
樹状細胞とがん細胞の 融合ワクチン

大野典也

血液・腫瘍科 第45巻 第1号 別刷
2002年 7月発行

東京都千代田区神田高町 2-10-8

科学評論社

電話 03 (3252) 7741 (代表)

特集

腫瘍免疫の新しい展開

樹状細胞とがん細胞の
融合プロセス*

大野典也**

Key Words : antigen presenting cell (APC), dendritic cell, cell fusion, IL-12

はじめに

現代免疫学の基本テーマは「自己と非自己」の識別の機構を明らかにすることである。かつては免疫学とは「二度雁り無し」の原理を追究する学問分野であると考えられていた。腫瘍免疫学の研究と移植免疫学の進展から、現在では病原菌に対する免疫現象も典型的な非自己に対する生体の反応であると理解されるに至っている。そして、トランス(免疫学的寛容状態)という概念の導入により「自己と非自己」の識別の機構の理解は新たな展開をもたらした。

一方、腫瘍抗原の概念とこの探求は、歴史的にはT抗原の発見を導いた。このT抗原が腫瘍ウイルスの感染により誘導されることから、研究の中心は腫瘍ウイルスの研究へと進展し、その発展から、プロトオンコジーンという概念提示により、癌遺伝子の発見へと導かれた。癌遺伝子研究の目覚ましい発展の影で、本来の腫瘍抗原の研究は比較的緩徐な進展を遂げてきた。

その間に免疫学の分野は分子生物学とDNA医学の手法の導入により、T細胞受容体の分子構造の解明や主要組織適合性抗原(MHCクラスIとMHCクラスII)の分子構造を明らかにした。その他のアクセサリー分子の構造も解明され、さら

にシグナル伝達分子として各種リンファカインとサイトカイン、さらにケモカインの発見より「自己と非自己」の識別の機構に関与している主要な登場人物はすべて出そろった状況にあると考えられている。

免疫反応の第一段階である抗原提示細胞(antigen presenting cell : APC)の重要性の認識と、ことに樹状細胞が主要な抗原提示細胞であることの見解から、腫瘍免疫の研究は新たな段階を迎えようとしている。かかる状況認識に立って、本稿ではわれわれのDNA医学研究所の悪性腫瘍治療研究部門の多くの研究者による研究業績の一端を紹介しつつ、腫瘍免疫学の当面の問題点と研究方向への提言を試みたい。

AP細胞の機能とMHCクラスI

抗原提示細胞の抗原提示の方法は、原則的に図1に示すように外来性のウイルスや細菌などに対応するMHCクラスIIに提示される抗原はCD4分子を介してヘルパーT細胞に提示され、B細胞により特異抗体産生へと導かれる。これに対して、細胞の内部から発現してくる抗原はMHCクラスIに提示される。MHCクラスIに提示された抗原はCD8を介して細胞障害性T細胞に伝達される。ウイルス感染細胞等の除去にはMHCクラスIを介しての細胞障害性T細胞の活性化が主要な役割を担っていると、教科書的には考えられている。

* DC/tumor fusion cell vaccine.

** Tsuneya OHNO, M.D., Ph.D.: 東京慈恵会医科大学DNA医学研究所(☎105-8461 東京都港区西新橋3-25-81) ; Institute of DNA Medicine, Tokyo Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, JAPAN

