

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659396

研究課題名(和文) 樹状細胞と新規ケモカイン製剤の併用により肝がんの二次発がんを制御する手法の開発

研究課題名(英文) Development of combination methods with dendritic cells and novel chemokine products for preventing hepatocellular carcinoma recurrence

研究代表者

中本 安成 (Nakamoto, Yasunari)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40293352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)： 肝がん治療後の再発(二次発がん)を抗腫瘍免疫によって制御する目的で、樹状細胞と新規ケモカイン製剤を併用する手法を開発した。樹状細胞の誘導についてOK-432と亜鉛を用いる方法の有用性、ケモカイン製剤についてがん免疫の賦活化作用が示唆された。さらに、組換え技術を用いて本製剤の生物学的安定性を向上した。これより、樹状細胞とケモカイン製剤の併用によって肝がんの二次発がんが抑制される可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： The current study was designed to develop the combination methods with dendritic cells and novel chemokine products for preventing the recurrence of hepatocellular carcinoma following the treatments. The methods of dendritic cell induction were modified using OK-432 and zinc, and the chemokine products were evaluated for the activation of the cancer immunity. Furthermore, the biological stability of the products was improved by recombinant technology. Collectively, the results indicated that the modified methods using both dendritic cells and the chemokine products may contribute to the reduction of hepatocellular carcinoma recurrence.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌 免疫学 トランスジェネレーション 動物 内科

1. 研究開始当初の背景

【肝がん治療における免疫療法の必要性】肝細胞がん(肝がん)は早期病変に対して現行の治療法を駆使しても3年以内に約70%が再発(二次発がん)するという予後不良の悪性疾患である。そして、がんに対する標準治療の限界を打破する手法としてこれまで多くの免疫療法が試みられてきた(Adv. Cancer Res. 99:363,2008; Immunity 29:372,2008)。

【樹状細胞治療の開発における問題点】我々は肝がんに対する肝動脈塞栓療法(TAE)と併用して樹状細胞を投与する免疫療法を独自に開発し安全性、有効性について確認した(Nakamoto et al.; Clin. Exp. Immunol. 147:296,2007 & 2010, in press)。そして再発率の改善も認められたが満足の行くものではなく、その要因として、1)樹状細胞の調整過程(ex vivo)や、2)投与したがん組織の微小環境(in vivo)において十分に免疫が賦活されなかった可能性が考えられた(Nature Rev. Immunol. 7:790,2007; Nature 449:419,2007)。

【新規のケモカイン製剤】国内で開発され産学共同研究を進めていた免疫増強技術であるアジュバント(ケモカイン MIP-1 α /CCL3; ECI301)製剤に関して、肝がんの経皮的ラジオ波焼灼療法(RFA)の際に用いることによって、優れた免疫賦活(アブスコパル)効果が発揮されることを発見した(Iida, Nakamoto et al.; Cancer Res. 70:6556,2010)。本剤の安全性は米国FDAにおいて肺がんに対する第I相試験(IND:#100263)により確認されている。

そこで、肝がんに対するRFAと併用する樹状細胞治療の際にケモカイン製剤を投与することによって抗腫瘍免疫を増強し二次発がんを制御する治療法を開発する研究計画を立案した。

2. 研究の目的

肝がんの再発を抗腫瘍免疫によって制御する目的で、樹状細胞を用いた免疫治療と新規のケモカイン製剤を併用することによってがん組織の微小環境で免疫賦活(アブスコパル)効果を発揮する手法を開発する研究を展開した。

予備実験において、国内で開発され産学共同研究を進めていた免疫増強技術であるアジュバント(ケモカイン MIP-1 α /CCL3; ECI301 など)製剤に関して、肝がんの経皮的ラジオ波焼灼療法(RFA)の際に用いることによってアブスコパル効果が発揮されることを観察していた。

そこで、以下の手順で肝がんに対するRFAと併用する樹状細胞治療の際にアジュバントを投与する治療法を開発した。

- 1)肝がん患者における至適な樹状細胞の誘導法(ex vivo)を確立した。
- 2)肝がんモデル(in vivo)でのアジュバントの併用に関する前臨床試験を施行した。
- 3)アジュバント製剤の生物学的安定性を向上するために改良を加えた。

