

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461934

研究課題名(和文) 癌性胸腹水癌細胞パルス樹状細胞ワクチンのがん幹細胞に対する治療効果増強の研究

研究課題名(英文) Therapeutic effects on cancer stem cells using dendritic-cell vaccine pulsed by cancer cells derived from malignant pleural or peritoneal fluid

研究代表者

辻谷 俊一 (Tsujitani, Shunichi)

鳥取大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30188544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌性胸腹膜炎の新たな治療を開発するために、腹膜播種を有するがん患者16例において癌性腹水中のがん細胞を難治性腹水濾過濃縮再静注法(CART)により濾過フィルター内に回収し、FACSを用いて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でき、胸腹水がん細胞を用いた樹状細胞ワクチン療法が可能であった。胃癌細胞株MKN45、MKN74をFACSにてCD44+がん幹細胞とCD44-がん細胞に分離し、それぞれの細胞で健康人由来の細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導したところ、がん幹細胞でもCTL感受性は同様であり、特異的免疫療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dissemination of gastric cancer stem cells and overcoming immune escape were investigated. In 16 patients with malignant ascites, intraperitoneal free cancer cells were obtained by using cell-free and concentrated ascites rein fusion therapy (CART). CD45-EpCAM+ cancer cells were separated from cancer cells obtained by washing the filtration filters. More than 2.4×10^5 cancer cells were obtained in all of the cases. These data suggest that dendritic cell vaccine can be introduced by using cancer cells in malignant ascites. Cultured gastric cancer cell lines MKN45 and MKN74 were sorted by FACS into CD44+ and CD44- cells. Cytotoxic T cells (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 be killed by cancer specific immunotherapy using dendritic cell vaccine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：がん幹細胞 樹状細胞 免疫回避機構

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。さらに PD-1/PD-L1 のシグナルががん細胞に対するエフェクター細胞機能の調整に重要であり、抗 PD-1 抗体 nivolumab が悪性黒色腫、非小細胞肺癌治療などに有効であることが報告され、免疫チェックポイント阻害薬の臨床応用が実現した。

2. 研究の目的

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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. 研究の方法

(1) 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。

(2) 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。

(3) がん治療における DC ワクチン療法の臨床的意義

①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。

②進行非小細胞肺癌 260 例において Wilms' tumor protein-1 (WT1) が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。

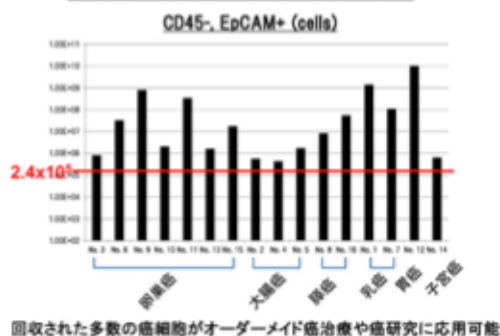
4. 研究成果

(1) 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。今後臨床での DC による治療開発を試みる。

(2) 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。

(3) がん治療における DC ワクチン療法の臨床的意義

①多施設における化学療法施行進行非切除腺癌

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 ($\geq 30\text{mm}$) 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。

②進行非小細胞肺癌

DC ワクチン療法開始後の MST は 13.8 ヶ月で、多変量解析による有意な予後因子として、ワクチン注射部位の紅斑の大きさ ($\geq 30\text{mm}$) が良好な予後と相関した。この傾向は腺癌でも腺癌以外でも認められたが、腺癌でより明確に予後および奏効率と相関した。

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 5 件)

- ① Katai H, Ishikawa T, Akazawa K, Isobe Y, Miyashiro I, Tsujitani S, Ono H, Tanabe S, Fukagawa T, Nunobe S, Kakeji Y, Nashimoto A. Five-year survival analysis of surgically resected gastric cancer cases in Japan: a retrospective analysis of more than 100,000 patients from the nationwide registry of the Japanese Gastric Cancer Association (2001-007). *Gastric Cancer*. 2017 Apr 17; DOI: 10.1017/s10120-017-0716-7. (査読あり)
- ② Tanabe S, Hirabayashi S, Oda I, Ono H, Nashimoto A, Isobe Y, Miyashiro I, Tsujitani S, Seto Y, Fukagawa T, Nunobe S, Furukawa H, Kodera Y, Kaminishi M, Katai H. Gastric cancer treated by endoscopic submucosal dissection or endoscopic mucosal resection in Japan from 2004 through 2006: JGCA nationwide registry conducted in 2013. *Gastric Cancer*. 2017 Feb 15; DOI: 10.1007/s10120-017-0699-4. (査読あり)
- ③ Takahashi H, Shimodaira S, Ogasawara M, Ota S, Kobayashi M, Abe H, Morita Y, Nagai K, Tsujitani S, Okamoto M, Suzuki Y, Nakanishi Y, Yonemitsu Y. Lung adenocarcinoma may be more susceptible subtype to a dendritic-cell based cancer vaccine than other subtypes of non-small cell lung cancers: a multicenter retrospective analysis. *Cancer Immunol Immunother*. 2016 Sep; 65(9):1099-111. DOI: 10.1007/s00262-016-1872-z. (査読あり)
- ④ Soya R, Taguchi J, Nagakawa Y, Takahashi O, Sandoh N, Hosokawa Y, Kasuya K, Umeda N, Okamoto M, Tsujitani S, Tsuchida A. A large number of circulating tumor cells (CTCs) can be isolated from samples obtained by using leukapheresis procedures. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*. 2015 Sep;42(9):1069-72. (査読あり)
- ⑤ Kobayashi M, Shimodaira S, Nagai K, Ogasawara M, Takahashi H, Abe H, Tani M, Okamoto M, Tsujitani S, Yusa S, Ishidao T, Kishimoto J, Shibamoto Y, Nagaya M, Yonemitsu Y. Prognostic factors related to add-on dendritic cell vaccines on patients with inoperative pancreatic cancer receiving chemotherapy; a multicenter analysis. *Cancer Immunol Immunother*.

2014 Aug; 63(8):797-806. DOI:
10.1007/s00262-014-1554-7. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Watanabe J, Saito H, Miyatani K,
Ikeguchi M, Umekita Y, Otani S,
Tsujitani S, TSLP expression and high
serum TSLP indicate a poor prognosis in
gastric cancer patients. American
Association for Cancer Reserch Annual
Meeting, Apr 16-20, 2016, New Orleans,
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・教授
研究者番号：30188544