

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592247

研究課題名（和文） 口腔癌に対する化学療法＋樹状細胞ワクチン療法の最適併用プロトコールの確立

研究課題名（英文） Establishment of dendritic cell-based vaccine in combination with chemotherapy for oral cancer patients

研究代表者

岡本 正人 (OKAMOTO MASATO)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10243718

研究成果の概要（和文）：口腔癌に対して樹状細胞(DC)ワクチンが効果的である事を報告してきた。ある種の抗癌剤が癌患者の免疫環境を改善し癌ワクチンの効果を増強する事も明らかになった。本研究にて、口腔癌の標準治療薬 5-FU 等が DC に発現する免疫抑制因子 PD-L1, CTLA4, SOCSs 等を制御し、DC ワクチンの細胞傷害性 T 細胞(CTL)誘導能を増強させる事、経口 5-FU 製剤 S-1 と DC ワクチン併用療法が強い抗腫瘍効果を示す事を明らかにした。この研究結果は標準治療無効の難治性口腔癌患者に対する新規治療法の開発に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have reported that dendritic cell (DC)-based vaccine is effective in oral cancer patients. Certain chemotherapeutic agents may enhance antitumor effect of cancer vaccine mediated by improvement of immunological condition in cancer patients. In the current study, we demonstrated that a standard therapeutic agent 5-FU inhibited the expression of immuno-suppressors, PD-L1, CTLA4 and SOCSs on DCs, and augmented the cytotoxic T lymphocyte (CTL)-inducing efficacy of DCs and that DC vaccine in combination with S-1, an oral fluoropyrimidine formulation, elicited a marked antitumor effect in tumor-bearing mice. These findings may greatly contribute for establishing a novel treatment protocol for oral cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：口腔腫瘍学、腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、免疫療法、癌ワクチン、樹状細胞、化学療法剤、免疫化学療法

1. 研究開始当初の背景

標準的治療に抵抗性を有する難治性口腔癌患者に対して免疫療法が期待されている。我々は既に、口腔癌に対して樹状細胞がんワクチン療法が有効である事を報告している(Cancer Res, 64, 5461, 2004, Res Adv in Cancer, 5, 61, 2005)。近年シクロフォスファミドやゲムシタピン等の抗癌剤が癌患者の免疫抑制環境を改善し癌ワクチン療法の効果を増強

させる事が明らかになった(Nat Rev Cancer, 4, 423, 2005)。抗癌剤＋樹状細胞ワクチンの適切な併用療法により、標準治療不応の難治性口腔癌に対して効果的な治療が可能になる可能性がある。

2. 研究の目的

in vitro 実験ならびにマウスを用いた動物実験において、抗癌剤が免疫環境を改善

し、DC ワクチンがさらに高い治療効果を発現するメカニズムを分子レベルまで踏み込んで検討し、その結果から、より有効な、抗癌剤と DC ワクチンの併用プロトコールを確立する。

3. 研究の方法

(1) 健常人あるいは口腔癌患者由来末梢血単核球(PBMC)あるいは DC を各濃度の抗癌剤 5-FU, CDDP, Docetaxel (DTX)あるいは免疫療法剤 OK-432 で処理し、OK-432 により増強された免疫活性に及ぼす抗癌剤の影響を観察する。培養上清中のサイトカイン、PBMC の非特異的細胞障害活性、DC のアロ T 細胞分裂刺激性、CTL 誘導活性、PBMC および DC の表面マーカーならびに T 細胞の分化や免疫抑制に重要な分子の mRNA を検索する。

(2) 担癌マウスを各種抗癌剤ならびに同系マウス骨髄由来 DC で治療を行う。投与量は *in vitro* 実験の結果から検討する。腫瘍体積を計測する事で抗腫瘍効果を判定するとともに、抗癌剤投与前後で免疫状態を上記の方法でチェックし各種抗癌剤において、最も免疫環境が改善し抗腫瘍効果が得られるプロトコールを確定する。

