

平成 21 年 3 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590793

研究課題名(和文) ヒト癌幹細胞と樹状細胞との融合細胞を用いた膵臓癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Induction of antitumor immunity by fusions of dendritic cells and pancreatic cancer stem cells

研究代表者 小井戸 薫雄 (KOIDO SHIGEO)
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70266617

研究成果の概要：

1. 成熟樹状細胞と熱処理した癌細胞を細胞融合させた新規癌ワクチンを作成した。
2. 融合細胞から癌拒絶抗原を同定する新技術を開発した。
3. CD133 陽性の膵臓癌細胞は癌幹様細胞の特徴を有していた。
4. 癌ワクチンは、免疫抑制状態を改善する治療法と併用することが望ましい。
5. 進行膵臓癌において塩酸ゲムシタビンと癌ワクチン療法の併用療法により、相乗的治療効果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
2008年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学／消化器内科学

キーワード：樹状細胞、がんワクチン、膵がん

1. 研究開始当初の背景

(1)膵臓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い。

(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)新規治療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

(1)自然免疫を活用した樹状細胞癌ワクチンの開発

(2)新規腫瘍拒絶抗原の単利

(3)癌ワクチンの癌細胞逃避機構の解明

(4)膵臓癌細胞株より幹細胞様細胞の同定。

(5) 膵臓癌における癌ワクチンと化学療法との併用療の有効性を解明する。

3. 研究の方法

(1) 改良型融合細胞ワクチンの開発：

Toll-like receptor agonist である OK-432 の癌ワクチンへの効果を明らかにする。

(2) LC/MS/MS を用いて、新しい癌拒絶抗原の同定システムを確立する。

(3) 癌ワクチン治療を受けた患者の癌細胞から産生される物質の免疫担当細胞に及ぼす影響を調べる。

(4) 膵臓癌細胞株より CD133 陽性細胞を分離し、腫瘍形成能を調べる。

(5) 膵臓癌細胞株の塩酸ゲムシタピン（標準化学療法）を添加することによる腫瘍抗原の発現変化や細胞傷害性 T 細胞による殺傷効果の変化を調べる。

4. 研究成果

(1) Toll-like receptor agonist である OK-432 にて成熟誘導した樹状細胞と熱処理した腫瘍細胞を融合した改良型融合細胞ワクチンは(a)熱ショック蛋白、MHC class I、II、CEA、CD80、CD86、CD83 と IL-12 の著しい発現増強、(b)融合細胞からの IL-12 の産生増強、(c)自己腫瘍細胞に対する CTL 活性の増強、そして(d)CD107+IFN-gamma+CD8+ T 細胞と CD154+IFN-gamma+CD4+の誘導亢進が認められた。以上より、改良型融合細胞ワクチンは相乗的に免疫原性が増強し、ワクチンによる癌治療効果の改善が期待される。

(2) マウス肝癌細胞を取り込ませた樹状細胞とコントロール樹状細胞の MHC class II 上に提示されるペプチド抽出し、LC/MS/MS を用いて両者を比較検討することにより、T 細胞に提示される新規腫瘍拒絶抗原の同定を試みた。同定された抗原ペプチドを人工合成しアジュバントとともにマウスに免疫し、T 細胞からのサイトカイン産生を検討した。LC/MS/MS による解析の結果、肝癌細胞に発現する Cytochrome p-450 2j subfamily (CYP2j5) 分子の一部を構成するペプチドが肝癌細胞を取り込ませた樹状細胞の MHC class II から分離された。この新しい単利方法は今後ヒト癌幹細胞関連抗原への同定に応用する予定である。

(3) 樹状細胞と肝細胞癌の融合細胞ワクチンを肝細胞癌患者 1 例に 9 回ワクチン治療を行った（倫理委員会の承認と患者の同意を得

ておこなった）。この臨床試験の結果、下記の知見を得た。

(a) ワクチン後の患者より誘導した樹状細胞はワクチン前と比較し、活性化していた。

(b) ワクチンにより自己 T 細胞を刺激し、IFN- γ の産生が増強していた。

(c) ワクチン治療により腫瘍抗原 (WT1 や CEA) 特異的で自己癌細胞を殺傷する細胞傷害性 T 細胞の誘導が可能であった。

(d) ワクチン治療により肝細胞癌の原発病巣は安定していたが転移病巣はコントロールできなかった。

(e) 肝細胞癌の培養液用いて作製した融合細胞ワクチンは活性化していなく未熟な融合細胞であった。この未熟融合細胞を用いて自己 T 細胞を刺激すると、IFN- γ の産生が減弱しており、分裂能が低下していた。またこの刺激 T 細胞は細胞傷害性 T 細胞に分化するよりも抑制生 T 細胞への分化増殖傾向を示していた。

