

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591552

研究課題名（和文）免疫細胞活性化カラムを用いた体外循環治療技術を併用した癌ワクチン療法の開発

研究課題名（英文）The development of novel cancer vaccine therapy using extracorporeal circulation system with immunosuppressive substance absorption column

研究代表者 伊藤 剛（ITO TSUYOSHI）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40420707

研究成果の概要（和文）：基礎実験から、担癌患者の血清中で増加している免疫抑制液性因子、すなわち Vascular endothelial growth factor (VEGF), Tumor growth factor-beta (TGF-β), Interleukin-6 (IL-6)などの諸因子が、宿主の免疫反応を抑制し、癌ワクチン療法の効果を制限している可能性が考えられた。われわれの開発した、ポリスチレン系極細繊維に官能基を付加して作製した、免疫抑制物質吸着カラムは、これらの抑制因子を効果的に吸着し、生体の免疫反応を増強する事が明らかとなった。さらに、免疫抑制物質吸着カラムにリポタイコ酸を固定化した繊維カラムを併用して作製したハイブリッドカラムを使用し、体外循環で処理した個体において誘導される細胞は、細胞性免疫と液性免疫の両面において、その機能が活性化されている事がわかった。すなわち、前述の抑制物質の吸着による効果のみならず、T細胞刺激試験や、PHA 幼若化反応などの増強効果を認め、正の免疫反応促進効果を有する事が明らかとなった。ラットを用いたインビトロおよびインビボにおける動物実験からは、同カラムの有する免疫抑制物質吸着作用による免疫増強効果が、癌ワクチンの免疫学的効果の補強に有効である事がわかった。さらにこれらによるワクチン効果が実際の動物実験において抗腫瘍効果を発揮しうる事も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In vitro experiments focusing on the immunological effects using lymphocytes derived from cancer bearing patients suggested that immunosuppressive factors increased in those patients limited the therapeutic effects of cancer vaccine therapy. We developed hybrid column consisted of immunosuppressive substance absorptive column covered with lipoteicoic acids for immunotherapy of cancer. Lymphocytes induced by hemoperfusion treatment using immunosuppressive substance absorption (ISA) column hold enhanced activity in humoral and cellular immunity. This column has been proven to hold immunostimulative activities determined by mixed lymphocyte reaction (MLR) and PHA test. Cancer vaccine effects in vitro as well as in vivo were also demonstrated in experiments using tumor bearing rats. Furthermore, in vivo anti-tumor effect induced by ISA column was also suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：①実験外科学②外科腫瘍学③腫瘍免疫学

1. 研究開始当初の背景

我々は、1990年代前半の培養 T 細胞を用いた AIT の時代を経て、1998年 10月に本邦でいち早く、「CEA 陽性上皮性癌に対する樹状細胞と CEA 由来ペプチドを用いた癌ワクチン療法の臨床試験」を開始した。18例の CEA 陽性の消化器癌、肺癌患者を対象とし、末梢血単球由来未成熟 DC と HLA-A2401 拘束性の CEA 由来腫瘍拒絶抗原ペプチドの組み合わせで治療を行った。すべて前治療（化学療法、放射線療法）不応性の転移巣を有する難治性再発腺癌症例であり、ワクチン投与回数は 5~39 回におよんだ。残念ながら明らかな腫瘍の退縮をきたした症例は得られなかったが、ペプチド特異的な免疫学的効果とともに血清 CEA 値の低下をきたした症例を数多く経験した。また、CEA 低下症例においては無効例に比し生命予後が明らかに改善した。治療方法の改変を種々重ね、また、極めて悪性度が高い食道原発メラノーマに対する MAGE ペプチドを用いた DC ワクチン療法の有効性も明らかにしたが、その限界を痛感し、現在は後述する体外循環治療の開発研究へ移行している。

一般に担癌患者の血清中で増加している免疫抑制性因子が癌ワクチン療法の効果を制限している可能性が考えられた。我々はこれらの因子を吸着する免疫抑制物質吸着カラムにリポタイコ酸を固定化した繊維カラムを併用したハイブリッドカラムの開発に着手して来た。このハイブリッドカラムを用いる事でさらに細胞性免疫を担うエフェクター細胞を活性化させる事ができ、これをインビボで応用する事により、癌ワクチン療法の効果を増強しうる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

直径 3 から 5 μ m のポリスチレン系極細繊維に、TGF (Tumor growth factor)-beta 吸着剤を付加したカラムに、さらにリポタイコ酸を利用した免疫賦活作用を有するハイブリッドカラムを作製し、ラットに使用する事により惹起される免疫反応について、細胞性免疫および液性免疫の両側面からその効果を解析する事を目的とする。

