

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659649  
 研究課題名（和文）細胞内腫瘍抗原を標的とした抗体による免疫療法の試みー化学療法との併用ー  
 研究課題名（英文）Serological immunotherapy against intra-cellular tumor antigens-combination with chemotherapy-  
 研究代表者  
 土岐 祐一郎 (DOKI YUICHIRO)  
 大阪大学・医学系研究科・教授  
 研究者番号：20291445

## 研究成果の概要（和文）：

マウスの実験系を確立した。NY-ESO-1 発現 CT26 を移植後 5-FU を投与したマウスにマウス抗 NY-ESO-1 抗体 E978 を静注すると、72 時間後に NY-ESO-1 抗原抗体複合体を観察し、抗腫瘍効果は Fc 依存性であった。研究室において樹状細胞を混合培養した場合、効果は飛躍的に亢進した。これらより、抗癌剤併用抗体療法は、腫瘍内抗原が特異抗体と複合体を作り、抗原提示細胞に Fc 受容体を介してとりこまれ、CD8T 細胞を抗原特異的に誘導・活性化し、抗腫瘍効果をもたらすことが証明された。

## 研究成果の概要（英文）：

We established the mouse model of serological immunotherapy combined with chemotherapy. NY-ESO-1 Ab E978 was administered i.v. to mice bearing NY-ESO-1-expressing CT26 tumor and treated with 5-FU. NY-ESO-1-Ag-Ab complex was observed in these mice and the anti-tumor effect was dependent on Fc portion and antigen presenting cells as dendritic cells, followed by induction and activation of antigen specific CD8 T cells, resulting in anti-tumor response.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：ヒト抗体、化学療法併用、NY-ESO-1、Fc 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 抗体は細胞内腫瘍抗原を認識できない。近年、癌の抗体療法への期待が高まってきている。Trastuzumab (Herceptin) や Cetuzimab (Erbix) などは、細胞表面の機能分子を抑制することにより抗腫瘍効果を発揮する。このため、これら機能分子を高発現しない癌腫に対しては、これら抗体は効果を示さない。一方、腫瘍細胞内には腫瘍特異抗原といわれる抗原が多数存在することが知られている。我々は腫瘍特異抗原の一つである NY-ESO-1 を蛋白、長鎖ペプチド、複合長鎖ペプチドと言う形態で用いた癌ワクチン

ン臨床試験を 2004 年より行ってきており、投与症例はすでに 30 例を超えている。癌抗原を用いた癌ワクチンでは、腫瘍細胞内に存在する腫瘍抗原の一部が HLA とともに細胞表面に表出し、誘導・増強された効果細胞によって認識攻撃される。腫瘍抗原に対する特異抗体では、腫瘍細胞内の抗原を認識できない。

(2) 抗原抗体複合体は免疫系を賦活しやすい。抗原抗体複合体が特異免疫系を誘導賦活するのは 2 つの機序がある。抗原抗体複合体に

補体が結合することにより抗原提示細胞 (APC) などに貪食されやすくなる機序 (オプソニン効果) と、抗体の Fc 部分が APC 上の FcR に結合することにより抗原が APC に取り込まれやすくなる機序の二つである。これら機序により取り込まれた抗原は、効果細胞である抗原特異的 T 細胞を賦活・誘導・増強する。

### (3) 化学療法は抗腫瘍免疫を賦活化する。

Doxorubicin により破壊された腫瘍細胞から HMGB1 が遊離、TLR4 を介した免疫賦活作用が報告されている。Calreticulin の介在も指摘されている。

### (4) 抗癌治療は細胞内抗原を放出する。

現在我々は NY-ESO-1 蛋白ワクチン投与患者における血清を用いた種々の腫瘍抗原に対する抗体反応を解析中である。NY-ESO-1 ワクチンを受けながら、他の抗原である MAGE-A4, MAGE-A3, SSX2, SOX2 に対する抗体価が上昇している症例を多く観察している。すなわちワクチンにより腫瘍が破壊され新たに放出した腫瘍抗原に対する免疫が活性化された可能性 (Antigen Spreading 現象) が強く示唆されている。この理論に基づき、我々は 2009 年より食道癌化学療法に併用した自己樹状細胞の腫瘍内投与を臨床試験として行っている。自己樹状細胞を末梢血より大阪大学附属病院内 CPU において樹状細胞を誘導し、術前化学療法投与中の食道癌患者に経内視鏡的に腫瘍内投与を行うものである。この場合腫瘍抗原を付加していないため、十数種類の腫瘍抗原に対する抗体産生を投与前後で測定し、現在解析中である。

### (5) 化学療法と抗体療法の併用。

食道癌の術前化学療法として 5-FU, CDDP, ADM を 2 サイクル用い、40% 以上の奏功率を見ている。この際に、腫瘍抗原特異的ヒト化抗体の経内視鏡的腫瘍内投与を併用すれば、放出された腫瘍抗原と投与された抗原特異的抗体が結合することにより、理論上非常に有効な癌免疫療法を施行できうる可能性があると考え、今回の研究を立案した。

