

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591585

研究課題名 (和文) マイクロ波熱凝固による癌局所療法から
in vivo 樹状細胞ワクチン療法への展開研究課題名 (英文) Development of in vivo dendritic cell vaccine therapy
with microwave local ablation therapy研究代表者 川口 晃 (KAWAGUCHI AKIRA)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10303778

研究成果の概要：

腫瘍をマイクロウェーブで熱凝固し、熱凝固した腫瘍局所に未熟樹状細胞 (DC) を注入すると、強力な腫瘍特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) が誘導でき、熱凝固していない対側の未治療腫瘍に対しても抗腫瘍効果が認められた。腫瘍を熱凝固する局所治療から in vivo DCワクチンによる全身治療としての抗腫瘍免疫治療へと発展できる可能性を示すことができた。しかし、この in vivo DCワクチン治療は、腫瘍抗原に対して免疫寛容状態にあるマウスにおいては、抗腫瘍免疫誘導は不十分であり、免疫寛容を打ち破るためのさらなる工夫が必要であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：肝臓外科学、アブレーション、樹状細胞ワクチン

1. 研究開始当初の背景

低侵襲治療は、癌治療の重要なキーワードであり、社会のニーズとなってきた。

この低侵襲治療法の担い手として、アブレーション治療がある。

ラジオ波やマイクロ波、収束超音波、ある

いは、凍結により、腫瘍を熱凝固や融解により壊死させて、腫瘍を完全除去したり、腫瘍の増大を制御しようとする治療法である。原発性肝癌の治療や、転移性肝腫瘍、腎癌、前立腺癌、脳腫瘍などに用いられている。いずれも、腫瘍の局所制御が目的である。低侵襲に腫瘍治療が可能であるが、局所再発や遠隔

臓器への再発などが問題となる。

一方、癌の低侵襲治療の別の担い手として、癌免疫療法がある。

これまでに臨床応用された代表的なものに、癌ワクチン療法、樹状細胞ワクチン療法、CTL細胞移入療法などがある。いずれの治療も、癌抗原を樹状細胞 (DC) に取り込ませ、抗原提示したDCが癌抗原特異的なT細胞レセプターを持ったT細胞を特異的に活性化させ、癌抗原を細胞表面にもつ細胞のみを傷害する腫瘍抗原特異的な細胞障害性T細胞 (CTL) に育て、CTLを癌局所へと移動集積させて癌を治療しようとする方法である。

この癌免疫療法は転移巣も含め同一の腫瘍抗原をもつ腫瘍すべてに作用する、全身療法である。抗原提示するDCや抗原特異的なCTLを患者体内で誘導させるか、対外で誘導したものを患者へ戻すかにより2種類の方法がある。

樹状細胞 (DC) ワクチン療法は、樹状細胞に抗原提示させることを *in vitro* で行い、炎症性サイトカイン (TNF α など) を加えて、樹状細胞を活性化させて体内に戻し、この活性化樹状細胞により抗原特異的なCTLを誘導することを狙ったものである。

アブレーション治療後の治療局所の状態は、樹状細胞が活性化するには都合がよい。熱凝固が起こった腫瘍局所には、腫瘍細胞壊死による多くの腫瘍抗原があり、その後、熱によるヒートショック蛋白、TNF α など多くの炎症性サイトカインが産生される (Nature Med. 5(11), 1999)。この環境は、樹状細胞が抗原提示細胞として成熟するのに最良の環境といえる。つまり、腫瘍のアブレーション治療局所に、抗原を細胞内に取り込む能力の高い未熟樹状細胞がいれば、腫瘍壊死により生じた大量の腫瘍抗原を取り込み、細胞表面のMHC上に抗原提示する。その後産生されるヒートショック蛋白や、炎症性サイトカインの作用で樹状細胞は活性化し、腫瘍抗原の提示と共に多くの補助刺激因子を細胞上に発現する成熟樹状細胞になる。成熟樹状細胞はT細胞を正しく、強く活性化できる。リンパ組織に移動した成熟樹状細胞は、そこで待ち受ける腫瘍抗原特異的なT細胞レセプターを持つT細胞を

効率よく刺激し、腫瘍抗原特異的なCTLを誘導することができると考えられる。

近年、凍結療法やラジオ波凝固療法で、腫瘍特異免疫が誘導されることが動物実験で報告された (J Exp Med. 191(3), 2000, Cancer Res. 60, 2000, Cancer Res 64, 2004)。さらに最近、原発性肝癌に対するラジオ波凝固療法により患者の腫瘍特異的な細胞障害性T細胞の反応が活性化し増強されることが報告された (Cancer Res 2006;66, World J Gastroenterology 2006;12)。