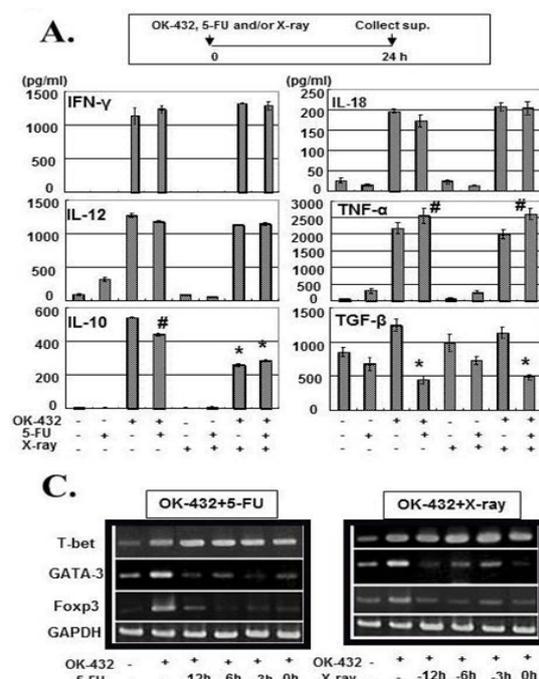
(3) 抗癌剤あるいは DC ワクチン投与されている口腔癌患者の血清および PBMC を用いて免疫状態を上記の方法で解析する。治療方法、免疫状態ならびに治療効果との比較検討において、化学療法剤が DC ワクチンの抗癌免疫活性を増強させているか否か検討し、最適な併用プロトコールの確立に役立つ。

4. 研究成果

口腔癌に対して、放射線、5-FU 系経口抗癌剤 (UFT あるいは S-1) および OK-432 の免疫化学放射線療法 (J Natl Cancer Inst, 95:316, 2003, Apoptosis, 2:227, 1997) や S-1 併用 DC 腫瘍内投与療法 (Res. Adv. in Cancer, 5:61, 2005, J Immunother, 27:432, 2004) が有効な治療法であること、膵癌においては Gemcitabine あるいは S-1 と DC ワクチンの併用療法が有効である可能性があること (Pancreas, 41:195, 2012) を報告してきた。Helper T-cell 1 (Th1) タイプのサイトカインが抗腫瘍免疫反応の増強に働き、Th2 タイプサイトカインおよび transforming growth factor (TGF)- β は抑制的に働くサイトカインであることが知られている。

(1) まず最初に、PBMC における、OK-432 による Th1/Th2 タイプサイトカインおよび TGF- β 1 の誘導における、放射線および 5-FU の影響つき *in vitro* 実験にて検討した。PBMC を、OK-432 で処理することにより、interferon (IFN)- γ 、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-12 および IL-18 等の Th1 サイトカインのみならず Th2 サイトカインで

ある IL-10 の誘導も認められた。TGF- β は未処理 PBMC においても産生が認められ、OK-432 処理でも有意な産生増強は認められなかった。OK-432 と同時に 5-FU で処理することにより、IL-10 の誘導に有意な変化は認められなかったが、TGF- β 産生の著明な抑制効果が認められた。放射線単独では、IL-10 および TGF- β の若干の産生増強が認められたものの、OK-432 と放射線の併用により、IL-10 および TGF- β の有意な抑制効果が認められた。OK-432、放射線および 5-FU の同時処理では、IL-10 および TGF- β の産生は最も強く抑制された。さらに、放射線および 5-FU により、OK-432 による免疫抑制分子 Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 および SOCS3 の発現増強が制御されていることが明らかとなり、IL-10 および TGF- β の抑制作用に、これらの分子が関係していることが示唆された。OK-432 による Th1 サイトカイン誘導は、放射線および 5-FU により抑制されなかった。antisense oligonucleotide を用いて SOCS1 あるいは SOCS3 をノックダウンすることにより、OK-432 処理による IL-10 および TGF- β の誘導を抑制したが、IFN- γ および IL-12 の誘導に影響は与えなかった。PBMC において放射線および 5-FU は、IL-10 や TGF- β 等の抑制性サイトカインの産生は抑えるが、抗腫瘍免疫反応の活性化に重要な Th1 サイトカインの産生には影響を与えないことが強く示唆される結果が得られた。

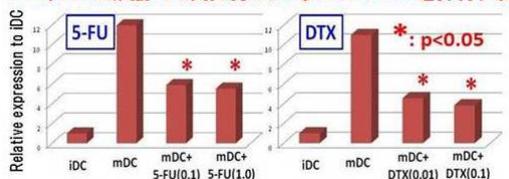


(Neoplasia, in press, 2013 より抜粋)