## 2. 研究の目的

抗がん剤投与時に細胞内腫瘍抗原に対する特異抗体を同時に投与することによる抗体抗腫瘍免疫療法を確立する。まずマウスの系において、ヒト化抗 NY-ESO-1 抗体を用い、抗がん剤を投与した担癌マウスでの抗腫瘍効果を観察する。その際に、機構・必要な因子などを解析する。その後、NY-ESO-1 抗原発現食道癌患者に対して、化学療法に併用したヒト化 NY-ESO-1 抗体の腫瘍内投与を行

う臨床試験を実施し、抗体を用いた細胞内腫瘍抗原に対する腫瘍免疫療法を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスの実験系の確立

NY-ESO-1 を発現させた BALB/c マウス由来大腸癌細胞 CT26 皮下投与後、7, 14 日目に 5-FU を 75mg/kg ip および 9, 16 日目に E978 100µg iv を行う。さらに抗体の腫瘍局所投与を行う。

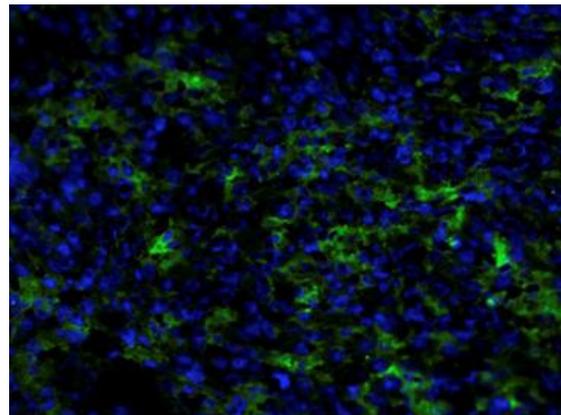
### (2) 投与抗体と遊離抗原の結合の確認。

抗原抗体複合体の存在を末梢血を用い、血清中タンパクの同定を Western Blot を用い観察する。また、Fab 抗体を用いた実験系および FcR-KO mice を用いた実験にて解析する。さらに抗原提示細胞の関与をそれぞれ確認する。

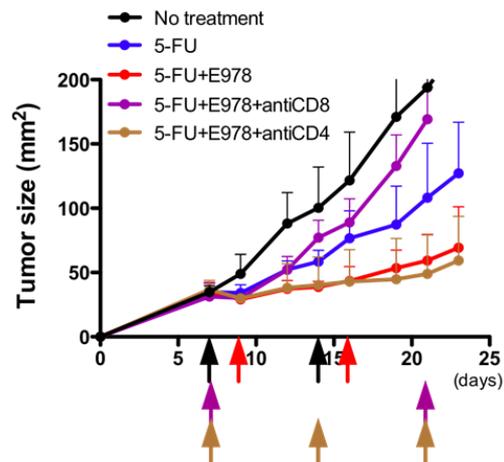
## 4. 研究成果

### (1) マウスの実験系の確立

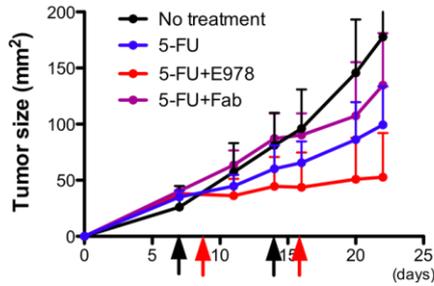
NY-ESO-1 発現 CT26 を移植後 5-FU を投与したマウスにマウス抗 NY-ESO-1 抗体 E978 を静注すると、72 時間後に NY-ESO-1 抗原抗体複合体を観察しえた。