2. 研究の目的

本研究では、2種類の治療法を組み合わせ、アブレーションによる局所療法を癌免疫治療による全身療法へと展開していくことを目指したいと考えている。

すなわち、アブレーション後の腫瘍凝固治療局所に、未熟樹状細胞を移入し、抗原提示細胞として成熟化させ、所属リンパ組織で腫瘍抗原特異的なCTLを誘導させる *in vivo* 樹状細胞ワクチン療法へと展開し、局所から全身へと抗腫瘍効果を広げることを研究の目的とする。

3. 研究の方法

<マウス>

(1) FVB/NマウスとHER2/neu トランスジェニックマウスを用いた。

HER2/neu トランスジェニックマウスの特徴は

- * FVB/Nマウスにrat-HER2/neu geneが遺伝子導入されたマウス。
- * HER2/neuが乳腺にover-expressionし生後4ヶ月後より1年以内に3から4個のHER2/neuが過剰発現する自発乳癌が発生する。
- * HER2/neu抗原 (腫瘍抗原であり、自己抗原) に対して特異的に免疫寛容状態となっており、担癌患者に酷似した免疫寛容状態を持つ、

pre-clinicalなマウスモデル。

<腫瘍>

(1) HER2/neu トランスジェニックマウスの自発乳癌より作成したNT細胞をもちいた。NT細胞はHER2/neuを高発現している。

<方法>

(1) FVB/Nマウスを用いた、in vivo DCワクチン療法による、抗腫瘍免疫効果の検討

① FVBマウスにNT腫瘍を皮下接種後、腫瘍をマイクロ波熱凝固した。

所属リンパ節、脾臓での腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応を細胞内サイトカイン (IFN- γ) 染色 (ICS) を行って観察した。

② FVBマウス皮下にNT腫瘍接種しその対側にも腫瘍を接種した。

片側の腫瘍をマイクロ波熱凝固した。

その後、MACSビーズにより未治療マウスの脾臓より分離した未成熟樹状細胞 (DC) を腫瘍内注入した。

所属リンパ節、脾臓での腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応をICSで観察した。

アブレーション部の腫瘍局所制御を観察した。

アブレーション対側の腫瘍に対する抗腫瘍効果を観察した。

(2) HER2/neuトランスジェニックマウス (neu-N) を用いた、pre-clinicalモデルでのin vivo DCワクチン治療

① neu-Nマウスの片側にNT腫瘍を皮下接種し、腫瘍をマイクロ波熱凝固した。

所属リンパ節、脾臓での腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応をICSで観察した。

② NT腫瘍を両側に皮下接種したあと、片側の腫瘍をマイクロ波熱凝固した。腫瘍局所にMACSビーズにより未治療マウスの脾臓より分離した未成熟樹状細胞 (DC) を注入した。

所属リンパ節、脾臓での腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応をICSで観察

した。免疫寛容状態を打ち破り特異免疫が誘導できるかどうかを確かめた。

アブレーション部の腫瘍局所制御を観察した。

アブレーション対側の未治療腫瘍に対する抗腫瘍効果を観察した。

③ neu-Nマウスの自発乳癌に対してマイクロ波凝固をしたあと、腫瘍局所にMACSビーズにより未治療マウス脾臓より分離した未成熟樹状細胞 (DC) を注入し、もともとヒト癌に近いモデルでのin vivo DCワクチン療法の評価を行った。

所属リンパ節、脾臓での腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応をICSで観察した。免疫寛容状態を打ち破り特異免疫が誘導できるかどうかを調べた。

アブレーション部の腫瘍局所制御を観察した。

アブレーション腫瘍以外の未治療自発乳癌腫瘍に対する抗腫瘍効果を観察した。

4. 研究成果

(1) FVB/Nマウスを用いた、in vivo DCワクチン療法による、抗腫瘍免疫効果の検討

① FVBマウスにNT腫瘍を皮下接種し、10mm大になった腫瘍をマイクロ波熱凝固したあと7日目に、腫瘍の所属リンパ節と脾臓を摘出し、nylon woolカラムを用いてT細胞を分離し、腫瘍抗原 (HER2/neu) 由来のRNEUペプチドを用いて、特異的T細胞反応を細胞内サイトカイン (IFN- γ) 染色 (ICS) を行って観察した。マイクロ波熱凝固しなかったマウスに比較し、腫瘍のマイクロ波熱凝固を受けたマウスでは、IFN- γ 産生するHER2/neu特異的CD8+T細胞が増加していた。

② FVBマウス皮下にNT腫瘍を接種しその対側にもNT腫瘍を接種した。10mm大に腫瘍が成長したあと、片側の腫瘍をマイクロ波熱凝固した。さらに熱凝固した腫瘍内に、MACSビーズにより未治療マウスの脾臓より分離した未成熟樹状細胞 (DC) を注入した。

