

平成 21 年 12 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591494  
 研究課題名（和文） 融合細胞癌ワクチンと化学療法の併用療法による第 I・II 相臨床試験  
 研究課題名（英文） Phase I・II clinical trial of fusion vaccine combined with chemotherapy  
 研究代表者  
 冲永功太 (OKINAGA KOTA)  
 帝京大学・医学部・教授  
 研究者番号：00101098

## 研究成果の概要：

切除不能進行・再発胃癌を対象に、融合細胞ワクチンと化学療法（TS-1）の併用療法による第 I/II 相臨床試験を行った。全例に grade 3 以上の有害事象を認めなかった。臨床効果は、融合細胞ワクチンと TS-1 併用群で PR3 例・SD5 例・PD2 例、TS-1 単独群で PR3 例、SD3 例、PD4 例であった。併用群の PR・SD 症例で、CTL の誘導を認めた。融合細胞と TS-1 の併用療法は安全に施行でき、腫瘍特異免疫も誘導可能であることから、その有用性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1800000	540000	2340000
2008 年度	1600000	480000	2080000
年度			
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：融合細胞ワクチン・胃癌・TS-1・化学療法

## 1. 研究開始当初の背景

近年、樹状細胞を用いた癌特異的免疫療法が臨床応用されその効果が注目されている。腫瘍抗原の感作法にはペプチド、tumor lysate、細胞融合、遺伝子導入などさまざまな手法がある。その中でも、腫瘍細胞全体を免疫源とみなす融合細胞療法は、未知の腫瘍抗原を含めた複数の抗原に対して抗腫瘍免

疫の誘導が可能である。さらに腫瘍の heterogeneityにも対応することができ、従来の既存の腫瘍抗原ペプチドを用いたワクチン療法の問題、すなわち既知の腫瘍抗原を持ち、MHCのタイプの一致した症例という制約を凌駕することから、腫瘍ワクチンの適応拡大という点で期待されている。しかし融合の手法が難しいこともあり、臨床試験までいたって

いる施設は少ない。国内外を通して、これまで報告されている臨床試験に関する論文は、進行腎癌 (Marte A. Human Gene Therapy 14:483-494, 2003), グリオーマ (Kikuchi T. J. Immunother 27, 452-259, 2004) およびメラノーマ (Raje N, Br J Haematol 125:343-352, 2004) である。我々は、これまでtwo-step法という独自の融合方法を開発し、臨床レベルでのできるだけ安定化した融合方法を確立した。これらの基礎研究の結果を踏まえた後、消化器癌症例での第I相臨床研究を行った (Iinuma H, Okinaga K. J. Immunol, 176, 3461-9, 2006; Ogawa F, Iinuma H, Okinaga K. Scan J Immunol 59, 432-439, 2004; 飯沼久恵・沖永功太. Bio Clinica 21:147-152, 2006; 飯沼久恵・沖永功太. 外科治療 94:196-198, 2006; 飯沼久恵・沖永功太. Biotherapy 20:184-189, 2006)。その結果、融合細胞ワクチンの安全性が確認された。しかし、これらの結果から、融合細胞ワクチン単独では治療効果を期待することは困難なことも推察された。しかしこれまで、胃癌に対する化学療法と融合細胞ワクチン併用療法の臨床報告はない。

## 2. 研究の目的

切除不能進行・再発胃癌を対象に、融合細胞ワクチンと化学療法 (TS-1) 併用療法の第I/II相臨床試験を行った。まず融合細胞の効果をより増強するため、heat shock protein に注目し、ワクチン効果を高める工夫をした。さらに、この改良型融合細胞ワクチンを用いて、TS-1との併用療法による第I/II相臨床試験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) HSP 増強による融合細胞の改良

癌細胞の加温 (40℃) と、OK432 による樹状細胞の成熟化により、heat-shock protein の産生を高めた改良型融合細胞ワクチンを作成し、抗原提示能および抗腫瘍効果を検討した。

①樹状細胞：樹状細胞は、10人の胃癌患者の末梢血より培養、作成した。成熟化の過程でOK-432を添加した。

②2種類の腫瘍細胞 lysate で刺激した樹状細胞：腫瘍細胞をホモジナイズし、抽出物を遠心分離、その上清を可溶性の腫瘍細胞 lysate とした (Sol-Lysate)。凍結融解を4回くりかえした腫瘍細胞を凍結解凍した腫瘍細胞 lysate (FT-Lysate) とした。これらの lysate は未熟な樹状細胞とともに 37℃で18時間共培養、その後 OK-432 を添加し樹状細胞を成熟化させた。