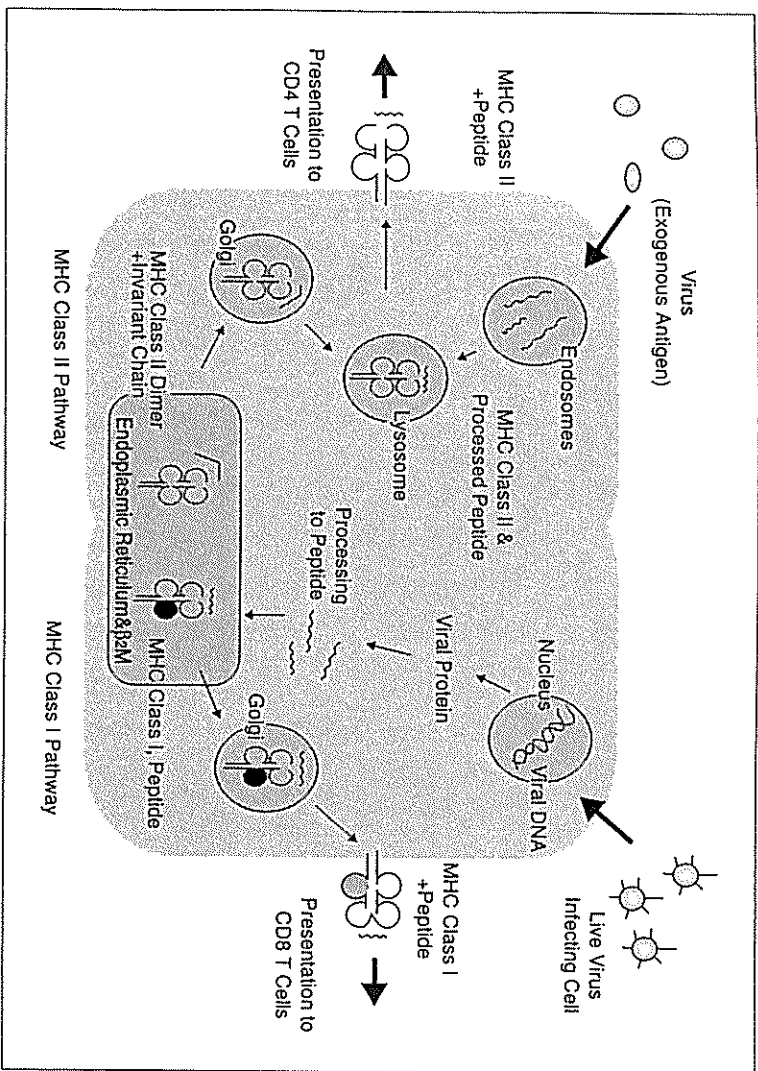


図1 MHCクラス分子による抗原提示の分岐

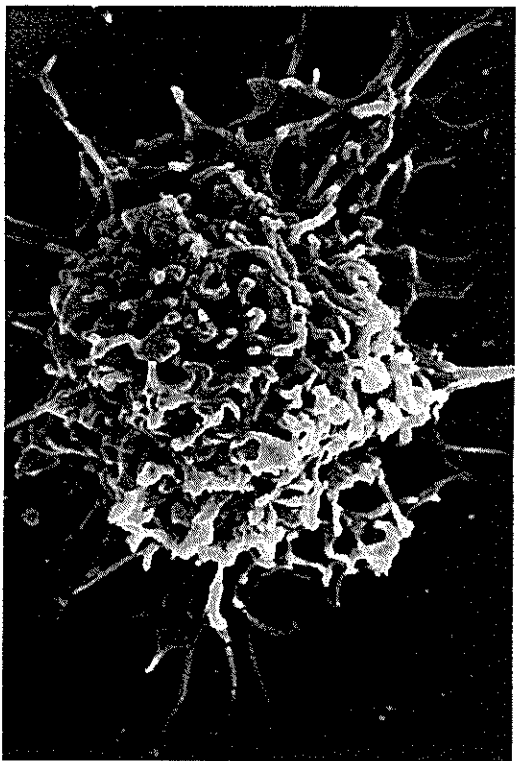


図2 ヒト樹状細胞の走査電子顕微鏡像

したがって、腫瘍免疫により癌細胞を除去するために細胞障害性T細胞の活性化をはかる必要がある。最近注目されてきている抗原提示細胞の中でも中心細胞の中でも重要な細胞として樹状細胞(Dendritic cell: DC)がある。樹状細胞の走査電顕による画

像を図2に示す。細胞表面の全域に樹状突起を有している特徴的な形態をしている細胞である。この樹状細胞こそが抗原提示細胞のうちでも中心的な細胞である。しかも外来性の抗原をMHCクラスI分子上に提示できることを特徴として

