

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591939

研究課題名(和文)胃癌幹細胞による腹膜転移形成と宿主免疫回避機構に関する研究

研究課題名(英文) Peritoneal dissemination of gastric cancer stem cells and immunotherapy overcoming immune escape

研究代表者

辻谷 俊一 (Tsujitani, Shunichi)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：30188544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌細胞株MKN45、MKN74を用いてFACSにてがん幹細胞と報告されているCD44+細胞とCD44-細胞の分画に分け、細胞内サイトカインの発現を調べた。がん幹細胞ではTGF- β の発現が亢進し、IL-10、VEGFの発現も高く、がん幹細胞は高度な免疫回避機構を有すると考えられた。しかし、CD44+細胞で誘導した健康人由来の細胞傷害性T細胞(CTL)はCD44-細胞で誘導したCTLと同様のCTL感受性を示した。したがって、がん幹細胞はそれ自体が免疫治療に抵抗性なのではなく、局所の免疫回避機構によって守られている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dissemination of gastric cancer stem cells and immunotherapy overcoming immune escape were investigated. Cultured gastric cancer cell lines MKN45 and MKN74 were sorted by FACS into CD44+ and CD44- cells. CD44+ gastric cancer cells expressed TGF- β , IL-10 and VEGF. Therefore, gastric cancer stem cells may have high potential to escape from immune surveillance. However, CTL from healthy donor co-cultured with CD44+ gastric cancer cells could kill CD44+ gastric cancer cells as well as that CTL co-cultured with CD44- gastric cancer cells could kill CD44- gastric cancer cells. These results indicate that cancer stem cells may not be resistant to immunotherapy but the cancer stem cells may be protected by strong escape mechanisms provided by host cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：がん幹細胞 免疫回避機構 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)胃癌腹膜播種の治療成績

漿膜浸潤胃癌の再発形式の約 50%は腹膜播種であり、腹膜播種症例の5年生存率は10%以下と不良である。申請者らは OK-432、Cisplatin、Etoposide、低浸透圧 Cisplatin の動物実験や臨床試験で腹腔内化学療法の有用性を報告したが、治療成績は限られており、腹膜播種の根治には全く異なるアプローチが必要と考えられた。

(2)がん幹細胞の概念

近年、腫瘍内で自己複製能と腫瘍を構成する種々の分化系統の癌細胞を生み出す能力を持つがん幹細胞の存在が実証された。がん幹細胞は細胞周期の静止期を維持し、放射線療法や抗がん剤耐性の一因となっている。幹細胞は Hoechst33342 蛍光色素の排出能が高く、Side Population (SP) 細胞として同定に用いられる。申請者らは CD44+胃癌の予後が不良と報告したが、胃癌細胞株の CD44+分画に幹細胞が存在する可能性が示され、SP 細胞は腹膜転移形成能が高く、インテグリンや CD44 の発現が高度であった。

(3)がん特異的免疫治療

CD8+ T 細胞が認識するがん抗原が同定されて以来、種々のがん抗原を用いたワクチン療法の開発が続いている。がん細胞の多様性に対応するには樹状細胞に多種類のがん抗原を効率よく標的し、樹状細胞の成熟化、サイトカイン産生誘導をはかる必要がある。さらに CTL の誘導で CD4+ および CD8+ T 細胞へのクロスプレゼンテーションが免疫抑制克服に重要である。申請者らは腫瘍細胞と樹状細胞 (DC) の細胞融合が多くの課題を解決することを示した。

(4)がんによる免疫回避機構

がん細胞は種々の免疫抑制分子を分泌し、胃癌でも TGF- β 、IL-10、VEGF、MICA などが免疫抑制に働いている。また、がん細胞膜上の FasL や RCAS1 などの免疫抑制性膜分子は T 細胞に増殖抑制やアポトーシスを起こす。一方、B7-1 リガンドを認識して CTL 機能を抑制する CTLA-4 に対する抗体 Ipilimumab が RCT で転移性黒色腫の全生存期間の有意な延長を示し、免疫回避機構の制御ががん免疫治療にとって非常に重要な戦略となることが明らかとなった。