DCの腫瘍内注入7日目に、脾臓での腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応をICSで観察したところ、未治療担癌マウスに比較して、有意にIFN- γ 産生HER2/neu特異的CD8+T細胞が増加していた。

抗腫瘍効果を観察したところ、アブレーションとDC注入を受けた腫瘍は、次第に腫瘍が消失していった。さらに、対側の未治療腫瘍も治療腫瘍に遅れて、腫瘍径が縮小していった。

(2) HER2/neuトランスジェニックマウス (neu-N)を用いた、pre-clinicalモデルでの in vivo DCワクチン治療

① neu-Nマウスの片側にNT腫瘍を皮下接種し、腫瘍が10mmになった時点で腫瘍をマイクロ波熱凝固した。

治療7日目に所属リンパ節、脾臓を摘出し、T細胞を分離し、腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応をICSで観察したところ、未治療マウスに比較してHER2/neu特異的CD8+T細胞の有意な増加は認められなかった。

② NT 腫瘍を両側に皮下接種し片側の腫瘍をマイクロ波熱凝固したあと、MACS ビーズにより未治療マウスの脾臓より分離した未成熟樹状細胞(DC)を腫瘍内注入した。

DC治療7日目に、脾臓での腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応をICSで観察したところ、未治療マウスに比べてわずかにHER2/neu特異的CD8+T細胞が増加していた。しかし、その反応は弱いものであった。

抗腫瘍効果を観察したところ、DC治療腫瘍は腫瘍がほぼ消失した。しかし、アブレーション対側の未治療腫瘍は、成長速度はやや落ちたが、腫瘍はゆっくりと成長した。

③ neu-Nマウスの自発乳癌に対してマイクロ波凝固したあと、未治療マウス脾臓より分離した未成熟樹状細胞(DC)を腫瘍内注入し、もっともヒト癌に近いモデルでのin vivo DCワクチン療法の評価を行った。

neu-Nマウスの自発腫瘍が10mmになった時点で腫瘍をマイクロ波熱凝固した。

治療7日目に所属リンパ節、脾臓を摘出し、

T細胞を分離し、腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的T細胞反応をICSで観察したところ、未治療マウスに比較してDC治療マウスでのHER2/neu特異的CD8+T細胞の有意な増加は認められなかった。

抗腫瘍効果を観察したところ、アブレーション部の腫瘍は壊死したが、アブレーションできなかった部分の腫瘍は増殖した。他の乳腺に発症した未治療腫瘍の増殖抑制は見られなかった。

以上より、腫瘍をマイクロウェーブで ablationすることにより、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) が誘導されるが、ablation腫瘍局所に未熟樹状細胞を注入すると、さらに強力な腫瘍抗原特異的CTLが誘導でき、ablation腫瘍局所だけでなく、ablationを行っていない未治療腫瘍に対しても抗腫瘍効果が認められた。ablation局所治療から in vivo DCワクチンによる全身の抗腫瘍免疫治療へと発展できる可能性が示された。

しかし、このin vivo DCワクチン治療は、腫瘍抗原に対して免疫寛容状態にあるマウスでは抗腫瘍免疫誘導は不十分であり、ヒト癌患者に適用するためには、免疫寛容を打ち破るためのさらなる工夫が必要であると考えられた。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 清水智治、来見良誠、遠藤善裕、村田 聡、目片英治、阿部 元、仲 成幸、塩見尚礼、川口 晃、森川茂廣、谷 徹「乳房温存治療としてのリアルタイムMR I ガイド下マイクロ波凝固療法の可能性」
第45回日本癌治療学会総会学術集会
2007年10月24日 京都
- ② 清水智治、来見良誠、村田 聡、阿部 元、仲 成幸、塩見尚礼、川口 晃、森川茂廣、谷 徹
「乳癌温存治療としての MR ガイド下マイクロ波凝固療法」
第27回 Microwave Surgery 研究会
2008年9月6日 横浜
- ③ 清水智治、阿部 元、村田 聡、張 弘富、河合由紀、村上耕一郎、村山浩之、田中麻紀子、森川茂廣、川口 晃、来見良誠、谷 徹
「乳癌に対する MR ガイド下マイクロ波凝固療法の検討」
第16回 日本乳癌学会学術総会
2008年9月26日 大阪
- ④ 佐藤浩一郎、清水智治、阿部 元、村田聡、張 弘富、河合由紀、田中麻紀子、森川茂廣、川口 晃、来見良誠、谷 徹
「乳癌温存治療としての MR ガイド下マイクロ波凝固療法」
第70回日本臨床外科学会総会
2008年11月27日 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

川口 晃 (KAWAGUCHI AKIRA)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10303778

(2)研究分担者

村田 聡 (MURATA SATOSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90239525

清水 智治 (SHIMIZU TOMOHARU)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：70402708

来見 良誠 (KURUMI YOSHIMASA)

滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70205219

(3)連携研究者
なし