3. 研究の方法

本研究ではGMPグレードの免疫学的手法を駆使して樹状細胞の誘導培養法(ex vivo)を改良するとともに、新規のアジュバント製剤を併用する手法を検討した。

(1)樹状細胞の誘導培養法(ex vivo)の検討:肝がん患者および健常者から得られる樹状細胞の表面マーカー、機能的特徴に関して比較検討した。具体的には、末梢血単核球から得られたCD14(+)接着細胞を分離して、GM-CSF、IL-4を含む培養液中で7日間培養する。誘導培養の過程で、以下の刺激を用いた。

a)GM-CSF/IL-4、+ b)IL-1 β /IL-6/TNF α 、+ c)PEG2、+ d)OK-432、e)[Zn]誘導されたCD14(-)HLA-DR(+)樹状細胞分画に対して、以下の項目を検討した。

A)細胞表面マーカー、B)サイトカイン産生、C)抗原取込み能、D)MLR試験健常者と比較して、肝がん患者において、a)–e)の誘導培養法においてA)–D)の解析で機能的に高い活性化を示す方法を確立した。

(2)肝がん再発モデルにおけるアジュバント製剤の前臨床試験(in vivo):肝がんモデルにおいてがん組織(皮下、肝内)へのラジオ波焼灼療法(RFA)とともに、樹状細胞、アジュバント製剤(ケモカインなど)を投与して抗腫瘍免疫、再発抑制効果を観察した。肝がん再発マウスモデルはすでに確立しており(Tsuchiyama, Nakamoto et al.; J. Immunol. 178:574,2007)、皮下または肝内(経門脈的)に形成した肝がん結節(BNL、MM45T、Hepa1-6株)を以下の方法で治療した後に、再度肝がん細胞株(再発腫瘍)を移植して経過を観察した。

a)肝がんへのRFA施行後にマウス樹状細胞(CD11c+)を投与した。b)aに加えてアジュバント製剤を全身性(静脈内、腹腔内)に投与した。c)a,bを併用する。治療後に、移植した再発腫瘍に対する抗腫瘍免疫、再発抑制効果を評価した。

A)再発腫瘍径の経時的変化・免疫組織学的検討、B)末梢血、脾細胞に由来するNK、NKT、Tリンパ球、樹状細胞の抗腫瘍免疫能(B-1. サイトカイン産生、B-2. 細胞障害アッセイ)、C)体重、活動性の

観察

a) - c)において投与量・回数・期間を工夫することによって、A), B)での高い活性を示し、C)において副反応、有害事象が最小となる方法、至適量を確立した。

(3) アジュバント製剤の改良：当初計画されていた安全性臨床研究の実施前にさらなる治療効果を向上させる目的で、アジュバント製剤のひとつであるケモカイン CCL2/MCP-1 について生物学的安定性を改良した。

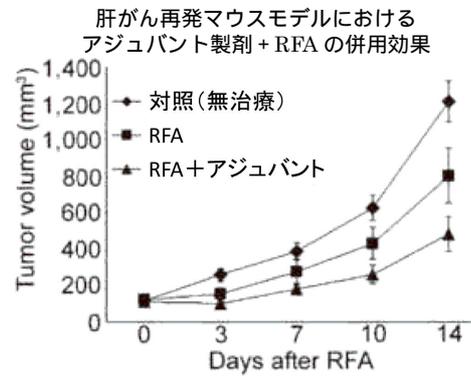
4. 研究成果

(1) 樹状細胞の誘導培養法 (ex vivo) の検討

A) 細胞表面マーカーについて、樹状細胞の活性化を示す CD83、T 細胞への補助刺激分子である CD86 の発現に関しては、誘導法 (a) と比べて OK-432 (d) や OK+Zn (e) で亢進を認め、樹状細胞の遊走能を示す CCR7 の発現は、OK+Zn 刺激 (e) で低下傾向を示した。B) サイトカイン産生について、OK-432 刺激 (d) によって誘導された樹状細胞は著明な IL-12、IFN γ 産生能を示した。C) 樹状細胞の貪食能 (FITC dextran uptake) の評価について、OK-432 刺激 (d) では樹状細胞の活性化に伴い低下傾向を示したが、OK+Zn 刺激 (e) では回復 (増加) を認めた。D) 樹状細胞の細胞障害活性 (^{51}Cr -release assay) について、誘導法 (a) と比べて OK-432 刺激 (d) で亢進を認め、OK+Zn 刺激 (e) ではさらに増強することが観察された。これより、OK-432 と亜鉛を用いる新たな樹状細胞の誘導法が示唆され、抗腫瘍免疫を賦活化する治療法に発展する可能性が示された。

