

厚生省科学研究助成金  
ヒトゲノム遺伝子治療研究事業  
平成10年度研究報告書

研究課題名

腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療－IV期腎細胞がん患者を  
対象とする GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接  
種に関する臨床研究 (H10-ゲノム-032)

主任研究者 東京大学医科学研究所・病態薬理学研究部  
助教授 谷 憲三郎

## 総括研究報告書

## 腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療—IV期腎細胞がん患者を対象とするGM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究

主任研究者 谷憲三郎 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・助教授

研究の要旨：本計画では IV 期腎細胞がん患者から患側腎臓を手術で全摘出し、がん組織より無菌的に細胞浮遊液を得、培養により腎細胞がん細胞を増殖させた後、レトロウイルスベクターによりヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下 GM-CSF と省略）遺伝子を導入する。大量の放射線照射をした遺伝子導入腎細胞がん細胞を、安全性を確認後、治療内容等の説明を十分に受け同意書に署名した予後不良の IV 期腎細胞がん患者 5 人の上腕もしくは大腿部皮内に、手術後約 8 週目より  $4 \times 10^7$  個接種、その後 2 週間毎に  $2 \times 10^7$  個を 5 回接種する。そして定期的に血液、免疫系を中心とした臨床検査ならびに CT やエコーなどの画像診断装置を用いた腫瘍縮小効果の検討を行ない、この治療法が安全に実施可能であることを確認するとともに、本治療法の臨床的有効性についても評価・検討する。さらに本遺伝子治療を受けた腎細胞がん患者体内に誘導される可能性のある細胞傷害性 T 細胞クローンの同定と増幅、それが認識する腎細胞がん細胞抗原の同定を行い、さらに新しい免疫療法開発にむけての基礎技術も確立する。

本臨床試験の実施が本研究グループにより可能であると判断された後、平成 10 年 10 月 5 日に第一例目において患側腎の摘出が行われ、遺伝子導入腎細胞がんの作製に成功したため、12 月 10 日から同患者への遺伝子導入腎細胞がんワクチン細胞の接種が開始された。その後の経過から本治療法の安全性が確認され、さらに患者体内に抗腫瘍免疫反応が誘導されていることが明らかになった。

また本臨床研究では将来的には腎細胞がん細胞上の腫瘍特異的抗原の同定をめざしており、それに必要な細胞障害性 T 細胞(CTL)誘導に関する予備的検討も行った。さらに、GM-CSF 遺伝子導入ワクチン療法に、自殺遺伝子療法を併用したり、リンフォタチン遺伝子を導入した樹状細胞療法を併用することでより効果的に抗腫瘍作用を増強できること、CD154 (CD40 リガンド) 遺伝子を用いることで新たな免疫遺伝子治療が可能であること、などを前臨床動物実験研究により見出し、今後の免疫遺伝子治療法開発への新たな方向性となるものと期待される。さらに尿路上皮がんにおける CA19-9 抗原の重要性を明らかにするとともに、SAGE 法により GM-CSF 遺伝子治療における重要分子を同定することで、新規遺伝子治療法開発へ向けての基礎的情報も着実に蓄積されてきている。

## A. 研究目的

現在、腎細胞がんにより本邦では年間約 2,800 人が死亡している。一般に病期が III 期までの患者であれば手術療法が有効であるが、他臓器への転移、浸潤を認める IV 期進行腎細胞がん患者では、手術療法、化学療法、放射線療法などのいずれの療法によってもその治療成績は極めて不良で、多くの患者は 2 年以内に死亡している。このような背景から IV 期腎細胞がん患者に対する新たな治療法の開発が強く望まれる。一方、最近のサイトカインならびにリンパ球を用いた臨床研究結果から、腎細胞がんに対する免疫療法の有効性が示唆されてきている。これまでのマウス自家腫瘍細胞系を用いた前臨床試験で、放射線照射・GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍細胞の抗腫瘍免疫誘導能ならびにその際の免疫担当細胞が明らかにされている。最近米国、オーストラリア、オランダでは、腎細胞がん、メラノーマ、前立腺癌ならびに肺癌患者に大量放射線照射後の GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞 (GVAX と以下省略) を実際に接種し、その臨床結果が報告されてきている。これによるいずれの臨床試験プロトコールにおいても、接種細胞数が多い患者体内で抗腫瘍免疫誘導効果が認められた。今回の臨床試験では以上のような知見を基礎に、患者の抗腫瘍免疫活性をより増強させ臨床効果に結びつける目的で、これまで米国を中心に検討されてきた GVAX 臨床試験の結果を参考に、放射線照射・GM-CSF 遺伝子導入自家腎細胞がん細胞の皮内接種投与量を最適と考えられる量に設定し、その投与実施の可能性ならびに安全性の評価を第一の目的としている。同時に実際に患者にもたらされた抗腫

瘍免疫誘導効果を評価検討すること、さらには画像診断技術を用い、腫瘍縮小効果についても併せ検討することも本臨床研究の目的である。また本臨床プロトコールに付随した基礎的検討として、固形腫瘍に対する新たな免疫遺伝子治療法の開発も目的としており、その為の新規遺伝子のクローン化ならびに遺伝子導入法の開発研究を行う。

## B. 研究方法

(1) 第 IV 期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討

病名告知の為された IV 期腎細胞がん患者に対し、本臨床研究プロトコールの内容を十分に説明し、その内容を理解できた患者の中で同意書に署名をした患者 5 人について、以下の治療ならびに治療後の臨床的検討を行う。

1) 東大医科研病院外科で患側腎の全摘出術を行い、摘出腎はすぐに無菌状態、4℃にて東大医科研病院附属臨床細胞工学室に運び、そのクリーンベンチ内で腎細胞がん部位の分離とその細片化を行った後、コラゲナーゼ含有腎細胞がん(RCC)培養液中に浮遊、ストマッカー器により完全な細胞浮遊液にする。

2) RCC 培養液にて細胞培養を開始、初代培養腎細胞がん細胞を継代し(第 1 継代細胞)、臨床細胞工学室内で Cell Genesys 社より予め空輸され凍結保存されている MFGs-GM-CSF レトロウイルスベクター液を用いて、GM-CSF 遺伝子導入を行う。その後さらに継続して細胞培養を行い GM-CSF 遺伝子が導入された細胞を増幅する。これらの細胞処理操作は GMP 基準に従った手順にて常時行い、室内環境も適

時モニターしながら行う。

3) 第1継代遺伝子導入培養細胞を回収し、15,000ラドの放射線照射を行い、プログラム凍結を行う。最終回収細胞の1%ならびに培養液全体の5%は安全性検討(複製可能レトロウイルス(RCR)、細菌、真菌、マイコプラズマなどの汚染がないことの確認)のため、米国MA社へ空輸するとともに、東大医科研病院臨床検査室もしくは病態薬理学研究部において遺伝子導入細胞の機能検査(GM-CSF産生能や患者HLAの保存性などの検定)を行う。

4) 安全性ならびにGM-CSF遺伝子発現が確認された場合には、手術より約8週後より(細胞培養速度に依存)凍結細胞を解凍し、患者皮内に $4 \times 10^7$ 個の細胞を接種し、その後は隔週で $2 \times 10^7$ 個を5回接種する。

5) 患者の臨床的観察は原則として東大医科研附属病院入院管理下で行い、定期的採血により血液学的、生化学的、免疫学的な一般的臨床検査項目に関する追跡検査を行う。また定期的に皮膚生検を細胞接種部位や遅延性皮膚反応(DTH)検査部位について行い、病理学的に詳細に検討する。さらにMRIやエコーを用い、転移病巣の経過観察を行う。

6) 5)の一般検査項目に加え、PCR法を用いた腎細胞がん患者末梢血Tリンパ球のオリゴクロナリテー解析、腎細胞がん患者腫瘍浸潤Tリンパ球を用いた細胞傷害性Tリンパ球解析などの特殊免疫学的解析、さらには腎細胞がん腫瘍抗原の同定なども可能であれば行う。

