

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23501289

研究課題名(和文)高免疫原性細胞ワクチンと化学療法との併用による低侵襲・個別化療法の確立

研究課題名(英文)Improved immunogenicity of fusions between ethanol-treated cancer cells and dendritic cells exposed to dual TLR stimulation

研究代表者

小井戸 薫雄(Koido, Shigeo)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70266617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- β を高産生する膵癌細胞株(PANC-1)であるPANC-1/TGF- β を作製した。このPANC-1/TGF- β は低免疫原性であったが、エタノール処理することにより、高免疫原性に誘導することが可能であった。また、未熟樹状細胞をOK-432とPSKで刺激することで、IL-12p70やHSP90の産生が増加した成熟樹状細胞を誘導することに成功した。

この成熟樹状細胞と高免疫原性癌細胞を細胞融合した融合細胞ワクチンは、効率よくMUC1特異的な細胞障害性T細胞を誘導することが可能であった。さらに、CD4とCD8 T細胞からIFN- γ の産生が増加し、癌細胞に対して有効な抗腫瘍効果を発揮した。

研究成果の概要(英文)：Fusions of ethanol-treated tumor cells and dual Toll-like receptors (TLRs)-stimulated dendritic cells (DCs) (E-tumor/FCs) inhibited the production of multiple immunosuppressive soluble factors including TGF- β 1 and up-regulated the production of IL-12p70 and HSP90. Importantly, E-tumor/FCs activated T cells capable of producing high levels of IFN- γ , resulting in augmented MUC1-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) induction. Collectively, our results illustrate the synergy between ethanol-treated whole tumor cells and dual TLRs-stimulated DCs in inducing augmented CTL responses in vitro by fusion cell preparations. The alternative system is simple and may provide a platform for adoptive immunotherapy.

研究分野：がん免疫

キーワード：樹状細胞 がん細胞 がん免疫 細胞障害性T細胞 がんワクチン 融合細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)膵癌は新規の化学療法の登場によっても、有効な治療法が確立されていなく、癌死亡率が1位と非常に難治性の癌である。

(2)従来の標準治療法である化学療法の限界を如実に示している。

(3)膵癌に対し、従来の治療概念の限界を打破する新規治療法が望まれる。

2. 研究の目的

難治性癌のひとつである膵癌に対し、従来の治療概念の限界を打破する目的で、「免疫抑制性サイトカインの産生を制御した癌細胞」と「優れた抗原提示能を有する樹状細胞」を化学的に細胞融合した融合細胞ワクチンを開発する。

平成23年度:安全性と免疫原性の高い癌細胞の開発と医薬応用可能な活性化樹状細胞の開発をおこなう。

平成24年度:免疫原性の高い新規融合細胞ワクチンの開発をおこなう。

平成25~26年度:新規融合細胞ワクチンの機序解明をおこない、全体の総括をする。

3. 研究の方法

(1)腫瘍細胞の免疫原性の評価

a)FACSにて腫瘍細胞の表現型(HLA-ABC, HLA-DR, MUC1, Calreticulinなど)を解析した。

b)熱ショック蛋白(HSP90 α), HMGB1や免疫抑制サイトカイン(TGF- β , IL-10やVEGFなど)は, ELISA法にてkitを用いて解析した。

(2)樹状細胞の評価

a)ヒト未熟樹状細胞は単核球を用いて, GM-CSFとIL-4にて誘導し, 成熟樹状細胞は未熟樹状細胞をOK-432とPSKを用いて刺激することで作製した。

b)樹状細胞の細胞表現型(HLA-ABC, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CCR7)をFACSにて解析した。

c)樹状細胞から産生されるサイトカイン(HSP90 α , IL-12p70, IL-10)はELISA法にて評価した。

(3)樹状細胞と癌細胞を融合した融合細胞ワクチンの評価

a)融合細胞はPEGを用いて作製した。融合細胞の細胞表現型は, 樹状細胞マーカーであるHLA-DRと腫瘍細胞マーカーであるMUC1の2重染色を行い評価した。

b)融合細胞の機能は, HSP90 α , TGF- β , IL-10, VEGFおよびIL-12p70の産生をELISA法にて評価した。

c)融合細胞とリンパ球を*in vitro*で共培養することにより, 腫瘍抗原であるMUC1に特異的な細胞障害性T細胞の誘導能を検討した。評価項目として, CD4およびCD8T細胞から産生されるINF- γ を細胞内染色にて評価した。さらに, PANC-1に対するcytotoxicityを*in vitro*で評価した。MUC1特異的な抗腫瘍効果はpentamer染色を行うことで検討した。

