

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390190
 研究課題名(和文) 樹状細胞療法の反応例の解析に基づく腫瘍血管標的療法の検討
 研究課題名(英文) Development of anti-angiogenic therapy based on the analysis of patients responded to dendritic cell therapy

研究代表者
 山下 直秀 (YAMASHITA NAOHIDE)
 東京大学・医科学研究所・教授
 研究者番号：90174680

研究成果の概要(和文)：

悪性黒色腫に対する樹状細胞療法で反応した症例を解析した結果、治療反応症例にのみ炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase II:CAII)に対する抗体が上昇していた。また CAII は腫瘍血管内皮に特異的に染色された。これらの事実から本研究の目的は、(1)樹状細胞療法の反応例における腫瘍血管を破壊させる抗体の検索、(2)腫瘍血管内皮様に分化させた hUVEC を抗原とした腫瘍免疫療法の確立とした。(1)についてメラノーマ腫瘍 cDNA ライブラリーを作製し、蛋白を発現させ、患者血清を用いたスクリーニングを行った。(2)の腫瘍免疫療法については動物実験を行いその効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：

We analyzed the melanoma patients who were treated with the dendritic cell therapy. In three patients who responded to this therapy the antibody to carbonic anhydrase II (CAII) was elevated after treatment. Immunohistochemical study revealed the expression of CAII specific to tumor vessel endothelium. Based on these findings this study was designed (1) to explore antibodies which specifically destruct the tumor vessel, and (2) to establish the immunotherapy using hUVECs which are differentiated similar to tumor vessel endothelium. We constituted cDNA library from melanoma tissue and expressed proteins, and thereafter screened with patients' sera. With regard to immunotherapy we conducted animal model study and found that immunization of tumor vessel endothelium significantly prolonged the life span of animals transplanted with melanoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：(1)樹状細胞、(2)腫瘍血管、(3)発現解析、(4)hUVEC、(5)抗体

1. 研究開始当初の背景

これまでに第IV期悪性黒色腫患者10名と遠隔転移を伴う甲状腺癌患者6名に対し、腫瘍溶解液を抗原とする樹状細胞療法（第I相臨床研究）を責任医師として行っている（Nagayama et al. *Melanoma Res* 13:1, 2003 ; Kuwabara et al *Thyroid*, 2006, in press）。臨床研究に参加した全ての患者に対してこの治療は安全に行うことができた。また抗核抗体などの自己免疫疾患にかかわる自己抗体の発現も認められなかった。臨床経過は悪性黒色腫ではstable disease1名, mixed response2名, progressive disease7名であり、甲状腺癌では stable disease2名, progressive disease4名であった。悪性黒色腫でmixed responseを示した2例では、多数の転移巣の壊死とそれに続く腫瘍の縮小あるいは消失が認められた。これらの反応は第IV期悪性黒色腫の自然経過では説明できない現象であり、樹状細胞療法が契機となって生じたものと結論され、病理学的な検索の結果、壊死は腫瘍血管の障害によって生じている可能性が高いことが判明した。さらに壊死巣への細胞浸潤は少なく、壊死は液性因子によって生じている可能性が示唆された。これまで樹状細胞をはじめとした腫瘍免疫療法は、CD8+陽性T細胞によるCTL反応を主眼とするものがほとんどであるが、抗体に注目した解析はこれまで活発には行われていなかった。よって治療反応例における腫瘍組織に対する抗体をプロテオーム解析によって検討した。その結果、悪性黒色腫の治療反応症例にのみ、治療後に炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase II:CAII) に対する抗体が上昇していることが明らかとなった（Yoshiura et al, *Clin Cancer Res* 11:8201, 2005）。次に免疫組織化学によりCAIIの局在を調べたところ、腫瘍血管内皮に特異的に染色され、正常血管内皮には認められなかった。臨床研究では血管破綻による壊死は腫瘍にのみ生じ、正常組織では起きなかったことと一致する。さらに悪性黒色腫以外の癌における血管を検索したところ、食道癌、肺癌、腎癌などにおいても腫瘍血管に CAII が発現していることが判明した。以上の事実より、CAII は腫瘍血管内皮に特異的に発現する腫瘍関連抗原であり、免疫系の標的になると考えられた。CAII は酸塩基平衡を調節する酵素であり、正常組織では腎尿細管や膀胱上皮で活性が高いが、腫瘍血管に特異的に発現するという事はこれまでは報告されていなかった。抗 CAII 抗体の生物学的な意義であるが、CAII は細胞内のみ存在する酵素であるので、抗 CAII 抗体自身が腫瘍血管を破綻させたとは考えにくく、他の原因により腫瘍血管が破綻しその結果抗 CAII 抗体が誘導されたと解釈された。すなわち腫瘍血管を破綻させ

