

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390364

研究課題名（和文）難治性悪性腫瘍根絶へ向けた免疫賦活 RNA ウイルス療法の体系化基盤研究

研究課題名（英文）Development of “immunostimulatory virotherapy” to treat various malignancies

研究代表者

米満 吉和（YONEMITSU YOSHIKAZU）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40315065

研究成果の概要（和文）：

最近の免疫学の進歩により抗腫瘍免疫における樹状細胞（DC）の重要性が明確になり、進行がんを中心に DC を用いた免疫療法が検討されているが、その治療成績は十分なものではない。特に、腹水がんにおいては DC 療法に耐性であり、その治療レジメの確立が強く望まれている。

まず我々は、最適化を行ったサイトカインカクテル（GM-CSF + SCF）を用い、浮遊培養を行うことで、進行がん患者末梢血を材料とした DC の体外大量増幅技術の開発に成功した。得られた DC は通常法で培養されたミエロイド系 DC と同様の形態を示し、抗原取込み能、抗原提示に必要な分子群の発現、サイトカインの産生、T 細胞増殖刺激能を備えていることが確認された。

治療モデルについて、CT26（マウス大腸がん細胞株）を用いた検討により、腹水がんに対する rSeV/DC 療法はほぼ無力であったが、その原因となる物質が VEGF であることが明らかになった。加えて、ヒト腹水及びマウス腹水において、VEGF がそのデコイレセプターである sFLT-1 に比して高濃度となっていることが明らかになった。そこで、SeV を用いて内因性 sFLT-1 を発現する DC を腹腔内へ投与することで、腹水がんに対する DC 療法の治療成績を飛躍的に向上させることに成功した。また、それは CTL の寄与が大きいことが明らかになった。現在以上の知見をもとに、臨床試験用 GMP 製剤の準備を開始している。

研究成果の概要（英文）：

Though DC-based cancer immunotherapy has been suggested as a potential treatment for various kinds of malignancies, its clinical efficacies are still insufficient in many human trials. Especially, malignant ascites (MA) is a highly intractable and immunotherapy-resistant state of advanced gastrointestinal and ovarian cancers.

First, floating cultivation of mononuclear cells from cancer patients under an optimized cytokine cocktail (GM-CSF/SCF) led these cells to stable proliferation and to DC differentiation. As are seen in conventional DCs, expanded DCs showed dendrites after maturation, and endocytotic activities. Expanded DCs also expressed HLA-DR, adhesion molecules, and co-stimulatory molecules and produced inflammatory cytokines as well as conventional DCs did. Functionally, MLR assay revealed that expanded DCs could stimulate allogenic T-cell proliferation to the same extent as conventional DCs.

Next, using a murine model of MA with CT26 colon cancer cells, we here determined that the imbalance between the VEGF-A and its decoy receptor, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1 (sFLT-1), was a major cause of MA resistance to DC-based immunotherapy. We found that the ratio of VEGF-A/sFLT-1 was increased not only in murine but also in human MA, and F-gene-deleted recombinant Sendai virus (rSeV/dF)-mediated secretion of human sFLT-1 by DCs augmented not only the activity of DCs themselves, but also dramatically improved the survival of tumor-bearing animals associated with enhanced CTL activity and its infiltration to peritoneal tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

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：実験外科学

1. 研究開始当初の背景

がんは国民死亡原因の第1位であり、このがん死亡率を低下させると共にがん患者のQOLを維持に主眼を置いた包括的治療戦略を構築することは、極めて重要であることは論を待たない。最近の免疫学の進歩により抗腫瘍免疫における樹状細胞（DC）の重要性が明確になり、進行がんを中心にDCを用いた免疫療法が検討されている。