(2) 泌尿器がんの糖鎖発現と浸潤・転移能との関係についての検討

癌細胞の転移能と癌細胞が産生する糖タンパク質の質的・量的差異との間の関係は重要であると考えられる。特にCA19-9抗原は転移能を有する大腸癌細胞に強く発現している糖タンパク質の一つである。本研究では、尿路上皮がんにおける血清CA19-9抗原量と転移・予後との関連について検討することを目的に、164例の尿路上皮がん患者より、原発巣摘出前に得た血液標本を用いて検討を行う。すべての手術摘出標本は病理医により、TNM分類、grade分類を行う。CA19-9抗原の測定には、Centocor社製CA19-9キットを用いて、EIA法により測定する。統計学的な検定には、Mann-WhitneyのU検定とKruskal-Wallisの検定を用いる。生存率はKaplan-Meier法により解析し、生存率の有意差検定には一般化Wilcoxon検定を用いる。

(3) CD154(CD40リガンド)遺伝子を用いた新規免疫遺伝子治療法の開発

共刺激分子CD154遺伝子導入細胞の持つ特異的抗腫瘍免疫誘導により癌治療が可能であるかを検討する目的で、マウスの系において、皮下接種により腫瘍形成を惹起するDBA/2マウス由来肥満細胞腫P815に共刺激分子CD154を遺伝子導入し(CD154/P815)、作製したCD154/P815細胞による抗腫瘍治療効果を、CD80遺伝子導入によるものと比較検討する。

すなわちDBA/2マウス由来の肥満細胞腫であるP815細胞にマウスCD154遺伝子を導入しCD154/P815細胞およびマウスCD80遺伝子を導入しCD80/P815細胞を作製する。DBA/2マウスから腹

腔マクロファージを調整し、CD154/P815細胞と共培養し、IL-12産生能をELISAにて測定する。P815またはCD154/P815細胞をDBA/2またはヌードマウス皮下に接種し、腫瘍の生着の有無をもって抗腫瘍効果を検討する。また、腫瘍接種時にCD154抗体またはIL-10中和抗体を投与し、その抗腫瘍効果に与える影響を検討した。in vivo T細胞除去にはCD4、CD8抗体を、NK細胞除去にはアシアロGM1抗体を投与する。

(4) 複合的GM-CSF遺伝子導入ワクチン療法の開発

GM-CSF遺伝子導入ワクチン療法をさらに強力にする目的で、GM-CSF遺伝子導入細胞と自殺遺伝子導入細胞との併用や樹状細胞の応用を検討する。先ず大腸菌シトシンデアミナーゼ遺伝子(CD)を発現する組み換えアデノウイルスAdCDとGM-CSF遺伝子を発現するAdGMCSFとの併用効果をB16メラノーマ担癌マウスの動物治療実験モデルを用いて検討する。さらにリンフォタクチン遺伝子を導入した骨髄樹状細胞(DC)にペプチド抗原を組み合わせることで強い抗腫瘍免疫活性の誘導を試みた。

(5) mRNA連続解析システムによるGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析

GM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍免疫誘導に関しての作用分子の本体は依然不明である。この分子の同定が可能となれば新規遺伝子治療法の開発につながる。本研究室で作製したGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の完全な退縮が認められるマウス腫瘍モデル系を用い、最近開発されたSerial Analysis of Gene Expression(SAGE)法と呼ばれる強力なmRNA発現解析システムを適用し、造腫瘍抑制効果にかかわる新規遺伝子を単離することを目的とした研究を行う。すなわちBALB/cマウスならびに同系ヌードマウス(BALB/c nu/nu)背部皮下にGM-CSF遺伝子を導入WEHI 3B細胞を移植した場合の実験系を基礎にSAGE法による解析を行ない、腫瘍拒絶の系と腫瘍生着の系の発現遺伝子を比較検討する。得られたTag配列を抽出し、GenBankから得られたデータベースと照合することで、発現遺伝子を解析する。

(6) 腎細胞癌長期転移病巣担癌患者の末梢血単クローン増生Tリンパ球の抗腫瘍免疫能の検討

腎癌患者においては担癌状態で長期生存を来す患者群があり、末梢血中の腫瘍反応性T細胞の誘導との関連性が疑われる。そこでRT-PCR法を用いたTCR V $\beta$ レパートア解析法により検索し、単クローン増生を遂げたT細胞の腎癌特異的細胞障害活性を証明することを目的に長期転移病巣腎癌患者末梢血単核細胞からRNAを抽出後、T細胞受容体遺伝子再編成において生ずる $\beta$ 鎖CDR3再編成領域のサイズ長からT細胞のクローナル増生を検出する。さらに抗V $\beta$ 3モノクローナル抗体をマーカーにしてFACS VantageでsortingしT細胞クローン化を行う。クローン化したT細胞の表面抗原をCD3、CD4、CD8、CD45、TCR V $\beta$ 3についてFACS Caliburを用いて解析し、HLA class Iが合った同種異系腎細胞癌に対する反応性をIFN $\gamma$ 産生量ELISA法と各種抗体(Anti-CD3、CD4、CD8、MHC class I)を用いた阻害実験を組み合わせて解析し、その特異性を評価することで単クローン増生を遂げたT細胞の腎細胞癌細胞に対する細胞障害性を証明する。

## C. 研究結果

### (1) 第IV期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討

第1例目の患者は60歳男性で、右腎癌ならびにその多発性肺転移を認めたため第IV期腎癌として紹介を受けた。遺伝子治療の第1段階としての腎摘出術を行うにあたり、遺伝子治療の詳細な説明を文書にて行い、同意書への第1回目の署名を得た。手術適応としては血尿ならびに巨大腫瘍であるため局所への腫瘍進展による諸症状出現の予防があげられ、右腎摘出術を平成10年10月5日に実施した。同日より患者腎癌細胞の培養を開始し、10月16日にはMFGS-GM-CSF レトロウイルスベクターを用いてGM-CSF 遺伝子導入を行い、10月19日には $4.6 \times 10^8$ 個細胞を回収した。約1週間後より、米国MA社での遺伝子導入細胞の安全性の検討が開始され、細菌、真菌、マイコプラズマ、エンドトキシン、複製可能レトロウイルスの混入が無いことが確認された。また遺伝子導入腎癌細胞からのGM-CSF産生は $47 \text{ ng}/10^6/24$ 時間であり、遺伝子導入細胞1個あたり0.1コピーのGM-CSF遺伝子が組み込まれていることが判明した。

以上の結果を得た段階で、患者に第2回目の文書による説明ならびに同意書への署名を得、12月10日に $4 \times 10^7$ 細胞の皮内接種を行い、その後2週毎に $2 \times 10^7$ 細胞の皮内接種を行った。2月18日には第6回目の接種が終了し、その段階で本治療法の短期的な安全性には問題のないことが明らかになった。またDTH皮膚反応を観察する目的で患者培養放射線照射腎癌細胞ならびに正常腎細胞の接種を行った。腎癌細胞の接種部位には明らかな発赤と硬結を認め、病理学的にもCD4陽性のリンパ球を中心とした免疫担当細胞の著明な浸潤を認めた。また、正常腎細胞接種部位にも軽度の同様の反応を認めた。ただし、肺の転移腫瘍病巣においては最大病変部の増殖速度の鈍化を観察したものの、全体の腫瘍サイズの縮小化は認められなかった。さらに現在 $2 \times 10^7$ 細胞を2週間毎に3回追加接種中である。

患者末梢血単核球の投与前、治療開始後26日(2回投与後)、67日(6回投与後)におけるin vitroにおける免疫機能を評価した結果では、(a)抗CD3抗体によるT細胞増殖反応性はワクチン投与により亢進が認められた。(b)IL-2による増殖反応はワクチン2回投与により反応性が4.5倍に増強し、6回投与後ではさらに増加していた。(c)腎癌細胞との共培養による増殖反応を検討したところ、IL-2単独刺激と比較すると自家癌細胞添加により明らかに増殖が抑制されていたが、ワクチン接種によりやや増殖反応の増加傾向が認められた。(d)細胞障害活性の検討結果では自家癌および自家正常腎細胞に対する障害活性がワクチン2回投与後に明らかに増強し、抗CD3-Fab抗体で27%の阻害を認めることから、抗原特異的CTLが誘導されていることが示唆された。6回投与後では、増強効果および抗CD3抗体による阻害効果は認められなかった。自家正常腎細胞に対する細胞障害活性は、投与前および2回投与後に同程度に認められたが、抗CD3抗体による阻害は認められなかった。6回投与後で自家正常腎細胞に対する細胞障害活性は増強され、抗CD3抗体による阻害効果が認められた。