### ③樹状細胞と腫瘍細胞との融合細胞

OK-432 で成熟化させた樹状細胞と腫瘍細胞とを 2:1 の割合で混ぜ、PEG 法と electrofusion の2ステップ法を用いて融合細胞を作成した。

④測定項目：(a) FACS による細胞表面抗原の発現 (B) ELISPOT assay による IFN $\gamma$  産生能 (b) Real Time RT-PCR による細胞内の HSP70mRNA 発現 (c) ELISA により HSP70 のタンパク量 (d) 免疫沈降にて抽出した HSP70 の CTL 産生能などを検討した。

### (2) 融合細胞ワクチンと化学療法の併用療法による第 I/II 相臨床試験：

十分な説明の後、文書による同意が得られた患者を対象に、以下2群の無作為化割付をおこない、安全性と臨床効果を評価した。

①対象：消化器癌症例

A群：TS-1 単独投与群

B群：TS-1+融合細胞ワクチン群

②薬剤投与スケジュール：TS-1

(80mg/m<sup>2</sup>/day) を4週連続投与し、2週休業する。融合細胞ワクチンは、週1回4週投与を1クールとし、2クール治療を行った。

### ③ 評価項目

Primary endpoint:

安全性・progression-free survival (PFS)

Secondary endpoint:

抗腫瘍効果・腫瘍縮小効果

Time to treatment failure (TTF)

## 4. 研究成果

### (1) HSP 増強による融合細胞の改良

#### ①細胞表面抗原の発現:

胃癌患者から抽出した腫瘍細胞では CEA、HER-2、HLA-ABC が高率に発現していた。加温処理した腫瘍細胞では、CEA と HER-2 の発現率が上昇していた。OK-432 で成熟化を促した樹状細胞では、HLA-DR、CD83、CD86 が高率で発現しており、これは未熟な樹状細胞と比較して高い値であった。次に以下に示す 4 種類 (a, b, c, d) の腫瘍細胞 lysate で刺激した樹状細胞の表面抗原を調べた。

(a) FT-Lysate (b) 加温処理を加えた FT-lysate (HS/FT-Lysate) (c) Sol-Lysate (d) 加温処理 Sol-lysate (HS/Sol-Lysate)

これら4種類のlysateで刺激した樹状細胞においては、HLA-ABC、HLA-DR、CD80、CD83、CD86、CEA、HER-2 すべてにおいて、高い発現率を示した。Sol-Lysate と FT-Lysate との間に有意な差は認められなかった。融合細胞については、未熟な樹状細胞を用いて作成した融合細胞に比べて、OK-432 で成熟化させた樹状細胞を用いて作成した融合細胞においては、HLA-DR、CD83、CD86 の発現が有意に増加していた。また、OK-432 で成熟化させた樹状細胞と、熱処理を加えた腫瘍細胞とで作成した融合細胞においては、CEA と HER-2 の発現が有意に増加していた。これらの結果から、融合細胞においてはCEAやHER-2といった腫瘍関連抗

原と、CD83、CD86 といった co-stimulator のいずれもが発現していることが判明した。また腫瘍細胞に熱処理を加えることで、これらの発現率が高まることも明らかとなった。

#### ②IFN $\gamma$ の産生能:

以下に示す8種類の細胞(a-g)で刺激したCD8<sup>+</sup>T細胞のIFN $\gamma$ 産生能を調べた。

(a)加温処理腫瘍細胞と樹状細胞の融合細胞 (HS/FC)

(b)加温処理腫瘍細胞と OK-432 刺激樹状細胞との混合細胞(MIX/HS-Tumor/DC)

(c) FT-Lysate パルス樹状細胞(FT-Lysate)

(d) 熱処理凍結融解 lysate パルス樹状細胞 (HS/FT-Lysate)

(e) Sol-Lysate パルス樹状細胞(Sol-Lysate)

(f) 加温処理 Sol-Lysate パルス樹状細胞 (HS/Sol-Lysate)

(g) medium

1回目の刺激では、FC群とHS/FC群は、他群に比べてIFN $\gamma$ 産生能が高値を示した。2回目の刺激でも、同様にFC、HS/FC群では高いIFN $\gamma$ 産生能を示した。これらの結果から、融合細胞はCD8<sup>+</sup>T細胞のIFN $\gamma$ 産生能を高めることが明らかとなった。

#### ③HSP70mRNAの発現:

OK-432 で成熟化させた樹状細胞のHSP70mRNA/GAPDH比は、未熟な樹状細胞のそれに比べて有意に上昇した。加温処理を加えた腫瘍細胞においてもHSP70mRNA/GAPDH比は上昇した。上記の8群(a-g)でこれらを検討したところ、HS/FC群でHSP70mRNA/GAPDH比が最も高値を示した。またHS/FC群とFC群は他の群に比べて、有意に高値を示した。この結果から、融合細胞では、HSP70のmRNA発現が増加していることが示唆された。さらに加温処理を加えることでこの値はさらに増加することが明らかとなった。

