

機関番号：37104

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591581

研究課題名 (和文) 癌化学療法と細胞免疫療法との相乗効果に関する研究

研究課題名 (英文) The combination effects of conventional chemotherapy and adoptive cell therapy for refractory advanced/recurrent cancer

研究代表者

唐 宇飛 (TOH UHI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：60268901

研究成果の概要 (和文)：

高度進行再発癌の集学的治療として化学療法と細胞免疫療法との併用療法を用いた臨床試験では両者の相互的な補助効果が示唆された。その機序について臨床的、基礎的に解析を行った。乳癌、胃癌、肺癌の難治例に対し、抗腫瘍免疫細胞 (CTL など) と標準化学療法と併用療法の臨床試験を行い、臨床効果と局所免疫状態を比較検討した。Her2 抗体薬 Trastuzumab、プロテアソーム阻害薬 Bortezomib による腫瘍抗原提示能及び CTL 誘導能の増強効果を確認した。それは抗腫瘍薬による腫瘍細胞のアポトーシスが起った結果、生体内樹状細胞 (Dendritic cell) の抗原提示能が向上し、cross-presentation による CTL の抗腫瘍効果が増強されたと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Adoptive cell therapy (ACT) could successfully treat a limited part of patients inducing tumor regression or prolonged survival, but therapeutic efficacy was still lower than expected in most of the patients. For the further clinical application, development of more effective multidisciplinary cancer therapy including ACT therapy combined with chemotherapeutic agents or molecular targeting therapeutics has been focused in our studies. Therapeutic strategies and the mechanisms of biological effects have been studied in vitro and several clinical trials. The data show that combination therapy of CTL transfer and chemotherapy is a feasible option for patients with refractory lung, breast and gastric cancer without serious adverse events. Our preliminary data also suggest that in the ability of DC cross-presentation followed by the enhancement of antitumor cellular immunity by trastuzumab. Moreover, we demonstrated that bortezomib sensitizes human various cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis via activation of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腫瘍免疫

科研費の分科・細目：

キーワード：細胞免疫療法、化学療法、難治性がん、Trastuzumab, Bortezomib

1. 研究開始当初の背景

我々は食道癌を始め、高度進行再発癌患者に対し、転移性所属リンパ節リンパ球と癌局所リンパ球の免疫状態の研究を行い、これらの部位から癌特異的に認識するキラーT細胞(CTL)が高頻度に誘導されることを確認し、その臨床応用を実験的に行ってきた。(Nakao M etc, Cancer Reserch, 1995; Toh U etc, Cell. Immuno, 1997)自己癌細胞と末梢血リンパ球との混合培養により誘導した自己活性化リンパ球 (autolougus tumor activated lymphocytes: AuTL) を用いて、癌局所投与による固形癌特異的免疫細胞療法を開発した。第 I/II 相臨床試験を施行し、その臨床的有効性を認めた (Toh U, etc, ASCO2000, Toh U. et al, Int J Clin Oncol, 2002; Clinical Cancer Research, 2000)。その治療効果を安定向上させるため、難治進行性がん患者に対し、細胞免疫療法と化学療法の併用療法 (非骨髄抑制抗癌剤併用免疫細胞療法 non myelosurpressive chemo-immunocellular therapy) について検討を行った、その結果、臨床的には従来の単独 CTL 療法よりも、本療法はより長期にわたり抗癌剤単独の化学療法よりも治療継続可能で高い反応性を得られた。また、骨髄抑制のなど副作用も軽減できた (唐ら, 日本消化器外科学会、ASCO など 2003~2004年)。一方では固形癌の標準的的化学療法に用いられる多くの抗癌剤或いはその組み合わせの投与により腫瘍局所の免疫環境が改善され、より強力な治療効果も得られた。(P Correale, etc, J Immunol, 2005; Br. J. Cancer, 2004) 化学療法と細胞免疫療法との組み合わせは、相乗(加的)な抗腫瘍効果を得られ、同時に両者併用することにより抗癌剤の薬物耐性を克服する可能性も示唆された。抗癌剤の作用により、腫瘍細胞増殖シグナル抑制やアポトーシスシグナル増強を経て、癌の退縮が起る。一方、免疫細胞治療では、宿主免疫系を介した治療効果、特に免疫細胞 (CTL や NK 細胞、マクロファージ) を介した腫瘍傷害がそのもう1つの機序として考える。更に、抗癌剤により退縮した癌細胞の断片などは抗原提示細胞 (樹状細胞:DC) の活性化、腫瘍抗原の提示を通して、腫瘍抗原特異的細胞性免疫の賦活化が起る。我々は Trastuzumab がもたらす免疫系を介した効果、特に腫瘍抗原特異的細胞性免疫に関与するデータが得られた (Tayama etc.2005 ASCO; 唐ら、2006 外科治療)。また、Gemcitabine が生体の細胞免疫状態に影響