以上の結果から、ワクチン投与により一般抗原に対するT細胞機能は、明らかに亢進されていた。しかし、癌特異的なT細胞反応においては若干の動きはあるものの明らかではなくさらに検討が必要である。

### (2) 泌尿器系がんの糖鎖発現と浸潤・転移能との関係についての検討

分化度、深達度、リンパ節転移、遠隔転移、病期のいずれのパラメーターにおいても、各群間でCA19-9値に有意差を認めた。すなわちgrade3、pT4、N3、M1、stage IVで、他群に比べてCA19-9値が有意に高値を示した。また血清CA19-9のカットオフ値を37U/mlに設定した場合に、陽性群の予後が有意に不良であった。さらに血清CA19-9値を患者赤血球表面のLewis式血液型別に比較すると、a+b-、a-b+、a-b-の順に高値となり各群間に有意差を認めた。

### (3) CD154 (CD40 リガンド) 遺伝子を用いた新規免疫遺伝子治療法の開発

CD154/P815細胞は腹腔マクロファージを刺激しIL-12産生を誘導した。親株であるP815細胞はDBA/2およびヌードマウスに全例生着したのに対して、CD154/P815細胞は全例拒絶された。その拒絶パターンはCD80/P815細胞のそれとは明らかに異なり、この拒絶反応はCD154抗体、アジアロGM1抗体もしくはIL-12抗体により抑制された。さらにCD154/P815細胞を拒絶したマウスに親株を接種した場合、親株は全例拒絶された。その際、CD80/86抗体もしくはCD4/CD8抗体投与により、親株P815細胞は生着した。

### (4) 複合的GM-CSF遺伝子導入ワクチン療法の開発

AdGMCSFとAdCD5FCを併用した場合、AdlacZ/5FC、AdCD/5FC、AdGMCSFのそれぞれを単独で用いた場合よりも、はるかに強い治療効果が得られた。併用療法を行うと、腫瘍細胞のMHC-1(H-2Db)とB7-1分子の発現が高まり、多くの樹状細胞(DC)とCD8+T細胞が、腫瘍内に浸潤した。また特異的なCTLも誘導された。GMCSFとCD自殺遺伝子の併用は、メラノーマの増殖を相乗的に抑制し、しかも抗腫瘍免疫反応を効果的に誘導することから、単独では不十分な効果しか得られないような癌に対しても、期待できる遺伝子治療法と考えられた。またリンフォタクチン遺伝子を導入した骨髄樹状細胞(DC)にペプチド抗原を組み合わせることで強い抗腫瘍免疫活性を誘導できた。

### (5) mRNA連続解析システムによるGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析

SAGE法に於けるdi-Tag増幅の効率アップとバックグラウンドの減少を詳細に検討し、1k base以上のdi-Tag concatemerのCloning頻度を80%まで高めることに成功した。現在、BALB/cにWEHI 3B/GM-CSF細胞を接種した腫瘍内発現遺伝子の解析を進めており、11baseから成るTag配列約5000個から544種類の既知遺伝子と1812種類の未知遺伝子の発現を認めた。その中で免疫反応に関与すると思われるマーカー遺伝子の発現は、頻度の高い順にMHC class I haplotype d, IL-11, macrophage migration inhibitory factor(MIF), besigin (CD147), Ia-associated invariant chain などであった。

### (6) 腎細胞癌長期転移病巣担癌患者の末梢血単クローン増生Tリンパ球の抗腫瘍免疫能の検討

転移病巣が発見されてから1年以内に死亡した患者と比較して、2年以上生存した患者群ではクローン増殖を示すT細胞が増加する傾向にあった。特に7年間もしくは5年間の長期生存を示した患者においては、V $\beta$ 3 T細胞受容体を持ったT細胞が24種類のV $\beta$ レパートアの中で最も大きな偏りを示し、単クローン性増殖を認めた。腎細胞癌切除時の転移病巣を持たない患者では、多クローン性増殖を示す場合やV $\beta$ 3 T細胞が24種類のV $\beta$ レパートアの中で最も大きな偏りを示す患者も認められた。そこで、V $\beta$ 3 T cellの単クローン性増殖を示した患者の末梢血単核細胞からV $\beta$ 3 T cellのクローニングを行い、V $\beta$ 3 T細胞の表面マーカーならびにその機能解析を行っている。

#### D. 結論と考察

腎癌に対するGM-CSF遺伝子を用いた免疫遺伝子治療実施第1例目におけるこれまでの臨床ならびに免疫学的検討結果より、本遺伝子治療法は安全に患者に対して実施できることが明らかになった。また患者体内に同定可能な腫瘍特異的免疫反応を誘導できることが明らかになった。DTH皮膚反応部位に認められた正常腎細胞への反応は、培養過程において存在するウシ胎児血清やトリプシンなどのタンパク分子が細胞表面に堅固に付着し、ある程度の共通抗原として認識されている可能性が高いものと考えられた。

我々はすでに腎がんにおける分化度依存的 sialyl Lewis Xの発現増加につき報告した。尿路上皮がんについては、血清CA19-9値の上昇をみた症例の報告が散見されるほか、少数例を対象とした検討ではあるが、血清CA19-9値と臨床経過との関連を示唆する報告がみられる。尿路上皮がん患者のCA19-9発現に関して、血清濃度とがん組織内濃度、組織染色強度との間に相関を認めたとする報告があり、本研究結果と考え合わせると、CA19-9抗原の高発現と転移能との関係につき興味もたれた。CA19-9抗原の合成には、Lewis式血液型遺伝子によりコードされるLewis酵素の存在が必須と考えられており、事実、赤血球Lewis式血液型別にみて血清CA19-9値に有意差が認められた。これらの結果から今後の尿路系腫瘍を標的化する遺伝子治療開発への方向性が示唆された。

腫瘍に対する免疫遺伝子治療法の開発を目的に、共刺激分子CD154の遺伝子を腫瘍細胞に導入し、それによって誘導される抗腫瘍効果について基礎的検討を行った。その結果、CD154遺伝子導入腫瘍細胞は、IL-12産生を誘導し抗腫瘍効果を増強した。この一次効果にはT細胞の関与は少なく、NK細胞/IL-12依存性であった。しかし、その後のCD154遺伝子導入による特異的抗腫瘍効果の獲得にはT細胞が関与しておりCD80/CD86依存性であった。以上の様に共刺激分子CD154遺伝子を導入することにより、腫瘍細胞に対して特異的抗腫瘍免疫を誘導できる可能性が示唆され、新規免疫遺伝子治療法の開発が可能と考えられた。自殺遺伝子導入とサイトカイン遺伝子導入療法の併用やリンフォタクチン遺伝子を導入した骨髄樹状細胞(DC)にペプチド抗原を組み合わせることなどの方法は、現在進めているGM-CSF遺伝子導入ワクチン療法の効果をさらに強力にする

ために有力な戦略になると思われる。これまでの結果をもとに、今後は主に変異型アデノウイルスを用いて、標的腫瘍細胞に対して効果的な遺伝子導入を行い、GM-CSFワクチン療法の強化を目指す。

SAGE法による解析では、腫瘍内の5000個のTag配列からT細胞、B細胞、抗原提示細胞及び顆粒球の発現遺伝子や、抗原・転移・アポトーシス関連の遺伝子をとらえることが出来た。今後、比較検討の系についてそれぞれ解析Tagを10万個まで伸ばす予定であり、腫瘍拒絶にかかわるとされる遺伝子を同定後、それが既知の遺伝子であれば組織免疫染色とNorthern Blottingから更に証明が可能となり、未知の遺伝子であればTagの11 baseにCATGを加えた15 baseからcDNAをスクリーニングすることで新たな腫瘍拒絶エフェクター分子をとらえることが可能となると考えられた。

腎癌患者よりのT細胞クローン化の検討では、T細胞受容体 $\beta$ 鎖CDR3領域のアミノ酸配列から共通抗原同定の可能性も検討する。また最近、再発巣が発見後2年間転移病巣を保持した後、自然縮小が認められた大変珍しい症例も経験した。同症例で原発切除時の腎細胞癌細胞を樹立していることから、同種同系の腎癌特異的細胞障害活性の証明ならびにそれに関与するT細胞クローンの単離が可能であると考えられた。