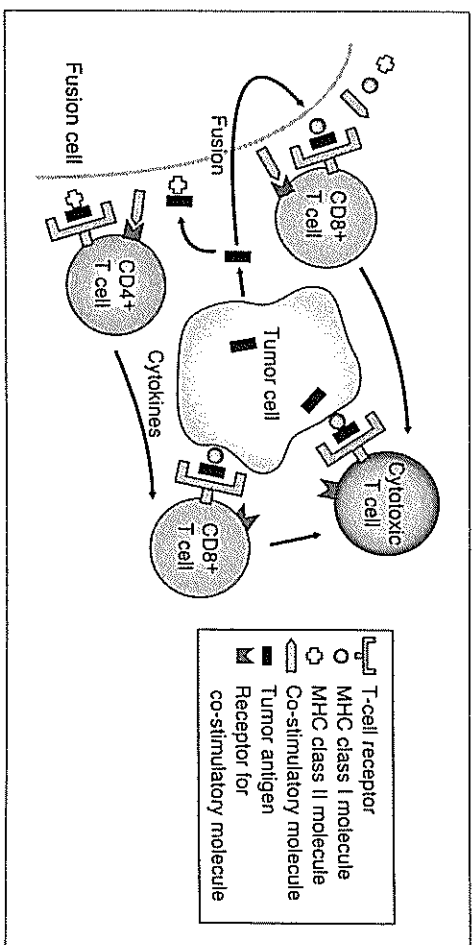


図3 融合細胞による抗原提示と免疫反応

いる細胞である¹⁰⁾。このことから、樹状細胞にペプチド抗原をバルスする方法や、癌細胞の可溶性物質存在下で樹状細胞を培養し、その細胞を用いての免疫療法の開発の試みは、メラノーマ等では臨床研究も多くなされている。さらに樹状細胞の働きとしてαガラクトクトシルセラミドに代表される糖鎖抗原がCD1dを介してNKT細胞に提示され、抗腫瘍活性を示すNKT細胞を活性化することが知られている。

樹状細胞と癌細胞との融合細胞の応用

癌の特性の一つに、癌組織を構成している癌細胞の多様性がある。この多様性の存在こそが、癌の化学療法や放射線療法による治療を困難にしている。かりに99.9%の癌細胞を化学療法や放射線療法で殺滅したとしても、残りの0.1%の癌細胞が増殖し、再発として発現してくる。この繰り返しにより徐々に抵抗性の強い細胞群が選択的に増殖してくるのが考えられる。

個々の癌症例は既知の癌抗原以外に、細胞の癌化に伴う遺伝子変異により発現される固有の癌抗原(individually unique antigen)¹¹⁾や、現時点では未固定の癌抗原を表現している可能性があり、既知の癌抗原とともにこのような抗原性を治療に用いる方法も検討されている。その方法の一つが、抗原提示細胞と癌細胞の融合細胞による癌免疫療法である¹⁴⁾。DCのような抗原提示細胞と癌細胞の融合細胞を用いる方法は、フ

ロテオソームのような細胞内machineryを利用して、癌抗原ペプチドをMHC class I結合性の内因性抗原として細胞障害性Tリンパ球(CTL)に提示しうる利点を有している。しかし、操作がほかの方法に比較して複雑であり、融合に用いる癌細胞の性質が多岐にわたるなどの問題点も少なくない。

癌抗原は核蛋白、細胞質蛋白、膜蛋白のいずれにも存在し、T細胞レセプターに確認される癌抗原ペプチドは、これらの蛋白がプロセッシングを受け、おもにMHC class I分子上に提示される。癌細胞がこのような免疫系に確認される抗原性を発現している場合、一般的に癌細胞自身がTリンパ球に抗原提示を行うために必須である共刺激分子(co-stimulatory molecule)を発現していないために¹⁵⁾、いわゆる末梢性免疫寛容の状態をつくり出し出している。報告されているDCと癌細胞の融合細胞は、DCの発現する共刺激分子を発現し、mixed lymphocyte reactionなどのリンパ球刺激能を示す¹⁶⁾。融合細胞作製の目的は、癌細胞にDCのもつ抗原提示機能を付与し、癌細胞自身を抗原提示細胞とすることにある。DCの特性を保持した融合細胞は融合パートナー細胞である癌細胞の癌抗原を提示し、Tリンパ球を活性化、増殖させ、Tリンパ球を中心とした抗腫瘍免疫を誘導すると考えられる。この機構を模式化した図を図3として示す。

