

# Surgery Frontier

メヂカルビュー社

# 樹状細胞と癌細胞の細胞融合による 特異的癌免疫療法

Induction of antitumor immunity by immunization with fusions of dendritic and tumor cells

- 1. 東京慈恵会医科大学内科科学講座第1
- 2. 同 DNA 医学研究所悪性腫瘍治療研究部門
- 3. Dana-Farber 癌研究所

本間 定<sup>1,2</sup>・戸田剛太郎<sup>1</sup>  
Sadamu Homma (講師) Gozno Toku (教授)

大野 典也<sup>2</sup>・Donald Kufe<sup>3</sup>  
Tsuneyo Oho (教授) (教授)

## Summary

強力な抗原提示細胞である樹状細胞と癌細胞の融合細胞をホリエチロングリコール処理により作製した。この融合細胞は樹状細胞の発現する MHC 分子や副刺激分子と癌細胞の抗原を発現し、抗原提示細胞化された癌細胞と考えられる。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、癌細胞特異的な細胞傷害性 T リンパ球が誘導され、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。自己の樹状細胞と癌細胞の融合細胞を用いれば、癌抗原が未同定な癌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。

Key Words 樹状細胞, 細胞融合, 癌免疫療法, 細胞傷害性 T リンパ球

## はじめに

MHC class I 分子に結合し、特異的 T リンパ球の T 細胞レセプターに認識される癌抗原のペプチド構造が次々に同定され、抗原特異的免疫反応を基盤とした癌免疫療法への期待が高まりつつある。一方、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)<sup>1)2)3)</sup>や、現時点では未同定の癌抗原を発現している可能性があり、既知の癌抗原として使用する方法のひ

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。癌抗原に対する T リンパ球の認識と応答を確立させるためには、強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cells : DC) が重要な役割を演じている<sup>3)4)</sup>。生体内では minor population 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り<sup>5)6)</sup>、細胞治療という新たな治療体系の開発へ結びつくものも期待されている。ここでは癌細胞

## ◆メモランダム◆ 単離された癌細胞を得るには

樹状細胞と癌細胞を融合させるためには、バラバラに単離された癌細胞が必要となる。体腔液中の癌細胞のようにすでに単離された状態であれば好都合であるが、固形癌組織から単離癌細胞を採取するには、そのための処置を要する。一般的には細切され洗浄して血清成分を除いた腫瘍組織片をコラゲナーゼ、デイスパーゼ、トリプシン、ヒアルロニターゼ、DNase などを用いて酵素処理し、単離細胞を得ることが行われている。しかし、結合織の量や細胞の結合様式などによりその採取量や効率はずしも一定ではなく、研究者の個人的流儀も多数存在する。腫瘍組織片をペタリと培養皿にはりつけて培養液を満たしておくだけで癌細胞が周囲に遊走して単層を形成し、容易に癌細胞が採取される場合もある。

とつである樹状細胞と癌細胞の融合細胞による特異的癌免疫の誘導と、その臨床応用に対する展望を述べる。

### 樹状細胞と癌細胞の融合細胞による癌抗原の提示

同定された特定の癌抗原ペプチドを用いず、癌細胞全体を免疫原とする方法として、癌細胞の lysate, または癌細胞より抽出された MHC class I 結合性ペプチドを樹状細胞にパルスする方法が用いられており、外来性抗原も MHC class I にのせて、CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球に抗原提示できるという樹状細胞の特性が利用されている。癌細胞の lysate を樹状細胞にパルスすることにより有効な抗腫瘍免疫が誘導されたことが報告されているが<sup>7)</sup>、癌抗原の性状が不明である以上 lysate の作製と樹状細胞への取り込みの条件が問題となる。また、樹状細胞への癌抗原ペプチドパルス法では、外来性にパルスされたペプチドの MHC class I 分子への親和性とペプチドが結合した MHC class I 分子の turnover が問題となる。樹状細胞と癌細胞の融合細胞を用いる方法は、 proteosome 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傷害性 T リンパ球(CTL)に提示しうる利点を有している。しかし、操作が他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

