科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 05 月 29 日現在

研究種目:基盤研究(C)研究期間:2007~2008課題番号:19590395研究課題名(和文)

腫瘍内投与活性化樹状細胞の抗腫瘍効果と腫瘍内微小環境改変機構の解明

研究課題名(英文)

Elucidation of mechanism of the modification of intratumoral microenvironment in antitumor effect of intratumoral activated dendritic cell therapy

研究代表者 (岡野 慎士)

九州大学病院・病理部・臨床助教

研究者番号:10380429

研究成果の概要: 固形腫瘍に対する細胞性免疫療法 (腫瘍抗原特異的 T 細胞を活性化あるいは移入する治療法) は、長期間続く腫瘍特異的メモリー免疫応答を誘導し、現在の手術療法、化学、放射線療法などの治療法との併用で、腫瘍の根絶が期待できる治療法であると考えられるが、その確固たる治療効果 (実地の臨床試験でも報告されているように腫瘍抗原特異的 T 細胞応答が体内で誘導されても、腫瘍の縮小効果が必ずしも認められない)が得られていないため、悪性腫瘍の標準的治療への取り入れは未だ実現していない。

我々は、活性化樹状細胞の腫瘍内投与が、樹状細胞療法の中で、最も優れた抗腫瘍効果(生着腫瘍の完全拒絶効果を含む)及び強力な腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球活性を惹起する治療法であることを見いだしていたが、本研究では腫瘍内の微小環境に注目してその機序解明を行った。この腫瘍内活性化樹状細胞投与療法は腫瘍抗原特異的 T 細胞応答を活性化するという当初考えられていた機序のほかに、腫瘍内に直接投与された活性化樹状細胞が、腫瘍内の微小環境を腫瘍免疫療法(腫瘍抗原特異的 T 細胞応答)が奏功する環境に効率よく改変し得る方法であることが判明し、固形腫瘍の特徴の一つである、樹状細胞の分化・成熟抑制状態を補充する効果もあることが判明した。本研究で得られた知見は、今後の細胞性免疫療法全体への応用に重要な知見であり、種々の腫瘍内微小環境改変薬の開発が腫瘍細胞免疫療法に必要であることを示唆するものである。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1, 800, 000	540, 000	2, 340, 000
2008 年度	1, 700, 000	510, 000	2, 210, 000
年度			
年度			
年度			
総計	3, 500, 000	1, 050, 000	4, 550, 000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:基礎医学・実験病理学

キーワード: (1)癌 (2) 病理学(3)免疫学(4) 樹状細胞(5) 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

【①研究の学術的背景と目的】

悪性腫瘍に対する予防、診断、治療面での 技術革新はめざましい発展を遂げているに もかかわらず、悪性新生物は昭和56年以降、 依然として日本で死因第1位を占める。現在、 悪性腫瘍に対する治療は、外科治療、化学療 法、放射線療法、interventional radiotherapy、 分子標的薬、免疫療法(抗体投与などの passive immunotherapy) などが実地の臨床 で施行されており、患者予後の改善や生活の 質の改善に寄与している。これらの治療法は、 患者側にとっては、いわば受動的治療であり、 その治療による悪性腫瘍の遺残が、最終的に は腫瘍死に帰結する。一方で、宿主の免疫監 視機構及び active immunotherapy (十分な 腫瘍特異的メモリーT細胞応答の惹起が達 成された場合)は、腫瘍の発生抑制 (Dunn GP, et al. Immunity 2004;137)及び拒絶効果を発 揮し (Xiang et al., J immunol. 1999;3676)、 個体からの悪性腫瘍の根絶に威力を発揮す ると考えられる。よって、樹状細胞療法を含 む active immunotherapy は、患者側にとっ て、能動的治療力を寄与するもので、腫瘍免 疫監視機構による腫瘍遺残の根絶を目的と する active immunotherapy を集学的治療に 盛り込むことは治療成績向上に寄与すると 考えられる。しかしながら、現行の active immunotherapy は、その確固たる治療効果 が得られていないため、悪性腫瘍の標準的治 療への取り入れは未だ実現していない。これ は、宿主免疫応答と腫瘍の免疫応答制御シス テムの全貌が明らかになっていないことが 一因と考えられる。一旦、腫瘍塊を形成した 悪性腫瘍と宿主の免疫応答には、独特の制御 機構が形成されていると考えられ、腫瘍内微 小環境(腫瘍細胞、血管新生関連細胞、cancer associated fibroblasts (CAF)、炎症細胞(制 御性T細胞、エフェクターT細胞、NK 細胞、 NKT 細胞、B細胞、tumor associated dendritic cells (TADC), tumor associated macrophages (TAM)など) と個々の免疫療法 による影響及び修飾に関する詳細な機序解 明がなされない限りは、確実な抗腫瘍効果を 惹起する active immunotherapy 開発は困難 であると考える。