を与えることを報告した (Toh U, etc, 2007 ASCO)。臨床的に免疫細胞療法と化学療法との併用での有効性を引き続き検討することにより、新しい固形癌の集学的治療法の確立を目指す。

2. 研究の目的

主な免疫細胞治療と化学療法併用の作用機序として、1) 腫瘍細胞のアポトーシス感受性の亢進、2) APCによるcross-primingの増強、3) 免疫寛容状態の解除、4) エフェクター細胞の局所への集積、等が上げられている (Kake RA and Robinson BWS, Nature Reviews, 2005, etc)。久留米大学病院において、進行消化器癌を中心とした高度進行性癌患者に対して、自己癌細胞と末梢リンパ球の混合培養により誘導された自己活性化リンパ球の養子免疫療法 (以下CTL療法) を実験的に施行してきた。さらに、進行難治癌に対し、比較的低濃度の標準的抗癌剤 (Gemcitabine等) を用いた骨髄抑制を来さない化学療法とCTL細胞免疫療法との併用療法を行った。その結果従来の単独CTL療法よりも、本併用療法はより長期にわたり治療継続可能で、高い反応性を得られた。(唐ら、2004~2005年、日本癌治療学会など) 近年、国内外でも同様の報告も多く見られるようになり、次世帯の新しい集学的癌治療法のひとつとして有望視されている。本治療法の成績向上と安定さらにその標準化のためには、更なる基礎的研究、臨床的検討が必要であると考え。我々が生体免疫に有意な影響をもたらすと考えられる抗癌(製)剤として1) プロテアソーム阻害薬Bortezomib、2) ara-C類似デオキシシチジンの誘導体であるGemcitabine、3) HER2受容体を分子標的とするTrastuzumabに注目した。

3. 研究の方法

I. In vitro, In vivoでの基礎的検討

1) 細胞株を用いプロテアソーム阻害薬

BortezomibやGemcitabine, Trastuzumab に対する感受性を各種ヒト癌細胞株を用いて、感受性をin vitroにて調べる (MTT, cell cycle analysis等)

2) 免疫effector細胞に対する感受性影響

についてヒト癌細胞株をbortezomibで前処理により、death receptorを介したTRAIL感受性が上がり、NK感受性の亢進した。

・上記のメカニズムについて解析する。癌細胞上のHLA発現 (class I 発現、酸処理後のclass Iの発現回復の変化)、HLA関連分子 (N

K-ligandであるMICA/B, ULBP)、apoptosis 関連分子等 (Bax, Bcl-2, Bcl1; cIAP, p53, p21, p27, NF-kB活性etc)等について検討する。

3) In vitro におけるTrastuzumabの作用機序についての解析

HER2+乳癌患者の末梢血から、IL4, GM-CSF, TNF- α etc.にてDCを誘導、そのPhenotypeを確認する。更に、自己癌細胞とDC, PBMCによるMLTCを行い腫瘍特異的CTLの誘導を行う。Trastuzumab添加の有無によりDC成熟度, 表面マーカー, サイトカインのプロファイルの差異について検討する。またCTLの特異性・誘導能の差異について、自己腫瘍、他の腫瘍株、またはHLA-A2およびA24患者に対してはAPC (T2細胞, A2402分子を遺伝子導入したCOS-7細胞株を使用) 上の既知のHER2, CEAペプチド抗原をTargetにし、細胞傷害活性などを評価する。Trastuzumab添加の有無によるエフェクター相での差異をも検討する。

II. マウス治療モデルでの検討

- マウス皮下腫瘍及び肺転移モデル (Rencaなどを予定)にて、bortezomib、Gemcitabineなど及び細胞免疫療法による治療を行う。Effector細胞, 投与の時期等について検討する。
- 有効例において、局所の免疫組織学的検討を行い、単独治療群との比較検討を行う。局所に於けるサイトカイン・浸潤細胞のプロファイル、癌血管新生、NFkB活性等を免疫組織学染色等にて検討する。

III. 臨床的症例の検討と腫瘍免疫再構築を目的とする化学療法併用免疫細胞療法 (chemo-immunocellular therapy) の開発: 2004年11月より厚生労働省より高度先進医療の認定を受け、現在、臨床において高度進行癌患者に対しても細胞

免疫治療が行われている。本治療を受けた進行癌患者の末梢血細胞分画と培養上清などを用いて従来の標準的化学療法あるいは免疫細胞療法だけを受けた患者サンプルと比較する。具体的には1) 治療後の宿主癌腫瘍免疫にもたらす影響についてリンパ球数とリンパ球分画 (CD3CD4, CD3CD8など)の変化およびNKとLAK細胞活性などの変化を観察する。また、各種レセプターの発現 (ex. FcR, NKG2D etc)、血清サイトカイン (TGF- β , IL-10など)、NK活性、TrastuzumabによるADCC活性等について検討する。治療後の末梢血中自己癌特異的CTL細胞の存在有無をクローニング行い、CTL frequencyを解明し、生体内免疫状態を明らかにする。2) ex vivo では、本治療した癌患者の末梢血血清、癌局所組織、胸腹水などについて、免疫抑制に関連するサイトカインをELISA法で測定し、癌患者において生体内の細胞免疫能の変化についても解明する。3) 生体免疫抑制状態 (TGF- β など)と抗癌剤併用免疫細胞療法の治療効果との相関性について評価検討する。

4. 研究成果

臨床的研究として

- 1) 標準治療抵抗性乳癌例 (Trastuzumab 併用 Her2+: 7例; Her2-: 7例) に対し、抗腫瘍免疫細胞 (CTL) とトラスツズマブ (Trastuzumab) との併用臨床試験 (Phase I/II) を実施した。平均治療期間は 4.8 ヶ月であり、著効例 (PR) : 不変例 (NC) : 無効例 (PD) は 1 : 6 : 7 であった。5例に腫瘍マーカーの減少、6例は胸腹水の減少を認めた。有害事象は軽度な発熱、下痢、循環器症状であった。基礎解析では (1) 細胞分画と T cell clonality : 2週間混合培養により誘導リンパ球の各分画 (%) は Trastuzumab 添加培養群では CD3⁺CD8⁺ T

cell (CTLprecursor) が有意に増加し、CD3⁺CD4⁺T cell やNK は変化がなかった。培養リンパ球のクローン化は6例中に3例 (Her2+/- : 2/1) を認めた。(2) ADCC 活性とサイトカイン分泌量：自己腫瘍細胞に対するADCC活性はHer2+ 3例中2例において増強された。Trastuzumab 処理によりCTL優位になり、ADCC活性が増強された。また、培養液中のTGF-β量は有意に抑制された。

- 2) 腹膜播種性腹水を伴う胃癌患者に、化学療法単独群 (A 群) と化学療法無効後に自己活性化リンパ球による免疫細胞療法 (腹腔内投与) 施行群 (B 群)、および標準化学療法と免疫細胞療法併用群 (C 群) の3群について比較検討した。その結果、腹水消失例は、A、B、C 群それぞれ 2/7、4/6、2/8 例で平均生存期間は 8.4、5.2、11.3 ヶ月であった。腹水サイトカイン濃度において、C 群で治療後に TGF-β 減少、IFN-γ、IL-12 は上昇した。化学療法は抗癌効果に加え、腹腔内局所の免疫抑制状態を改善し、CTL の抗腫瘍活性が高まることが示唆された。
- 3) Gemcitabine と免疫細胞療法の併用による肺がん患者体内の抗腫瘍効果が増強された。基礎解析から GEM で前処理癌細胞が、NK/LAK 細胞に対する感受性が向上され、B 細胞や炎症性細胞の増殖が抑制された。

基礎的研究として

- 1) in vitro での検討において、Trastuzumab 添加・HER2 抗原刺激により樹立された DC は、非添加例に比し、有意な IL-12p70 の産生上昇・IL-10 の産生低下を認め、同 DC により効果的に HER2 ペプチド認識 CD8⁺T 細胞の誘導が可能であった。
- 2) プロテアソーム阻害薬 Bortezomib により免疫活性化分子 TRAIL を介した各種癌のアポトーシス感受性が亢進された。更に臨床有効例の患者末血リンパ球を用いて、自己癌

細胞とのリンパ球腫瘍混合培養 (MLTC) により自己CTLを誘導し、in vitro で各種抗癌剤と様々の組み合わせで自己腫瘍細胞などに添加投与した。その結果、Bortezomib 併用効果の作用機序は細胞株依存性に異なるものの、death-inducing signaling complex (DISC) における Caspase-8 の活性化をトリガーとする外因性アポトーシス経路、ならびに Bid を介した内因性アポトーシス経路の両経路において、活性化の増強が認められた。外因性経路をトリガーとする TRAIL の応用により、内因性アポトーシス (ミトコンドリア) 経路による従来の化学療法・放射線療法無効例での新しい治療ストラテジーの構築の可能性が期待された。

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 10 件)

1. Preclinical studies of molecular-targeting diagnostic and therapeutic strategies against breast cancer. Fujii T, Yokoyama G, Takahashi H, Namoto R, Nakagawa S, Toh U, Kage M, Shirouzu K, Kuwano M. Breast Cancer. 2008;15(1):73-8. (査読あり)
2. Preclinical and clinical studies of novel breast cancer drugs targeting molecules involved in protein kinase C signaling, the putative metastasis-suppressor gene Cap43 and the Y-box binding protein-1. Fujii T, Yokoyama G, Takahashi H, Toh U, Kage M, Ono M, Shirouzu K, Kuwano M. Curr Med Chem. 2008;15(6):528-37. (査読あり)
3. YB-1 prevents apoptosis via the mTOR/STAT3 pathway in

HER-2-overexpressing breast cancer cells.

Fujii T, Seki N, Takahashi H, Inoue Y, Toh U, Kage M, Shirouzu K. Future Oncol. 2009 5(2):153-6.

4. Cell-cycle regulation by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase signaling in breast cancer cells Teruhiko Fujii, Anna Nakamura, Hiroki Takahashi, Roka Namoto Matsubayashi, Yuka Inoue, Miki Takenaka, Nobutaka Iwakuma, Hiroko Otsuka, Uhi Toh, Hideaki Yamana, Masayoshi Kage, Kazuo Shirouzu Current Topics in Biochemical Research 2009 11(2):1-11.
5. Bortezomib sensitizes human esophageal squamous cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis via activation of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. Seki N, Toh U, Sayers TJ, Fujii T, Miyagi M, Akagi Y, Kusukawa J, Kage M, Shirouzu K, Yamana H. Mol Cancer Ther. 2010 9(6):1842-51.(査読あり)

他 5 編 (1 編査読あり)

[学会発表] (計 53 件)

2008 年度

1. プロテアソーム阻害薬による TRAIL 感受性の増強効果 唐 宇飛、藤井輝彦、白水雄、関 直子、山名秀明 第 29 回癌免疫外科研究会
2. Trastuzumab 併用細胞免疫療法による難治性乳癌の集学的治療 唐 宇飛、藤井輝彦、矢原敏郎、中川志乃、三島麻衣、福永真理、淡河恵津世、白水雄 第 16 回日本乳癌学会学術総会