ターに認識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うけ、主に 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認識されうる抗原性を発現しているも、一般的に癌細胞自身が T リンパ球に対してこの抗原を提示し、免疫反応を惹起することは少ない。その要因のひとつは、癌細胞が T リンパ球に抗原提示を行うために必須である副刺激分子 (costimulatory molecule) を発現していないためで、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癌細胞の融合細胞は、樹状細胞の発現する副刺激分子を発現し、mixed lymphocyte reaction などのリンパ球刺激能を示す<sup>8)</sup>。融合細胞作製の目的は癌細胞に樹状細胞の持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。樹状細胞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 T リンパ球に提示し、癌抗原を認識する 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(図1)。

### 樹状細胞と癌細胞の融合細胞作製と抗腫瘍免疫の誘導

抗原提示細胞と癌細胞の融合細胞を利用して癌免疫を誘導する報告がなされてきている。初期の報告は 1994 年、Science 誌上に発表された Guo ら<sup>9)</sup>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。われわれと共同研究を行っている Dana-Farber 癌研究所の Gong ら<sup>10)</sup>は、骨髄由来樹状細胞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 のような抗原提示に必要な分子を発現し、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<sup>11)</sup>。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。この融合細胞は *in vivo* における造腫瘍性を示さず、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。Lespagnard ら<sup>10)</sup>は樹状細胞と 6-thioguanine 耐性 P-815 細胞をポリエチレングリコール処理で融合させ、HAT selection を行い、樹状細胞-P-815 hybridoma を作製した。この hybridoma も独自の癌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、融合細胞により免疫されたマウスのリンパ節 T リンパ球の adoptive transfer による抗腫瘍効果についても報告されている<sup>11)</sup>。一方、PEG 処理を行わず、単に樹状細胞と癌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か<sup>12)</sup>、その