2. 研究の目的

(1)胃癌細胞株で CD44+細胞と CD44-細胞の免疫回避機構の差異を明らかにする。

がん幹細胞では TGF- β の産生が亢進し CD4+Foxp3+Treg を高頻度に誘導することから、高度な免疫抑制機能を有する可能性が予想される。IL-10、VEGF、MICA や FasL、RCAS1 の発現を調べることにより、がん幹細胞の免疫回避機構を制御す

るための情報を得る。

(2)がん治療における DC ワクチン療法の臨床的意義を明らかにする。

免疫療法ががん治療においてどのような効果を示すかを臨床的に明らかにすることにより、免疫療法のがん幹細胞への効果を推測するとともに、免疫療法が有望な宿主の状態やがんの進行度についての知見を得る。とくに CTL 誘導による治療効果、ヘルパー細胞機能の重要性についての示唆を得る。

(3)がん腹膜播種症例腹水中のがん細胞に対する免疫治療効果を調べる

がん性腹水中のがん細胞を改良型の腹水濾過濃縮還元療法 (KM-CART) によって濾過フィルター内に回収し、FACS にてがん細胞を分離して臨床例での DC による治療開発を試みる。

3. 研究の方法

(1)ヒト培養胃癌細胞におけるがん幹細胞の免疫抑制能

CD44+細胞ががん幹細胞として報告されているヒト培養胃癌細胞 MKN-45、MKN-74 を用いて、FACS にて CD44+細胞と CD44-細胞の分画に分け、TGF- β 、IL-10、VEGF、MICA などの免疫抑制因子の発現を FACS にて解析し、CD44+がん幹細胞の免疫抑制能を CD44-細胞と比較して明らかにする。

(2)がん治療における DC ワクチン療法の臨床的意義

1)進行・再発非小細胞肺癌 62 例において Wilms' tumor protein-1 (WT1)がん抗原ペプチドを感作した DC ワクチン療法の治療効果を検討した。

2)進行・再発胆道癌 65 例において WT1 ないし Mucin 1 (MUC1)がん抗原タンパクを感作した DC ワクチン療法の治療効果を検討した。

3)多施設における化学療法施行進行非切除膀胱癌 225 例において WT1 ないし MUC1 を感作した DC ワクチン療法の治療効果を検討した。

4)再発卵巣癌 56 例において WT1 ないし MUC1 を感作した DC ワクチン療法の治療効果を検討した。

(3)がん腹膜播種症例腹水中のがん細胞に対する免疫治療

がん性腹水中のがん細胞を腹水濾過濃縮還元療法 (KM-CART) によって濾過フィルター内に回収し、FACS にてがん細胞を分離する。がん細胞の Lysate をパルスした DC による高度進行腹膜播種症例に対し、臨床例での治療開発を試みる。

4. 研究成果

(1)ヒト培養胃癌細胞におけるがん幹細胞の免疫抑制能

胃癌細胞株 MKN45、MKN74 を用いて FACS にてがん幹細胞と報告されている CD44+細胞

胞と CD44-細胞の分画に分け、細胞内サイトカインの発現を調べた。がん幹細胞では TGF- β の発現が亢進し、IL-10、VEGF の発現も高く、がん幹細胞は高度な免疫回避機構を有すると考えられた。しかし、CD44+細胞で誘導した健常人由来の細胞傷害性 T 細胞(CTL)は CD44-細胞で誘導した CTL と同様の CTL 感受性を示した。したがって、がん幹細胞はそれ自身が免疫治療に抵抗性ではなく、局所の免疫回避機構によって守られている可能性が示唆された。

(2)がん治療における DC ワクチン療法の臨床的意義

1)進行・再発非小細胞肺癌

DC ワクチン療法開始後 3 ヶ月での奏効度は CR 1 例、PR 4 例、SD 26 例で病勢制御率は 50%であった。MST は 27 ヶ月、1 年および 2 年生存率はそれぞれ 48%と 22%であった。多変量解析において、血清 Hb 値と WT1 ペプチドの使用が有意な予後因子であった。本研究により、非小細胞肺癌の DC ワクチン療法において WT1 の使用が治療効果に影響する重要な因子として示唆された。