3. 研究の方法

われわれの既報 (Oncol Rep 2006;16:1277-1284) に準じて、ラットの体外循環を、カラムを用いて行った。

①ハイブリッドカラム単独治療により惹起される免疫学的パラメータの変化について

1) 免疫制御性液性因子の変化についての検討

カラムで処理した動物個体から採取した血清中の各種サイトカイン濃度を測定した。ハイブリッドカラムによる効果として、TGF-beta, IL (Interleukin)-6, Vascular endothelial growth factor (VEGF) などの因子が効果的に吸着される事、すなわち、処理した個体中で血清中の免疫抑制性サイトカインの濃度が低いことがわかった。

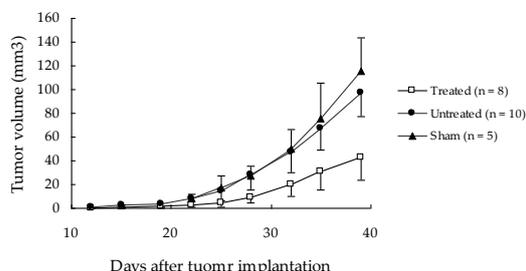
2) 抗原提示機能の変化についての検討

②ハイブリッドカラムによる治療を受けたラットにおける抗原刺激に対する免疫応答の検討

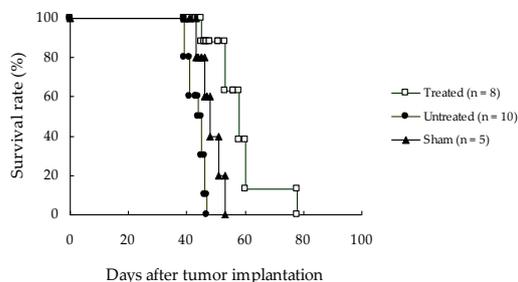
ハイブリッドカラム治療後の個体から採取された免疫担当細胞であるリンパ球を使用した抗原刺激試験では、T 細胞刺激効果の増強が示唆される結果を得る事ができた。

③ラット腫瘍移植モデルにおける癌ワクチン療法との併用効果についての検討

ハイブリッドカラムによる腫瘍の治療実験では図のごとく、腫瘍縮小効果を有する事が示されている。



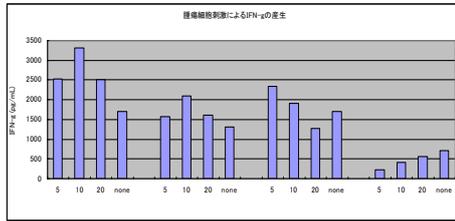
またその腫瘍効果は生存期間の延長につながる事も示されている。



4. 研究成果

免疫抑制物質吸着カラムは TGF-b, IL-6, Vascular endothelial growth factor (VEGF) などの免疫抑制因子を効果的に吸着し、体外循環治療においてこれらの因子を除去し、腫瘍増殖抑制効果を有する事を証明し得た。カ

ラム処理後の個体から採取されたリンパ球を用いた Interferon-gamma 産生のアッセイでは、以下の図のごとく、非治療コントロール群に比して、効果的な同サイトカインの産生の増強効果が認められた。



また CD4/CD8 陽性 T 細胞や NK (Natural killer) 細胞を活性化して細胞免疫を賦活する事も示された。すなわち、NK 活性の増強、PHA 幼若化反応試験の増強、各種抗原刺激によるリンパ球混合試験の増強効果を認めた。インビトロでの免疫学的効果の増強実験については、各種抗原に対する特異的免疫反応の増強効果を認めた。さらに、インビボにおいては同カラムで前処置した動物において腫瘍特異的免疫学的反応の増強とそれによる抗腫瘍効果を有する可能性がある事が示唆された。ラット腫瘍細胞株とそれに呼応する特異的癌抗原を用いたワクチン治療のモデルにおいても、同カラムで処理する個体においては、期待される抗腫瘍効果の増強を示唆する結果を得る事ができ、臨床応用の可能性があるものと考えられた。以上より、本実験の結果、我々の開発している免疫抑制物質吸着カラムと、免疫賦活作用をもつハイブリッド型カラムは、癌患者の免疫療法において、体外循環として使用する事により、免疫抑制作用を緩和し、さらに腫瘍特異的免疫反応を増強する事により、その抗腫瘍効果を増強し、臨床効果を発揮する可能性がある事が示唆された。癌ワクチン療法の昨今の研究により、各種難治性癌に対する、免疫療法の可能性があることが明らかとなっているが、一方で、癌患者の有している、免疫抑制状態を克服するために、免疫反応の賦活を期待するアジュバント療法としての重要性がクローズアップされている。本研究で用いた体外循環カラムの開発により、癌患者の血液中に著しく増加する免疫抑制性サイトカインを効率的に吸着除去し、血中の免疫担当細胞を直接活性化することが可能となり、安全に、簡便に、繰り返し施行可能な完全閉鎖系体外循環による免疫細胞療法の新しい治療体系の構築が行える可能性がある事が示唆された。