(2) 肝がん再発モデルにおけるアジュバント製剤の前臨床試験 (in vivo)

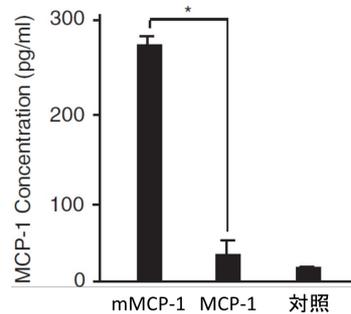
アジュバント (ECI301 製剤) をマウス肝がんモデルに用いて、RFA との併用による効果を検討したところ、RFA を施行したがん腫の消失に加えて RFA を施行していない他部位のがん腫の増殖が著明に抑制された。また作用機序として、末梢血中に多くの抗原提示細胞が誘導され、これらの細胞が RFA 部位において活性化されることによって、所属リンパ節を介して他部位のがん腫に効果を発揮することが示唆された。これより、アジュバント製剤による局所での感作が全身の癌免疫を賦活しているものと考えられ、この活性は肝がん局所治療後の二次発がんの制御に有望であると考えられた。



(3) アジュバント製剤の改良

アジュバント製剤であるケモカイン CCL2/MCP-1 について、他のケモカイン CX3CL1 の細胞膜結合ドメインを融合した組換えタンパク mMCP-1 を作製した。その結果、mMCP-1 は高い生物学的安定性を発揮しマクロファージ、CD4・CD8(+) Tリンパ球の活性化を介して強い抗腫瘍効果を発揮した。

肝がんマウスモデルの腫瘍組織内における CCL2/MCP-1 濃度



以上の基礎的・前臨床的検討の結果は、肝がんに対する RFA 併用樹状細胞治療に用いるアジュバント製剤の開発に寄与するとともに、治療後の二次発がんの制御に有望であると考えられた。

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 20 件)

- 1) Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, Kaneko S; Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014 (in press) (査読有) doi: 10.1002/hep.27093.