#### F. 発表

1. Sumimoto, H., Tani, K., Asano, S., et al. Superiority of interleukin-12-transduced murine lung cancer cells GM-CSF or B7-1 (CD80) transfectants for therapeutics antitumor immunity in syngeneic immunocompetent mice. *Cancer Gene Therapy* 5: 29-37, 1998.
2. Matsuoka, M., Tani, K. and Asano, S., Interferon- $\alpha$ -induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19 Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages. *Oncogene* 16: 2075-2086, 1998.
3. Nakazaki, Y., Tani, K., Hamada, H., Asano, S., et al. Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine leukemia/lymphoma cells and their cooperative enhancement of antitumor immunity. *Gene Therapy* 5(10): 1355-1362, 1998.
4. Koseki, S., Tani, K., Asano, S., et al. The structure of ribozymes expressed from an RNA polymerase III promoter determines functional activity in vivo by influencing their stability. *Nucl Acids Sympo. Series.(Oxford Univ. Press)*, 39: 145-146, 1998
5. Takahashi, S., Tani, K., Asano, S., et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) combined conditioning regimen for allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in standard-risk myeloid leukemia. *Am J Hematol* 57: 303-308, 1998.
6. Ooi, J., Tani, K., Asano, S., et al. Immune mediated optic neuritis after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 91: 2619, 1998.
7. Nagamura, F., Tani, K., Asano, S., et al. Establishment of noeval cell lines derived from two patients with chronic myelogenous leukemia in blast crisis; IMS-BC1 and IMS-BC2 which exhibit markedly different sensitivity to apoptosis. *Int J Hematol* 67: 283-294, 1998

8. Kuwabara, T., Tani, K., Asano, S., et al. Maxizyme, an allosterically controllable novel tRNAVal-ribozyme, with extremely high and specific activity in cells with a Philadelphia chromosome induces apoptosis only in leukemic cells without affecting normal cells. *Mol Cell* 3: 617-627, 1998.
9. Nagayama, H., Tani, K., Asano, S., et al. IL-2/LAK therapy for refractory acute monoblastic leukemia relapsing after unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 23:183-185, 1998.
10. Shimane, M., Tani, K., Asano, S., et al. Significant expression of G-CSF induced gene-1(GIG-1) protein in myeloid cells and NK cells. *J Leuk Biol.* 65:109-116, 1998.
11. Hibino, H., Tani, K., Asano, S., et al. Common Marmoset as a Target Preclinical Primate for Cytokine and Gene Therapy Studies. *Blood* 1999 (in press)
12. Okada, H., Tani, K., Asano, S., et al. The AML1(-/-) embryos do not express a set of hematopoiesis-related gene transcripts including that of PU.1. *Oncogene* 1998 (in press)
13. Ohata, J., Tani, K., Asano, S., et al. CD4/CD8 double-positive adult T cell leukemia with preceding cytomegaloviral gastroenterocolitis. *Int J Hematol.* 1999 (in press)
14. Tsunita, T., Tani, K., Asano, S., et al. Myeloperoxidase gene expression and regulation by myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. *Leukemia Lymphonia* 32: 257-267, 1999.
15. Koseki, S., Tani, K., Asano, S., et al. Factors governing the activity in vivo of ribosomes transcribed by RNA polymerase III. *J Virol* 1868-1877, 1999.
16. Yamashita T, Asano, S., et al.: Differentiation inducers modulate cytokine signaling pathways in a murine erythroleukemia cell line. *Cancer Res* 58: 556-561, 1998
17. Taniguchi T, Asano, S., et al. Cyclin D1 overexpression detected by a simple competitive reverse transcription-polymerase chain reaction assay for lymphoid malignancies. *Jpn J Cancer Res* 89: 159-166, 1998
18. Nishihira M, Asano, S., et al.: A combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances the growth of human progenitor B cells supported by murine stromal cell line MS-5. *Eur J Immunol* 28: 855-864, 1998
19. Tsuruta, T., Sato, N., et al. Effects of myeloid cell growth factors on alkaline phosphatase, myeloperoxidase, defensin and granulocyte colony-stimulating factor receptor mRNA expression in haemopoietic cells of normal individuals and myeloid disorders. *Brit J Haematol* 92; 9-22, 1996
20. Ohshima, Y., Tani, K., Sato, N., Asano, S., et al.: Fetal GVHD demonstrating an involvement of respiratory muscle following donor leukocyte transfusion (DLT). *Bone marrow Transplant* 19: 734-740, 1997.
21. Kawamura, T., Okumura, K., et al. Critical role of NK1+ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J. Immunol.* 160: 16-19, 1998.
22. Nakajima, A., Okumura, K., et al. Antitumor effect of CD40 ligand: elicitation of local and systemic antitumor responses by IL-12 and B7. *J. Immunol.* 161: 1901-1907, 1998.
23. Tsukada, N., Okumura, K., et al. Graft-versus-leukemia (GVL) effect and graft-versus-host disease (GVHD) can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* in press
24. Mogi, S., Fujime, M., Okumura, K., et al.: Efficient generation of autologous peripheral blood-derived cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic human tumors using recombinant CD80-adenovirus together with interleukin 12 and interleukin 2. *Clinical. Cancer Research*, in press.
25. Honda S, Fujime, M., et al.: Immunohistochemical study of tumor-infiltrating lymphocytes before and after intravesical Bacillus Calmet-Guerin treatment for superficial bladder cancer. *Int J Urol* 1997;4:68-73
26. Shibagaki, N., Hamada, H., et al. Functional analysis of CD82 in the early phase of T cell activation: roles in cell adhesion and signal transduction. *Eur. J. Immunol.* 28(4): 1125-1133, 1998.
27. Shiratori, Y., Hamada, H., et al. Gene therapy for hepatic micrometastasis of murine colon carcinoma. *J. Hepatology* 28(5): 886-895, 1998.
28. Cao, X., Ju, Hamada, H., et al. Adenovirus-mediated GM-CSF gene and cytosine deaminase gene transfer followed by 5-fluorocytosine administration elicit more potent antitumor response in tumor-bearing mice. *Gene Therapy* 5: 1130-1136, 1998.
29. Cao, X., Hamada, H., et al. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce antitumor immunity. *J. Immunol.* 161(11): 6238-6244, 1998.
30. Matsumoto, G., Okumura, K., Hamada, H., et al. Adjuvant immunotherapy using genetically engineered interleukin 12 secreting fibroblasts prevents recurrence after surgical resection of established tumors in a murine adenocarcinoma model. *Surgery* 125(3): 257-264, 1999.
31. Zhang, W., Hamada, H., et al. Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotactin. *Human Gene Therapy* 10 (7): in press, 1999.
32. Yasuda, H., Hamada, H., et al. Local expression of immunoregulatory IL12p40 gene prolonged syngeneic islet graft survival in diabetic NOD mice. *J. Clin. Invest.* 102(10): 1807-1814, 1998.
33. Tanaka, H., Hamada, H., et al. Successful adoptive immunotherapy of murine nonimmunogenic tumor with specific effector cells generated from gene-modified tumor-primed lymph node cells. *J. Immunol.* in press, 1999. (Accepted, 981215)
34. Shinoura, N., Hamada, H., et al. Apoptosis by retrovirus- and adenovirus-mediated gene transfer of Fas ligand to glioma cells: implication for gene therapy. *Human Gene Therapy* 9(14): 1983-1993, 1998.
35. Yoshida, Y., Hamada, H., et al. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Human Gene Therapy* 9(17): 2503-2515, 1998.
36. Shinoura, N., Hamada, H., et al. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for pro-apoptotic genes. *Human Gene Therapy* 9(18): 2683-2689, 1998.
37. Inaba, M., Hamada, H., et al. In vitro circumvention of 5-fluorouracil resistance in human stomach cancer cells by adenovirus-mediated transduction of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene. *Jp. J. Cancer Res.* 90 (3): in press, 1999.