4. 研究成果

(1)低免疫原性を有する腫瘍細胞の樹立

TGF- β を強発現しているヒト膵癌細胞株(PANC-1)を樹立した(PANC1/TGF- β 細胞)。このPANC1/TGF- β の培養上澄液を用いて, 樹状細胞を培養すると, MHC class II, CD86, CD80, CD83の発現が低下した。

(2)高免疫原性を有する腫瘍細胞の樹立

低免疫原性の膵癌細胞株であるPANC1/TGF- β 細胞を, *in vitro*で高免疫原性に誘導できる条件を検討した。エタノール処理をすることにより, 熱ショック蛋白の上昇と免疫抑制サイトカイン(TGF- β , IL-10やVEGFなど)の産生の低下を認めた。また, MUC1などの腫瘍抗原の表現型に変化は認めなかった。さらに, エタノール処理した腫瘍細胞からはCalreticulinとHMGB1の発現増加が認められた。以上より, 一定の条件でエタノール処理をすることにより, 低免疫原性腫瘍細胞を, 高免疫原性を有するapoptosisに誘導することが可能であった。

(3) 医薬応用が可能な活性化樹状細胞の誘導

医薬品であるbiological response modifiers(BRM)であるOK-432とPSKを組み合わせ, 樹状細胞の活性化を試みた。未熟樹状細胞をOK-432とPSKを用いて刺激すると, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CCR7の発現が増強した。更に, IL-12p70, HSP90 α とIL-10の産生増加が認められた。

(4)樹状細胞と癌細胞を融合した融合細胞ワクチンの作成

「OK-432とPSKで刺激した成熟樹状細胞」と「膵癌細胞PANC-1」を細胞融合した融合細胞ワクチンは, 「未熟樹状細胞」と「膵癌細胞PANC-1」を融合した融合細胞ワクチンよりも, MUC1特異的な細胞障害性T細胞を効率よく誘導できた。

一方, 「OK-432とPSKで刺激した成熟樹

状細胞」と「低免疫原性の膵癌細胞 PANC1/TGF-β 細胞」は、「OK-432 と PSK で刺激した成熟樹状細胞」と「膵癌細胞 PANC-1」を細胞融合した融合細胞ワクチンと比較して、MUC1 特異的な細胞障害性 T 細胞の誘導が抑制された。すなわち、腫瘍細胞が低免疫原性である場合、「OK-432 と PSK で刺激した成熟樹状細胞」を融合パートナーとしても、十分なワクチン効果が得られなかった。

(5)成熟樹状細胞と高免疫原性癌細胞を融合した融合細胞ワクチンの作成

PANC1/TGF-β 細胞をエタノール処理することにより高免疫原性の腫瘍細胞に誘導後、「OK-432 と PSK で刺激した成熟樹状細胞」と細胞融合することにより作製した融合細胞ワクチンは、非常に効率よく MUC1 特異的な細胞障害性 T 細胞を誘導することが可能であった。

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 32 件)

筆頭者論文(原著と総説)

- 1) Koido S, Gong J. Characterization of structure and direct antigen presentation by dendritic/tumor fused cells as cancer vaccines. Anticancer Res 2013; 2: 347-54.
- 2) Koido S, Homma S, et al. Combined TLR2/4-activated dendritic/tumor cell fusions induce augmented cytotoxic T lymphocytes. PLoS ONE 2013; 8: e59280.
- 3) Koido S, Homma S, et al. Augmentation of antitumor immunity by fusions of ethanol-treated tumor cells and dendritic cells stimulated via dual TLRs through TGF-β1 blockade and IL-12p70 production. PLoS ONE 2013 24; 8: e63498.
- 4) Nishida S, Koido S, Takeda Y, Homma S, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1)-peptide based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. J Immunother 2014; 37: 105-14.
- 5) Koido S, Ito M, et al. Vaccination with vascular progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells elicits antitumor immunity targeting vascular and tumor cells. Cancer Immuno Immunotherapy 2014; 63: 459-68.
- 6) Koido S, Homma S, et al. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by fusion cells generated from allogeneic plasmacytoid dendritic and tumor cells. Int J Oncol 2014; 45: 470-8.

7) Koido S, et al. Tumor regression by CD4 T-cells primed with dendritic/tumor fusion cell vaccines. Anticancer Res 2014; 34: 3917-24.

8) Koido S, Homma S, et al. Treatment with chemotherapy and dendritic cells pulsed with multiple Wilms' tumor 1 (WT1)-specific MHC class I/II-restricted epitopes for pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2014; 20:4228-39.

