胞療法と血管新生阻害薬の新規併用療法の開発にむけた基礎研究
 研究課題名 (英文) Basic research for development of the novel cell therapy with anti-angiogenic drugs in renal cell carcinoma
 研究代表者
 及川 剛宏 (OIKAWA TAKEHIRO)
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
 研究者番号：00361345

研究成果の概要：転移を有する進行腎細胞癌患者に対して、活性化自己リンパ球療法を実施した。その際に患者の血漿を採取してサイトカインを測定し、一部の症例で IFN γ および IL-6 の変動を確認した。腎癌細胞株において、血管新生阻害薬であるソラフェニブに対する感受性を確認した。ソラフェニブを添加した腎癌細胞株において、活性化リンパ球による傷害性の増強が認められ、免疫細胞療法と血管新生阻害薬の新規併用療法の可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	180,000	1,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：泌尿器科学、癌、免疫学、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

難治性癌に対する新しい治療体系として免疫細胞療法にかけられた期待は大きい。既に我々は転移期腎細胞癌（腎癌）および内分

泌療法抵抗性再燃前立腺癌（前立腺癌）を対象として細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) や Natural Killer (NK) 細胞を選択的に誘導する系を開発するとともに、臨床応用を行って

きており、現在、活性化 NK 細胞療法の早期第 II 相臨床試験が進行中である。

現在までに、活性化 NK 細胞療法によって一部の症例には臨床的有効性も認められているが、さらなる効果の増強を目指した新たなアプローチが必要である。一方、海外では腎癌に対して VEGF (vascular endothelial growth factor) 等の受容体関連シグナルを阻害する分子標的薬剤 (ソラフェニブ、スニチニブ) が臨床応用段階にあり、高い有用性が報告され、期待が寄せられている。

今回、分子標的薬剤による抗腫瘍免疫誘導能の有無を検討し、活性化 NK 細胞療法との新規併用治療を開発することを目的とした研究計画を立案するに至った。

2. 研究の目的

VEGF を標的とした抗血管新生治療との併用により、より有効性の高い免疫細胞療法の開発を目指し、以下の基礎的検討を行う。

(1) 腎癌患者血漿のサンプル採取とサイトカイン、バイオマーカーの測定

(2) 腎癌細胞株の VEGF 蛋白産生量の測定

(3) ソラフェニブの添加による腎癌細胞株の MHC class I 発現の解析

(4) ソラフェニブの添加による *in vitro* での NK 活性の検討

3. 研究の方法

(1) 腎癌患者血漿のサンプル採取とサイトカイン、バイオマーカーの測定

腎癌患者の血漿を採取し、IFN γ 、TNF α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 を、Cytometric Bead Array 法を用いて同時に測定した。

(2) 腎癌細胞株の VEGF 蛋白産生量の測定

本研究の計画では 2-oxoglutarate を用いる予定であったが、海外において既に腎癌の抗 VEGF 分子標的治療に用いられているソラフェニブの供与が得られた。より臨床応用に近い研究を目的としているため、今回はソラフェニブを用いて検討した。

腎癌の初代培養株および IFN α に対する感受性・非感受性の細胞株、計 14 株について、ソラフェニブ添加後の細胞増殖を、添加量および培養時間別に WST-8 assay で測定した。また、ソラフェニブ添加後に発現が変化する遺伝子の定量 PCR を行い、ソラフェニブ感受性に関わる候補遺伝子をピックアップした。

上記の腎癌細胞 14 株について、ソラフェ

ニブ添加量 (0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M) および培養時間 (0, 8, 24, 72 時間) 別に培養上清を採取した。

(3) ソラフェニブの添加による腎癌細胞株の MHC class I 発現の解析

上記の腎癌細胞株にソラフェニブを添加し、MHC class I 発現の変化を検討するための条件設定を行った。

(4) ソラフェニブの添加による *in vitro* での NK 活性の検討

ソラフェニブ非感受性腎癌細胞株と NK 細胞感受性ウィルムス腫瘍細胞株を用い、それぞれソラフェニブを 0, 1, 10 μ M 添加して 42 時間培養した。これらの細胞にあらかじめ培養したヒト NK 細胞を加え、標的細胞の傷害活性を WST-8 assay で測定した。