(f) 以上より、癌細胞は癌抑制産物を産生することによって生じる免疫逃避機構が存在し、その結果抑制生 T 細胞を誘導している可能性が示唆された。癌ワクチンは癌量の少ない段階で治療することにより有効な治療法となる可能性があると考えられた。

(4) 癌幹細胞を標的とした癌ワクチンを開発する目的で癌幹細胞の同定を試みた。SCID マウスに CD133 陽性細胞 1000 個移植したところ、CD133 陰性細胞の場合と比較して腫瘍の生着発育を認めた。現在 CD133 陽性細胞の純化をとおして、癌幹細胞の正常に近い細胞の同定を試みている。同定後樹状細胞に導入した癌ワクチンに関して詳細な検討を行う予定である。

(5) (1) の経験より得られた「癌ワクチンは癌量の少ない段階で治療することにより有効な治療法となる」という仮定を明らかにするため、化学療法と癌ワクチンの併用療法の有効性に関して基礎的検討をおこない、下記の知見を得た。

(a) 進行膵臓癌は増殖が早いので、標準療法である化学療法（塩酸ゲムシタピン）は不可欠である。ヒト膵臓癌細胞株である PaCa-2 を塩酸ゲムシタピンで処理すると腫瘍抗原 (WT1) の mRNA の発現が増加した。

(b) SCID マウスに PaCa-2 を移植後、このマウスに塩酸ゲムシタピンを投与すると in vivo においても、WT1 の mRNA 発現の増加が認められた。

(c) WT1 ペプチドをパルスした樹状細胞を用いて WT1 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導した。これをエフェクターとしてター

ゲットを塩酸ゲムシタピン処理した PaCa-2 と非処理の PaCa-2 をターゲットとして細胞傷害性活性を比較した。塩酸ゲムシタピンで処理することにより膵臓癌細胞は WT1 特異的な CTL による殺傷効果が増強した。

(d)適切な化学療法により癌量が減った後、癌ワクチン療法を併用することにより、相乗効果が得られる可能性が示唆された。

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 6 件)

- (1) Homma S, Koido S, Sagawa Y, Suzuki H, Komita H, Nagasaki E, Takahara A, Horiguchi-Yamada J, Tajiri H, Zeldin D, Obata T. Antigenic stimulation with cytochrome P450 2J expressed in mouse hepatocellular carcinoma cells regulates host antitumor immunity. Clin Exp Immunol 2009 (in press)
- (2) Koido S, Hara E, Homma S, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Cancer immunotherapy by fusions of dendritic cells and tumor cells. Immunotherapy 2009 1 49-62
- (3) Koido S, Homma S, Hara E, Mitsunaga M, Namiki Y, Takahara A, Nagasaki E, Komita H, Sagawa Y, Ohkusa T, Fujise K, Gong J, Tajiri H. In vitro generation of cytotoxic and regulatory T cells by fusions of human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cells. J Transl Med 2008 6 51
- (4) Gong J, Koido S, Calderwood SK. Cell fusion: from hybridoma to dendritic cell-based vaccine. Exp Review of Vaccines 2008 7 1055-68
- (5) Koido S, Hara E, Homma S, Fujise K, Gong J, Tajiri H. Dendritic/tumor fusion cell-based vaccination against cancer. Arch Immunol Ther Exp 2007 55 281-287
- (6) Koido S, Hara E, Homma S, Mitsunaga M, Takahara A, Nagasaki E, Kawahara H, Watanabe M, Toyama Y, Yanagisawa S, Kobayashi S, Yanaga K, Fujise K, Gong J, Tajiri H. Synergistic induction of antigen-specific CTL by fusions of TLR-stimulated dendritic cells and heat-stressed tumor cells. J Immunol. 2007 179 4874-83