抗原提示細胞と癌細胞の融合細胞を利用して

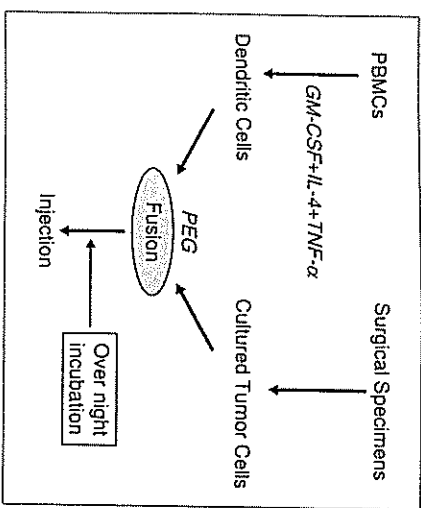


図4 融合細胞作成方法

癌免疫を誘導する報告がなされている。初期の報告は1994年、Science誌上に発表されたGuoらの報告で、活性化B細胞と肝癌細胞の融合細胞を作製し、この細胞で宿主を免疫することにより、融合パートナー細胞である肝癌に対する抗腫瘍免疫を誘導できたと述べている³⁾。われわれと共同研究を行っているDana-Farber癌研究所のGongら⁴⁾は、骨髄由来DCとマウス大腸癌細胞MC-38の融合細胞をポリエチレングリコール(PEG)処理法を用いて作製した。融合細胞はMHC class I, class II, CD80, CD86, CD54のような抗原提示のための分子を発現していた。さらにヒト腫瘍マーカーの一つであるMUC-1遺伝子を導入したMC38/MUC-1細胞をDCの融合パートナーとして用いた場合、融合細胞にもMUC-1の発現が認められた⁴⁾。このことより、融合細胞は二つの細胞の機能を同時に表現していると考えられた。この融合細胞は*in vivo*においても抗腫瘍性を示さず、この細胞でマウスを免疫することにより、MC-38に対する特異的な予防、治療効果が得られた。われわれの検討したPEG処理を用いたマウスDCと癌細胞の細胞融合の方法と、融合細胞でマウスを免疫することにより得られる抗腫瘍効果の詳細については、他の総説を参照して頂きたい⁶⁾。

2000年になりドイツのKuglerら⁷⁾のグループは、allogeneic DCと自己癌細胞の融合細胞の投与により腎臓癌に高い治療効果が認められたことを報告し、同時に発熱以外は有害事象が認められなかったことを示した。

樹状細胞と癌細胞の融合細胞の作製
われわれの用いているPEG処理を用いたマウス樹状細胞と癌細胞の細胞融合の方法と、融合細胞でマウスを免疫することにより得られる抗腫瘍効果について述べる(図4参照)。マウスの樹状細胞は精液⁸⁾の方法により、マウス骨髄細胞より誘導し採取している。一方、ヒトの場合には末梢血の単核球を使用している。癌細胞はマウスに移植可能な各種樹立癌細胞株を用いた。PEGは市販の細胞融合用(MW1450, 50%)を37℃に加熱して使用している。樹状細胞と癌細胞を3~10:1の比率で混合し、PEGで処理する。一定時間間隔でPEGを希釈した後、遠心でPEG処理細胞を回収する。この時、細胞は非常に脆弱な状態となっているので、取り扱いには十分な注意を要する。GM-CSF, IL-4を加えた培地で1~7日間培養した後、細胞を採取する。細胞増殖の活発な癌細胞を用いる場合は、PEG処理直前に癌細胞を放射線処理する。現在までのわれわれの経験では、融合細胞は樹状細胞に似た性状を示し、PEG処理後も浮遊または緩やかに付着した状態で培養され、ピペット操作により簡単に回収される。培養皿に付着している細胞は未融合の癌細胞が多い。走査型電子顕微鏡で融合細胞を観察すると、樹状細胞特有の樹状突起を有するが、細胞は大型で、一部癌細胞の形態に類似した特性もみられる。その後、樹状細胞と腫瘍細胞との融合細胞の性質を詳細に検討した結果、細胞融合という操作によって、まったく新しい細胞が形成されることを明らかにした。樹状細胞と腫瘍細胞とをPEG法により融合させると、この細胞の形態変化を走査型電子顕微鏡で観察した結果を図5に示す。図から明らかのように2時間後には腫瘍細胞の表面構造に変化の兆候をきたし、4時間で腫瘍細胞は樹状突起を細胞表面に多数形成し、あたかも腫瘍細胞が樹状細胞に変化したような形態的な変化をきたしていた。融合細胞の発現するphenotypelは1週間くらいは両方の細胞の性格を示すが、増殖はほとんど示さない。PEG処理後1~7日後に融合細胞をマウスに投与する。