9) Koido S, et al. Immunological assessment of cryotherapy in breast cancer patients. Anticancer Res 2014; 34: 4869-76.

10) Koido S, et al. Immunogenic modulation of cholangiocarcinoma cells by chemoimmunotherapy. Anticancer Res 2014; 34: 6353-61.

11) Takakura K, Koido S, et al. Prognostic markers for patient outcome following vaccination with multiple MHC class I/II-restricted WT1 peptide-pulsed dendritic cells plus chemotherapy for pancreatic cancer. Anticancer Res 2014; 35: 555-62.

12) Koido S, Homma S, et al. Immunologic monitoring of cellular responses by dendritic/tumor cell fusion vaccines. J Biomed Biotechnol 2011; 910836.

13) Koido S, Homma S, et al. Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. Clin Dev Immunol. (J Immunol Res.) 2011; 267539.

14) 小井戸薫雄, 本間定, など. 進行膵癌に対する Gemcitabine 併用 WT1 標的免疫療法の意義. 胆と膵. 2011; 32: 887-91.

15) Koido S, Homma S, et al. Immunotherapy synergizes with chemotherapy targeting pancreatic cancer. Immunotherapy 2012; 4: 5-7.

16) Koido S, Homma S, et al. Fusions between dendritic cells and whole tumor cells as cancer vaccines. Oncoimmunology 2013; 2: e24437.

17) Koido S, Homma S, et al. The combination of TLR2 and TLR4 agonists promotes the immunogenicity of dendritic cell/cancer cell fusions. Oncoimmunology 2013; 2: e24660.

18) Koido S, Homma S, et al. Improved immunogenicity of fusions between ethanol-treated cancer cells and dendritic cells exposed to dual TLR stimulation. Oncoimmunology 2013; 2: e25375.

19) Koido S, Homma S, et al. Strategies to improve the immunogenicity of anticancer vaccines based on dendritic cell/malignant cell fusions. Oncoimmunology 2013; 2: e25994.

20) Koido S, Homma S, et al. Chemoimmunotherapy targeting Wilms' tumor 1 (WT1)-specific cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses for patients with pancreatic cancer. Oncoimmunology 2014; 15: e958950.

共著論文 (原著)

- 1) Weng D, Song B, Durfee J, Sugiyama V, Wu Z, Koido S, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes against ovarian cancer-initiating cells. Int J Cancer 2011; 129: 1990-2001.
- 2) Takahara A, Koido S, et al. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T cell-mediated antitumor immune response. Cancer Immuno Immunotherapy 2011; 60: 1289-97.
- 3) Weng D, Penzner JH, Song B, Koido S, et al. Metastasis is an early event in mouse mammary carcinomas and is associated with cells bearing stem cell markers. Breast Cancer Res. 2012; 25: R18.
- 4) Kimura Y, Imai K, Shimamura K, Tsukada J, Tomoda T, Sunamura M, (Koido S), et al. Clinical and immunologic evaluation of dendritic cell-based immunotherapy in combination with gemcitabine and/or S-1 in the patients with advanced pancreatic carcinoma. Pancreas 2012; 41: 195-202.
- 5) Kan S, Hazama S, Maeda K, Inoue Y, Homma S, Koido S, et al. Suppressing effects on regulatory T cell induction by cyclophosphamide and gemcitabine in vitro. Anticancer Res 2012; 32: 5363-9.
- 6) Tomoyuki T, Okamoto M, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, Homma S, et al. Prognostic impact of expression of Bcl-2 and Bax genes in circulating immune cells derived from patients with head and neck carcinoma. Neoplasia 2013; 15: 305-14.
- 7) Kamata Y, Kuhara A, Iwamoto T, Hayashi K, Koido S, et al. Identification of HLA class I-binding peptides derived from unique cancer-associated proteins by mass spectrometric analysis. Anticancer Res 2013; 33: 1853-9.
- 8) Tano T, Okamoto M, Kan S, Bando T, Goda H, Nakashiro K, (Koido S), et al. Immuno-chemoradiotherapy for patients with oral squamous cell carcinoma: augmentation of OK-432-induced helper T-cell 1 response by 5-FU and X-ray irradiation. Neoplasia 2013; 15: 805-14.
- 9) Weng D, Song B, Koido S, et al. Immunotherapy of radioresistant mammary tumors with early metastasis using molecular chaperone vaccines combined with ionizing radiation. J Immunol 2013; 191: 755-63.
- 10) Kobayashi M, Sakabe T, Abe H, Tani M, Takahashi H, Chiba A, (Koido S), et al. Dendritic cell-based immunotherapy targeting synthesized peptides for advanced biliary tract cancer. J Gastrointest Surg 2013; 17: 1609-17.

11) Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T, Nakashiro K, Sugita A, (Koido S), et al. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. PLoS ONE 2014; 9: e110378.

12) Ito M, Hayashi K, Adachi E, Minamisawa T, Homma S, Koido S et al. Combinatorial contextualization of peptidic epitopes for enhanced cellular immunity. PLoS ONE 2014; 9: e110425.

〔学会発表〕(計 36 件)

- 1) 小井戸薫雄,西田純幸,大草敏史. 進行膵癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンの併用療法. ワークショップ 膵・胆道がんを克服する新たな道はあるか? ~ 基礎と臨床の双方から具体的解決方法の模索を ~ 第 97 回日本消化器病学会総会
- 2) Hara K, Nishida S, Koido S et al. CD45RA- CCR7+/- memory WT1-CTLs predicts the favorable clinical outcome; the WT1 cancer vaccine combined with gemcitabine in the pancreatic cancer patients. 第15回日本がん免疫学会総会
- 3) 岡本正人,木村幸乃,今井一弘,嶋村香苗,塚田旬,石田尾武文,高橋秀徳,砂村真琴,下平滋隆,小井戸薫雄,本間定. 治療経験のある進行膵癌に対する樹状細胞ワクチン療法 ~ 臨床的・免疫学的検討 ~ 第15回日本がん免疫学会総会
- 4) 本間定,佐川由紀子,伊藤正紀,永崎栄次郎,高原映崇,込田英夫,小井戸薫雄. iPS細胞から腫瘍血管を標的とした癌ワクチンの作製. 第15回日本がん免疫学会総会
- 5) Kan S, Homma S, Koido S et al. Enhancement of an immune sensitivity of cancer cells by chemotherapeutic agents. 第70回日本癌学会学術総会,
- 6) 辻谷俊一,岡本正人,木村幸乃,本間定,小井戸薫雄,など. WT1およびMUC1がん抗原ペプチドを用いた進行膵癌に対する樹状細胞ワクチン療法. 第67回日本消化器外科学会定期学術総会
- 7) Homma S, Takahara A, Koido S. WT1 immune response against pancreatic cancer cells is enhanced by treatment with gemcitabine which up-regulates WT1 expression of the cancer cells. The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia.
- 8) Takakura K, Koido S, Homma S, et al. Fusions cells generated with combined TLR2/4-activated dendritic cells and tumor cells induce efficient antigen-specific cytotoxic T lymphocytes through IL-12p70 production. American Gastroenterological Association (AGA 2013)
- 9) Kamata Y, Koido S, Homma S et al. Proteomic analysis of HLA Class I binding

peptides from prostate cancer cell lines to seek for novel cancer vaccine and cancer biomarker. 12th HUPO (Human Proteome Organisation) World Congress.

10) 小井戸薫雄, 本間定, など. 進行膵癌に対するゲムシタピン併用WT1ペプチドワクチン療法. 第50回日本臨床分子医学会

11) 本間定, 小井戸薫雄. iPS細胞由来血管前駆細胞によるvaccinationは強い抗腫瘍効果を示す. 第23回日本樹状細胞研究会

12) Ito M, Homma S, Koido S, et al. Optimization of molecular context of antigenic peptides in artificial protein for enhanced cellular immunogenicity. Optimization of molecular context of antigenic peptides in artificial protein for enhanced cellular immunogenicity. 第17回日本がん免疫学会総会,

13) Koido S, Homma S, et al. Fusions of TLR2/4-activated dendritic cells and whole tumor cells induce augmented cytotoxic T lymphocytes. 第72回日本癌学会学術総会

14) Yuko K, Koido S, Homma S, et al. Identification of HLA Class I-binding peptides as potential novel cancer biomarker or vaccine of prostate cancer. 第72回日本癌学会学術総会

15) Ito M, Homma S, Koido S, et al. The proper molecular context of antigen epitopes in artificial proteins potentiates cellular immunity for cancer. 第72回日本癌学会学術総会

16) Kan S, Koido S, Homma S, et al. Antitumor activity against human pancreatic cancer by Trastuzumab-Emtansine, a unique antibody-drug conjugate. 第72回日本癌学会学術総会

17) 小井戸薫雄, 西田純幸, 本間定, など. 進行膵癌に対するWT1ペプチドワクチンとゲムシタピンによる集学的治療法の選択基準. JDDW2013

18) Nishida S, Koido S, Homma S, et al. Gemcitabine pulse WT1 peptide-based cancer vaccine versus gemcitabine alone for advanced pancreatic cancer: Randomized phase II clinical study in multi-center -Interim analysis- The 7th International Conference on WT1 in Human Neoplasia.