#### ④HSP70のタンパク量：

HS/FC群とFC群のHSP70タンパク量は他群のそれに比べて有意に高値を示した。mRNAと同様に、融合細胞においてHSP70タンパク量発現は最も高く、また加温処理によりさらに増加することが示された。

#### ⑤ HSP70-peptide complex(HSP70.PC)のCTL産生能：

HSP70.PCでパルスした樹状細胞で刺激したT細胞のCTL活性を測定した。HS/FC群のHSP70.PCでパルスした樹状細胞で刺激したT細胞のCTLはすべての群の中で最も高く、HS/Tumor、Tumor、HS/FT-Lysate、HS/Sol-Lysate、medium群のそれに比べて有意に高値であった。一方、HS/FT-Lysate、HS/Sol-Lysate群から抽出したHSP70.PCでパルスした樹状細胞はCTLを誘導することはできなかった。HS/FCとFCから抽出したHSP70.PCでパルスした樹状細胞で刺激したT細胞は強いCTLを誘導することが明らかとなった。

#### (2) 融合細胞ワクチンと化学療法の併用療法による第I/II相臨床試験：

##### ①安全性

融合細胞ワクチンと化学療法の併用療法において、Grade3以上の副作用は認められなかった。

##### ②効果判定

臨床効果は、融合細胞ワクチンとTS-1併用群でPR3例、SD5例、PD2例、TS-1単独群はPR3例、SD3例、PD4例であった。

③イムノモニタリングの結果、SD以上の症例に融合細胞ワクチン投与後、自己癌に対する機能的CTLの産生(CD45RA+CD27-/CD8+)を認めた。一方、制御性T細胞(CD25high Foxp3+/CD4+)の割合は、融合細胞ワクチン投与後、低下する傾向を示した。

##### ④PFS

融合細胞ワクチンとTS-1併用群におけるPFS

の平均生存日数は、TS-1単独群に比べて延長した。

#### 結語

以上の結果から、融合細胞ワクチンとTS-1の併用療法では、grade3以上の有害事象は認められなかった。さらに、併用群は腫瘍特異免疫の誘導が可能であり、臨床効果の改善、PFSの延長なども認められた。今後、切除不能進行・再発胃癌に対する新たな治療法として有用と考える。

#### 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 9 件)

1. Koide H, Iinuma H et al. Efficient CTL productivity of modified fusion cells by increase of HSP 70. *Oncol Rep* 21:737-746, 2009
2. Yamada H, Iinuma H et al. Prognostic value of 5-fluorouracil metabolic enzyme genes in Dukes stage B and C colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil based adjuvant chemotherapy. *Oncol Rep* 19:729-735, 2008
3. Mimori T, Iinuma H, et al. Hematogeneous metastasis in gastric cancer requires isolated tumor cells and expression of vascular endothelial. *Clin Cancer Res* 14: 2609-2616, 2008
4. Tamura H, Iinuma H, et al. Prospective study of quantitative CEA and CK20 mRNA detection in peritoneal washes to predict peritoneal recurrence in gastric carcinoma patients. *Oncol Rep* 17:667-672, 2007
5. 飯沼久恵・沖永功太・他. 細胞融合とプロテオーム解析を用いた癌治療の新たな標的分子の探索. *臨床免疫・アレルギー科*. 50 (6): 728-730, 2008
6. 飯沼久恵・沖永功太. 融合細胞ワクチン療法. *Biotherapy* 22 (6): 389-398, 2008

7. 飯沼久恵・沖永功太．細胞融合とプロテオーム解析による新規標的分子の探索．*Biotherapy* 22 (4):248-254, 2008
8. 飯沼久恵．IL-12,IL-18 遺伝子導入腫瘍細胞・樹状細胞の融合細胞による腫瘍免疫療法．*臨床免疫・アレルギー科* 47(1):109-116, 2007
9. 飯沼久恵・沖永功太．癌細胞と樹状細胞との融合細胞ワクチンを用いた癌免疫療法．*Biotherapy* 21 (1) 48-55, 2007

[学会発表] (計 24件)