3. 難治性乳癌の抗体治療薬併用細胞免疫療法に関する検討 福嶋敬愛、唐 宇飛、三島麻衣、福永真理、白水雄、関 直子、山名秀明 第 21 回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. Trastuzumab による腫瘍特異的細胞性免疫の誘導 唐 宇飛、関 直子、山名秀明、白水雄 第 21 回日本バイオセラピー学会学術集会総会
5. Strategy to augment the efficacy of immunotherapy for refractory breast cancer using trastuzumab combined adoptive cell therapy Uhi Toh 2008 ASCO Annual Meeting **2009 年度**
6. 難治性固形癌に対する標準化学治療薬と細胞免疫療法との併用療法の可能性 唐宇飛 第 6 回日本免疫治療学会研究会 (JRAI) 学術集会
7. 基礎解析から見た治療耐性進行再発癌に対する細胞免疫療法を含めた集学的治療の可能性 唐 宇飛、関 直子、福永真理、福嶋敬愛、三島麻衣、山名秀明、白水雄 第 109 回日本外科学会定期学術集会
8. 抗体治療薬 Trastuzumab による乳癌特異的抗腫瘍細胞性免疫の誘導 唐 宇飛、三島麻衣、福永真理、福嶋敬愛、白水雄、山名秀明、淡河恵津世、藤井輝彦 第 17 回日本乳癌学会学術総会
9. 抗体治療薬投与による特異的抗腫瘍細胞性免疫の誘導に関する検討 唐 宇飛、福嶋敬愛、山名秀明、白水雄 第 64 回日本消化器外科学会総会
10. 標準化学療法治療薬と細胞免疫療法との併用による相乗 (加) 的抗腫瘍効果についての検討 唐 宇飛、福永真理、福永敬愛、大塚弘子、山名秀明、藤井輝彦、白水雄 第 47 回日本癌治療学会学術集会
11. The combination therapy of trastuzumab and adoptive cell therapy for refractory

- breast cancer U Toh, K Shirouzu.
Internstional Surgical Week 2009
12. Induction of specific anti-cancer immune response by trastuzumab administration in patients with advanced breast cancer Hiroko Otsuka, Uhi Toh, Mari Fukunaga, Takanaru Fukushima, Teruhiko Fujii, Kazuo Shirouzu Global Breast Cancer Conference 2009
13. The combination therapy of trastuzumab and adoptive cell therapy for refractory breast cancer Uhi Toh World Cancer Congress 2010 Tri-Breast Cancer conference
14. Strategy to augment the efficacy of immunotherapy for refractory breast cancer: a pilot clinical study of adoptive cell therapy combined with trastuzumab N Seki, U Toh, T. Fujii, S Nagagawa, K Shirouzu, H Yamana. European Breast Cancer Conference 7
- 2010 年度**
15. 難治性進行再発乳癌に対するテーラーメイド癌ペプチドワクチン療法による集学的治療 唐 宇飛、白水和雄、伊東恭悟 第 18 回日本乳癌学会学術総会
16. A phase II study of personalized selection of peptide vaccines combined with conventional chemo- or endocrine therapy for refractory breast cancer Uhi Toh American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual 2010 Meeting 2010/06/07
17. 実地臨床から見る難知性固形癌に対する細胞免疫療法及びペプチドワクチン療法の可能性 唐 宇飛、山名秀明、伊東恭悟、白水和雄 第 48 回日本癌治療学会学術集会
18. テーラーメイドがんペプチドワクチンによる難治性乳がんの新規集学的治療 唐 宇飛、岩熊伸高、竹中美貴、大塚弘子、高橋龍司、

- 白水和雄、山名秀明、伊東恭悟 第 72 回日本臨床外科学会総会
19. 臨床的見地から見る難知固形癌に対する細胞免疫療法及びペプチドワクチン療法の有効性 唐 宇飛、岩熊伸高、竹中美貴、大塚弘子、高橋龍司、山名秀明、伊東恭悟、白水和雄 第 23 回日本バイオセラピー学会学術集会総会
20. 乳癌組織における FOXP3 と pSTAT3 の発現についての検討 竹中美貴、唐 宇飛、関直子、岩熊伸高、大塚弘子、白水和雄、山名秀明、鹿毛政義 第 23 回日本バイオセラピー学会学術集会総会
- 他 23 編
- 〔図書〕(計:0 件)
〔産業財産権〕
○出願状況(計:0 件)
名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
- 取得状況(計0件)
名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:
- 〔その他〕
ホームページ等
6. 研究組織
(1)研究代表者
唐 宇飛 (TOH UHI)
研究者番号: 60268901
久留米大学・医学部・講師
(2)研究分担者
山名 秀明 (Yamana Hideaki)
研究者番号: 30140669
久留米大学・医学部・教授
関 直子 (Seki Naoko)
研究者番号: 40226634
久留米大学・医学部・講師