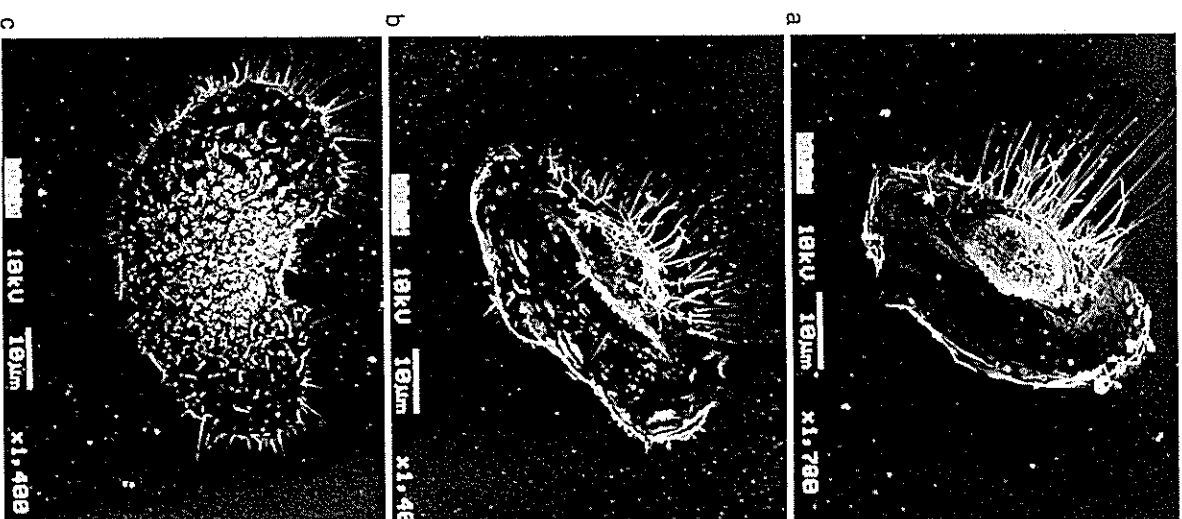


図5 融合細胞の経時変化
a: 1 hour after, b: 2 hour after, c: 4 hour after

マウス脳腫瘍モデルでの融合ワウチンの検討

赤崎, 菊地らはマウスのグリオーマ細胞(SR-B10.A)によるモデル実験系での治療実験を以下のように試みた¹¹⁾。実験初日(day 0)にマウスの脳内に定常投与方法により右前葉に1×10⁴個のSR-B10.A細胞を移植した。その後、第5日と12日に融合細胞によるワウチンの投与を実施した。経

路としては皮下投与が静注、脾内局注などに比べ優れているようであるが、用いる腫瘍の系により異なる。1匹のマウスに3×10⁵の融合細胞を7日間隔で2回投与している¹¹⁾。このような処置を受けたマウスの脾細胞には、樹状細胞との融合に用いた癌細胞に対する特異的なCTLが誘導される。無処理のマウスに癌細胞を移入するとマウスを腫瘍死に導くが、融合細胞で免疫されたマウスは移植された癌細胞を強く拒絶して腫瘍は形成されず、ワウチン効果が認められる。免疫前に移植された癌細胞に対する治療効果は、脳腫瘍の系でも著明に認められた。しかし、脳内にグリオーマ細胞を直接移植した系では治療効果はやや劣る。このモデル系での実験で、融合細胞によるワウチン療法により、未治療群と比較して平均20日で死亡するマウスが平均40日間生存していた。この実験動物系で平均余命の延長に成功した事例は、われわれの知るかぎり、この実験の結果が初めてである(図8参照)。化学療法や放射線療法など多くの研究が過去になされてきたが、最大でも7日間の生命予後の延長が最良の結果であった。