4. 研究成果

(1) 活性化 NK 細胞療法の実施、ならびに腎癌患者血漿のサンプル採取とサイトカイン、バイオマーカーの測定

これまでに再発悪性脳腫瘍 8 例、サイトカイン療法抵抗性の転移期腎癌 3 例、内分泌療法抵抗性の再燃前立腺癌 3 例、計 14 例に対し、のべ 18 コースの活性化 NK 細胞療法を施行した。投与したリンパ球数は 1 クールあたり平均 2.4×10^9 個であり、表面マーカーは CD3⁺CD56⁺ 76.0% (平均)、リンパ球の NK 活性は E/T 比=8 において 84% 程度であった。比較的簡便な培養法により、いずれの症例においても安定したリンパ球増殖が得られ、高い細胞傷害活性を有する NK 細胞が選択的に誘導された。抗腫瘍効果としては、脳腫瘍の 1 例に病変の完全な消失 (Complete Response: CR) が得られ 3 年以上にわたって維持されているほか、5 例では近接効果において病変の有意な進行がみられなかった (Stable Disease: SD)。また、腎癌の 2 例に 20 ヶ月及び 6 ヶ月間の SD が認められた。残りの 8 例では病変の進行を認めたが、前立腺癌の 2 例では下肢のリンパ浮腫の軽快と腫瘍マーカーの一時的な低下がそれぞれ観察された。いずれも予後不良な症例を対象としているが、現時点で 7 例 (50%) において 1 年以上の生存が認められている。なお、本臨床試験の中止を要する重篤な全身性の有害反応は認められなかった。

また、治療前後に血清サイトカインの測定を行った結果、臨床効果が得られた症例では経過に一致して持続する血清 IFN γ の濃度上昇がみられ、効果のなかった症例ではこれがみられなかった。これにより、本治療において血清サイトカインをモニタリングするこ

とによって臨床効果の予測や治療スケジュールの立案など、よりテーラー化した治療が実施できる可能性が示唆された。



図1 活性化NK細胞療法の治療成績

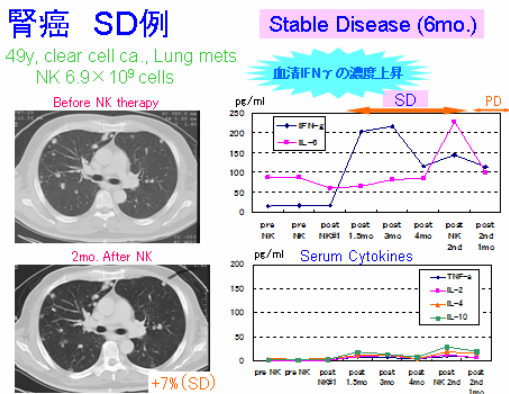


図2 腎癌SD例におけるサイトカインの推移

(2) 腎癌細胞株のVEGF蛋白産生量の測定

腎癌の初代培養株およびIFN α に対する感受性・非感受性の細胞株、計14株について、ソラフェニブ添加後の細胞増殖を、添加量および培養時間別にWST-8 assayで測定した。その結果、10 μ M添加、72時間後に細胞増殖の差が顕著に認められた。この細胞増殖性の結果から、ソラフェニブ感受性細胞株1種および非感受性細胞株2種が同定された。上記の腎癌細胞14株について、ソラフェニブ添加量(0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M)および培養時間(0, 8, 24, 72時間)別に培養上清を採取した。現在、VEGF蛋白量の測定と解析を継続中である。

腎癌細胞のSorafenib感受性

腎癌細胞14株のSorafenibに対する感受性をスクリーニング

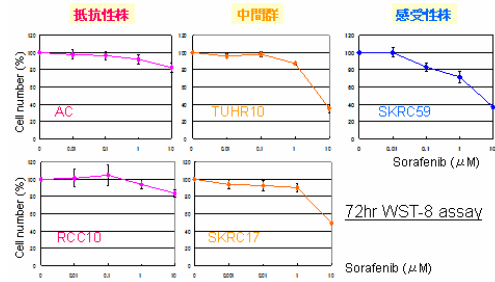


図3 腎癌細胞株のソラフェニブ感受性

(3) ソラフェニブの添加による腎癌細胞株のMHC class I発現の解析

上記の腎癌細胞株にソラフェニブを添加し、MHC class I発現の変化を検査するための条件設定を行った。現在、FACSでの測定と解析を継続中である。

(4) ソラフェニブの添加によるin vitroでのNK活性の検討

ソラフェニブの添加によりいずれの標的細胞においてもNK細胞による傷害活性が増強する傾向がみられた。特にソラフェニブ10 μ Mの添加により、24-30%の細胞傷害活性増強が認められた。この結果から、ソラフェニブの併用がNK細胞療法の効果をin vitroで増強する可能性があることが示唆された。