19) 西田純幸, 小井戸薫雄, 本間定, など. WT1 peptide-based cancer vaccine in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer. 第18回日本がん免疫学会

20) 小井戸薫雄, 本間定, など. Dendritic cells pulsed with WT1-specific MHC class I/II restricted epitopes for pancreatic cancer. 第18回日本がん免疫学会

21) KAN S, 小井戸薫雄, 本間定, など. ゲムシタピンによるHER2 発現増強効果を利用し

た膵癌に対する新たな分子標的療法. 第18回日本がん免疫学会

22) 伊藤正紀, 小井戸薫雄, 本間定, など. 細胞性免疫を誘導する人工抗原の作用メカニズムの解析. 第18回日本がん免疫学会

23) 本間定, 林和美, 小井戸薫雄, など. Nafamostat MesylateはGemcitabineによる膵癌細胞のPD-L1 発現上昇を抑制する. 第18回日本がん免疫学会

24) Hayashi K, Koido S, Homma S, et al. CD20 up-regulation in B cell lymphoma by some chemotherapeutic agents enhances antitumor activity of rituximab. 第73回日本癌学会総会

25) Sagawa Y, Koido S, Homma S, et al. Nafamostat Mesylate suppresses GEM-induced PD-L1 up-regulation of pancreatic cancer cells. 第73回日本癌学会総会

26) Ito M, Koido S, Homma S, et al. Combinatorial contextualization of peptidic epitopes for enhanced cellular immunity. 第73回日本癌学会総会

27) Komita H, Koido S, Homma S, et al. Gastrointestinal stromal tumors might be immunogenic to become a new target of cancer immunotherapy. 第73回日本癌学会総会

28) Kan S, Koido S, Homma S, et al. HER2 up-regulation by gemcitabine augments antitumor effect of trastuzumab emtansine against low HER2 breast cancer cell. 第73回日本癌学会総会

29) Koido S, Nishida S, Homma S, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. American Association for Cancer Research (AACR) 2014

30) Koido S, Homma S, et al. Dendritic cells pulsed with Wilms' tumor gene 1 (WT1)-specific and MHC class I and II-restricted epitopes with gemcitabine induce antitumor immune responses in patients with advanced pancreatic cancer. AACR 2014,

31) Kan S, Koido S, Homma S, et al. HER2 upregulation induced by gemcitabine treatment augments antitumor effect of trastuzumab emtansine against pancreatic cancer. AACR 2014

32) 嗣鑫, 小井戸薫雄, 本間定, など. ゲムシタピンによるHER2発現増強効果を利用した膵癌に対する新たな分子標的療法. 第52回日本癌治療学会学術集会.

33) 小林正学, 小井戸薫雄, など. 切除不能な進行・再発胆道癌 65例に対する人工抗原を用いた樹状細胞ワクチン療法第52回日本癌治療学会学術集会.

34) Koido S, Homma S, et al. Combination treatment by chemotherapy and dendritic cells pulsed with multiple Wilms' tumor gene 1 (WT1)-specific MHC class I/II restricted epitopes for pancreatic cancer. 第52回日本癌治療学会学術集会.

35) 小井戸薫雄,本間定,田尻久雄. ウィルムス腫瘍遺伝子産物 (WT1) 由来のヘルパーとキラーペプチドをマルチプル・パルスした樹状細胞ワクチンと化学療法を併用した新規免疫化学療法. JDDW 2014

36) 小井戸薫雄. WT1ペプチドパルスドDC. 第27回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (シンポ招待講演)

〔図書〕(計 3 件)

1) Gong J and Koido S. Cell fusion and dendritic cell based vaccines. Germany: Springer Cell Fusions. Regulation and Control 2011; 315-50. Namiki Y, Matsunuma S, Inoue T,

2) Koido S, Tsubota A, Tada N, et al. Magnetic nanostructures for biomedical application: an iron nitride crystal/cationic lipid nanocomposite with enhanced magnetically guided RNA interference in cancer cells. Croatia: INTECH Nanocrystal 2011; 349-72.

3) Koido S, Homma S, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer. Croatia: INTECH Pancreatic cancer-Molecular mechanism and targets- 2012; 225-50.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小井戸 薫雄 (KOIDO, Shigeo)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70266617

(2) 研究分担者

本間 定 (HOMMA, Sadamu)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：50192323

(3) 連携研究者

(なし)