我々はDC療法の重要なファクターであるDCの数を十分に確保するべく、マウス骨髄細胞及びヒト臍帯血CD34陽性細胞を材料としたDC体外大量増幅技術を開発してきた。一方、既に実用化段階にある高性能国産ウイルスベクターであるrSeVによるDC活性化法を用い、従来のDC療法と際だって異なる性質と、極めて高い抗腫瘍効果を示すこと明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、実用化を前提に以下の3点に研究の焦点を絞り、臨床における難治性悪性腫瘍患者の病態に即した治療モデルを構築、その免疫学的・分子生物学的メカニズムを解明する。

- 1) 腹水がんにおける効果的なrSeV/DC療法（+効果増強法）の開発
- 2) 腹水がんにおけるrSeV/DC療法の免疫学的・分子生物学的作用メカニズムの解明
- 3) 増幅DCを上記1) 2) に適応すると共に、臨床応用に即したヒトDC増幅レジメを完成

3. 研究の方法

(1)ヒトDC増幅システムのレジメ化：既報（Harada Y, et al. PLoS ONE, 2009）のサイトカインによるマウスDC増幅法を応用するべく、ヒト臍帯血CD34陽性細胞を材料としたDC増幅法を最適化した後、実際に治療に供する進行がん患者アフエレーシス産物

を材料としたDC増幅法のレジメを決定し、SOPの作成を行う。本工程は九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の認可を得て行われた臨床研究、『健康人および進行がん患者末梢血単核球細胞を用いた大量樹状細胞及びNK細胞増殖技術の確立』（許可番号：22-176）にて行われた。

(2) 腹水がんモデルにおける治療レジメの最適化：

対数増殖期にあるマウス大腸がん細胞株（CT26）をbalb/cマウス及びbalb/c nu/nuマウスの腹腔内へ投与することにより臨床病体に類似した腹水がんモデルマウスを作成した。sFlt-1産生DCは、rSeV/dF-hsFLT-1感染後にELISA法によりsFlt-1を産生していることを確認した。また、FACSによる表面抗原の発現の確認、ELISA法による炎症性サイトカインの産生を確認した。本モデルマウスに対して腫瘍接種直後から7日置きに複数回（1～6回）DCの投与を行った。DCは全て既報（Harada Y, et al. PLoS ONE, 2009）の増幅DCを用いた。治療経過は全生存率及び体重によりモニタリングを行った。治療時のコントロールとして、GFP搭載SeV及びLPSにより活性化したDCを用いた。

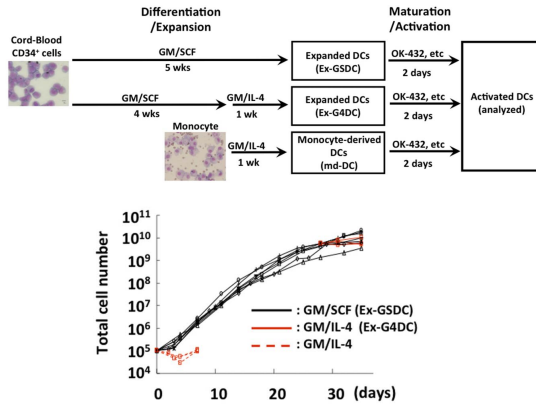
(3)rSeV/DC療法の免疫学的メカニズムの解明：

上記腹水がんモデルマウス治療後に脾臓細胞を採取し、CT26及びMethA（マウス繊維肉腫細胞株）に対する傷害活性を<sup>51</sup>Crの放出をγ-counterで計測することで測定した。また、CT26及びMethAを、ナイーブbalb/cマウス及び腹水がん治療後100日以上生存した個体に対して、皮下に投与し、35日後の生着を確認すると共に、腫瘍内に浸潤した各種リンパ球（CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞）を免疫化学染色法により確認、定量した。

#### 4. 研究成果

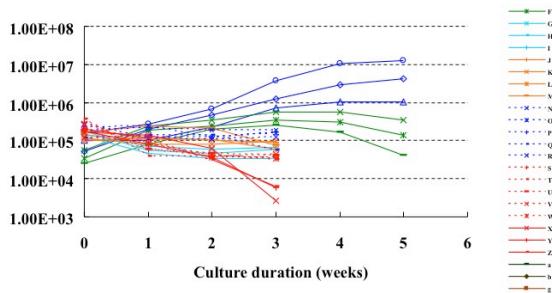
(1) ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を材料とした DC 増幅法の最適化:

MPC コートされたディッシュを用い、GM-CSF (終濃度 100ng/ml) と SCF (終濃度 50ng/ml) を含む IMDM 培地での培養で、4~5 週間の増幅が最適であることが明らかになった。



(2) 進行がん患者アフェレーシス産物を材料とした DC 増幅法の最適化:

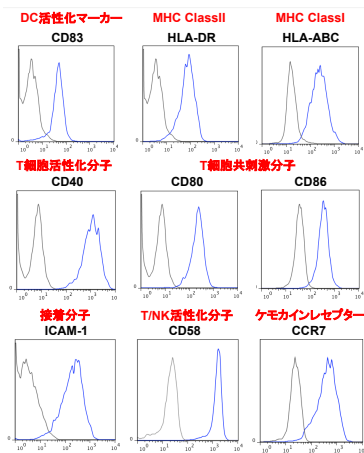
最適化されたヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を材料とした DC 増幅法を応用し、血液中の CD3 陽性細胞を除去することで、DC の大量増幅に成功した。



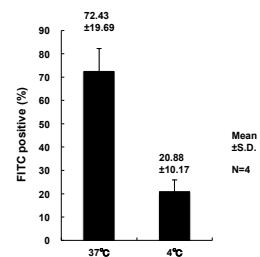
(3) 進行がん患者増幅 DC の性状解析:

患者増幅 DC の抗原取込み能、抗原提示に必要な分子群の発現、サイトカインの産生、T 細胞増殖刺激能は通常法で得られる DC と同等以上であることが確認された。

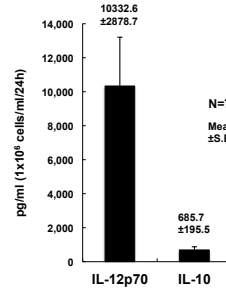
表面抗原:



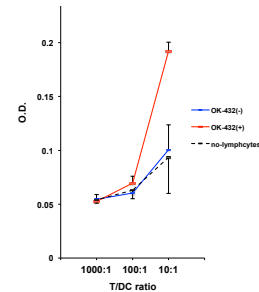
抗原取込み:



サイトカイン:

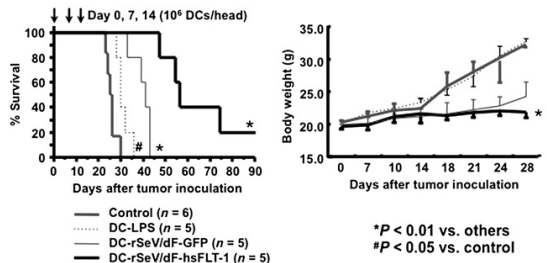


T 細胞刺激能:



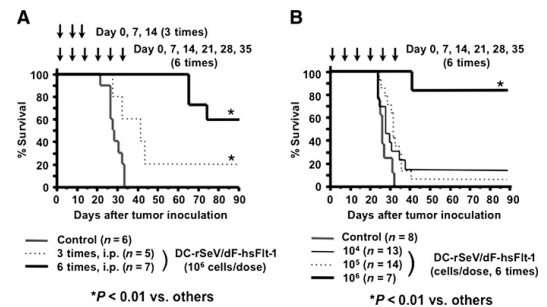
(4) マウス腹水がんモデルの治療経過:

DC-rSeV/dF-hsFLT-1 による治療効果により生存は有意に延長し、腹水貯留による体重増加は抑制された。



(5) 腹水がん治療レジメの最適化:

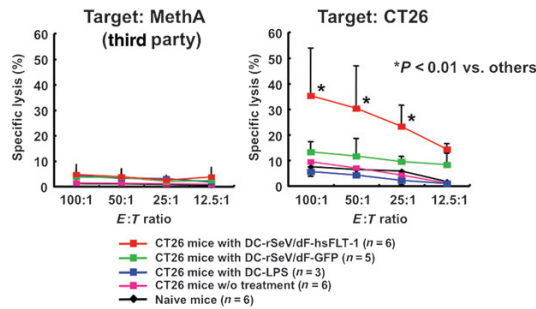
生存の延長は、投与回数及び投与 DC 数に依存することが明らかになった。即ち、投与回数は 6 回 (下図 A)、1 回投与当りの DC 数は  $1 \times 10^6$  個とした場合 (下図 B) (いずれも検討した最大値) に最も高い治療効果が得られた。



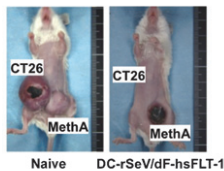
これらのファクターは体重比で換算して、臨床で現実的に使用可能な範囲での検討とした。

(6) rSeV/DC 療法の免疫学的メカニズムの解明：

CT26 接種後に rSeV/DC による治療を受けたマウスの CTL は CT26 特異的に傷害活性を有することが明らかになった。



また、治療後の長期生存個体に対し、MethA を用いたセカンドチャレンジにおいては、治療を受けた群についてのみ CT26 の生着を認めなかった。



	Tumor formation at second challenge	
	CT26	MethA
Naive	10/10	10/10
DC-rSeV/dF-hsFLT-1	0/10	10/10

以上の結果より、DC-rSeV/dF-hsFLT-1 による腹水がんの治療効果は、sFlt-1 による腹水中の VEGF の濃度低下に加え、CTL による特異的免疫応答によるものであることが強く示唆された。

## 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 3 件)

Harada Y, Okada-Nakanishi Y, Ueda Y, Tsujitani S, Saito S, Fuji-Ogawa T, Iida A, Hasegawa M, Ichikawa T, Yonemitsu Y.

Cytokine-based high log-scale expansion of functional human dendritic cells from cord-blood CD34-positive cells.

Sci. Rep. 1, 174; DOI:10.1038/srep00174, 2011.

Sugiyama M, Kakeji Y, Tsujitani S, Harada Y, Onimaru M, Yoshida K, Tanaka S, Emi Y, Morita M, Morodomi Y, Hasegawa M, Machara Y, Yonemitsu Y.

Antagonism of VEGF by genetically engineered dendritic cells is essential to induce antitumor immunity against malignant ascites.

Mol Cancer Ther. 10, 540-549, 2011.

Harada Y, Yonemitsu Y.

Dramatic improvement of DC-based immunotherapy against various malignancies.

Front Biosci. 17, 2233-2242, 2011.

[学会発表] (計 3 件)

Harada Y, Saito S, Yonemitsu Y.

Cytokine-based log-scale expansion of functional human dendritic cells

The 11th International Symposium on Dendritic Cells, 2010 第 11 回 国際樹状細胞シンポジウム (スイス)

Harada Y, Saito S, Yonemitsu Y.

Cytokine-based log-scale expansion of functional human dendritic cells from PBMCs

American society of Gene and Cell Therapy 14th Annual meeting, 2011 第 14 回アメリカ遺伝子・細胞治療学会 (Seattle)

Harada Y, Saito S, Yonemitsu Y.

Cytokine-based log-scale expansion of functional human dendritic cells from PBMC

The 2nd Meeting of ACTO, 2011 第 2 回アジア細胞治療学会 (宮崎)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：樹状細胞の培養方法

発明者：原田結、齊藤智、吉田久美、米満吉和、矢崎雄一郎、岡本正人、遊佐精一

権利者：九州大学、テラ株式会社

種類：公開特許公報 (A)

番号：特願 2010-112588、特開 2011-239701

出願年月日：2010 年 5 月 14 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計◇件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米満 吉和 (YONEMITSU YOSHIKAZU)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40315065

(2) 研究分担者

上田 泰次 (UEDA YASUJI)

千葉大学・医学研究院・客員准教授

研究者番号：80165662

(3) 連携研究者

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80165662