る別の液性因子が存在するという事になる。もう一つの知見としては、腫瘍血管は免疫原性を有するので、これを抗原として用いれば癌種を超えた免疫治療が可能になるということである。正常血管内皮であるヒト臍帯静脈血管内皮細胞(hUVEC)を3次元培養し、腫瘍環境を再現させるために低 pH、低酸素で培養すると CAII の活性が高まることをこれまでに確認している。これは適切な条件下でhUVECは腫瘍血管内皮様に分化することを示唆する。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2つに大別される。
①樹状細胞療法の反応例における腫瘍血管を破綻させる抗体の検索、②腫瘍血管内皮様に分化させたhUVECを抗原とした腫瘍免疫療法の確立。腫瘍血管を破綻させる抗体が同定されれば、これを治療に用いることは可能であるが、GMP基準でヒト化抗体を作製し、これを用いて治験を行うためには巨額な資金と相当の時間が必要となる。(2)の細胞療法は抗体に比較して安価で行え、院内製剤として樹状細胞を作製して臨床研究を行うことにそれほど時間は要しない。またこの樹状細胞療法が確立すれば、腫瘍血管内皮様に分化させたhUVECを癌ワクチンとして応用することも可能になる。よって上記2つを目的とした。具体的には(1)については悪性黒色腫の発現解析を行い、樹状細胞療法に反応した患者の治療後の血清から腫瘍組織と結合する抗体を検索し、腫瘍血管の破綻と関連するものを同定する。(2)については腫瘍血管特異的に発現するSTC1、TEM1、TEM7、CAIIなどの蛋白、あるいはそのmRNAを指標とし、低酸素、低pHの設定条件に加え、種々の組み合わせのサイトカインを添加した培地でhUVECを培養し、至適条件を決定する。さらにレーザーマイクロダイセクション法を用いて腫瘍組織から腫瘍血管内皮を切り出し、発現している他の腫瘍血管マーカーを検索し、hUVECの培養条件をより良いものに改変する。これにより腫瘍血管内皮様に分化したhUVECを抗原とする免疫療法の臨床研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍の発現解析による抗体の検索
①メラノーマの腫瘍組織を摘出後速やかにRNA later (Ambion) に浸し、冷凍保存する。
②解凍後 Trizol 試薬 (Invitrogen) 中でホモジェナイズし、腫瘍組織の total RNA を抽出し、Total RNA から poly(A) purist (Ambion) を用いて poly(A)⁺ RNA を精製する。
③上記 RNA を用い、ZAP Express cDNA synthesis kit (Stratagene) を用いて一方方向性の cDNA 合成を行い、ZAP Express XR (Xho I と Eco RI であらかじめ切断されたベクタ

一)に cDNA を挿入し、一方向性ライブラリーを作製する。

④ライブラリーのタイターをチェックし、各プール 3 - 4 万個の独立クローンを含むようにプール化し、一回だけ amplification を行う。

⑤異なったクローンの挿入遺伝子断片を T3 と T7 プライマーを用いて PCR で増幅しチェックを行う。

⑥他の患者の腫瘍摘出標本からも同様に一方向性ライブラリーを作成し、メラノーマ腫瘍由来のライブラリーを 2 - 3 種類以上作製してスクリーニングに供する。

⑦プール化して保存したライブラリーをそれぞれプラーク数 2 - 3 万個となるように 15 cm² プレートに撒く。

⑧ファージを IPTG 処理したニトロセルロース膜に転写し、膜上で cDNA 由来のペプチドを発現させる (Kiniwa et al. *Cancer Res* 61:7900, 2001; Zhou et al. *Cancer Immunol Immunother* 55:910, 2006)。

⑨発現ニトロセルロース膜を吸着処理を行った患者血清、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体と順次反応させ、NBT/BCIP 溶液 (Roche) で発色させ、陽性クローンを検出する。

⑩陽性プラークを希釈し、10cm² シャーレに撒き直し、患者血清と反応させ、陽性クローンを単離する。

⑪陽性クローンに関してはクローンのファージを単離後、インサート cDNA を T3 と T7 プライマーで増幅し、ダイレクトシーケンシングで遺伝子を同定する。

⑫シーケンシングの結果、明らかとなった遺伝子を pGEX-4T シリーズのベクターに挿入し、大腸菌 BL21 中でグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパクとして発現させる。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパクはグルタチオンアガロースを用いて精製する。