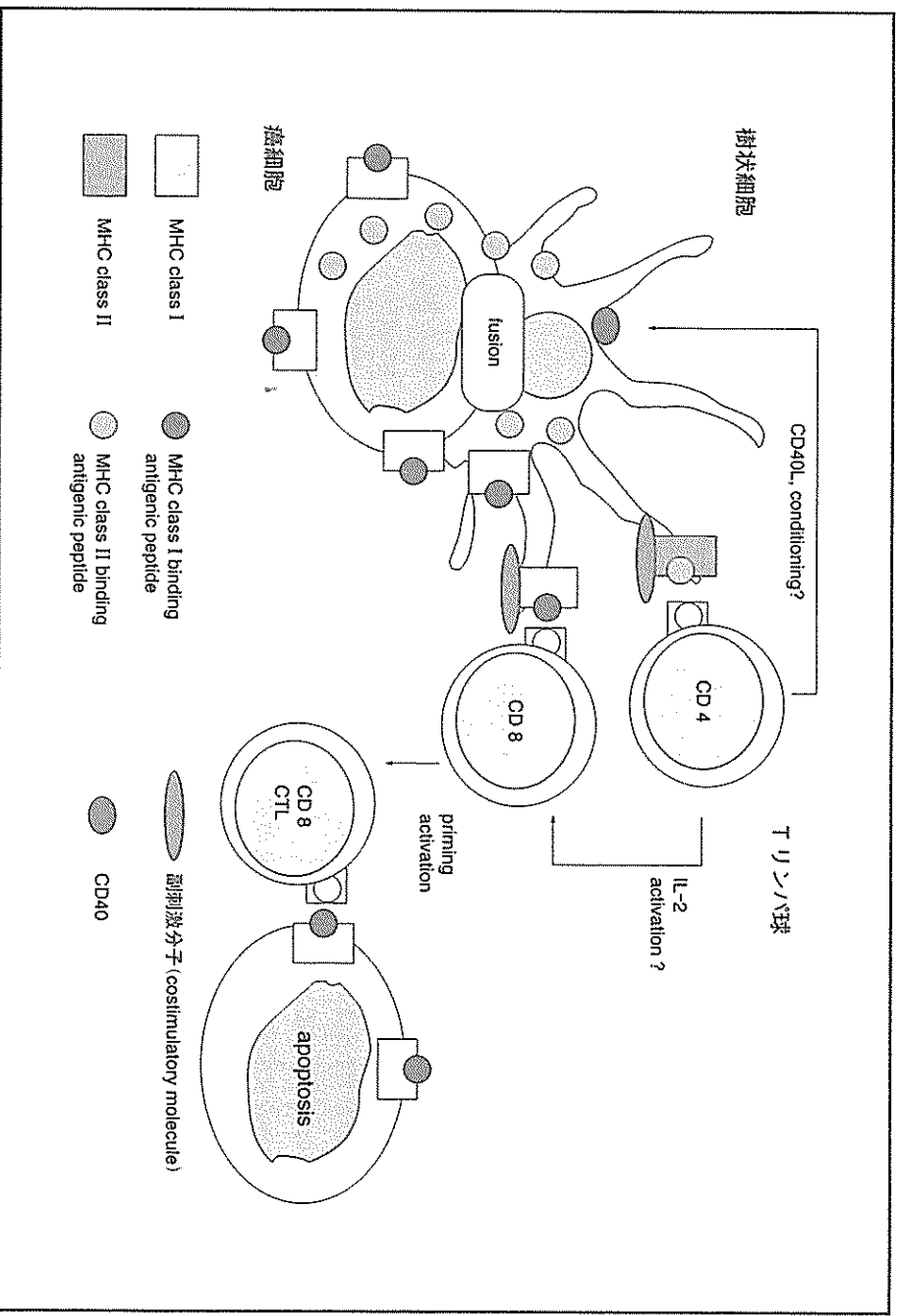


図1 樹状細胞と殺細胞の融合細胞による癌抗原のトリノンパ球への提示と特異的抗腫瘍免疫の誘導  
 癌細胞に感染する癌抗原の抗原ペプチドは融合細胞内の proteosome などを経介してプロセッシングを受け、MHC class I 分子と結合して内因性抗原として CD8+細胞傷害性トリノンパ球(CTL)に提示される。また、癌細胞表面にある MHC class I-peptide 複合体がそのまま使用される可能性もある。CD4+ヘルパートリノンパ球に提示される抗原は細胞表面より endosome 内に取り込まれ、MHC class II 分子と結合して提示されると考えられる。ヘルパートリノンパ球は IL-2 などのサイトカインを産生して CTL を活性化したり、CD40-CD40L を介して樹状細胞を刺激する。

機序は不明である。

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。樹状細胞は稲葉ら<sup>9)</sup>の方法によりマウス骨髓細胞より誘導し採取している。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°C に加温して使用している。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、取扱い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、pipetting 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癌細胞が多い。

な性状(サイトカイン分泌能などの遺伝子発現, 運動能, ホーミング能力など), 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。

### 新たな癌術後療法への展望

融合細胞を用いた癌免疫療法の実際として, 以下の方法が考えられる。1つは癌患者の樹状細胞と癌細胞の融合細胞を作製し, この細胞を患者に移入し, 患者の体内で癌特異的 CTL の誘導を目指す方法である(図3)。両細胞の有効な融合効率を必要とし, 同時に, 癌細胞の抗原性と樹状細胞の抗原提示能の保持も必須となる。そのためには, 望ましい機能を示す樹状細胞を得るための培養法と, 効率のよい細胞融合法が重要となる。

もう1つの使用方法は *in vitro* における特異的 CTL の誘導に用いる方法である。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リンパ球の癌抗原への特異的認識が誘導されれば, このようなリンパ球の癌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。

近年注目されているもう1つの方法は, allogeneic な樹状細胞と自己癌細胞の融合細胞による免疫療法である。活性化B細胞と癌細胞の融合細胞による免疫療法についての検討では, allogeneic なB細胞を用いた時に有効性が高かったと報告されている<sup>14)</sup>。癌細胞側に MHC class I 分子とそれに結合した癌抗原エペトープが存在すれ

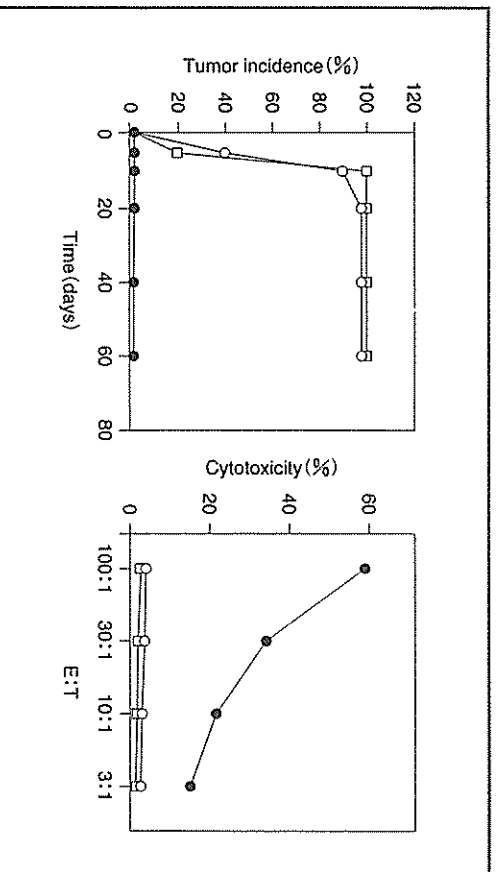


図2 樹状細胞と癌細胞の融合細胞投与による癌細胞に対するマウソン効果

融合細胞を前もって投与しておいたマウスに癌細胞を移入しても癌細胞は拒絶され生着しない(左)。融合細胞で免疫されたマウスには癌細胞を特異的に傷害する細胞障害性Tリンパ球の誘導が認められる(右)。コントロールとしてマウスにPBSを注射(□),  $3 \times 10^6$ の樹状細胞(○), または樹状細胞と癌細胞(MC38/MUC1)の融合細胞(●)を2週間隔で皮下注し, 2週間後にMC38/MUC1細胞を移植し腫瘍発生を観察した。同様の処置を行ったマウスの脾細胞を採取し,  $^{54}\text{Cr}$ リリーアス法を用いてMC38/MUC1に対する細胞障害活性を測定した。(文献8より引用)

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見られる。融合細胞の発現する phenotype 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精注, 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  $2 \sim 5 \times 10^6$ 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, マウソン効果が認められる(図2)。免疫前に移植された癌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。固形癌の治療に対しては癌組織内へのリンパ球の浸潤, 癌細胞とリンパ球の接着, 癌細胞の産生する免疫抑制物質の影響などを考慮にいられたサイトカイン, BRMなどの併用が有効と考えられる。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<sup>13)</sup>。いずれにしても, この研究の歴史は浅く, より効果的な細胞融合法, 融合細胞の基本的

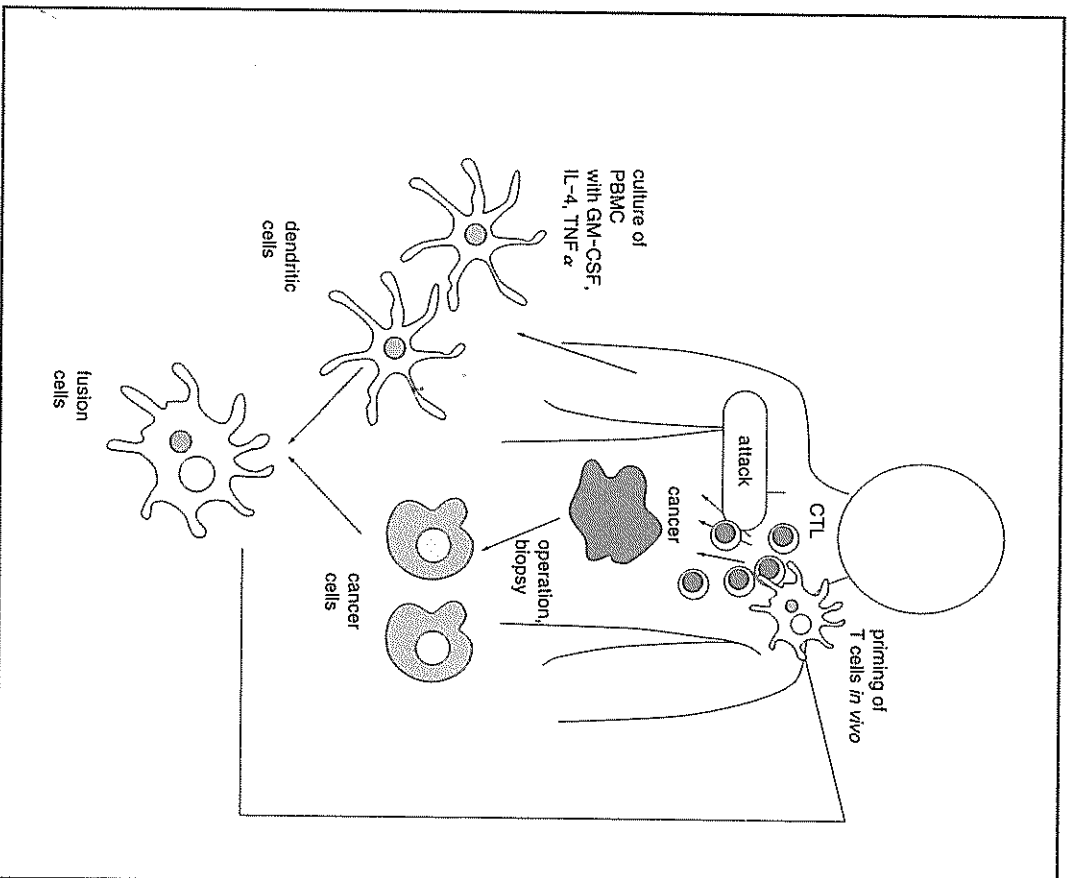


図3 樹状細胞と癌細胞の融合細胞を用いた特異的癌免疫療法  
手術、生検、体腔液穿刺などで採取した癌細胞(新鮮単離細胞または培養細胞)をPEGまたは電気的処理により融合させる。この融合細胞を患者に投与し、in vivoにおいて癌細胞を特異的に傷害する細胞傷害性Tリンパ球の誘導を試みる。未融合癌細胞の移行による弊害を防ぐため、細胞融合直前に癌細胞を放射線照射などにより不活化する。融合細胞は皮下投与、またはリンパ節内投与が望ましいと予想される。

は、allogeneicな樹状細胞の機能分子を利用してその抗原エピソードはTリンパ球に提示され、自己の樹状細胞を使用するよりもより強力な免疫反応を誘導することが可能であるという。

すでに国外において腎臓癌に対し良好な臨床成績が得られつつあるこの方法は、細胞融合法としての利点が生かされ、また、進行癌患者における樹状細胞の採取量低下や機能不全を補う方法

となる可能性を有している。

融合細胞を用いた癌免疫療法のもつ利点と問題点を表1に示した。この治療法のもつ性格より、有効性が期待される癌症例は非治癒切除の外科手術症例、早期の再発症例などであろう。手術により得られた癌細胞を利用して樹状細胞との融合細胞を作製し、micrometastasisや早期の癌再発集に対する治療効果が期待される。進行癌症例に対しては、融合細胞による免疫に加えて、Tリンパ球の活性化作用を示すサイトカイン、biological response modifierの併用が必要と予想される。融合細胞により癌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可能性が考えられる。

### おわりに

樹状細胞と癌細胞の融合細胞を用いた癌免疫療法は、癌細胞に免疫学的癌拒絶を引き起こす抗原が存在し、細胞融合によりその癌細胞を抗原提示細胞化させるといった概念の上になり立っている。癌抗原は既知のものも含まれるが、未知の抗原の関与も考えられる。このような治療法で有効性が示された癌症例の治療前後での免疫動態をテトラマーなどを用いて検討することにより、癌拒絶に関与した抗原が同定できる可能性もある。この方法は症例固有の癌抗原profileに対応する特異的免疫療法、いわば症例ごとの“オーダーメイド”の癌免疫療法と考えられるが、その施行にあたっては患者本人の癌細

表 1 樹状細胞と癌細胞の融合細胞を用いた特異的癌免疫療法の手懸される利点と問題点

利点	問題点
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 末梢血由来の樹状細胞の大量培養, 採取が比較的容易</li> <li>・ 専用培養施設のみで施行可能</li> <li>・ 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</li> <li>・ HLA拘束性による制限がない</li> <li>・ 細胞傷害性Tリンパ球, ヘルパーTリンパ球の両方を活性化しうる</li> <li>・ 癌細胞が採取できればどの部位の癌, 悪性腫瘍にも施行可能</li> <li>・ 生検レベルの少量の癌細胞で施行可能</li> <li>・ 治療手技による患者への負担が少ない</li> <li>・ 明らかな免疫抑制状態でなければ初期から末期癌まで施行可能</li> <li>・ 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</li> <li>・ 既知の癌抗原のみならず未同定, 複数, 固有の変異を有している癌抗原にも免疫反応が期待される</li> <li>・ 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</li> <li>・ 新たな癌抗原発見の糸口となりうる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 末梢血由来樹状細胞の機能, 成熟度</li> <li>・ 癌細胞の単離, 培養, 保存</li> <li>・ 癌細胞の不均一性</li> <li>・ 癌細胞の培養中の抗原性の喪失</li> <li>・ 癌細胞によるDC不活化物質の産生</li> <li>・ 融合する癌細胞の確実な不活化</li> <li>・ 有効な細胞融合法の確立</li> <li>・ 投与経路, 方法, 回数</li> <li>・ 融合細胞のリンパ節への移動の確認</li> <li>・ 治療効果判定のためのパラメーター</li> <li>・ 細胞培養時の微生物汚染</li> <li>・ 癌細胞採取不能症例</li> <li>・ MHC class I分子の発現のない癌に対する治療</li> <li>・ 自己免疫疾患誘発の可能性</li> <li>・ GM-CSF, IL-4, TNF<math>\alpha</math>の人体への微量汚染</li> <li>・ サイトカインの供給</li> </ul>

細胞の採取が必須であり, 外科医療チームの協力と細胞培養に精通したスタッフの共同作業のうえに成り立つといえる。樹状細胞と癌細胞の融合細胞を用いた細胞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。

2) Brandt D, Brassier 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* 183: 2501-2508, 1996

3) Grabbe S, Beissert S, Schwarz T, et al: Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today* 16: 117-121, 1995

4) Shurin MR: Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother* 43: 158-164, 1996

5) 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* 176: 1693-1702, 1992

6) Romani N, Grner S, Brang D, et al: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: 83-93, 1994

7) Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, et al: Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen *in vivo*. *J Exp Med* 183: 317-322, 1996

8) Gong J, Chen D, Kashiwaba M, et al: Induction of antitumor activ-

1) Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, et al: A mutated  $\beta$ -catenin gene encodes a melanomaspecific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183: 1185-1192, 1996

- ity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 3 : 558-561, 1997
- 9) Guo Y, Wu M, Chen H, et al : Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science* 263 : 518-520, 1994
- 10) Lespagnard L, Mettens P, Verheyden A, et al : Dendritic cells with mastocytoma cells elicit therapeutic antitumor immunity. *Int J Cancer* 76 : 250-258, 1998
- 11) Wang W, Saffold S, Cao X, et al : Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. *J Immunol* 161 : 5516-5524, 1998
- 12) Celluzzi CM, Falo LD Jr : 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
- 13) 本間 定, 入江正紀, 戸田剛太郎, 他 : 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 : 257, 1999
- 14) Kugler A, Seseke F, Thelen P, et al : Autologous and allogenic hybrid cell vaccine in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Urol* 82 : 487-493, 1998