# 分 担 研 究 報 告 書

分担研究者：浅野 茂隆（東京大学医科学研究所・教授）  
奥村 康（順天堂大学医学部・教授）  
藤目 真（順天堂大学医学部・教授）  
濱田 洋文（癌研究会癌化学療法センター・部長）  
佐藤 典治（東京大学医科学研究所・助教授）



## 分担研究報告書

## 腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療—IV期腎細胞がん患者を対象とするGM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究

主任研究者 谷憲三郎 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・助教授

分担研究者 浅野 茂隆 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・教授

佐藤 典治 東京大学医科学研究所附属病院・検査部・助教授

研究要旨：「IV期腎細胞がん患者を対象とするGM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究」の本邦での実施に際して、同意が得られた第IV期腎細胞がん患者において、東京大学医科学研究所附属病院で患側腎摘出を行い、同臨床細胞工学室内において腎細胞がん細胞を培養後、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入をし、作製された遺伝子導入細胞の性状解析ならびに安全性を確認後、再度同意を得た後患者皮内へ接種した。接種後、患者における副作用出現の有無を諸検査によりモニターするとともに、抗腫瘍免疫誘導の有無、臨床的な抗腫瘍効果の有無をそれぞれ免疫学的もしくは画像診断にて評価した。これら臨床的研究に加え基礎研究では、GM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍免疫誘導における機能分子の同定をSAGE法の導入により行っている。さらに長期に亘り腎細胞がんを有している患者の末梢血中の、T細胞クローン解析を行いそのクローン性増殖を確認すると共に、同T細胞クローンを単離した。

## A.研究目的

現在、他臓器への転移、浸潤を認めるIV期進行腎細胞がん患者では、手術療法、化学療法、放射線療法などのいずれの療法によってもその治療成績は極めて不良で、多くの患者は2年以内に死亡している。本臨床研究では、このような患者にたいする新しい治療法としての、放射線照射・GM-CSF遺伝子導入自家腎細胞がん細胞の皮内接種の可能性を検討する。この目的の為に、遺伝子導入腎細胞がん細胞の投与量を新たに設定し、その投与実施の可能性ならびに安全性の評価を第一に行う。本年度は、第1症例用のGM-CSF遺伝子導入腎細胞がん細胞を東京大学医科学研究所附属病院内で安全かつ効率的に作製し、その性状の解析ならびに安全性を確認後患者への投与を開始し、その後の患者の状態を臨床的、免疫学的に詳細にモニターする。また本臨床プロトコルに付随した基礎的検討として、固形腫瘍に対する新たな免疫遺伝子治療法の開発も目的とし、その為の新規遺伝子のクローン化を行う。

## B.研究方法

(1) 第IV期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討病名告知の為されたIV期腎細胞がん患者に対し、本臨床研究プロトコルの内容を十分に説明し、その内容を理解できた患者の中で同意書に署名をした患者5人について、以下の治療ならびに治療後の臨床的検討を行う。

1) 東大医科研究病院外科で患側腎の全摘出術を行い、摘出腎はすぐに無菌状態、4℃にて東大医科研究病院附属臨床細胞工学室に運び、そのクリーンベンチ内で腎細胞がん部位の分離とその細片化を行った後、コラゲナーゼ含有腎細胞がん(RCC)培養液中に浮遊、ストマッカーア器により完全な細胞浮遊液にする。

2) RCC培養液にて細胞培養を開始、初代培養腎細胞がん細胞を継代し(第1継代細胞)、臨床細胞工学室内でCell Genesys社より予め空輸され凍結保存されているMFGs-GM-CSFレトロウイルスベクター液を用いて、GM-CSF遺伝子導入を行う。その後さらに継続して細胞培養を行いGM-CSF遺伝子が導入された細胞を増幅する。これらの細胞処理操作はGMP基準に従った手順にて常時行い、室内環境も適

時モニターしながら行う。

3) 第1継代遺伝子導入培養細胞を回収し、15,000ラドの放射線照射を行い、細胞ペレットの状態プログラム凍結を行う。最終回収細胞の1%ならびに培養液全体の5%は安全性検討(複製可能レトロウイルス(RCR)、細菌、真菌、マイコプラズマなどの汚染がないことの確認)のため、米国MA社へ空輸するとともに、東大医科研究病院臨床検査室もしくは病態薬理学研究部において遺伝子導入細胞の機能検査(GM-CSF産生能や患者HLAの保存性などの検定)を行う。

4) 安全性ならびにGM-CSF遺伝子発現が確認された場合には、手術より約8週後より(細胞培養速度に依存)凍結細胞を解凍し、患者皮内・皮下に $4 \times 10^7$ 個の細胞を接種し、その後は隔週で $2 \times 10^7$ 個を5回接種する。

5) 患者の臨床的観察は原則として東大医科研究附属病院入院管理下で行い、定期的採血により血液学的、生化学的、免疫学的な一般的臨床検査項目に関する追跡検査を行う。また定期的に皮膚生検を細胞接種部位や遅延性皮膚反応(DTH)検査部位について行い、病理学的に詳細に検討する。さらにMRIやエコーを用い、転移病巣の経過観察を行う。

6) 5)の一般検査項目に加え、PCR法を用いた腎細胞がん患者末梢血Tリンパ球のオリゴクロナリティー解析、腎細胞がん患者腫瘍浸潤Tリンパ球を用いた細胞傷害性

Tリンパ球解析などの特殊免疫学的解析、さらには腎細胞がん腫瘍抗原の同定なども可能であれば行う。(2) mRNA連続解析システムによるGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析  
GM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍免疫誘導に関しての作用分子の本体は依然不明である。この分子の同定が可能となれば新規遺伝子治療法の開発につながる。本研究室で作製したGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の完全な退縮が認められるマウス腫瘍モデル系を用い、最近開発されたSerial Analysis of Gene Expression (SAGE)法と呼ばれる強力なmRNA発現解析システムを適用し、造腫瘍抑制効果にかかわる新規遺伝子を単離することを目的とした研究を行う。すなわちBALB/cマウスならびに同系ヌードマウス



(BALB/c nu/nu) 背部皮下に GM-CSF 遺伝子を導入 WEHI 3B 細胞を移植した場合の実験系を基礎に SAGE 法による解析を行ない、腫瘍拒絶の系と腫瘍生着の系の発現遺伝子を比較検討する。得られた Tag 配列を抽出し、GenBank から得られたデータベースと照合することで、発現遺伝子を解析する。

### (3) 腎細胞がん長期転移病巣担癌患者の末梢血単クローン増生 T リンパ球の抗腫瘍免疫能の検討

腎癌患者においては担癌状態で長期生存を来す患者群があり、末梢血中の腫瘍反応性 T 細胞の誘導との関連性が疑われる。そこで RT-PCR 法を用いた TCR V $\beta$  レパートア解析法により検索し、単クローン増生を遂げた T 細胞の腎癌特異的細胞障害活性を証明することを目的に長期転移病巣腎癌患者末梢血単核細胞から RNA を抽出後、T 細胞受容体遺伝子再編成において生ずる  $\beta$  鎖 CDR3 再編成領域のサイズ長から T 細胞のクローナル増生を検出する。さらに抗 V $\beta$ 3 モノクローナル抗体をマーカーにして FACS Vantage で sorting し T 細胞クローン化を行う。クローン化した T 細胞の表面抗原を CD3, CD4, CD8, CD45, TCR V $\beta$ 3 について FACS Calibur を用いて解析し、HLA class I が合った同種異系腎細胞がんに対する反応性を IFN $\gamma$  産生量 ELISA 法と各種抗体 (Anti-CD3, CD4, CD8, MHC class I) を用いた阻害実験を組み合わせて解析し、その特異性を評価することで単クローン増生を遂げた T 細胞の腎細胞がん細胞に対する細胞障害性を証明する。