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 込田英夫、本間定、小井戸薫雄、田尻久雄、Andrew A. Amoscato、Sean M Alber Walter J. Storkus 固形腫瘍拒絶抗原としての Hemoglobin- β の効果 Short Title:

DC-IL12 gene therapy of cancer 第 21 回 日本バイオセラピー学会 東京 2008 年 11 月 19 日

(2) 永崎栄次郎、高原映崇、小井戸薫雄、相羽恵介、本間定 DC ワクチンと 5-FU 併用の NK 細胞を介する抗腫瘍増強効果. 第 21 回 日本バイオセラピー学会 東京 2008 年 11 月 19 日

(3) Shigeo Koido, Eiichi Hara, Sadamu Homma, Makoto Mitsunaga, Akitaka Takahara, Eiichiro Nagasaki, Hidejiro Kawahara, Yoichi Toyama, Hideo Komita, Susumu Kobayashi, Katsuhiko Yanaga, Toshifumi Ohkusa, Hisao Tajiri. Synergistic induction of antigen-specific CTL by fusions of TLR-stimulated dendritic cells and heat-stressed tumor cells. 第 67 回 日本癌学会学術総会 名古屋 2008 年 10 月 28 日

(4) Eiichi Hara, Hirohiko Sakamoto, Masaichi Ogawa, Michiaki Watanabe, Toshihide Tanaka, Sadamu Homma, Shigeo Koido. Establishment of many types of primary cancer cell lines; Colon, pancreas, melanoma, and metastatic brain tumors. 第 67 回 日本癌学会学術総会 名古屋 2008 年 10 月 28 日

(5) Hideo Komita, Shigeo Koido, Hisao Tajiri, Sadamu Homma, Andrew A Amoscato, Sean M Alber, Walter J Storkus. Intratumor DC. IL-12 therapy elicits protective immunity against the tumor-associated vasculature. 第 67 回 日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場

(6) 小井戸薫雄、本間定、光永真人、高原映崇、藤瀬清隆、田尻久雄. 樹状細胞と肝細胞癌との融合細胞ワクチンによる免疫応答の誘導 第 50 回日本消化器病学会大会 JDDW 東京 2008 年 10 月 1 日

(7) 小井戸薫雄、本間定、高原映崇、光永真人、藤瀬清隆、田尻久雄. アロ癌細胞株と自己樹状細胞との融合細胞にて誘導された MUC1 特異的細胞障害性 T 細胞の特徴 第 94 回日本消化器病学会総会 福岡 2008 年 5 月 8 日

(8) 込田英夫、小井戸薫雄、田尻久雄、本間定、Amoscato AA, Storkus WJ. Dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 delivered into sarcoma results in the cross-priming of CD8+ T cells response against hemoglobin-beta. 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会、東京. 2007 年 7 月 2-

(9) 小井戸薫雄、本間定、光永真人、鳥居明、柳沢暁、遠山洋一、河原秀次郎、渡部通章、吉田清哉、小林進、矢永勝彦、藤瀬清隆、田尻久雄 OK-432 は樹状細胞と大腸癌細胞の融

合細胞の融合効率を増強し、自己大腸癌に対する効果的CTLを誘導する 第93回日本消化器病学会総会. 青森 2007年4月19日

(10) Shigeo Koido S, Sadamu Homma S, Akitaka Takahara, Eiichiro Nagasaki E, Makoto Mitsunaga, Yasuhiro Tanaka Y, Kiyotaka Fujise, Hisao Tajiri. Generation of antigen-specific T cells stimulated by fusions of dendritic cells and allogeneic cancer cell line. 第66回 日本癌学会学術総会 横浜. 2007年10月5日

(11) Sadamu Homma S, Yukiko Sagawa, Shigeo Koido, Eiichiro Nagasaki, Akitaka Takahara. Characterization of hepatoma antigen identified from dendritic/hepatoma fusion cells by mass spectrometric analysis. 第66回 日本癌学会学術総会 横浜. 2007年10月5日

(12) 本間定、佐川由紀子、永崎栄次郎、小井戸薫雄、小幡徹. プロテオーム解析技術(LC/MS/MS)を用いた肝癌のT細胞認識抗原の探索. 第43回日本肝臓学会総会、東京 2007年5月31日

〔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〕

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・講師
研究者番号：70266617

(2) 研究分担者

本間 定 (HONMA SADAMU)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：18659174

(3) 連携研究者