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 4 件)

① Itoh T, Fuji N, Taniguchi H, Kosuga Toshiyuki, Naito Kazuyo, Double cancer of the cystic duct and gallbladder associated with low junction of the cystic duct. Journal of hepatobiliary pancreatic surgery. 査読有、15, 2008, 338-343

② Itoh T, Fuji N, Taniguchi H, Kawaguchi Tsutomu, Naito Kazuyo, Port site herniation of the small bowel following laparoscopy-assisted distal gastrectomy: a case report. Journal of medical case report. 査読有、2, 2008, 48-51

③ 川口 耕、伊藤 剛、上田英史、藤 信明、内藤和世 膵管癒合異常を合併し背側膵管より発生した膵管乳頭粘液性腫瘍の一例 日本消化器外科学会雑誌. 査読有、42, 2009, 2699-1704

④ Kawaguchi T, Itoh T, Toma A, A case of neuroendocrine cell carcinoma with sigmoidvesical fistula. Case report of gastroenterology. 査読有、19, 2010, 178-184

[学会発表] (計 14 件)

① Itoh T, Fuji N, Taniguchi H, Port site herniation of the small bowel following laparoscopy-assisted distal gastrectomy: a case report. 11th World congress of endoscopic surgery, 2008, 横浜

② 伊藤 剛、藤 信明、谷口弘毅、内藤和世 胆嚢管低位合流型に合併した胆嚢腫瘍と診断された③症例、第 20 回日本肝胆膵外科学会、2008、山形

③ 伊藤 剛、藤 信明、谷口弘毅、内藤和世 執刀医関連因子が術後成績に与える影響の検討、第 108 回日本外科学会定期学術集会、2008、長崎

④ 伊藤 剛、藤 信明、谷口弘毅、天池寿、柏本錦吾、川口耕、内藤和世 大腸癌肝転移切除術後早期再発症例の検討、第 63 回日本消化器外科学会総会 2008、札幌

⑤ 伊藤 剛、藤 信明、中村憲司、谷口弘毅、内藤和世 肝動注と全身化学療法を併用して切除可能となった大腸癌肝転移の一例、第 70 回日本臨床外科医学会総会、2008、東京

⑥伊藤 剛、藤 信明、谷口弘毅、内藤和世
大腸癌肝転移切除術後の早期残肝再発に關
する検討、第21回日本肝胆膵外科学会学術
集会、2009、名古屋

⑦伊藤 剛、藤 信明、中村憲司、西村真澄、
当麻敦史、内藤和世 当院における肝胆膵手
術、第34回京都外科医会症例検討会、2009、
京都

⑧藤 信明、伊藤 剛、上村 宏、谷口弘毅、
内藤和世、CES-D Scale を用いた研修医研
修における抑うつ状態の把握、第64回日本消
化器外科学会総会、2009、大阪

⑨川口 耕、伊藤 剛、藤 信明、當麻敦史、
内藤和世、膵管癒合異常を合併し、副膵管よ
り発生した膵管内乳頭粘液性腫瘍の1例、第
21回日本肝胆膵外科学会学術集会、2009、
名古屋

⑩上田英史、伊藤 剛、真崎 武、川口 耕、
佐々木裕二、當麻敦史、中村憲司、藤 信明、
内藤和世、急激な経過を取った劇症型アメー
バ性大腸炎、第64回日本消化器外科学会総
会、2009、大阪

⑪上田英史、伊藤 剛、真崎 武、川口 耕、
佐々木裕二、當麻敦史、中村憲司、藤 信明、
内藤和世、前方アプローチによる拡大右肝切
除術を施行した巨大肝細胞癌の1例、第18
5回近畿外科学会、2009、神戸

⑫上田英史、伊藤 剛、西村真澄、川尻英長、
當麻敦史、中村憲司、藤 信明、内藤和世、
癒着性イレウスに対する腹腔鏡下手術の臨
床的検討、第186回近畿外科学会、2009、
大阪

⑬西村真澄、伊藤 剛、藤 信明、當麻敦史、
肝細胞癌との鑑別が困難であった限局性結
節性過形成の一例、第22回日本肝胆膵外科
学会学術集会、2010、仙台

⑭西村真澄、伊藤 剛、當麻敦史、腹腔鏡下
胆嚢摘出術を施行した胆嚢捻転症の一例、第
23回日本内視鏡外科学会総会、2010、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 剛 (Itoh Tsuyoshi)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40420707