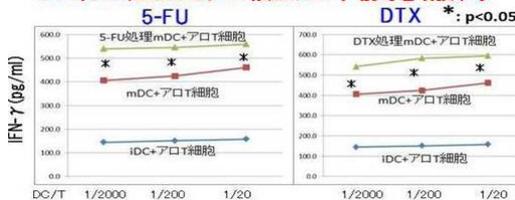
(2) 次に、専門的抗原提示細胞であるDCに及ぼす様々な化学療法剤 (5-FU, CDDP,

docetaxel (DTX), gemcitabine (GEM) の影響について検討した。末梢血単球をgranulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) およびIL-4存在下で6日間培養し未熟DCを誘導後、OK-432を添加し成熟DCを誘導した後、各種各濃度の化学療法剤で24時間処理し、各種DC表面マーカー、サイトカイン産生、免疫制御因子を検索した。5-FUおよびDTXは成熟DCによるIL-10産生をわずかながら、統計学的有意に減少させた。DCは免疫抑制分子programed cell death (PD) 1, PD-ligand (PD-L) 1, PD-L2, cytotoxic T lymphocyte associated antigen (CTLA) 4などを発現しておりOK-432で成熟させると、PD-L1, PD-L2, CTLA4, SOCS1, 2, 3などのnegative regulatorの発現が上昇することが明らかになった。これは一種のnegative feedback機構であると考えられる。化学療法剤の中で5-FUおよびDTXは、PD-L1, PD-L2, SOCS1およびSOCS2の発現を抑制した。5-FUおよびDTXで処理したDCは未処理DCに比較してより強くアロT細胞の分裂を刺激し、アロ抗原特異的なIFN- γ 産生を誘導した。このことは成熟DCに抗原をパルスして投与するDCワクチン療法と化学療法の併用を考えた時に極めて重要な知見である。さらに、siRNAを用いてDCのPD-L1およびPD-L2をノックダウンした時も、未処理DCに比較して、より強くアロT細胞の分裂ならびにIFN- γ 産生を誘導した。DCワクチンがT細胞に抗原提示する場合に、PD-L1およびL2の発現を抑制することが極めて重要であることが示唆され、抗癌剤併用によるDCの抗原提示能、CTL誘導能の増強のメカニズムの一端が明らかとなった。

5-FU, DTXは成熟DCで高発現しているPD-L1 mRNAを抑制する



5-FU, DTX処理DCはアロT細胞のIFN- γ 誘導を増強する



(3) 口腔癌細胞株を GEM あるいは DTX で処理することにより癌抗原 WT1mRNA およびタンパクに発現が上昇した。この時の WT1 タンパクの局在を蛍光抗体法で確認したところ、WT1 タンパクの核移行が妨げられ、ほとんどが細胞質に蓄積していることが明らかになった。

この現象はプロテアソームによる WT1 抗原ペプチドの産生が促進され、抗原性上昇の可能性が示唆された。このことも、化学療法併用 WT1 抗原パルス DC ワクチンのプロトコルを検討する上で有意義な知見であると考えられた。

(4) 担癌マウスモデルにおいて、経口5-FU製剤S-1のみ、DCワクチンのみでも抗腫瘍効果が得られたが、S-1+DCワクチンの併用でさらに強い抗腫瘍効果が得られた。この時、DCのリンパ節への移動能、マウスの腫瘍、リンパ節あるいは脾臓由来のリンパ球の細胞傷害活性ならびにCD8+Tリンパ球の腫瘍組織への浸潤能はともにDCワクチン投与群に比較してS-1+DCワクチン併用群では増強されていた。S-1+DCワクチンは単に上乗せ効果があるだけでなく、S-1によってDCワクチンにより引き起こされる免疫反応が増強されることが明らかとなった。

(5) 臨床検体の解析により、経口5-FU製剤S-1を投与された口腔癌患者において制御性T細胞や骨髄由来サプレッサー細胞の減少を認めた。S-1が口腔癌患者の免疫環境の改善に寄与し、DCワクチンとの併用が有効である可能性が強く示唆された。

今回のデータは、化学療法を併用した新しい癌ワクチンのプロトコルの確立に大きく寄与すると考えられる。

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16件)

- ① Tano T, Okamoto M, Kan S, Bando T, Goda H, Nakashiro K, Shimodaira S, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Sato M, Fujita T, Sato M, Yamashita N, Hamakawa H, Kawakami Y. Immuno-Chemoradiotherapy for Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma: Augmentation of OK-432-Induced Helper T-Cell 1 Response by 5-FU and X-Ray Irradiation. Neoplasia, in press, 2013. 査読有
- ② Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, Uchiyama K, Kajihara M,