我々は、腫瘍抗原をパルスした活性化樹状 細胞の腫瘍内投与(Intral Tumor Activated Dendritic Cell Therapy: 以下 ITADT と略) が、遠隔部皮下投与、静脈内投与と比して、 優れた抗腫瘍効果(established tumor の完 全拒絶効果を含む)及び強力な腫瘍特異的 CTL 活性を惹起することを見いだした(J Immunol. 2006)。この抗腫瘍効果は、主に CD8 T 細胞依存性で、一部の腫瘍には CD4 T 細胞にも依存することが判明した。この方法は、腫瘍抗原のパルスが不必要なため、腫瘍抗原の採取や腫瘍抗原の同定の必要性がなく、また、antigen loss variant などの腫瘍免疫の回避機構を獲得した腫瘍にも応用可能であるため、腫瘍内へのアプローチが可能な症例であれば普遍的な治療応用が期待できると考えられる。本研究ではこの樹状細胞腫瘍内投与 (ITADT) における抗腫瘍効果発揮メカニズムを、腫瘍内微小環境のダカニズムを検討する。

2. 研究の目的

腫瘍内微小環境に着目し、能動的細胞免疫療法時の宿主免疫応答と腫瘍の免疫応答制御システムの交互作用解明を目的として、

- A. 活性化樹状細胞腫瘍内投与療法 (ITADT) の免疫応答発動時の2次リンパ組織の役割、
- B. 腫瘍内樹状細胞と投与樹状細胞の腫瘍抗原特異的T細胞活性化における抗原提示能力評価とアロ樹状細胞の使用可否、
- C. 腫瘍内の微小環境(腫瘍血管新生と腫瘍免疫応答、腫瘍免疫療法時の腫瘍内線維芽細胞)の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(マウス) C3H/HeN mice (H-2k)、BALB/c mice $(H-2^d)$ BALB/c nude mice $(H-2^d)$ C57BL/6 $(H-2^b)$, DBA/2 $(H-2^d)$, BDF1 $(C57BL/6 \times DBA/2)$ F1, H-2^{b×d})を KBT オリエンタル (Tokyo, Japan)より、C57BL/6JJmsSlc-lpr マウス、 CBF1 mice (C57BL/6×BALB/c, H-2^{b×d}) を日 本 SLC (Shizuoka, Japan)より、C57BL/6 Ly5.1 congeneic mouse (H-2b) I-Ab 欠損マウス (C57BL/6)、T 細胞レセプター欠損マウス (C57BL/6)、IFN-g 欠損マウス (C57BL/6)、 Class I 欠損 (b-microglobline 欠損マウス; C57BL/6) を Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine、USA)、NIK^{aly/aly} マウスを日本クレア (Tokyo, Japan) より購入。SPF に準じた環 境下で飼育した(各雌 8 週齢を使用)。動物 実験は九州大学の動物実験指針に基づく学 内倫理委員会の実施認可(承認番号: 18-056-1「マウス腫瘍接種モデルを用いた新 規免疫療法(特に樹状細胞療法)の開発と免 疫学的、病理学的解析」他)を受け、その範 囲内で実施した。

(細胞株) MH134 (肝細胞癌株; H-2^k)、B16 melanoma (マウス悪性黒色腫; H-2^b)、CT-26 (マウス大腸癌株; H-2^d)を使用した。

(骨髄由来樹状細胞(bmDC)の作製) 骨髄 より、CD3、B220 に対するマグネットビーズ (BD Biosciences) でT細胞及びB細胞を除 去後、GM-CSF(250 U/ml; Peprotech EC Ltd., London, UK) & IL-4 (250 U/ml; Peprotech EC Ltd.) 存在下で5日間培養後、0.5 μg/ml lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で 8 時間刺激 (その後 50 μg/ml の polymyxin B (Sigma-Aldrich) でLPS を中和)、回収し、CD11cマグネットビー ズ (Myltenyi Biotec KK., Germany) で樹状 細胞に純化し(純度>90%)使用した。成熟 度はCD80、CD86、ICAM-1、I-A などの分子を 染色しフローサイトメーターで検討した。一 部の樹状細胞は carboxyfluorescein diacetate succinimidyl (CFDA; invitrogen Co. Carlsbad, CA)を用いてラベルしたものを 使用した。

(腫瘍接種モデル;ITADT)