⑬ ウェスタンブロットティングで融合タンパクに対する患者血清の反応性の変化を治療前後で比較する。

⑭ 他のメラノーマ患者血清の融合タンパクに対する反応性に関しても同様にウェスタンブロットティングで検討を行う。

(2) 培養 hUVEC を抗原とする腫瘍免疫療法の検討

① hUVEC の腫瘍血管内皮様細胞への誘導 : hUVEC を腫瘍環境類似化で培養することにより、腫瘍血管内皮様細胞へ誘導する。カルチャーディッシュへ hUVEC (2 x 10⁵ 個) をまき、3 次元培養する。低酸素、低 pH の条件に加え、VEGF、FGF を含めた種々のサイトカインを添加して約 20 時間培養した後、mRNA を抽出する。既知の腫瘍血管内皮マーカージ遺伝子としては STC1 (Kahn et al. *Am J Path* 156:1887, 2000)、

TEM1、TEM5、TEM7、TEM8 (Croix et al. *Science* 289:2297, 2000; Carson-Walter et al, *Cancer Res* 61:6649, 2001; Nanda & Croix, *Curr Opin Oncol* 16, 44:2004 ; *Nature Rev Cancer* 5:437, 2005) などが報告されている。これらのマーカージに加え、CAII を選択し、real time RT-PCR を用いて mRNA の発現をモニターしながら、最適な培養条件を検索する。

② 発現解析 : 反応性の変化が治療経過に相関する遺伝子が得られれば、遺伝子発現に関して特に腫瘍あるいは腫瘍血管や腫瘍間充織に発現しているかどうか免疫組織化学と in situ hybridization 法 (Moorman et al. *J Histochem Cytochem* 2001 49:1, 2001) で検討を行う。

③ その後、グルタチオンアガロースを用いて精製した融合タンパクをウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作製する。抗血清はアフィニティー精製する。腫瘍組織切片をアフィニティー精製したポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検討を行う。

④ 腫瘍組織切片を用いてポリクローナル抗体による in situ hybridization で検討を行う。実際には共同研究者らはジゴキシングニン-UTP でラベルした RNA プローブを用いた in situ hybridization の方法を確立しているため、この方法を用いる。

⑤ 抗体療法に関する検討 : 実際にヒト遺伝子に対応するマウスホモログ遺伝子が存在すれば、その遺伝子の中でタンパクをコードする部分の cDNA をマウス材料から RT-PCR で増幅する。

⑥ 増幅した cDNA を TOPO ベクター (invitrogen) にクローニングし、遺伝子配列を確認する。

⑦ 配列を確認した断片を pGEX-4T シリーズのベクターに挿入し、大腸菌 BL21 中で GST 融合タンパク質として発現させる。

⑧ GST 融合タンパク質はグルタチオンアガロースを用いて精製する。

⑨ 精製した融合タンパクをウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作成する。抗血清はアフィニティー精製する。

⑩ アフィニティー精製したポリクローナル抗体を用いて抗腫瘍実験を行う。具体的には種々の担癌マウスを作製し、腹腔内に抗体を注射して腫瘍の退縮、生存期間の変化を調べる。

⑪ マウスホモログ遺伝子の解析と並行し、ヒトポリクローナル抗体による腫瘍血管内皮様 hUVEC の傷害性を in vitro で調べる。

⑫ 腫瘍血管内皮マーカージの確立 : 腫瘍組織と正常組織から、顕微鏡下でそれぞれ血管内皮細胞だけを LMM 法 (Gjerdrum & Hamilton-Dutoit, *Methods Mol Biol* 293:139, 2005) によって切り出す。内皮から mRNA を抽出して RT-PCR により増幅する。色素で標識

化しつつcDNA を合成し、DNA チップ・マイクロアレイで正常血管内皮と腫瘍血管内皮の遺伝子発現の差異を解析し、新規マーカーを含む腫瘍血管内皮のマーカーを確立する。さらに培養hUVECにおいて新しく同定されたマーカーの動態を検索し、他のマーカーとの最適の組み合わせを調べる。

⑬腫瘍血管内皮様hUVECの抗原としての有効性の確認：誘導した腫瘍血管内皮様hUVECを、ボランティアから提供された樹状細胞へ取り込ませ、in vitroでDCを患者血液のリンパ球と混合培養して、免疫応答が得られることを明らかにする。

⑭腫瘍血管内皮様hUVECを用いた臨床研究：樹状細胞療法を用いた臨床研究のためのプロトコルを作成する。

⑮GMPに準拠した腫瘍血管内皮様hUVECを作製する。培地、サイトカイン等はGMPあるいはGLP基準のものを選択し、作製は施設内の臨床細胞工学室で行う。安全性については、細菌・真菌培養、エンドトキシン定量試験、マイコプラズマDNAのPCRと染色試験で検討する。