- Arihiro S, Imazu H, Arakawa H, Kan S, Komita H, Ito M, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Fusion cells generated with dendritic cells and whole tumors. *OncoImmunol*, in press, 2013. 査読有
- ③ Shibamoto Y, Okamoto M, Kobayashi M, Ayakawa S, Iwata H, Sugie C, Mitsuishi Y, Takahashi H. Immune-maximizing (IMAX) therapy for cancer: Combination of dendritic-cell vaccine and intensity-modulated radiation. *Mol Clin Oncol*, in press, 2013. 査読有
- ④ Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, Takahara A, Odahara S, Tsukinaga S, Yukawa T, Motobe J, Kajihara M, Matsudaira H, Nagatsuma K, Uchiyama K, Arihiro S, Imazu H, Arakawa H, Kan S, Komita H, Ito M, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Combined TLR2/4-activated dendritic/tumor cell fusions induce augmented cytotoxic T lymphocytes. *PLOS ONE*, 8 (3): e59280, 2013. 査読有
- ⑤ Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Sato M, Fujita T, Kawakami Y, Hamakawa H. Prognostic impact of expression of Bcl-2 and Bax genes in circulating immune cells derived from patients with head and neck carcinoma. *Neoplasia*, 15(3): 305-314, 2013. 査読有
- ⑥ Takahashi H, Okamoto M, Shimodaira S, Tsujitani S, Nagaya M, Ishidao T, Kishimoto J, Sugiyama H, Yonemitsu Y. Impact of dendritic cell vaccines pulsed with Wilms' tumor-1 peptide antigen on the survival of patients with advanced non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer*, 49(4): 852-859, 2013. 査読有
- ⑦ Kan S, Hazama S, Maeda K, Inoue Y, Homma S, Koido S, Okamoto M, Oka M. Suppressive effects of cyclophosphamide and gemcitabine on regulatory T cell induction in vitro. *Anticancer Res*, 32 (12): 5363-5370, 2012. 査読有
- ⑧ Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Yamashita N, Kawakami Y, Hamakawa H. Growth inhibition and apoptosis by an active component of OK-432, a streptococcal agent, via Toll-like receptor 4 in human head and neck cancer cell lines. *Oral Oncol*, 48(8): 678-685, 2012. 査読有
- ⑨ Kimura Y, Tsukada J, Tomoda T, Takahashi H, Imai K, Shimamura K, Sunamura M, Yonemitsu Y, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Okamoto M. Clinical and immunologic evaluation of dendritic cell-based immunotherapy in combination with gemcitabine and/or S-1 in the patients with advanced pancreatic carcinoma. *Pancreas*, 41(2): 195-205, 2012. 査読有
- [学会発表] (計54件)
- ① 第25回日本バイオセラピィ学会学術集会総会、2012年12月13日(木)、14日(金)、倉敷市文芸館
シンポジウム2「がんワクチンの新規工夫」
岡本正人：化学療法を併用した樹状細胞がんワクチン療法の臨床試験への取り組み
- ② 第25回日本バイオセラピィ学会学術集会総会、2012年12月13日～14日、倉敷市文芸館
田野智之：化学療法剤による樹状細胞のSOCS-1, -2発現の抑制とT細胞活性化能の増強
- ③ 54th Annual Meeting-American Association for Radiation Oncology (ASTRO),

October 28-30, 2012, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, MA, USA

Yuta Shibamoto: IMAX (Immune-Maximized) cancer therapy: Combination of dendritic cell-based vaccine and intensity-modulated radiation

④ 第50回日本癌治療学会学術集会、2012年10月25日～27日、パシフィコ横浜

田野智之：5-FU は樹状細胞においてPD-ligands 発現を抑制し T 細胞活性化能を増強させる

⑤ 千里ライフサイエンスセミナーD3 2012年9月7日（金）、千里ライフサイエンスセンタービル5階ライフホール

「がん免疫療法の新展開」

岡本正人：樹状細胞がんワクチン療法の臨床研究への取り組み

⑥ 第22回日本樹状細胞研究会、2012年06月15日～15日、福島ビューホテル

岡本正人：本院における化学療法を併用したペプチドパルス樹状細胞がんワクチン療法の臨床試験

⑦ AACR 103rd Annual Meeting 2012, March 31-April 4, 2012, Chicago, IL, USA

Masanori Kobayashi: Dendritic-cell based vaccine for advanced pancreatic cancer: A report of 39 cases treated in Seren Clinic Nagoya