## C. 研究結果

### (1) 第 IV 期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討

第 1 例目の患者は 60 歳男性で、右腎癌ならびにその多発性肺転移を認めたため第 IV 期腎癌として紹介を受けた。遺伝子治療の第 1 段階としての腎摘出術を行うにあたり、遺伝子治療の詳細な説明を文書にて行い、同意書への第 1 回目の署名を得た。手術適応としては尿管ならびに巨大腫瘍であるため局所への腫瘍進展による諸症状出現の予防があげられ、右腎摘出術を平成 10 年 10 月 5 日に実施した。同日より患者腎癌細胞の培養を開始し、10 月 16 日には MFGS-GM-CSF レトロウイルスベクターを用いて GM-CSF 遺伝子導入を行い、10 月 19 日には  $4.6 \times 10^8$  個細胞を回収した。約 1 週間後より、米国 MA 社での遺伝子導入細胞の安全性の検討が開始され、細菌、真菌、マイコプラズマ、エンドトキシン、複製可能レトロウイルスの混入が無いことが確認された。また遺伝子導入腎癌細胞からの GM-CSF 産生は  $47 \text{ ng}/10^6/24$  時間であり、遺伝子導入細胞 1 個あたり 0.1 コピーの GM-CSF 遺伝子が組み込まれていることが判明した。以上の結果を得た段階で、患者に第 2 回目の文書による説明ならびに同意書への署名を得、12 月 10 日に  $4 \times 10^7$  細胞の皮内接種を行い、その後 2 週毎に  $2 \times 10^7$  細胞の皮内接種を行った。2 月 18 日には第 6 回目の接種が終了し、その段階で本治療法の短期的な安全性には問題のないことが明らかになった。また DTH 皮膚反応を観察する目的で患者培養放射線照射腎癌細胞ならびに正常腎細胞の接種を行った。腎癌細胞の接種部位には明らかな発赤と硬結を認め、病理学的にも CD4 陽性のリンパ球を中心とした免疫担当細胞の著明な浸潤を認めた。また、正常細胞接種部位にも軽度の同様の反応を認

めた。ただし、肺の転移腫瘍病巣においては最大病変部の増殖速度の鈍化を観察したものの、全体の腫瘍サイズの縮小化は認められなかった。さらに現在  $2 \times 10^7$  細胞を 2 週間毎に 3 回追加接種中である。

患者末梢血単核球の投与前、治療開始後 26 日 (2 回投与後)、67 日 (6 回投与後) における *in vitro* における免疫機能を評価した結果では、(a) 抗 CD3 抗体による T 細胞増殖反応性はワクチン投与により亢進が認められた。(b) IL-2 による増殖反応はワクチン 2 回投与により反応性が 4-5 倍に増強し、6 回投与後ではさらに増加していた。(c) 腎癌細胞との共培養による増殖反応を検討したところ、IL-2 単独刺激と比較すると自家癌細胞添加により明らかに増殖が抑制されていたが、ワクチン接種によりやや増殖反応の増加傾向が認められた。(d) 細胞障害活性の検討結果では自家癌および自家正常腎細胞に対する障害活性がワクチン 2 回投与後に明らかに増強し、抗 CD3-Fab 抗体で 27% の阻害を認めることから、抗原特異的 CTL が誘導されていることが示唆された。6 回投与後では、増強効果および抗 CD3 抗体による阻害効果は認められなかった。自家正常腎細胞に対する細胞障害活性は、投与前および 2 回投与後に同程度に認められたが、抗 CD3 抗体による阻害は認められなかった。6 回投与後で自家正常腎細胞に対する細胞障害活性は増強され、抗 CD3 抗体による阻害効果が認められた。以上の結果から、ワクチン投与により一般抗原に対する T 細胞機能は、明らかに亢進された。しかし、癌特異的な T 反応においては若干の動きはあるものの明らかではなくさらに検討が必要である。

### (2) mRNA 連続解析システムによる GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析

SAGE 法に於ける di-Tag 増幅の効率アップとバックグラウンドの減少を詳細に検討し、1 k base 以上の di-Tag concatemer の Cloning 頻度を 80% まで高めることに成功した。現在、BALB/c に WEHI 3B/GM-CSF 細胞を接種した腫瘍内発現遺伝子の解析を進めており、11 base から成る Tag 配列約 5000 個から 544 種類の既知遺伝子と 1812 種類の未知遺伝子の発現を認めた。その中で免疫反応に関与すると思われるマーカー遺伝子の発現は、頻度の高い順に MHC class I haplotype d, IL-11, macrophage migration inhibitory factor (MIF), besigin (CD147), Ia-associated invariant chain などの発現頻度が高かった。

### (3) 腎細胞癌長期転移病巣担癌患者の末梢血単クローン増生 T リンパ球の抗腫瘍免疫能の検討

転移病巣が発見されてから 1 年以内に死亡した患者と比較して、2 年以上生存した患者群ではクローン増生を示す T 細胞が増加する傾向にあった。特に 7 年間もしくは 5 年間の長期生存を示した患者においては、V $\beta$ 3 T 細胞受容体を持った T 細胞が 24 種類の V $\beta$  レパートアの中で最も大きな偏りを示し、単クローン性増殖を認めた。腎細胞癌切除時の転移病巣を持たない患者では、多クローン性増殖を示す場合や V $\beta$ 3 T 細胞が 24 種類の V $\beta$  レパートアの中で最も大きな偏りを示す患者も認められた。そこで、V $\beta$ 3 T cell の単クローン性増殖を示した患者の末梢血単核細胞から V $\beta$ 3 T cell のクローニングを行い、V $\beta$ 3 T 細胞の表面マーカーならびにその機能解析を行っている。

#### D. 結論と考察

腎癌に対する GM-CSF 遺伝子を用いた免疫遺伝子治療実施第 1 例目におけるこれまでの臨床ならびに免疫学的検討結果より、本遺伝子治療法は安全に患者に対して実施できることが明らかになった。また患者体内に同定可能な腫瘍特異的免疫反応を誘導できることが明らかになった。DTH 皮膚反応部位に認められた正常腎細胞への反応は、培養過程において存在するウシ胎児血清やトリプシンなどのタンパク分子が細胞表面に堅固に付着し、ある程度の共通抗原として認識されている可能性が高いものと考えられた。SAGE 法による解析では、腫瘍内の 5000 個の Tag 配列から T 細胞、B 細胞、抗原提示細胞及び顆粒球の発現遺伝子や、抗原・転移・アポトーシス関連の遺伝子をとらえることが出来た。今後、比較検討の系についてそれぞれ解析 Tag を 10 万個まで伸ばす予定であり、腫瘍拒絶にかかわるとされる遺伝子を同定後、それが既知の遺伝子であれば組織免疫染色と Northern Blotting から更に証明が可能となり、未知の遺伝子であれば Tag の 11 base に CATG を加えた 15 base から cDNA をスクリーニングすることで新たな腫瘍拒絶エフェクター分子をとらえることが可能となると考えられた。

腎癌患者よりの T 細胞クローン化の検討では、T 細胞受容体  $\beta$  鎖 CDR3 領域のアミノ酸配列から共通抗原同定の可能性も検討する。また最近、再発巣が発見後 2 年間転移病巣を保持した後、自然縮小が認められた大変珍しい症例も経験した。同症例で原発切除時の腎細胞癌細胞を樹立していることから、同種同系の腎癌特異的細胞障害活性の証明ならびにそれに関与する T 細胞クローンの単離が可能であると考えられた。

