

最新医学・第54巻・第11号 (1999年11月号 別刷)

特集 樹状細胞の基礎と臨床

樹状細胞とがん細胞の融合細胞を用いた  
特異的がん免疫の誘導

本間 定 大野典也

戸田 剛太郎 Donald Kufe

最新医学社

## 基礎

樹状細胞とがん細胞の融合細胞を用いた  
特異的がん免疫の誘導本間 定<sup>\*1\*</sup> 大野 典也<sup>\*2</sup>戸田 剛太郎<sup>\*\*1</sup> Donald Kufe<sup>\*\*3</sup>

## 要 旨

強力な抗原提示細胞 (APC) である樹状細胞とがん細胞の融合細胞を、ポリエチレングリコール処理によって作製した。この融合細胞は樹状細胞の発現する MHC 分子や共刺激分子とがん細胞の抗原を発現し、APC 化されたがん細胞と考えられる。マウスを用いた基礎的検討では、融合細胞の宿主への投与により、がん細胞特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導され、予防・治療効果を示す抗腫瘍免疫が得られたことが報告されている。自己の樹状細胞とがん細胞の融合細胞を用いれば、がん抗原が未同定ながんに対しても特異的な免疫療法を施行しうる可能性が考えられる。

## はじめに

分子生物学の発展により、がん拒絶のための標的となる種々のがん抗原が同定された<sup>1)</sup>。そのような抗原が *in vivo* において T 細胞を中心とした免疫系に認識されるためには抗原提示細胞 (APC) が重要な役割を演じており、その中心的存在が樹状細胞 (DC) であることも明確となってきた<sup>2)3)</sup>。生体内では少数細胞である樹状細胞も、サイトカインを用いた大量培養によりその性状の解明と臨床使用への

道が開けつつある<sup>4-6)</sup>。免疫系に認識されるがん抗原の発見と、樹状細胞の分離・培養技術の進歩により、がん免疫は新たな世代を迎えたと言える。ここでは、我々の検討してきた樹状細胞とがん細胞の融合細胞を用いた特異的がん免疫の誘導と、その臨床応用に対する展望を述べる。

## なぜ融合細胞を用いるか

がん細胞に対する免疫反応の基盤となるべきがん抗原の同定が進められ、臨床治療に使用可能と予想される抗原も見いだされた<sup>1)</sup>。しかし、継続して進行しているがん症例より分離されたがん抗原は、その抗原を発現するがん細胞はすでに免疫反応によって排除され、抗原を発現していないがん細胞が残存して増殖しているとも推察される。進行がん症例に

\*1 東京慈恵会医科大学 内科学講座第一 講師

\*\*1 同 教授

\*2 同 DNA 医学研究所 悪性腫瘍治療研究部門 教授

\*3 Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School

キーワード：樹状細胞，細胞融合，抗腫瘍免疫，T 細胞

において多種存在すると考えられるがん拒絶抗原の中には、未だに免疫反応を受けていない抗原も存在すると考えられるが、ほとんどが未特定の抗原である。また、T細胞に認識されるがん拒絶抗原の中には、個々のがんに特異的な変異を有するもの (individually unique antigen) が想定され<sup>18)</sup>、このような抗原に対しては既知のがん抗原に対する免疫療法ではカバーできない。そこで、個々のがん患者のがん細胞全体を免疫原として使用する方法が発案され、その1つの方法として樹状細胞とがん細胞の細胞融合法が試みられた<sup>9,19)</sup>。がん拒絶抗原は核タンパク質、細胞質タンパク質、膜タンパク質のいずれにも存在し、T細胞受容体 (TCR) に認識されるがん抗原ペプチドはこれらのタンパク質に由来する。樹状細胞とがん細胞の融合細胞が2種の細胞の遺伝子発現を十分保持していれば、がん細胞の発現するがん抗原は樹状細胞の機能によって効率良くT細胞へ提示されることが期待される<sup>9)</sup>。

がん抗原およびその抗原ペプチドを樹状細胞を介してT細胞に提示させるには、幾つかの方法がある。外來性抗原をMHCクラスIにのせて提示する特性を利用して、がん細胞の lysate, がん細胞より抽出されたMHCクラスI分子結合性ペプチド、または特定のがん抗原ペプチドを、樹状細胞にパルスとして提示させる方法が多く用いられている。これらの方法に比して、樹状細胞とがん細胞の融合細胞を用いる方法は、がん抗原ペプチドをMHCクラスI結合性の本来の内因性抗原として、細胞傷害性T細胞 (CTL) に提示しうる利点を有している。MHCクラスI結合性のがん抗原ペプチドを樹状細胞に外來性にパルスとしてCTLを誘導する際は、ヘルパーT細胞活性化の手法の併用を要することがあるが<sup>11)</sup>、融合細胞の系ではCD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T細胞の両方の活性化の結果、ヘルパーT細胞の

ヘルプも期待される。

#### 融合細胞によるがん抗原ペプチドのT細胞への抗原提示

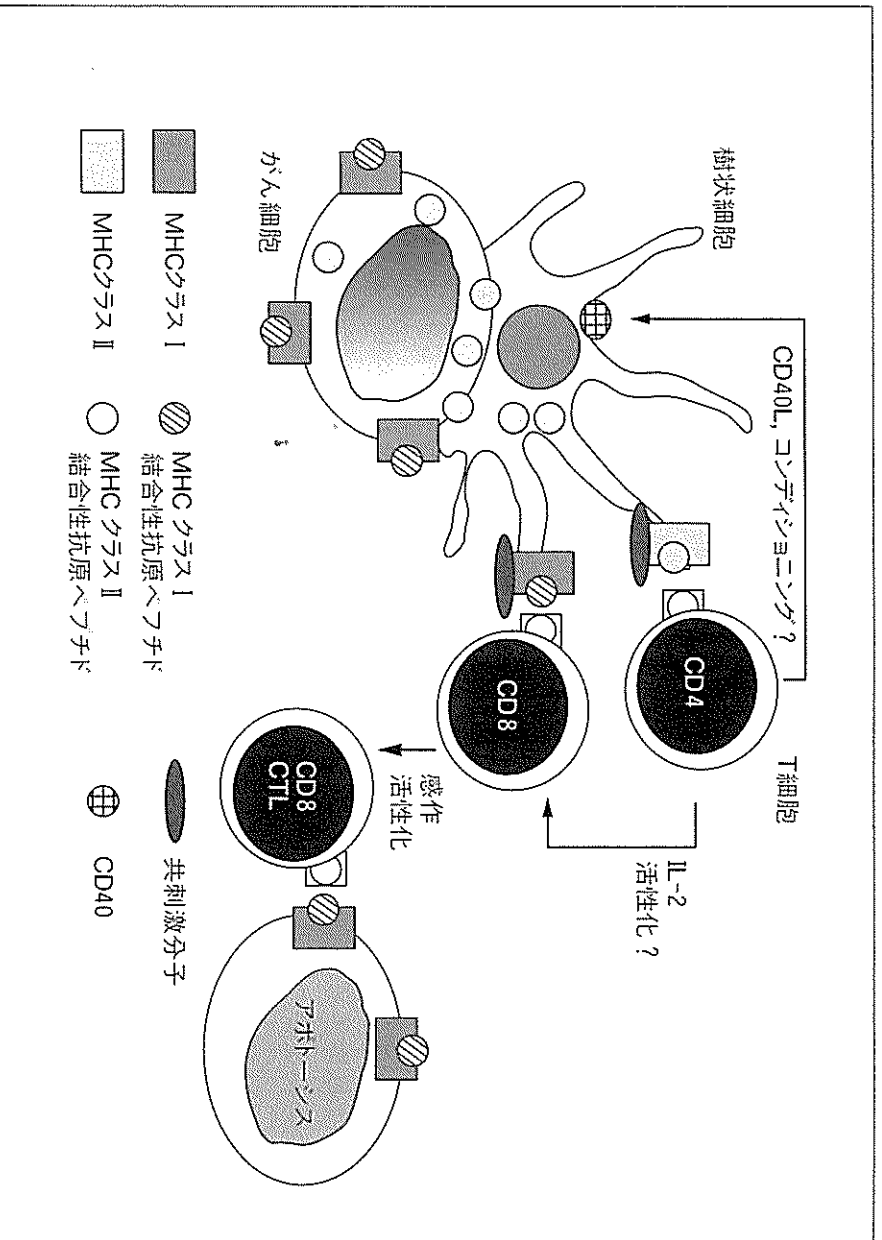
図1に、予想される樹状細胞とがん細胞の融合細胞による抗腫瘍免疫誘導の機序を示す。がん細胞は免疫系に認識される抗原性を有している。一般的にはT細胞がこの抗原を標的として作動することはない。この現象の1つの要因は、がん細胞がT細胞に抗原提示を行うために必須である共刺激分子 (co-stimulatory molecule) を発現していないため<sup>10)</sup>、いわゆる末梢性免疫寛容の状態を作り出している。報告されている樹状細胞とがん細胞の融合細胞は樹状細胞の発現する共刺激分子を発現し、混合リンパ球反応 (MLR) などのリンパ球刺激能を示す<sup>11)</sup>。融合細胞作製の目的は、がん細胞に樹状細胞の持つ抗原提示機能を付与し、がん細胞自身を強力なAPCとすることにある。樹状細胞の特性を保持した融合細胞は自己のがん抗原をT細胞に提示し、がん抗原を認識するT細胞を活性化、増殖させ、T細胞を中心とした抗腫瘍免疫を誘導すると考えられる。

#### 樹状細胞とがん細胞の細胞融合に関するこれまでの報告

樹状細胞を含むAPCとがん細胞の融合細胞を利用してがん免疫を誘導するこれまでの報告を紹介する。最も初期の報告は1994年『Science』誌上に発表されたGuoら<sup>10)</sup>の報告で、活性化B細胞と肝がん細胞の融合細胞を作製し、この細胞でマウスを免疫することにより融合パートナー細胞である肝がんに対する抗腫瘍免疫を誘導できたと述べている。

我々と共同研究を行っている Dana-Farber がん研究所の Gong ら<sup>11)</sup>は、骨髓由来樹状細胞とマウス大腸がん細胞 MC-38 の融合細胞をポリエチレングリコール (PEG) 処理を用

図1 樹状細胞とがん細胞の融合細胞による特異的がん免疫の誘導



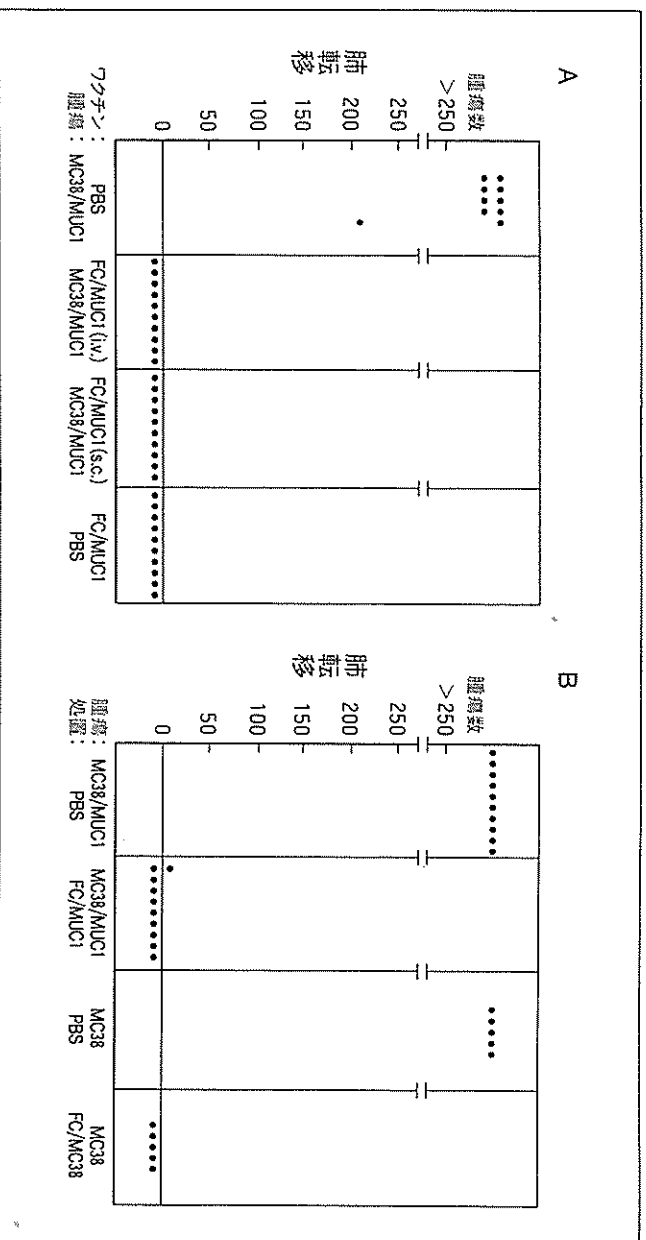
融合細胞は CD8<sup>+</sup> T 細胞 (細胞傷害性 T 細胞: CTL) に提示されるがん抗原ペプチドを MHC クラス I 分子に結合して発現し, 同時に T 細胞への抗原提示に必要な共刺激分子 (costimulatory molecule) を発現している. がん細胞に MHC クラス II 分子を介して CD4<sup>+</sup> T 細胞 (ヘルパー T 細胞) に提示される抗原が存在すれば, この抗原ペプチドも T 細胞に提示されると考えられる. 融合細胞は抗原提示細胞化されたがん細胞であり, がん抗原を認識する T 細胞の活性化, 増殖を誘導し, 最終的にはがん細胞を特異的に傷害する CTL によりがん細胞が破壊される. MHC: 主要組織適合遺伝子複合体, CD40L: CD40 リガンド

いて作製した. 融合細胞は MHC クラス I, クラス II, CD80, CD86, CD54 のような抗原提示のための分子を発現し, 同時にヒト腫瘍マーカーである MUC-1 遺伝子を導入した MC-38/MUC-1 細胞を樹状細胞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. このことより, 融合細胞は 2 つの細胞の機能を同時に発現していると考えられた. 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 (図 2). Les-pagnard ら<sup>12)</sup>は樹状細胞と 6-チオグアニジン耐性 P-815 細胞を PEG 処理で融合させ, HAT

選別を行い, 樹状細胞-P-815 ハイブリドマを作製した. このハイブリドマも独自のがん抗原と抗原提示のための分子を発現し, この細胞を移入されたマウスには P-815 に対する抗腫瘍免疫が誘導されたという. また, 融合細胞によって免疫されたマウスのリンパ節 T 細胞の養子移入による抗腫瘍効果についても報告されている<sup>13)</sup>. 一方, PEG 処理を行わず, 単に樹状細胞とがん細胞を混合培養しておくだけで, 融合細胞と同等の抗腫瘍免疫を誘導できたという報告も見られるが<sup>14)</sup>, その機序は不明である.

いずれにしてもこの研究の歴史は浅く, よ

図 2 樹状細胞とがん細胞の融合細胞による免疫で誘導された抗腫瘍効果 (文献<sup>13)</sup>より引用改変)



A: 予防モデル. 樹状細胞とがん細胞 (マウス大腸がん MC38 細胞) にヒトの腫瘍マーカーである MUC1 の遺伝子を導入した細胞: MC38/MUC1) の融合細胞 (FC/MUC1) で免疫されたマウスは, MC38/MUC1 細胞を静注されても全く肺転移を生じない. この効果は融合細胞の投与経路が静注でも皮下注でも同様であった. B: 治療モデル. がん細胞を静注し肺転移を成立させた後, 融合細胞の静注による治療を行った. 治療効果は MC38/MUC1 のみならず, MUC1 遺伝子の導入されていない親株 MC38 の融合細胞 (FC/MC38) を用いても認められた.

PBS: リン酸緩衝液, i.v.: 静脈注射, s.c.: 皮下注射

り有効な細胞融合法, 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.

### 樹状細胞とがん細胞の細胞融合の実際と抗腫瘍免疫の誘導

細胞融合の方法は種々あり, 用いる細胞, 目的によってその方法は異なる. 細胞融合には PEG 処理を用いる方法, HVJ を用いる方法, 電気的操作を用いる方法などがあるが, ここでは我々の用いている PEG 処理を用いたマウス樹状細胞とがん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って得られる抗腫瘍効果について概説する.

PEG は市販の細胞融合用 (分子量 1,450, 50%) を, 37℃ に加温して使用している. 樹状細胞とがん細胞を 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. このとき, 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. 細胞増殖の活発ながん細胞を用いる場合は, PEG 処理直前にがん細胞を放射線処理する. 現在までの我々の経験では, 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, ピペッテイングにより容易に回収される. 培養皿に付着している細胞は未融合のがん細胞が多い. 融合細胞は 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。融合細胞の投与経路としては皮下投与が、静注、脾内局注などに比べて優れているようである。1 匹のマウスに  $2 \sim 5 \times 10^5$  の融合細胞を 10～14 日間隔で 2 回投与している。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がん細胞に対する特異的な CTL が誘導されてくる。無処理のマウスにがん細胞を移入するとマウス体内で活発に増殖し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がん細胞を強く拒絶して腫瘍は形成されず、ワクチン効果が認められる。免疫前に移植されたがん細胞に対する治療効果は肺転移の系で著明に認められたが、皮下に形成された固形腫瘍に対してはその効果はやや劣る。固形がんの治療に対しては、がん組織内へのリンパ球の浸潤、がん細胞とリンパ球の接着、がん細胞の産生する免疫抑制物質などを考慮に入れたサイトカイン、BRM などの併用療法が有効と考えられる。

#### 臨床応用に向けた今後の展望

融合細胞を用いたがん免疫療法の実際として、2つの使用法が考えられる。1つはがん患者の自己樹状細胞とがん細胞の融合細胞を作製し、この細胞を患者に移入して患者の体内で CTL の誘導を目指す方法である。能動免疫とも言えるこの方法は、がん細胞が未だに免疫寛容を生じていない抗原性を有しており、リンパ球が人工的操作によりその抗原に反応しうる能力を残存させているという前提条件を要する。がん細胞の十分な不活化と、有効な融合効率を要することは言うまでもない。また、標的抗原が正常細胞にも共有された分化抗原などであると、自己免疫疾患の誘発にも注意を要する。もう1つの使用法は、*in vitro* における特異的 CTL の誘導に役立た

せる方法である。自己の融合細胞とリンパ球の混合培養により、*in vitro* において T 細胞に対しがん抗原の提示、感作の成立、がん抗原の特異的認識が誘導されれば、このようなリンパ球のがん患者への移入は有効な治療効果を示すことが期待される。

この治療法の持つ利点と問題点を表 1 に示した。ヒト末梢血の単核球より誘導される樹状細胞はマクロファージに似た性状を示し、マウスで用いた骨髄由来樹状細胞とはその性状は必ずしも同一ではない。また、ヒトがん細胞の有効な初代培養法は未だ確立されておらず、ヒトにおける両細胞の細胞融合法の確立には今後の十分な検討が必要である。

この治療法の持つ性格より、有効性が期待されるがん症例は、非治療切除の外科手術症例、早期の再発症例などであろう。進行がん症例に対しては、融合細胞による免疫に加え、T 細胞の活性化作用を示すサイトカイン、BRM の作用が有効であるかもしれない。融合細胞によりがん細胞に対する特異的 CTL が誘導されれば、従来より用いられた免疫能全体を活性化させる非特異的免疫療法との併用効果も高まると予想される。

#### おわりに

樹状細胞とがん細胞の融合細胞を用いた免疫療法は、がん細胞を APC 化させることがその基本にあり、自己に潜在している治療力を最大限に利用する方法とも理解される。自己の樹状細胞とがん細胞を使用し、ウイルスベクターなどの異物を使用することなく、個々の症例の有するがん抗原に対する特異的免疫反応を基盤とした“オーダーメイド”のがん免疫療法と考えられる。現時点では、この方法も多くの解決すべき技術的問題を残しているが、この技術の進歩とその研究により派生した知見が、多くのがん患者の福音となることを期待している。

表 1 樹状細胞とがん細胞の融合細胞を用いたがん免疫療法における利点と問題点

利点	問題点
<p>末梢血由来の樹状細胞の大量培養，採取は比較的容易</p> <p>専用培養施設のみで施行可能</p> <p>ウイルスベクター，化学薬品などの異物を患者に投与しない</p> <p>HLA 拘束性による制限がない</p> <p>がん細胞が採取できればどの部位のがん，悪性腫瘍にも施行可能</p> <p>生検レベルの少量のがん細胞で施行可能</p> <p>明らかでない免疫抑制状態でなければ初期から末期がんまで施行可能</p> <p>他の個体からの感染症（ウイルス肝炎など）の危険性がない</p> <p>既知のがん抗原のみならず未同定，複数，固有の変異を有しているがん抗原にも免疫反応が期待される</p> <p>サイトカイン，BRM などの非特異的免疫療法との併用効果が期待される</p> <p>新たながん抗原発見の糸口となりうる</p>	<p>末梢血由来樹状細胞の機能，成熟度</p> <p>がん細胞の単離と培養</p> <p>有効な細胞融合法の確立</p> <p>がん細胞の確実な不活化と抗原性の保持</p> <p>投与経路，方法，回数</p> <p>治療効果判定のためのパラメーター</p> <p>細胞培養時の微生物汚染</p> <p>がん細胞採取不能症例</p> <p>MHC クラス I 分子の発現のないがんに対する治療</p> <p>自己免疫疾患誘発の可能性</p> <p>GM-CSF, IL-4 の人体への微量汚染</p> <p>サイトカインの供給</p>

略語：巻末の「今月の略語」参照

## 文 献

- 1) Rosenburg SA: Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today* 18: 175-182, 1997.
- 2) Grabbe S, et al: Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today* 16:117-121, 1995.
- 3) Shurin MR: Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother* 43: 158-164, 1996.
- 4) Inaba K, et al: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony stimulation factor. *J Exp Med* 176: 1693-1702, 1992.
- 5) Romani N, et al: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: 83-93, 1994.
- 6) Jonuleit H, et al: Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27: 3135-3142, 1997.
- 7) Robbins P.F, et al: A mutated  $\beta$ -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183: 1185-1192, 1996.
- 8) Brandle D, et al: A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 183: 2501-2508, 1996.
- 9) Hart I, et al: Fusion induces tumor rejection. *Nature* 388: 626-627, 1997.
- 10) Guo Y, et al: Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science* 263: 518-520, 1994.
- 11) Gong J, et al: Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 3: 558-561, 1997.
- 12) Lespagnard L, et al: Dendritic cells fused with mastocytoma cells elicit therapeutic antitumor immunity. *Int J Cancer* 76: 250-258, 1998.
- 13) Wang W, et al: Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with

- dendritic cell-tumor fusion vaccines. *J Immunol* 161 : 5516-5524, 1998.
- 14) Nestle F.O, et al : Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4 : 328-332, 1998.
- 15) Chen L, et al : Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 14 : 483-486, 1993.
- 16) Celluzzi C.M, et al : Physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induce protective and therapeutic tumor rejection. *J Immunol* 160 : 3081-3085, 1998.
- 

Antitumor Immunity Induced by Immunization  
with Fusions of Dendritic and Carcinoma Cells

Sadamu Homma<sup>1,2</sup>, Tsuneya Ohno<sup>2</sup>,

Gotaro Toda<sup>1</sup>, Donald Kufe<sup>3</sup>

<sup>1</sup> First Department of Internal Medicine, Jikei University School of Medicine

<sup>2</sup> Department of Oncology, Institute of DNA Medicine, Jikei University School of Medicine

<sup>3</sup> Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School