⑯癌患者の末梢の単球から誘導した樹状細胞に、腫瘍血管内皮様hUVECの溶解液を抗原としてパルスし、皮内投与する。治療の安全性、免疫反応、腫瘍の変化を検索し、治療後に腫瘍の生検を行って腫瘍血管の変化を病理学的に調べる。

4. 研究成果

第IV期悪性黒色腫患者10名と遠隔転移を伴う甲状腺癌患者6名に対し、腫瘍溶解液を抗原とする樹状細胞療法(第I相臨床研究)を行った。悪性黒色腫でmixed responseを示した2例では、多数の転移巣の壊死とそれに続く腫瘍の縮小あるいは消失が認められた。検索の結果、悪性黒色腫の治療反応症例にのみ、治療後に炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase II:CAID)に対する抗体が上昇していることが明らかとなった。CAIIの局在を調べたところ、腫瘍血管内皮に特異的に染色され、正常血管内皮には認められなかった。これらの事実から本研究の目的は、(1)樹状細胞療法の反応例における腫瘍血管を破壊させる抗体の検索、(2)腫瘍血管内皮様に分化させたhUVECを抗原とした腫瘍免疫療法の確立とした。(1)についてメラノーマ腫瘍cDNAライブラリーを作製した。腫瘍組織の一方向性のcDNA合成を行い、ZAP Express XRにcDNAを挿入し、一方向性ライブラリーを作製した。各プール3-4万個の独立クローンを含むようにプール化し、amplificationを行った。メラノーマ腫瘍由来のライブラリーを3種類作製してスクリーニングを行った。次に患者血清を用いたスクリーニングを行った。(2)の腫瘍免疫療法については動物実験を行いその効果を確認した。マウス血管内皮細胞

株Tpit/Eをアジュバンドとともにマウスに皮下注射してワクチンとして免疫し、その後メラノーマ細胞を移植した。対照群に比べてワクチン投与群では明らかに腫瘍の増大が抑制された。また生存期間についてもワクチン投与群は対照群に比べて有意に延長していた。このことは腫瘍血管に対する免疫が抗腫瘍効果を持つことを示している。

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6件)

1. Sato K, Eizumi K, Fukaya T, Fujita S, Sato Y, Takagi H, Yamamoto M, Yamashita N, Hijikata A, Kitamura H, Ohara O, Yamasaki S, Saito T, and Sato K. (2009) Naturally occurring regulatory dendritic cells regulate murine cutaneous chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 113, 4780-4789
2. Yoshiura K, Nishishita T, Nakaoka T, Yamashita N, Yamashita N. (2009) Inhibition of B16 melanoma growth and metastasis in C57BL mice by vaccination with a syngeneic endothelial cell line. *J Exp Clin Cancer Res* 28:13-18
3. Fujita S, Yamashita N, Ishii Y, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Fukaya T, Nozawa R, Takamoto Y, Yamashita N, Taniguchi M, Sato K. (2008) Regulatory dendritic cells protect against allergic airway inflammation in a murine asthmatic model. *J Allergy Clin Immunol.* 121: 95-104.
4. Watanabe T, Sato T, Amano T, Kawamura Y, Kawamura N, Kawaguchi H, Yamashita N, Kurihara H, Nakaoka T. (2008) *Dnm3os*, a Non-coding RNA, is Required for Normal Growth and Skeletal Development in Mice. *Dev. Dyn.* 237: 3738-48.
5. Kuwabara, K., Nishishita, T., Morishita, M., Oyaizu, N., Yamashita, S., Kanematsu, T., Obara, T., Mimura, Y., Inoue, Y., Kaminishi, M., Kaga, K., Amino, N., Kitaoka, M., Ito, K., Miyauchi, A., Noguchi, S., Uchimaru, K., Akagawa, E., Watanabe, N., Takahashi, TA., Sato, K., Inazawa, T., Nakaoka, T., Yamashita, N (2007) Results of a phase I clinical study using dendritic cell vaccinations for thyroid cancer. *Thyroid*, 17:53-58
6. Fujita, S., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Kubo, M., Yamashita, N. and Sato, K. (2007) Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 110: 3793-3803

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 直秀 (YAMASHITA NAOHIDE)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：90174680

(2) 研究分担者

中岡 隆志 (NAKAOKA TAKASHI)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：80241256

渡辺 徳光 (WATANABE TOKUMITSU)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80401264

(2007年度のみ)