- 2) Miyake Y, Yamamoto K, Matsushita H, Abe M, Takahashi A, Umemura T, Tanaka A, Nakamuta M, Nakamoto Y, Ueno Y, Saibara T, Takikawa H, Yoshizawa K, Ohira H, Zeniya M, Onji M, Tsubouchi H: Intractable Liver and Biliary Diseases Study Group of Japan: Multicenter validation study of anti-programmed cell death-1 antibody as a serological marker for type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatol. Res.* 2014 (in press) (査読有)
doi: 10.1111/hepr.12305.
- 3) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S: In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. *Cancer Immunol Immunother.* 63: 347-356, 2014 (査読有)
doi: 10.1007/s00262-013-1514-7.
- 4) Muramatsu T, Ikawa M, Yoneda M, Sugimoto K, Matsunaga A, Yamamura O, Hamano T, Okazawa H, Nakamoto Y: Pathophysiological Decrease in the Regional Cerebral Blood Flow in Hashimoto's Encephalopathy: A Multiple-Case SPECT Study. *Eur Neurol.* 72: 13-19, 2014 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24777056>
- 5) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S: Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57: 1484-1497, 2013 (査読有)
doi: 10.1002/hep.26168.
- 6) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase in CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 62: 1421-1430, 2013 (査読有)
doi: 10.1007/s00262-013-1447-1.
- 7) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: Correction: TNF- α and Tumor Lysate Promote the Maturation of Dendritic Cells for Immunotherapy for Advanced Malignant Bone and Soft Tissue Tumors. *PLoS One.* 24: 8, 2013 (査読有)
doi:10.1371/annotation/7c0f14e6-cfba-4f5f-b93d-1a149eaeec96. eCollection 2013.
- 8) Ikawa M, Yoneda M, Muramatsu T, Matsunaga A, Tsujikawa T, Yamamoto T, Kosaka N, Kinoshita K, Yamamura O, Hamano T, Nakamoto Y, Kimura H: Detection of preclinically latent hyperperfusion due to stroke-like episodes by arterial spin-labeling perfusion MRI in MELAS patients. *Mitochondrion* 13:676-680, 2013 (査読有)
doi: 10.1016/j.mito.2013.09.007.
- 9) Matsunaga A, Ikawa M, Fujii A, Nakamoto Y, Kuriyama M, Yoneda M: Hashimoto's encephalopathy as a treatable adult-onset cerebellar ataxia mimicking spinocerebellar degeneration. *Eur. Neurol.* 69: 14-20, 2013 (査読有)
doi: 10.1159/000342217.
- 10) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: TNF- α and tumor lysate promote the maturation of dendritic cells for immunotherapy for advanced malignant bone and soft tissue tumors. *PLoS One.* 7: e52926, 2013 (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0052926.
- 11) Matsuda H, Ito Y, Suto H, Yamakawa A, Satomi S, Ohtani M, Yamazaki Y, Kusaka Y, Shimabukuro Y, Kikuchi K, Keida Y, Azuma T, Nakamoto Y: Clinical relevance and sequence analysis of the Helicobacter pylori dupA region from two areas in Japan with different gastric cancer risks. *Immuno-Gastroenterology* 1: 2, 127-135, 2012 (査読有)
<http://www.stmconnect.com/ig>
- 12) Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S: Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 19: 312-319, 2012(査読有)
doi: 10.1038/cgt.2012.3.
- 13) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A: Nucleostemin in Injury-Induced Liver Regeneration. *Stem Cells Dev.* 21: 3044-3054, 2012 (査読有)
doi: 10.1089/scd.2011.0725.
- 14) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H,

- Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. **Hepatol. Res.** 42: 523-542, 2012(査読有) doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00981.x.
- 15) Ikawa M, Arakawa K, Hamano T, Nagata M, Nakamoto Y, Kuriyama M, Koga Y, Yoneda M: Evaluation of systemic redox states in patients carrying the MELAS A3243G mutation in mitochondrial DNA. **Eur. Neurol.** 67: 232-237, 2012 (査読有) doi: 10.1159/000336568.
- 16) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. **Clin. Exp. Immunol.** 163: 165-177, 2011 (査読有) doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04246.x.
- 17) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S: Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. **HEPATOLOGY** 53: 1206-1216, 2011 (査読有) doi: 10.1002/hep.24149.
- 18) Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S: Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett.** 307: 165-173, 2011 (査読有) doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.029.
- 19) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group: Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. **GASTROENTEROLOGY** 141: 128-140, 2011 (査読有) doi: 10.1053/j.gastro.2011.03.051.
- 20) Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: Randomized, phase II study comparing interferon combined with hepatic arterial infusion of fluorouracil plus cisplatin and fluorouracil alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma. **Oncology** 81: 281-290, 2011 (査読有) doi: 10.1159/000334439.
- [学会発表] (計 5 件)
- 1) Ohtani M, Suto H, Nakamoto Y: Clinical evaluation of patency capsule system in high risk patients for video capsule endoscopy. **Japan Digestive Disease Week 2013 (Tokyo)**; 一般; oral: Oct. 12, 2013.
- 2) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: MicroRNA Dynamics in Precancerous Lesions in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. **第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 56 (4, Suppl.) 315A; 一般; oral: Nov. 13, 2012.
- 3) Naito T, Nemoto T, Matsuda H, Ohtani M, Suto H Nakamoto Y: High Incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies. **第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 56 (4, Suppl.) 643A; 一般; poster: Nov. 11, 2012.
- 4) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: Differential Dynamics of the NF-kappaB subunits RELA and RELB in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. **第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California)**: Hepatology 54 (4, Suppl.) 1300A; 一般; poster: Nov. 8, 2011
- 5) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase of CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma and its impact for prognosis of patients. **第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California)**: Hepatology 54 (4, Suppl.) 1400A; 一般; poster: Nov. 8, 2011
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
出願状況 (計 0 件)
- 名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
中本 安成 (NAKAMOTO YASUNARI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：40293352

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号：