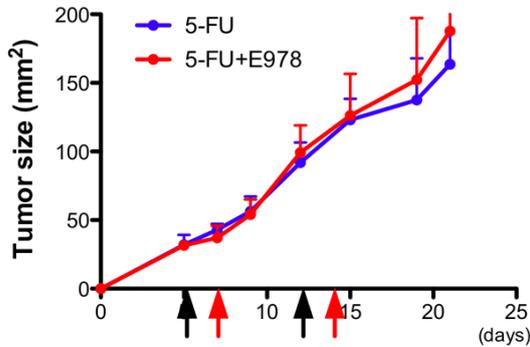
効果は CD8T 細胞依存性であった。



この実験系に、E978Fab 抗体を用いた場合、抗腫瘍効果はほぼ消失した。すなわち NY-ESO-1 抗体の抗がん剤併用抗腫瘍効果は、Fc 依存性であった。



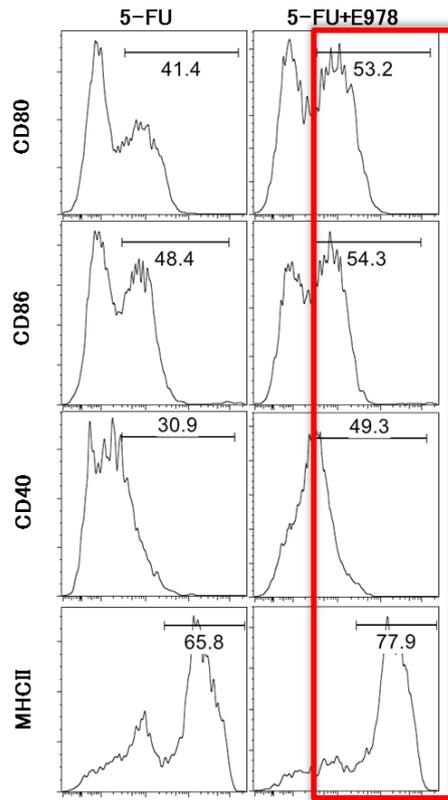
FcR-KO mice を用いた実験でも証明された。



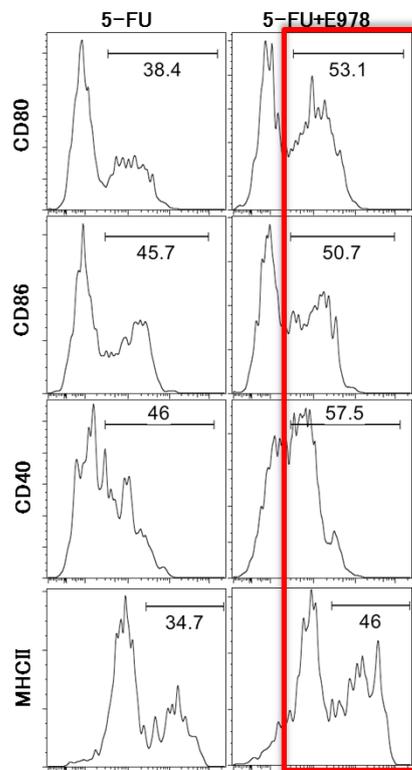
in vitro において樹状細胞を抗原抗体複合体と混合培養した場合、NY-ESO-1 抗体単独の場合に比して、NY-ESO-1 特異的抗原提示能が飛躍的に亢進した。実験マウスのリンパ節中樹状細胞の表面抗原は、CD80、CD86、CD40、MHCクラス II などの活性化マーカーの上昇が見られた。

これら結果より、抗癌剤併用抗体療法は、抗癌剤により遊離した腫瘍抗原が特異抗体と複合体を作ること、抗原提示細胞に Fc 受容体を介して効率よくとりこまれ、効果細胞である CD8T 細胞を抗原特異的に誘導・活性化し、抗腫瘍効果をもたらすことが証明された。

### CD8<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> DCs (day 9)



### CD8<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> DCs (day 9)



## 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 4 件)

Fujiwara S, Miyata H (21 人中 16 番目), Doki Y (21 人中 21 番目) ” NY-ESO-1 antibody as a novel tumour marker of gastric cancer.” Br J Cancer. 査読有 108 (2013)1119-1125. doi: 10.1038/bjc.2013.51.

Wada H, Doki Y, Nakayama E. “Immune monitoring and cancer vaccine.” Nihon Rinsho 査読無 70 (2012) p2183-2188.

Fujiwara S, Miyata H (22 人中 3 番目), Doki Y (22 人中 22 番目).” Clinical Trial of the Intratumoral Administration of Labeled DC Combined With Systemic Chemotherapy for Esophageal Cancer.” J Immunother. 査読有 35(2012):513-21. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182619cb4.

Kawada J, Miyata H (22 人中 15 番目), Doki Y (22 人中 21 番目), Nakayama E. “Heteroclitic serological response in esophageal and prostate cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination.” Int J Cancer. 査読有 130(2012):584-92. doi: 10.1002/ijc.26074.

[学会発表] (計 4 件)

和田尚、土岐祐一郎 S12-5 NY-ESO-1 長鎖ペプチドワクチン 第 71 回 日本癌学会学術総会 (2012) 札幌

土岐祐一郎 “ワークショップ WS7 食道癌サルベージ手術” 第 67 回 日本消化器外科学会総会 (2012) 富山

土岐祐一郎 消化器外科領域におけるエネルギーデバイスの発達と選択 第 21 回 脳神経外科手術と機器学会 (2012) 大阪

土岐祐一郎 LS-22 消化器がん治療におけるグレリンの役割～Kampo とのコンビネーション～ 第 67 回 日本消化器外科学会総会 (2012) 富山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土岐祐一郎 (DOKI YUICHIRO)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20291445

### (2) 研究分担者

宮田 博志 (MIYATA HIROSHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80362713