下図のプロトコールで腫瘍を皮下接種、得られた樹状細胞を腫瘍内投与ないしは、腫瘍の



ライセートをパルスした樹状細胞を腫瘍より離れた遠隔部皮下接種で免疫療法を行った。

(骨髄移植)

レシピエントマウスを系統に合わせた致死 量の放射線 (8-10.5 Gy) を全身照射し、T 細胞除去骨髄細胞を移植した。

(免疫染色)

腫瘍組織を切除回収し、OCT コンパウンドに包埋、凍結し、クリオスタットにて薄切し、冷アセトンにて固定後、5%スキンミルクでブロック(必要であれば、内因性ビオチンのブロックも施行)したのち蛍光抗体法で染色、解析した。

(細胞障害性Tリンパ球 (CTL) アッ セイ)

脾臓リンパ球ををマウスより採取し、赤血球を 0.83% ammonium chloride で溶血後, $4x10^6/m1$ の complete medium (10% FCS + RPMI) に $5\mu g/m1$ の TRP-2 peptide (メラノーマ抗原として SVYDFFVWL) あるいは $3x10^5/m1$ の mitomycin-C ($100\mu g/m1$; 90 分間 37 度) 処理の各腫瘍細胞株を添加し、培養開始した。 2 日後に 30 U/ml の human recombinant IL-2 を添加、5 日後に細胞を回収し、ペプチドを

パルスした EL-4 あるいは腫瘍細胞を(メラノーマは IFN- γ (100 U/ml 24 時間刺激したもの)を標的とし(標的細胞は 100 μ Ci の 51 Cr (Na $_2$ 51 CrO $_4$)を 1.5 時間パルスしたもの)Cr release assay を施行した。

(細胞内サイトカイン検出)

腫瘍内、脾臓、及びリンパ節よりリンパ球を回収し、本アッセイを行った。腫瘍内のリンパ球の回収には、腫瘍塊を細切後、DNAseとliberase溶液で37度30分インキュベートし、 $100\mu m$ のナイロンメッシュに通過させたものを使用した。各細胞は $1 \times 10^7/m1$ の濃度で培養し、ペプチド、マイトマイシンC処理した腫瘍細胞、あるいはPMA/ionomycineを添加し、細胞内蛋白輸送阻害剤を添加後、各種表面抗原及び細胞内蛋白質を蛍光ラベルした抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。

(抗体による細胞除去実験)

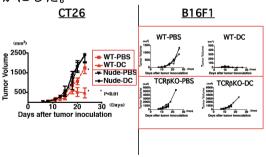
CD4 あるいは CD8 T 細胞の除去は anti-CD4 (GK1.5:ATCC)、anti-CD8 (53-6.72:ATCC) モノクローナル抗体を、NK 細胞は anti-asialo GM1 (ASGM1) 抗血清 (Wako Pure Chemiccal Industries, Osaka, Japan)を利用して生体内で除去した。除去時のプロトコール:CD4 あるいは CD8 T 細胞の除去は 250 μg のモノクローナル抗体を-2、-1、0、日目に、その後3日に一度投与を続けた。NK 細胞の除去は day -2、-1日目及びその後3日に1回100μ1の ASGM1を投与し続けた。

(細胞移入実験)

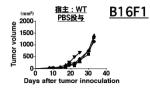
移入する各細胞はマグネットビーズを用い て、プロトコールに従って純化し、生体内に 投与した。

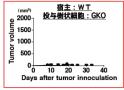
4. 研究成果

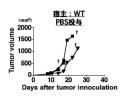
本研究において、以下の点について明らかにした。

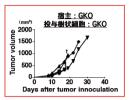


- ① ITADT の抗腫瘍効果は、T 細胞依存性で、 腫瘍特異的 T 細胞応答を誘導できる。
- ② 主に CD8 T細胞依存性で、一部の腫瘍には CD4 T細胞にも依存する。