#### F. 発表

1. Sumimoto, H., Tani, K., Asano, S., et al. Superiority of interleukin-12-transduced murine lung cancer cells GM-CSF or B7-1 (CD80) transfectants for therapeutics antitumor immunity in syngeneic immunocompetent mice. *Cancer Gene Therapy* 5: 29-37, 1998.
2. Matsuoka, M., Tani, K. and Asano, S., Interferon- $\alpha$ -induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19 Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages. *Oncogene* 16: 2075-2086, 1998.
3. Nakazaki, Y., Tani, K., Hamada, H., Asano, S., et al. Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine leukemia/lymphoma cells and their cooperative enhancement of antitumor immunity. *Gene Therapy* 5(10): 1355-1362, 1998.
4. Koseki, S., Tani, K., Asano, S., et al. The structure of ribozymes expressed from an RNA polymerase III promoter determines functional activity in vivo by influencing their stability. *Nucl Acids Sympo. Series. (Oxford Univ. Press)*, 39: 145-146, 1998
5. Takahashi, S., Tani, K., Asano, S., et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) combined conditioning regimen for allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in standard-risk myeloid leukemia. *Am J Hematol* 57: 303-308, 1998.
6. Ooi, J., Tani, K., Asano, S., et al. Immune mediated optic neuritis after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 91: 2619, 1998.
7. Nagamura, F., Tani, K., Asano, S., et al. Establishment of novel cell lines derived from two patients with chronic myelogenous leukemia in blast crisis; IMS-BC1 and IMS-BC2 which exhibit markedly different sensitivity to apoptosis. *Int J Hematol* 67: 283-294, 1998
8. Kuwabara, T., Tani, K., Asano, S., et al. Maxizyme, an allosterically controllable novel tRNAVal-ribozyme, with extremely high and specific activity in cells with a Philadelphia chromosome induces apoptosis only in leukemic cells without affecting normal cells. *Mol Cell* 3: 617-627, 1998.
9. Nagayama, H., Tani, K., Asano, S., et al. IL-2/LAK therapy for refractory acute monoblastic leukemia relapsing after unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 23:183-185, 1998.
10. Shimane, M., Tani, K., Asano, S., et al. Significant expression of G-CSF induced gene-1(GIG-1) protein in myeloid cells and NK cells. *J Leuk Biol* 65:109-116, 1998.
11. Hibino, H., Tani, K., Asano, S., et al. Common Marmoset as a Target Preclinical Primate for Cytokine and Gene Therapy Studies. *Blood* 1999 (in press)
12. Okada, H., Tani, K., Asano, S., et al. The AML1(-/-) embryos do not express a set of hematopoiesis-related gene transcripts including that of PU.1. *Oncogene* 1998 (in press)
13. Ohata, J., Tani, K., Asano, S., et al. CD4/CD8 double-positive adult T cell leukemia with preceding cytomegaloviral gastroenterocolitis. *Int J Hematol*. 1999 (in press)
14. Tsuruta, T., Tani, K., Asano, S., et al. Myeloperoxidase gene expression and regulation by myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. *Leukemia Lymphoma* 32: 257-267, 1999.
15. Koseki, S., Tani, K., Asano, S., et al. Factors governing the activity in vivo of ribosomes transcribed by RNA polymerase III. *J Virol* 1868-1877, 1999.
16. Yamashita T, Asano, S., et al.: Differentiation inducers modulate cytokine signaling pathways in a murine erythroleukemia cell line. *Cancer Res* 58: 556-561, 1998
17. Taniguchi T, Asano, S., et al. Cyclin D1 overexpression detected by a simple competitive reverse transcription-polymerase chain reaction assay for lymphoid malignancies. *Jpn J Cancer Res* 89: 159-166, 1998
18. Nishihira M, Asano, S., et al.: A combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances the growth of human progenitor B cells supported by murine stromal cell line MS-5. *Eur J Immunol* 28: 855-864, 1998
19. Tsuruta, T., Sato, N., et al. Effects of myeloid cell growth factors on alkaline phosphatase, myeloperoxidase, defensin and granulocyte colony-stimulating factor receptor mRNA expression in haemopoietic cells of normal individuals and myeloid disorders. *Brit J Haematol* 92; 9-22, 1996
20. Ohshima, Y., Tani, K., Sato, N., Asano, S., et al.: Fetal GVHD demonstrating an involvement of respiratory muscle following donor leukocyte transfusion (DLT). *Bone marrow Transplant* 19: 734-740, 1997.

研究者 奥村 康 順天堂大学医学部免疫学教授

研究要旨：共刺激分子 CD154 遺伝子を導入することにより、IL-12 産生を促し、特異的抗腫瘍免疫が誘導できることを明らかにした。

#### A. 研究目的

腫瘍に対する免疫遺伝子療法の開発を目的に、共刺激分子 CD154 の遺伝子を腫瘍細胞に導入し、それによって誘導される抗腫瘍効果について基礎的検討を行う。CD154/CD40 相互作用は B 細胞増殖や免疫グロブリンのクラススイッチを促すだけでなく、マクロファージなどからの IL-12 産生を誘導することが、近年明らかになってきた。本年度は、マウスの系において、皮下接種により腫瘍形成を惹起する DBA/2 マウス由来肥満細胞腫 P815 に共刺激分子 CD154 を遺伝子導入し (CD154/P815)、作製した CD154/P815 細胞による抗腫瘍治療効果を、CD80 遺伝子導入によるものと比較検討した。

#### B. 研究方法

DBA/2 マウス由来の肥満細胞腫である P815 細胞にマウス CD154 遺伝子を導入し CD154/P815 細胞およびマウス CD80 遺伝子を導入し CD80/P815 細胞を作製した。DBA/2 マウスから腹腔マクロファージを調整し、CD154/P815 細胞と共培養し、IL-12 産生能を ELISA にて測定した。P815 または CD154/P815 細胞を DBA/2 またはヌードマウス皮下に接種し、腫瘍の生着の有無をもって抗腫瘍効果を検討した。また、腫瘍接種時に CD154 抗体または IL-10 中和抗体を投与し、その抗腫瘍効果に与える影響を検討した。in vivo T 細胞除去には CD4, CD8 抗体を、NK 細胞除去にはアシアロ GM1 抗体を投与した。

#### C. 研究結果

CD154/P815 細胞は腹腔マクロファージを刺激し IL-12 産生を誘導した。親株である P815 細胞は DBA/2 およびヌードマウスに全例生着したのに対して、CD154/P815 細胞は全例拒絶された。その拒絶パターンは CD80/P815 細胞のそれとは明らかに異なり、この拒絶反応は CD154 抗体、アシアロ GM1 抗体もしくは IL-12 抗体により抑制された。さらに CD154/P815 細胞を拒絶したマウスに親株を接

種した場合、親株は全例拒絶された。その際、CD80/86 抗体もしくは CD4/CD8 抗体投与により、親株 P815 細胞は生着した。

#### D. 考察

腫瘍に対する免疫遺伝子療法を開発を目的に、共刺激分子 CD154 の遺伝子を腫瘍細胞に導入し、それによって誘導される抗腫瘍効果について基礎的検討を行った。その結果、CD154 遺伝子導入腫瘍細胞は、IL-12 産生を誘導し抗腫瘍効果を増強した。この一次効果には T 細胞の関与は少なく、NK 細胞/IL-12 依存性であった。しかし、その後の CD154 遺伝子導入による特異的抗腫瘍効果の獲得には T 細胞が関与しており CD80/CD86 依存性であった。

#### E. 結論

共刺激分子 CD154 遺伝子を導入することにより、腫瘍細胞に対して特異的抗腫瘍免疫を誘導できる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawamura, T., Takeda, K., Mendiratta, K.S., Kawamura, H., Kaer, V.L., Yagita, H., Abo, T. and Okumura, K. Critical role of NK1+ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J. Immunol.* 160: 16-19, 1998.
- 2) Nakajima, A., Kodama, T., Morimoto, S., Azuma, M., Takeda, K., Oshima, H., Yoshino, S., Yagita, H. and Okumura, K. Antitumor effect of CD40 ligand: elicitation of local and systemic antitumor responses by IL-12 and B7. *J. Immunol.* 161: 1901-1907, 1998.
- 3) Tsukada, N., Kobata, T., Aizawa, Y., Yagita, H. and Okumura, K. Graft-versus-leukemia (GVL) effect and graft-versus-host disease (GVHD) can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood in press*

分担研究者 藤目 真 順天堂大学 教授

**研究要旨** 泌尿器系がんの糖鎖発現と浸潤・転移能との関係につき検討を行った。その結果、尿路上皮がん患者において、血中の糖鎖抗原CA19-9量と浸潤、転移および予後との間に関連のあることが示唆された。

#### A. 研究目的

転移能を有するがん細胞と有さないがん細胞とでは、その産生する糖タンパク質が質的・量的に異なっていることが、多くの研究から明らかになっている。CA19-9抗原は大腸がんなどにおいて、転移能を有する癌細胞に強く発現している糖タンパク質の一つである。本研究では、尿路上皮がんにおける血清CA19-9抗原量と転移・予後との関連について検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

164例の尿路上皮がん患者より、原発巣摘出前に得た血液標本を対象とした。

すべての手術摘出標本は病理医により、TNM分類、grade分類が行われた。CA19-9抗原の測定には、Centocor社製CA19-9キットを用いて、EIA法により測定した。統計学的な検定には、Mann-WhitneyのU検定とKruskal-Wallisの検定を用いた。生存率はKaplan-Meier法により解析し、生存率の有意差検定には一般化Wilcoxon検定を用いた。