2)進行・再発胆道癌

DC ワクチン療法開始後の MST は 7 ヶ月で、多変量解析による有意な予後因子として捉えられたのは、併用化学療法、ワクチン療法前血清アルブミン高値(≥ 4.0 g/dl)、ワクチン療法前血清 CRP 低値(< 0.5 mg/dl)、ワクチン投与時の発熱、の 4 因子であった。これを反映して、prognostic nutritional index (PNI)高値(≥ 40)例は PNI 低値(< 40)例に比べ有意に予後良好であった(MST 8.1 ヶ月 vs 5.0 ヶ月)。本研究により、胆道癌の DC ワクチン療法において併用化学療法とワクチン開始前の栄養状態が予後向上に重要であることが示唆された。

3)多施設における化学療法施行進行非切除膵癌

DC ワクチン療法開始後の MST は 9.9 ヶ月で、予後因子としては ECOG-PS、腹膜播種、肝転移、PNI が上げられた。治療関連因子としてワクチン注射部位の紅斑の大きさ(≥ 30 mm)が良好な予後と相関し、またその生存曲線は典型的な delayed separation curve を描き、また多変量解析でも予後因子となったことから、免疫反応の有無が予後に影響していることが強く示唆された。この紅斑の大きさは免疫学的アジュバント OK-432 の使用の有無、血清アルブミン値、PNI と有意に相関し、ワクチン開始前の栄養状態と OK-432 の併用が予後向上に重要であると推察された。

4)再発卵巣癌

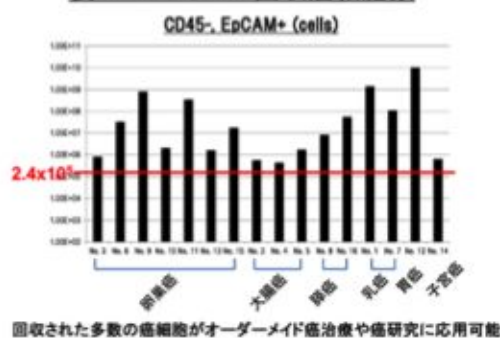
DC ワクチン療法開始後 3 ヶ月での奏効度は PR 2 例、SD 14 例で病勢制御率 28.6%、MST は 14.5 ヶ月であった。多変量解析によればワクチン開始前の血清アルブミン高値(≥ 4.0 g/dl)および LDH 低値(< 200 IU/L)が独立した有意な予後因子として検出された。血清アルブミン高値例と低値例の病勢制御率

は 36%と 15%、MST は 19.9 ヶ月と 11.6 ヶ月で、ワクチン開始前の栄養状態が治療効果に影響することが示唆された。

(3)がん腹膜播種症例腹水中のがん細胞に対する免疫治療

腹膜播種を有するがん患者 16 例においてがん性腹水中のがん細胞を CART によって濾過フィルター内に回収し、FACS にて CD45-EpCAM+がん細胞を分離した。すべての症例で 2.4×10^5 以上のがん細胞数を回収することが可能であった(表 3)。

表3 KM-CART回収癌細胞数



これにより、腫瘍を lysate として DC にパルスし、7 回分の DC ワクチンとして使用可能であることがわかった。今後臨床例での DC による治療開発を試みる。

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 8 件)

- Tsujitani S, Saito H, Wakatsuki T, Ikeguchi M, Shirabe K, Morita M, Kakeji Y, Yano T, Maehara Y. Relationship between expression of apoptosis-related proteins and the efficacy of postoperative chemotherapy in patients with T3 gastric cancer. Surg Today. 2012 Feb;42(3):225-32. DOI: 10.1007/s00595-011-0062-z.
- Maehara Y, Tsujitani S, Saeki H, Oki E, Yoshinaga K, Emi Y, Morita M, Kohno S, Kakeji Y, Yano T, Baba H. Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (KRESTIN®): review of development and future perspectives. Surg Today. 2012 Jan;42(1):8-28. DOI: 10.1007/s00595-011-0075-7.
- Shirabe K, Mano Y, Muto J, Matono R, Motomura T, Toshima T, Takeishi K, Uchiyama H, Yoshizumi T, Taketomi A, Morita M, Tsujitani S, Sakaguchi Y, Maehara Y. Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. Surg Today.