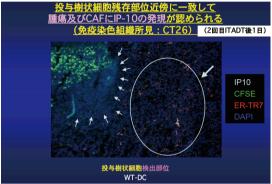




- ③ ITADT は IFN-y にも依存する。
- ④ 腫瘍抗原のパルスが不必要なため、腫瘍抗原の採取や腫瘍抗原の同定の必要性がなく、また、腫瘍抗原を消失した腫瘍などの腫瘍免疫の回避機構を獲得した腫瘍にも応用可能。
- ⑤ 腫瘍内ではなく腫瘍溶解液をパルスした 樹状細胞を遠隔部皮下接種した場合も自 己の樹状細胞であれば抗腫瘍効果は発揮 できるが、腫瘍拒絶 (B16 メラノーマ)を 効率に誘導できるのは腫瘍内投与法のみ であった。
- ⑥ アロの樹状細胞の効果は、腫瘍内投与療法では、セミアロジェニックの樹状細胞(主要組織適合抗原が半分違う樹状細胞)までは十分な抗腫瘍効果を惹起し、使用可能であるが、遠隔部皮下接種はこのセミアロジェニック樹状細胞を使用しても十分な抗腫瘍効果が発現できない。(つまり、樹状細胞を採取困難な小児患者の場合、両親の樹状細胞は、腫瘍内投与のみ有効である可能性がある)
- ⑦機能的 Fas 欠損マウス由来の DC を使用した場合は、完全な異系マウス由来の DC でも同系由来の DC と同等の抗腫瘍効果を発揮できることを見出した。本知見は、特に汎血球減少症及び小児の坦癌患者に対する DC のソース拡大が可能であることを示唆する。
- ⑧ IL-12 の腫瘍内遺伝子療法と ITADT 及び腫瘍切除術は、マウス肝癌皮下接種モデルで、術後の再発予防(転移の完全抑制)を可能とし、ITADT が neoadjuvant immunotherapyの一補助療法として有効に機能する可能性が示唆された(J Immunol. Kayashima H., Okano S., et al. in revision)
- ⑨血球系を野生型に置換したリンパ節欠損マウス(NIK^{aly/aly})を用いたマウス悪性黒色腫皮下接種治療実験にて、ITADT の抗腫瘍効果はリンパ節欠損マウスで完全にキャンセルされたことから、T 細胞応答の発動には、リンパ節が不可欠であることが明らかとなった。
- ⑩ B16 メラノーマ腫瘍を拒絶したマウスを 再感作し、2 日後に脾臓、リンパ節のリン

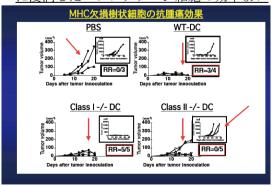
パ球をナイーブマウスに移入したところ、腫瘍再接種時の拒絶応答は脾臓に存在するメモリーT 細胞ではなく、所属リンパ節に存在するメモリーT 細胞が重要であることを見出し、腫瘍免疫療法における所属リンパ節の重要性が免疫応答の誘導期のみならず、メモリー応答時にも重要であることを見出した。本研究結果は、現在臨床リンパ節の重要性を立証する成果であり、有効な抗腫瘍効果の実現のために、腫瘍が存在する所属リンパ節を標的とすることが重要であることを示唆するものである。

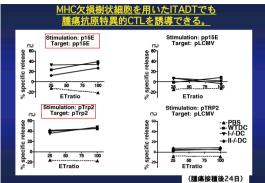
① ITADT により、腫瘍内へ宿主由来の樹状細胞並びに IFN-γ 陽性の T 細胞の動員、それと伴に投与樹状細胞周囲の腫瘍並びに線維 芽 細 胞 様 細 胞 に IFN-γ-inducible protein 10 (IP-10) の発現を高度に誘導



し、T 細胞依存性の血管新生抑制が惹起されることを見出した。よって、腫瘍内に活性化樹状細胞を投与することによって腫瘍内のTh1環境が増強され、腫瘍間質細胞の性質を免疫応答(特にTh1応答)が奏功しやすい状態へ改変を来すことが抗腫瘍効果を発揮する上で重要であることが判明した。(第97回日本病理学会総会(2008年、金沢、口演)、第49回、日本脈管学会(2008年、東京、口演)、第38回日本免疫学会(2008年、京都、口演)。

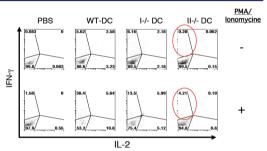
② 腫瘍抗原特異的 T 細胞応答をプライミングする樹状細胞は、<u>投与樹状細胞と宿主の抗原提示細胞の両者が機能</u>しており、このことが腫瘍特異的 T 細胞のプライミングの効率上昇に貢献している。また、<u>腫瘍内</u>に浸潤したエフェクターT 細胞の効率よい





再活性化には投与樹状細胞腫瘍が重要であった (特に B16 に対する拒絶誘導には投与樹状細胞の Class II 発現が重要で、CD4T 細胞エフェクター細胞の IFN-γ 産生増強と相関)。

腫瘍中のIFN-y産生CD4T細胞はClass || KODCで低下している。 (2回目ITADT後2日目)



③ よって、ITADT は通常の樹状細胞療法より、 多くの抗原特異的 T 細胞の活性化と局所 の IFN-γ の産生増強を惹起することが可能 となることより、他の投与ルートでの樹状 細胞療法より強い抗腫瘍効果を惹起でき ることが明らかとなった。

(結論)

- i) ITADT はリンパ節でのT細胞のプライミング後のエフェクターT細胞の腫瘍内浸潤により抗腫瘍効果を惹起するもので、遺伝子改変をしない場合は、セミアロジェニック樹状細胞まで使用可である。FAS の遺伝子発現抑制は ITADTでの完全なアロジェニック樹状細胞を使用可能にすることが示唆された。
- ii) ITADT は、樹状細胞の分化、成熟化に障害のある固形腫瘍微小環境における成熟化樹状細胞の供給療法として、腫瘍抗原特異的T細胞活性化と浸潤Tリンパ球の局所機能亢進を惹起する治療法である。
- iii) ITADT では、局所の IFN-γ 濃度の上昇並びに、腫瘍及び線維芽細胞様細胞の IP-10 発現亢進が惹起され、それが更なるT細胞遊走を促進するという微小環境構成細胞の Th-1 タイプのポジティブフィードバック機構による交互作用によって優れた抗腫瘍効果を惹起

する。

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)

- ① <u>Okano S.,</u> Yonemitsu Y., <u>Sueishi K.</u> Cancer immunotherapy using dendritic cells: current status and perspective. Fukuoka Igaku Zasshi. (査読有) 98 2007:277-286.
 - http://hdl.handle.net/2324/6368
- ② Tatsuta K., <u>Sueishi K.</u> et al. (他 10 名). Complete elimination of established neuroblastoma by synergistic action of gamma-irradiation and DCs treated with rSeV expressing interferon-beta gene. Gene Ther (査読有) 16 2009:240-251.
- ③ Inoue H., <u>Okano S.</u> et al. (他 11 名)
 Non-transmissible Sendai virus encoding
 granulocyte macrophage
 colony-stimulating factor is a novel and
 potent vector system for producing
 autologous tumor vaccines. Cancer Sci.
 (査読有) 99 2008:2315-2316.

[学会発表] (計8件)

- ①Okano S., Kondo H., Sueishi K. A pivotal role of CD4 T-cells (CD4) for generation of functionally distinct memory CD8 T-cells (mCD8) in tumor immunotherapy (TI) using dendritic cells (DC). 第 37 回日本免疫学会総会、2007年11月20日、グランドプリンスホテル高輪(東京)。
- ② Kondo H., <u>Okano S.</u>, <u>Sueishi K.</u> Assessment of antitumor immune response using Fas-mutated dendritic cells. 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 22 日、グランドプリンスホテル高輪(東京)。
- ③<u>岡野慎士</u>、近藤晴彦、居石克夫。腫瘍内活性化樹状細胞(DC)投与療法(ITADT)における腫瘍血管新生抑制効果とT細胞の役割に関する病理学的検討。第97回日本病理学会・総会、2008年5月16日、石川県立音楽堂(金沢市)。
- ④近藤晴彦、<u>岡野慎士、居石克夫</u>。Fas 欠損 アロ樹状細胞を用いた抗腫瘍効果の病態学 的検討。第 97 回日本病理学会・総会、2008 年 5 月 16 日、石川県立音楽堂(金沢市)
- ⑤<u>岡野慎士、居石克夫</u>。樹状細胞(DC)療法における腫瘍血管新生抑制効果とT細胞の役割に関する病理学的検討。第 48 回日本脈管学会・総会、2008 年 10 月 24 日、東京ステーションカンファレンス(東京)。
- ⑥Okano S., Kondo H., Sueishi K. A pivotal

role of CD4 T-cells (CD4) for long-lived memory CD8 T-cells (mCD8) in tumor immunotherapy. 第 67 回日本癌学会・総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場(名古屋)。

- ⑦ Kondoh H., <u>Okano S.</u>, <u>Sueishi K.</u> Assessment of antitumor immune response using allogeneic dendritic cells. 第 67 回日本癌学会・総会、2008 年 10 月 29 日、名 古屋国際会議場(名古屋)。
- ⑧ <u>Okano S.</u>, Kondo H., <u>Sueishi K.</u> Intratumoral activated dendritic cell therapy induces T-cell-dependent anti-angiogenic effect in tumor. 第 38 回日本免疫学会・総会、2009 年 12 月 1 日、国立京都国際会館(京都市)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡野 慎士 (Shinji Okano) 九州大学・大学病院・臨床助教 研究者番号:10380429

(2)研究分担者

居石 克夫(Katsuo Sueishi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号:70108710

中川 和憲(Kazunori Nakagawa)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号:50217668

古賀 孝臣 (Takaomi Koga) 九州大学・大学病院・講師 研究者番号:70380615