1. 第21回日本バイオセラピー学会．消化器癌幹細胞を指標とした腹膜再発予測診断の臨床的意義．佐野宏賢・飯沼久恵・沖永功太・他．2008年11月19日-20日 東京
2. 第21回日本バイオセラピー学会．大腸癌幹細胞の特徴と microRNA 発現．田村純子・飯沼久恵・沖永功太・他．2008年11月19日-20日 東京
3. 第21回日本バイオセラピー学会．IEFを用いた上部消化管外科周術期栄養管理の検討．堀川昌宏・飯沼久恵・沖永功太・他．2008年11月19日-20日東京
4. 第21回日本バイオセラピー学会．進行・再発食道癌の放射線化学療法併用新規ペプチドワクチン療法．飯沼久恵・沖永功太・他．2008年11月19日-20日東京
5. 第21回日本バイオセラピー学会．大腸癌幹細胞の特徴と microRNA 発現．田村純子・飯沼久恵・沖永功太・他．2008年11月19日-20日 東京
6. 第21回日本バイオセラピー学会．進行・再発食道癌の放射線化学療法併用新規ペプチドワクチン療法．飯沼久恵・沖永功太・他．2008年11月19日-20日東京
7. 第21回日本バイオセラピー学会．改良型融合細胞ワクチンの抗腫瘍免疫能と HSP ペプチド複合体の関与．小出泰平・飯沼久恵・沖永功太・他．2008年11月19日-20日 東京
8. 第21回日本バイオセラピー学会．改良型融合細胞ワクチンによる免疫抑制解除．石田えり・飯沼久恵・沖永功太・他．2008年11月19日-20日 東京
9. 第46回日本癌治療学会．消化器癌幹細胞を指標とした腹膜再発の予測診断と臨床的意義．飯沼久恵・沖永功太・他．2008年10月30日-11月1日 名古屋
10. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Effect of HSP 70-peptide complex vaccine derived from fusion cells of TLR-stimulated DCs and heat-stressed tumor cells. Hisae Inuma, Kota Okinaga. et al. October 28-30, 2008 Nagoya
11. 11<sup>th</sup> liposome research days conference. Efficient cross- presentation of heat shock protein 70-peptide complex from fusion cells by TLR-stimulated dendritic cell and heat-stressed tumor cells. Hisae Inuma, Kota Okinaga et al. July 19-22, 2008 Yokohama
12. 第29回癌免疫外科研究会．融合細胞から分離した HSP70 ペプチド複合体の抗腫瘍免疫誘導．小出泰平・飯沼久恵・沖永功太・他．2008年6月19日-20日 東京
13. 第21回日本小児脾臓研究会．胃癌の脾臓における regulatory T 細胞の動態解析．飯沼久恵・沖永功太．2008年 6月19日-20日 東京
14. 第20回 日本バイオセラピー学会．伊藤篤志・飯沼久恵・沖永功太・他：樹状細胞ワクチン療法における腫瘍抗原感作法の違いによる抗腫瘍免疫の誘導．2007年10月11日 札幌
15. 第20回 日本バイオセラピー学会．田村純子・飯沼久恵・沖永功太・他：胃癌症例における TRC 法による腹膜再発の

- 迅速予測診断。2007年10月11日  
札幌
16. 第20回 日本バイオセラピー学会。  
寺島雅典・飯沼久恵・他：切除不能進行お  
よび再発胃癌に対するTS-1療法とTS-1+  
PSK療法の多施設共同無作為化第II相比  
較臨床試験。2007年10月11日 札幌
17. 第20回 日本バイオセラピー学会。  
中村将薫・飯沼久恵・冲永功太・他：樹  
状細胞と腫瘍細胞の融合細胞により分離  
した heat shock protein 70 とペプチド複  
合体による抗腫瘍免疫増強効果。2007  
年10月11日 札幌
18. 第20回 日本バイオセラピー学会。  
飯沼久恵・冲永功太・他：細胞融合とプロ  
テオーム解析による新規標的分子の探索。  
2007年10月11日 札幌
19. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese  
Cancer Association. Hisae Iinuma, Kota  
Okinaga, et al.: A novel rapid genetic  
diagnosis for peritoneal recurrence in  
gastrointestinal cancer patients. October  
3-5, 2007, Yokohama
20. 第45回 日本癌治療学会総会。 飯沼  
久恵・冲永功太，他：プロテオーム解析と  
細胞融合を用いたに新規標的分子の探索  
2007年9月20日 京都
21. 43th ASCO Annual Meeting Hisae Iinuma,  
Kota Okinaga, et al : Genetic diagnosis  
for peritoneal recurrence in gastro-  
intestinal cancer patients. June 1-5,  
2007, Chicago, USA
22. 第28回 癌免疫外科研究会。小出泰平・  
飯沼久恵・Gong Jianlin. 腫瘍細胞と樹状  
細胞との融合細胞により分離した heat  
shock 70 (HSP70) による T 細胞の活性化  
についての検討。2007年5月25日 東京
23. 第28回 癌免疫外科研究会。飯沼久恵・  
冲永功太 他。：細胞融合とプロテオーム解

析による腫瘍血管関連標的分子の探索。2  
007年5月24日 東京

24. 第107回 日本外科学会定期学術集会  
飯沼久恵・冲永功太 他。消化器癌症例に  
おける TRC 法による腹膜再発術中予測診  
断。2007年4月13日 大阪

[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]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

冲永功太 (OKINAGA KOTA)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00101098

### (2) 研究分担者

飯沼久恵 (IINUMA HISAE)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：30147102

### (3) 連携研究者

なし