Sorafenib前処理によるNK活性の増強

Sorafenib 10 μ Mを標的細胞に前処理した際のNK活性を検討

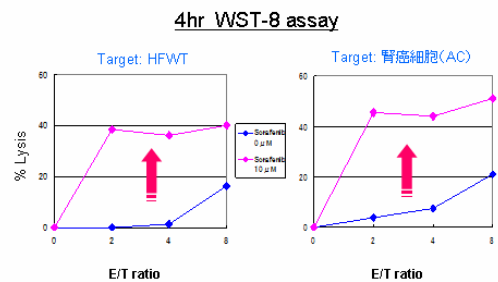


図4 ソラフェニブ処理によるNK活性の増強

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. Kojima T, Shimazui T, Hinotsu S, Joraku A, Oikawa T, Kawai K, Horie R, Suzuki H, Nagashima R, Yoshikawa K, Michiue T, Asashima M, Akaza H, Uchida K. *Oncogene* 28(2) 297-305, 2009 査読有
- ② 臨床医学の展望2009 —診断および治療上の進歩【1】泌尿器科学 赤座英之, 島居 徹, 宮永直人, 河合弘二, 関戸哲利, 末富崇弘, 及川剛宏, 常樂 晃, 樋之津史郎 日本医事新報 4424, 39-44, 2009 査読無
- ③ Background Variables for the Patients with Invasive Bladder Cancer Suitable for Bladder-preserving Therapy. Naoto Miyanaga, Hideyuki Akaza, Shiro Hinotsu, Akira Joraku, Takehiro Oikawa, Noritoshi Sekido, Koji Kawai, Toru Shimazui. *Jpn J Clin Oncol* 37, 852-857 (2007) 査読有
- ④ Three-weekly Docetaxel with Prednisone is Feasible for Japanese Patients with Hormone-refractory Prostate Cancer: A Retrospective Comparative Study with Weekly Docetaxel Alone. Toru Shimazui, Koji Kawai, Naoto Miyanaga, Takahiro Kojima, Noritoshi Sekido, Shiro Hinotsu, Takehiro Oikawa, Akira Joraku and Hideyuki Akaza. *Jpn J Clin Oncol* 37, 603-608 (2007) 査読有
- ⑤ Prediction of in vitro response to interferon- α in renal cell carcinoma cell lines. Toru Shimazui, Yoshihiro Ami, Kazuhiro Yoshikawa, Kazuhiko Uchida, Takahiro Kojima, Takehiro Oikawa, Kogenta Nakamura, Nobuaki Honda, Shiro Hinotsu, Jun Miyazaki, Noriko Kunita, Hideyuki Akaza. *Cancer Sci* 98, 4529-534 (2007) 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 難治性悪性腫瘍に対する活性化NK細胞療法. 及川 剛宏, 河合 弘二, 島居 徹, 赤座 英之. 第46回日本癌治療学会総会. 2008.10.31 (名古屋)
- ② 活性化ナチュラルキラー細胞療法の早期第II相臨床試験. 及川剛宏, 河合弘二, 島居 徹, 赤座英之. 第21回日本バイオセラピー学会 学術集会総会 2008.11.18-19 (東京)
- ③ Autologous activated natural-killer cell therapy for recurrent renal cell carcinoma, prostate cancer and

malignant brain tumor. Oikawa T, Kawai K, Sekido N, Hinotsu S, Miyanaga N, Shimazui T, Akaza H. The 24th Korea-Japan Urologic Congress, Chungbuk, Korea, 2007.10.6

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 剛宏 (OIKAWA TAKEHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：00361345

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし