

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10963

研究課題名(和文)新しいがん免疫治療：「免疫皮弁」の応用研究

研究課題名(英文)Novel cancer immunotherapy: Application of Immuno-flap

研究代表者

井上 啓太 (Inoue, Keita)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80618520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：「がん免疫皮弁」とは皮膚・皮下脂肪と血管茎を一塊とした「皮弁」の中に、癌特異的抗原により免疫能を付加した樹状細胞を移植して、局所の癌免疫応答を誘導するというコンセプトの皮弁である。ラット免疫皮弁モデルにおいて株化腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を示すことがわかっている。H27 - 29年度は、臨床応用を見据えてラットの下腹部に作成した免疫皮弁モデルを用いて移植した細胞の挙動追跡実験およびブタ鼠径部の皮弁モデル、リンパ流の解析をおこない、ブタモデルによって「がん免疫皮弁」の解析が可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The conceptual "immunologically augmented skin flap (immuno-flap)" is a novel anti-cancer approach, in which anti-cancer immunity is evoked by injection of dendritic cells stimulated by tumor specific antigens. The immuno-flap has been proved to be effective in a rat model so far. In this project, 2015-2017, rat and porcine models were utilized to analyze the traffics of GFP labeled cells and anatomy of lymphatic channels, suggesting porcine model was useful to examine the anti-cancer effect by immuno-flap.

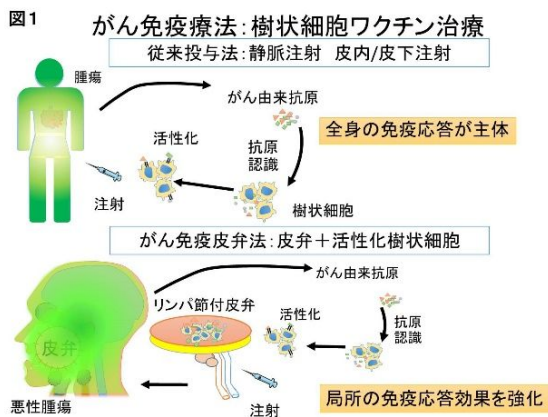
研究分野：形成外科学

キーワード：免疫療法 樹状細胞 皮弁 リンパ管

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療のひとつに樹状細胞を用いたがん免疫療法がある。これは樹状細胞によりがん抗原特異的な免疫応答を誘導し、がん細胞の増殖抑制や傷害を目的とするがんワクチン療法である。

平成26年度までにわれわれのグループが提唱した「がん免疫皮弁」とは皮膚・皮下脂肪と血管茎を一塊とした「皮弁」の中に、癌特異的抗原により免疫能を付加した樹状細胞を移植して、局所の癌免疫応答を誘導するというコンセプトの皮弁である(図1)。このコンセプトを提唱してから平成26年度までに基礎的実験をおこない、同系ラットの樹状細胞を抗原刺激して得られた活性化樹状細胞を免疫皮弁に移植することで株化腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を示すことがわかった。



(がん免疫療法: 樹状細胞ワクチン療法の比較。従来法においては、がん由来抗原で刺激した樹状細胞を静脈注射や皮内・皮下注射して、全身の免疫応答を起こしていたが、がん免疫皮弁を用いた方法では腫瘍に近接する皮弁内にも樹状細胞を注入するため、局所の免疫応答の強化が期待される。)

2. 研究の目的

本研究では、平成26年度までに行ってきた

「がん免疫皮弁」の臨床応用を実施する上で必要な予備的実験をおこなった。最大の焦点はヒトに近い大動物における免疫皮弁の機能解析を行うことである。そのため、まず移植した樹状細胞の挙動追跡実験を行い、さらにブタにおいて免疫皮弁の作成およびリンパ管の解剖について解析した。

具体的には、平成27年度は、臨床応用を見据えてラットの下腹部に作成した免疫皮弁モデルを用いて移植した細胞の挙動追跡実験を行った。比較的高価なブタでの追跡実験を行う前に、基本的なトレーサの条件検討、撮影条件などの検証をラットを用いて実施した。

平成28年度は平成27年度に引き続き、静岡がんセンター免疫治療部において、ラット細胞を用いた細胞挙動の追跡実験をおこなった。また、平成28年度はがん免疫皮弁の臨床応用の実施を視野におき、ヒトに近い動物をもちいて皮弁を作成し、細胞を安全に注入できるかを検証する必要がある。そのため、非臨床試験の予備実験として、自治医科大学先端医療技術開発センターにおいてブタを用いた皮弁モデルの開発をおこなった。

平成29年度はがん免疫皮弁のリンパ流の解析および、腫瘍免疫反応の強化を視野におき、自治医科大学先端医療技術開発センターにおいてヒトに近いブタをもちいて皮弁周囲組織のリンパ流の解析をおこなった。

3. 研究の方法

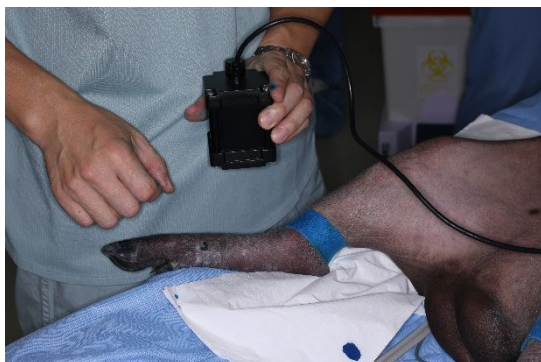
平成27年度の挙動追跡実験では、GFP ラットの樹上細胞を大腿骨幹部から採取して、GM-CSF、IL4 を添加した培地にて8日間浮遊培養を行い、LPS で刺激することで活性化樹状細胞を得た。GFP ラット由来の樹状細胞の特性は、野生型ラットの樹状細胞と変わりは無

かった。次いで非 GFP ラットの鼠径部に直径 1 cm の有茎皮弁を作成して下腹部正中に移動した。この有茎皮弁は大腿動静脈を系としている皮弁であり、皮下脂肪織内にリンパ節を含んでいる。

平成 28 年度のブタ皮弁モデルの開発では、ブタ（家畜豚 15 kg 前後）を用いて実験を行った。ブタを全身麻酔下におき、鼠径部において皮弁を作成した。

平成 29 年度のブタリンパ流解析では、ブタ（家畜豚 15 kg 前後）を用いて実験を行った。ブタを全身麻酔下におき、インドシアニンググリーンを足部に注入し近赤外光カメラを用いて、リンパ流を観察した（図 2）。

図 2 ブタ下肢におけるインドシアニンググリーン検査によるリンパ管撮影



（全身麻酔下にブタ足背皮下にインドシアニンググリーンを局所注射すると、インドシアニンググリーンがリンパ管内に取り込まれる。直後に近赤外光カメラ[写真中央黒いカメラ]を用いてリンパ管を観察する。）

4. 研究成果

ラット樹状細胞挙動追跡

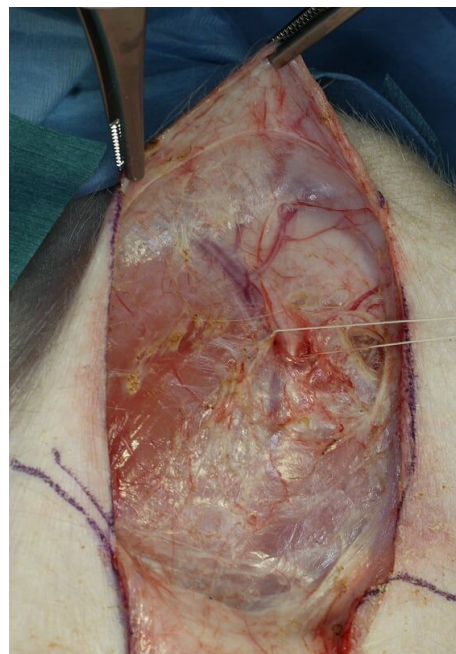
ラット免疫皮弁の皮下脂肪織内に GFP ラット樹状細胞を 0.1ml の懸濁液にして免疫皮弁内に局注した。0.1ml 中に約 100 万個の樹状細胞を含めることが出来た。皮弁を縫い付け、48 時間後に皮弁組織を回収し、GFP 陽性樹状

細胞の局在を解析した。皮弁内に GFP によりラベリングした細胞を注入し、蛍光顕微鏡により観察した。これにより GFP 陽性細胞が皮弁内や周辺組織内に分布していることがわかったが、蛍光のバックグラウンドが強く正確な解析はやや困難であった。今後は、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色などにより細胞分布を同定する必要があると考えられた。