そこで、樹状細胞と癌細胞との融合細胞によるワウチン療法の改良方法の検討を開始した。その結果、固形癌の治療に対しては、癌組織内へのリンソノ球の浸潤、癌細胞とリンソノ球の接着、癌細胞の産生する免疫抑制物質の影響などを考慮にいれたサイトカイン、BRMなどの併用の有効性の検討を開始した。われわれはマウス皮下移植肝癌に対し、融合細胞とIL-12の併用により有効な治療効果が得られることを示した⁹⁾。

樹状細胞と腫瘍細胞との融合細胞
マウスIL-12

この治療困難なマウス脳腫瘍のモデル系は、より人体での悪性腫瘍の治療モデルに近い系であると考えられる。この系でワウチン療法の有効性が証明できれば臨床応用への道が拓かれるとの期待の下に、研究を開始した。

著者はこのワウチンの作用を増強する方法についての検討を開始した。過去の経験から、多くのモデル系の腫瘍細胞は担癌生体の免疫反応性を極端に抑制する実験結果を観察してきた。

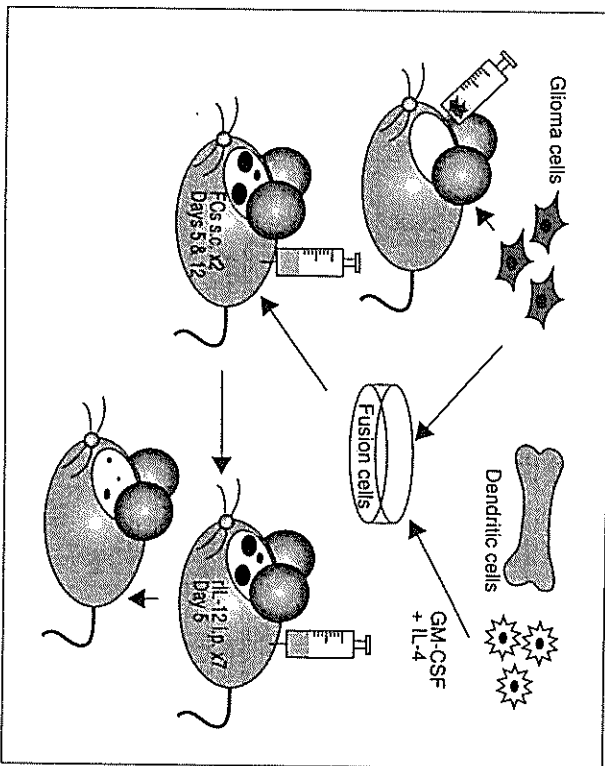


図6 マウス脳腫瘍モデル

そこで、生体の免疫反応系をMHC-Iの反応系に移行させることが重要であろうと考えた。しかも、臨床試験が実施可能な方法がより望ましい方法である。この点、インターロイキン12 (IL-12)は検討するに充分価値ある物質であると考えた。遺伝子組み替えによりヒト型IL-12 (hIL-12)とマウスIL-12 (mIL-12)の入手に幸い成り、実験が開始された。

その結果は劇的であった。前述のマウスのグリアローマ細胞 (SRB10A) によるモデル実験系での治療実験にmIL-12を加えることを試みた。すなわち、実験初日 (day 0) にマウスの脳内に定常投与方法により右前葉に 1×10^4 個のSRB10A細胞を移植した。その後、第5日と12日に融合細胞によるワクチンの投与を実施した。皮下投与で 3×10^6 個の融合細胞を2回投与した。第5日からmIL-12 (0.5 μ g/ μ l) を1日置きに2週間投与した。