⑧ 第4回信州血液疾患フォーラム、2012年3月3日（土）松本東急イン3F「オーケルーム」

【特別講演1】

岡本正人：癌ワクチン療法の現状～樹状細胞ワクチンを中心に～

⑨ 第49回日本癌治療学会学術集会、2011年10月27日（木）～29日（土）名古屋国際会議場

イブニングセミナー5

「難治性消化器癌に対する新しい取り組み

～樹状細胞を用いたがんワクチン療法～

岡本正人：樹状細胞がんワクチンの現状
—Bench to Bedside—

⑩ 第49回日本癌治療学会学術集会、2011年10月27日（木）～29日（土）名古屋国際会議場

「優秀示説11 口腔2」

岡本正人：成熟樹状細胞の食能ならびに樹状細胞局所投与療法への応用に関する検討

⑪ 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 3-5, 2011, Nagoya Congress Center

P12-1 Cancer vaccine therapy (1)

Shin Kan: Enhancement of an immune sensitivity of cancer cells by chemotherapeutic agents

⑫ 国立国際医療研究センター 臨時リトリートカンファランス、2011年8月24日（水）国立国際医療研究センター研修センター5階大会議室

「再生医療・細胞治療の今後の展望」

岡本正人：癌ワクチン、樹状細胞ワクチン療法とは、及びその治療成績

⑬ 第17回日本遺伝子治療学会年次学術集会、九州大学医学部百年講堂 2011年7月15日（金）-17日（日）

ランチョンセミナー

岡本正人：樹状細胞を用いた癌ワクチン療法～基礎から臨床へ～

⑭ 第15回日本がん免疫学会総会、2011年6月30日（木）、7月1日（金）千里ライフサイエンスセンター

岡本正人：治療経験のある進行膵癌に対する樹状細胞ワクチン療法～臨床的・免疫学的検討～

⑮ AACR 102nd Annual Meeting 2011, April 2-6, 2011, Orlando, FL, USA

Masato Okamoto: Immuno-chemoradiotherapy for head and neck cancer: Augmentation of

OK-432-induced anti-tumor immunity by tegafur and radiation

⑯ 第7回日本消化管学会総会・学術集会、国立京都国際会館、2011年2月18, 19日
ワークショップ9 「消化管癌に対するバイオセラピーの現状と展望」

岡本正人：消化管癌に対する樹状細胞ワクチン療法

⑰ 第29回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2011年1月27-28日、崇城大学市民ホール（熊本市民会館）

シンポジウム1 「口腔癌に対する癌ワクチン療法の現状と展望」

岡本正人：樹状細胞を用いた癌ワクチン療法～基礎から臨床へ～

⑱ 第23回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2010年12月9, 10日、大阪国際会議場
シンポジウム2「集学的治療におけるバイオセラピーの意義」

岡本正人：口腔癌における放射線化学免疫療法～放射線、5-FUによる抗腫瘍免疫増強効果～

⑲ 第23回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2010年12月9, 10日、大阪国際会議場
ワークショップ3 「腫瘍免疫逃避機構の解明と克服」

關 鑫：癌細胞の主組織適合抗原（MHC）およびNKG2DL発現に及ぼす各種薬剤の影響

⑳ The 3rd International Oncoplastic Breast Surgery Symposium 2010, November 25-26, 2010, Hotel Nikko, Tokyo, Japan

「Lecture」

Masato Okamoto. Dendritic cell-based vaccination for breast cancer

㉑ 第48回日本癌治療学会学術集会、2010年10月28～30日、国立京都国際会館
イブニングセミナー4 「がんワクチン～WT1ペプチドと樹状細胞ワクチン～」

岡本正人：樹状細胞ワクチン療法～基礎から臨床へ

㉒ 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22～24日、大阪国際会議場

Masato Okamoto: Augmentation of OK-432-induced anti-tumor immunity by tegafur and radiation

㉓ 第181回 癌研有明病院 学術研究講演会、2010年7月20日、吉田講堂

岡本正人：樹状細胞ワクチン療法～基礎から臨床へ～

㉔ 第65回日本消化器外科学会総会 2010年7月14～16日、海峡メッセ下関

イブニングセミナー3 「消化器癌の先端医療～樹状細胞がんワクチンと遺伝子治療～」

岡本正人：樹状細胞ワクチン療法の現状

㉕ Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010, July 11-13, Fukuoka, Japan

Yukino Kimura: Clinical and immunologic evaluation of dendritic cell-based vaccination in combination with gemcitabine / S-1 in the patients with advanced pancreatic cancer

㉖ AACR 101st Annual Meeting 2010, April 17-21, 2010, Washington DC, USA

Shinichiro Akiyama: Anti-tumor effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with chemotherapy in the patients with advanced colorectal cancer

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 正人 (OKAMOTO MASATO)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10243718