2012 Jan;42(1):1-7.
DOI: 10.1007/s00595-011-0058-8.
Okuyama T, Korenaga D, Edagawa A, Itoh S, Oki E, Kawanaka H, Ikeda Y, Kakeji Y, Tateishi M, Tsujitani S, Takenaka K, Maehara Y. Prognostic effects of oral anti-cancer drugs as adjuvant chemotherapy for 2 years after gastric cancer surgery. Surg Today. 2012 Aug; 42(8):734-40.
DOI: 10.1007/s00595-012-0129-5.
Takahashi H, Okamoto M, Shimodaira S, Tsujitani S, Nagaya M, Ishidao T, Kishimoto J, Yonemitsu Y; DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT). Impact of dendritic cell vaccines pulsed with Wilms' tumour-1 peptide antigen on the survival of patients with advanced non-small cell lung cancers. Eur J Cancer. 2013 Mar; 49(4):852-9.
DOI:10.1016/j.ejca.2012.11.005.
Kobayashi M, Sakabe T, Abe H, Tanii M, Takahashi H, Chiba A, Yanagida E, Shibamoto Y, Ogasawara M, Tsujitani S, Koido S, Nagai K, Shimodaira S, Okamoto M, Yonemitsu Y, Suzuki N, Nagaya M; DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT). Dendritic cell-based immunotherapy targeting synthesized peptides for advanced biliary tract cancer. J Gastrointest Surg. 2013 Sep; 17(9):1609-17.
DOI: 10.1007/s11605-013-2286-2.
Tatebe S, Tsujitani S, Nakamura S, Shimizu T, Yamane N, Nishidoi H, Kurisu Y, Kanayama H, Ogawa H, Ikeguchi M. Feasibility study of alternate-day S-1 as adjuvant chemotherapy for gastric cancer: a randomized controlled trial. Gastric Cancer. 2014 Jul;17(3):508-13.
DOI: 10.1007/s10120-013-0289-z.
Hirabayashi S, Kosugi S, Isobe Y, Nashimoto A, Oda I, Hayashi K, Miyashiro I, Tsujitani S, Kodera Y, Seto Y, Furukawa H, Ono H, Tanabe S, Kaminishi M, Nunobe S, Fukagawa T, Matsuo R, Nagai T, Katai H, Wakai T, Akazawa K. Development and external validation of a nomogram for overall survival after curative resection in serosa-negative, locally advanced gastric cancer. Ann Oncol. 2014 Jun; 25(6):1179-84.
DOI: 10.1093/annonc/mdu125.

[学会発表](計3件)

Tsujitani S, Tanii M, Yonemitsu Y,

Maehara M, Clinical evaluation of dendritic cell based vaccines pulsed with WT1 and /or MUC1 for patients with advanced or recurrent cancers. ESMO2012, Oct 12, 2012, Vienna, Austria
Endo K, Tsujitani S, Yoshimoto M, Watanabe J, Tokuyasu N, Sakamoto T, Naka T, Hirooka Y, Ikeguchi M, Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in human cholangiocarcinoma and risk condition. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Apr 6-10, 2013, Washington DC, USA
Kobayashi M, Sakabe T, Tanii M, Abe H, Takahashi H, Tsujitani S, Shimodaira S, Yonemitsu Y, Okamoto M, Nagaya M, Dendritic cell-based immunotherapy targeting WT1 and MUC1 for advanced biliary tract cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Apr 6-10, 2013, Washington DC, USA

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻谷 俊一 (TSUJITANI Shunichi)
鳥取大学・医学部附属病院がんセンター・
教授
研究者番号: 30188544

(2)研究分担者

掛地 吉弘 (KEKEJI Yoshihiro)
神戸大学・大学院食道胃腸外科・教授
研究者番号：80284488

(3)研究分担者

森田 勝 (MORIT Masaru)
国立病院機構九州がんセンター・消化器外科・部長
研究者番号：30294937

(4)研究分担者

鴻江 俊治 (KOHNOE Shunji)
田川市立病院・院長
研究者番号：30215199

(5)研究分担者

江頭 明典 (EGASHIR Akinori)
国立病院機構九州がんセンター・消化器外科
研究者番号：00419524

(6)研究分担者

園田 英人 (SONODA Hideto)
伊万里有田共立病院・外科・医長
研究者番号：00465725

(7)研究分担者

大賀 丈史 (OHGA Takefumi)
国立病院機構福岡東医療センター・外科・部長
研究者番号：60335958