対照群を含む各種の実験系のマウスから脾細胞を得て、グリアローマ細胞 (SRB10A) に対する特異的なCTLの誘導の有無を検討した¹¹⁾。その結果を図7に示す。顕著なCTL活性の増強がDC/Tumor Fusion cell+rIL-12により誘導されることが明らかになった。対照群のマウスやrIL-12、さらに樹状細胞のみの投与群ではCTL活性の誘導はみられなかった。DC/Tumor Fusion cellによって

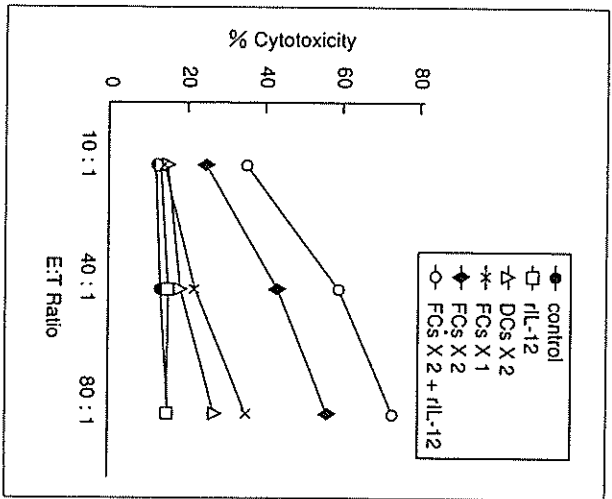


図7 担瘤マウス脾細胞の細胞障害性反応の検討

も活性は誘導される。しかし、rIL-12付与の効果は顕著であった。

さらに、ワクチン療法に対するDC/Tumor Fusion cell+rIL-12の効果は絶大であった。図8に示すようにDC/Tumor Fusion cell+rIL-12の治療を受けたマウスは10匹中4匹が実験終了日まで

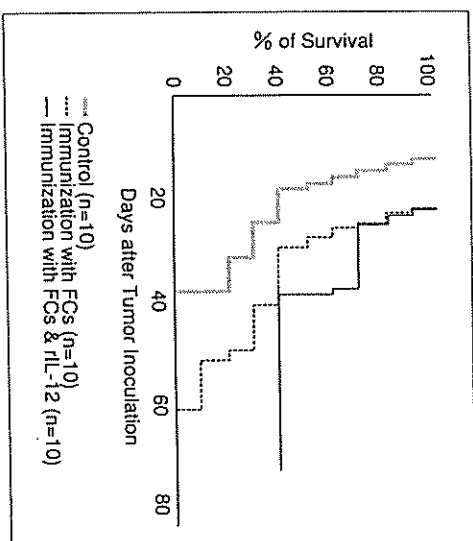


図8 融合細胞ワクチンとrIL-12付与による生存率の比較

る70日まで生存し、その後の病理組織学的検討の結果、腫瘍の消失が観察されたのである。このDC/Tumor Fusion cell+rIL-12のワクチン効果が免疫反応に由来していることを証明し、反応の性質を明らかにする目的で、各種抗体による除去反応を試みた。図9にその結果を提示する。図から対照群にもっとも近い、すなわちワクチン効果が除去されるのはCD8に対する抗体を投与した群であった。このことは、このワクチンの効果は細胞障害性のT細胞 (CD8+) の反応を抑制すると阻止される。対照的に、CD4やNK細胞の活性にはあまり依存していないことを証明した。

いずれにしても、この研究の歴史は浅く、より効率的な細胞融合法、融合細胞の基本的な性状 (サイトカイン分泌能などの遺伝子発現、運動能、ホーミング能など)、融合細胞の *in vitro*, *in vivo* における生存期間、抗腫瘍免疫誘導のための宿主への投与経路など、多くの点において今後の検討の余地を残している。

臨床研究の現状

1999年5月よりわれわれは、東京慈恵会医科大学の倫理委員会の承認を得て、進行癌患者に対する融合細胞を用いた免疫療法的安全性と有効性に関する臨床的検討を開始した¹²⁾。患者PBMC由来のDCと、放射線処理された患者癌細胞をPEG処理により融合させ、2~3週間隔で患

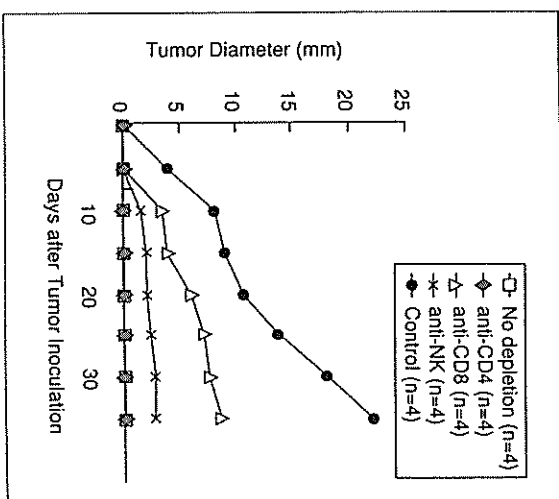


図9 T細胞のサブセット除去による移植癌細胞の再燃

者に皮下注射する方法である。現在まで、脳の悪性腫瘍を含む種々の癌患者がこの治療を受けたが、有害事象は8例の発熱のみで、治療に関連した重篤な有害事象は観察されなかった。接種部位の腫瘍形成、自己免疫疾患の誘発などもみられていない。8例の患者で自覚症状の改善、転移病巣の縮小、癌性腹水の減少、腫瘍マーカーの低下などの効果が認められ、遅延型過敏反応様の皮内反応を示す例もみられた。高度進行例は治療に反応する頻度は低いものの、融合細胞の作成方法、投与方法、併用治療などの点において今後の改善の余地を残しており、細胞治療としての新たな免疫療法法の確立の可能性を示している。

おわりに

DCを用いた免疫療法は、癌細胞に免疫学的癌拒絶をひき起こす抗原が存在し、DCによりその癌抗原に対するTリンパ球の反応を誘導させるといふ概念のうえに成り立っている。癌抗原は既知のものも含まれるが、多くの未知の抗原の関与も考えられる。この点を考慮すると、細胞融合法による抗原提示は利点を有する方法である。その施行にあたっては、臨床応用可能な状態での細胞産生施設の完備が必須である。さ

らに，癌細胞の採取のための医療チーム，細胞培養に精通した研究スタッフの共同作業のうちに成り立つといえる。

何よりも，新しい医療方法の開発に向けての決意と熱意を必要としている。樹状細胞を用いた癌免疫療法はいまだに多くの解決すべき技術的，生物学的問題を残しているが，今後の基礎研究の積み重ねにより癌治療へ寄与することが期待される。

文 献

- 1) Robbins PF, El-Garni M, Li YF, et al. A mutated β -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 183 : 1185-92.
- 2) Brandt D, Brasseur F, Weynants P, et al. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 1996; 183 : 2501-8.
- 3) Guo Y, Wu M, Chen H, et al. Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science* 1994; 263 : 518-20.
- 4) Gong J, Chen D, Kashwaba M, et al.: Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997; 3 : 558-61.
- 5) Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, et al. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 6586.
- 6) 本間 定, 細胞融合. In: 稲葉カヨ, 瀧川雅浩・編, 樹状細胞 基礎から臨床へ, 東京: 南江堂; 2000. P. 132-6.
- 7) Kugler A, Stuhler G, Walden P, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 2000; 6 : 332-6.
- 8) Inaba K, Inaba M, Romani R, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony stimulation factor. *J Exp Med* 1992; 180 : 83-93.
- 9) 本間 定, 入江正冠, 戸田剛太郎, ほか, 樹状細胞と癌細胞の融合細胞により誘導される特異的癌免疫の特性. 第58回 日本癌学会総会記事 1999. p. 257.
- 10) Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, et al. Intratumoral injection of dendritic and irradiated glioma cells induces anti-tumor effects in a mouse brain tumor model. *Cancer Immunol Immunother*. In press 2002.
- 11) Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S, et al. Antitumor effect of immunizations with fusion of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model. *J Immunotherapy* 2001; 24(2) : 106-13.
- 12) Kikuchi T, Akasaki Y, Irie M, et al. Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50 : 337-44.

* * *