ブタ皮弁モデルの検証

ブタ皮弁作成では浅大腿動脈分枝を露出した。浅大腿動脈分枝を系とした皮弁は鼠径部に最大で 20×20 cm 程度作成可能とみられた。細胞注入部位と想定される血管吻合部の血管径は 1.5 mm から 3 mm 程度であり、ヒト皮弁に近似していることがわかった（図 3）。また、同部において顕微鏡下に微小血管吻合実験もおこない、成功した。ブタ鼠径部皮弁はがん免疫皮弁のモデルとして使用可能であることがわかった。

図 3 ブタ鼠径部における皮下血管解剖



（ブタ鼠径部皮下において浅大腿動脈分枝[写真中央]を露出したところ。1 対の伴走静脈が存在し、これらの血管束を茎として遊離皮弁を作成することが可能であった。）

ブタリンパ管解剖の解析

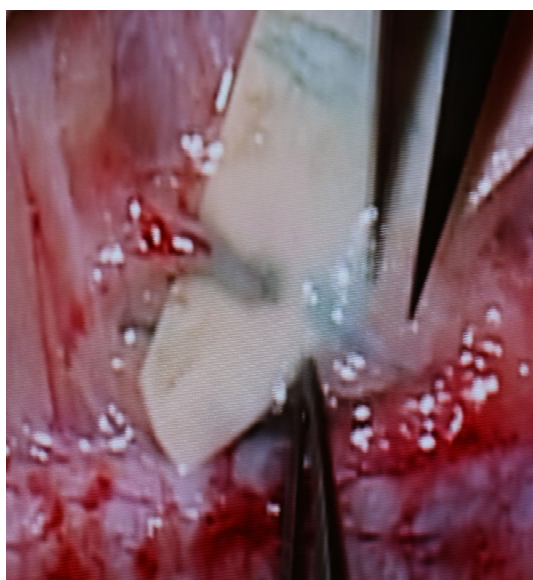
インドシアニングリーンでのマーキングを元にブタリンパ管を露出したところ、リンパ管は鼠径レベルで皮下脂肪内に 10 本程度確認することができた(図4)。リンパ管直径は0.3mmから0.5mm程度であり、鼠径リンパ節に向かってることが分かった。また、リンパ管の性状もヒト皮弁に近似していることがわかった。また、免疫皮弁中のリンパ管と静脈を吻合することで、より効率的な腫瘍免疫反応を惹起できる可能性が考えられた。皮弁採取部において顕微鏡下にリンパ管静脈吻合実験が可能であるかの検証もおこなった(図5)。吻合は4か所についておこなった。2週間後に組織を摘出したところ、吻合部が開存しているものが1例あった。技術的な改善により、開存率の向上が望まれたが、ブタがん免疫皮弁モデルのリンパ管も解析可能であることがわかった。

図4 インドシアニングリーン造影によりマーキングされたブタ下肢リンパ管



(近赤外光カメラ下で可視化されたリンパ管を油性赤マジックでマーキングしている。鼠径線レベル[写真中央]で10本程度のリンパ管が存在することが分かった。がん免疫皮弁を鼠径部に作成すると、多数のリンパ管とリンパ節を皮弁内に含めることが可能である。これらのリンパ管と静脈を吻合することにより、効率のよく樹状細胞を循環させることが可能である。)

図5 ブタにおけるリンパ管と静脈の吻合術



(皮下細静脈[写真左側]とリンパ管[写真右側]を吻合するところ。ヒトのリンパ管静脈吻合術と非常に近い状況で実施することができる。)

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 啓太（INOUE, Keita）

静岡県立静岡がんセンター・再建形成外科・医長

平成28年度から変更

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80618520

(2) 研究分担者

秋山 靖人（AKIYAMA, Yasuto）

静岡県立静岡がんセンター・免疫治療研究部・部長

研究者番号：70222552

中川 雅裕（NAKAGAWA, Masahiro）

静岡県立静岡がんセンター・再建形成外科・部長

研究者番号：00285793

三枝 紀子（SAEGUSA, Noriko）

静岡県立静岡がんセンター・再建形成外科・医師

平成29年度から変更

（財）沖中記念成人病研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10642639

(3) 連携研究者

なし