#### C. 研究結果

##### 1. 臨床的・病理学的パラメーターとの関連

分化度、深達度、リンパ節転移、遠隔転移、病期のいずれのパラメーターにおいても、群間でCA19-9値に有意差を認めた。すなわち、grade3, pT4, N3, M1, stage IVで、他群に比べてCA19-9値が有意に高値を示した。

##### 2. 予後との関連

血清CA19-9のカットオフ値を37U/mlに設定した場合に、陽性群の予後が有意に不良であった。

##### 3. Lewis式血液型との関連

血清CA19-9値を、患者赤血球表面のLewis式血液型別に比較すると、a+b-, a-b+, a-b-の順に高値となり、各群間に有意差を認めた。

##### 4. 分子的多様性

ウェスタンブロット法を用いて、血清CA19-9抗原の分子的多様性について検討中である。

#### D. 考察

がん細胞の発現する接着分子のリガンド糖鎖抗原については、sialyl Lewis Xやsialyl Lewis Aについての検討が、主に消化器系のがんに関して行われ、その転移との関連が注目されている。

泌尿器系のがんに関しては、我々はすでに腎がんにおける分化度依存的sialyl Lewis Xの発現増加につき報告した。

尿路上皮がんについては、血清CA19-9値の上昇をみた症例の報告が散見されるほか、少数例を対象とした検討ではあるが、血清CA19-9値と臨床経過との関連を示唆する報告がみられる。

CA19-9抗原は、Koprowskiらにより作製された、大腸

がんに対するモノクローナル抗体(NS19-9)により認識されるがん関連糖鎖抗原であり、血中に検出されることから、主に消化器系がんの腫瘍マーカーとして、臨床的に用いられている。

本研究において、尿路上皮がん患者血清中のCA19-9抗原量と、分化度、深達度、リンパ節転移、遠隔転移、病期、予後との間に有意の関係が見出された。

尿路上皮がん患者のCA19-9発現に関して、血清濃度とがん組織内濃度、組織染色強度との間に相関を認めたとする報告があり、本研究結果と考え合わせると、CA19-9抗原の高発現と転移能との関係につき興味もたれる。

一方、CA19-9抗原の合成には、Lewis式血液型遺伝子によりコードされるLewis酵素の存在が必須と考えられており、事実、赤血球Lewis式血液型別にみて、血清CA19-9値に有意差が認められた。したがって本研究結果は、各症例のLewis式血液型遺伝子の遺伝子型を判定したのち、再度解析し直す必要があると考えられる。この点に関しては、すでに検討を開始している。

今後は、CA19-9抗原高発現尿路上皮がん細胞株を用いて、転移発現との関連を検討する予定である。

#### E. 結論

尿路上皮がんにおいて、CA19-9抗原の発現と、転移発生との間に関連のあることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Evaluation of serum CA19-9 level in urothelial carcinoma. (J Urol 投稿中)

##### 2. 学会発表

Lewis式血液型の遺伝子型と血清および尿中CA19-9値との関連 (第87回日本泌尿器科学会総会, 1999年, 大阪)

## 腫瘍ワクチンによる免疫制御に関する研究

分担研究者 濱田洋文 (財) 癌研・癌化学療法センター・分子生物治療研究部

研究要旨： 当分担研究では、GMCSF遺伝子導入ワクチン療法に、自殺遺伝子導入療法やリンフォタクチン遺伝子を導入した樹状細胞移入療法などを併用することが、非常に効果的に抗腫瘍作用を増強するストラテジーとなることを見出した。

### A. 研究目的

当分担研究では、GMCSF遺伝子導入ワクチン療法をさらに強力にするために、自殺遺伝子導入との併用や樹状細胞の利用などについて基礎的な検討を行う。

### B. 研究方法と結果

(a) 自殺遺伝子導入とサイトカイン遺伝子導入療法の併用：大腸菌シトシンデアミナーゼ遺伝子 (CD) を発現する組み換えアデノウイルスAdCDとGM-CSF遺伝子を発現するAdGMCSFとの併用効果をB16メラノーマ担癌マウスの動物治療実験モデルを用いて検討した。AdGMCSFとAdCD5FCを併用した場合、AdlacZ/5FC、AdCD/5FC、AdGMCSFそれぞれ単独で用いた場合よりも、はるかに強い治療効果が得られた。併用療法を行うと、腫瘍細胞のMHC-1 (H-2Db) とB7-1分子の発現が高まり、多くの樹状細胞 (DC) とCD8+T細胞が、腫瘍内に浸潤するようになる。また特異的なCTLも誘導される。GMCSFとCD自殺遺伝子の併用は、メラノーマの増強を相乗的に抑制し、しかも抗腫瘍免疫反応を効果的に誘導することから、単独では不十分な効果しか得られないような癌に対しても、期待できる遺伝子治療法と考えられる (Cao et al. *Gene Ther.* 5: 1130-1136, 1998)。

(b) 平成10年度には、このほかに、リンフォタクチン遺伝子を導入した骨髄樹状細胞 (DC) にペプチド抗原を組み合わせることによって強い抗腫瘍免疫活性を誘導することを示した。(Cao et al. *J. Immunol.* 161 (11): 6238-6244, 1998)

### C. 考察と結論

自殺遺伝子導入とサイトカイン遺伝子導入療法の併用やリンフォタクチン遺伝子を導入した骨髄樹状細胞 (DC) にペプチド抗原を組み合わせることなどの方法は、現在進めているGMSF遺伝子導入ワクチン療法の効果をさらに強力にするために有力なストラテジーになると考えられる。平成11年度には、平成10年度までの結果をもとに、主に変異型アデノウイルスを用いて、標的腫瘍細胞に対して効果的な遺伝子導入を行い、GMCSFワクチン療法の強化法の開発を目指す。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Shibagaki, N., Hanada, K., Yamaguchi, S., Yamashita, H., Shimada, S. and Hamada, H. Functional analysis of CD82 in the early phase of T cell activation: roles in cell adhesion and signal transduction. *Eur. J. Immunol.* 28(4): 1125-1133, 1998.
2. Shiratori, Y., Kanai, F., Hikiba, Y., Moriyama, H., Hamada, H., Matsumura, M., Tanaka, T., Lan, K.-H., Ohashi, M., Okano, K., Naito, M., and Omata, M. Gene therapy for hepatic micrometastasis of murine colon carcinoma. *J. Hepatology* 28(5): 886-895, 1998.
3. Cao, X., Ju, D.W., Tao, Q., Wang, J., Wan, T., Wang, B.M., Zhang, W., and Hamada, H. Adenovirus-mediated GM-CSF gene

and cytosine deaminase gene transfer followed by 5-fluorocytosine administration elicit more potent antitumor response in tumor-bearing mice. *Gene Therapy* 5: 1130-1136, 1998.

4. Cao, X., Zhang, W., He, L., Xie, Z., Ma, S., Tao, Q., Yu, Y., Hamada, H. and Wang, J. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce antitumor immunity. *J. Immunol.* 161(11): 6238-6244, 1998.

5. Matsumoto, G., Sunamura, M., Shimamura, H., Kodama, T., Hashimoto, W., Kobari, M., Kato, K., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Hamada, H., and Matsuno, S. Adjuvant immunotherapy using genetically engineered interleukin 12 secreting fibroblasts prevents recurrence after surgical resection of established tumors in a murine adenocarcinoma model. *Surgery* 125(3): 257-264, 1999.

6. Zhang, W., He, L., Yuan, Z., Xie, Z., Wang, J., Hamada, H., and Cao, X. Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotactin. *Human Gene Therapy* 10 (7): in press, 1999.

7. Nakazaki, Y., Tani, K., Lin, Z.-T., Sumimoto, H., Hibino, H., Tanabe, T., Wu, M.-S., Izawa, K., Hase, H., Takahashi, S., Tojo, A., Azuma, M., Hamada, H., Mori, S., and Asano, S. Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine hematopoietic tumor cells and their co-operative enhancement of antitumor immunity. *Gene Therapy* 5(10): 1355-1362, 1998.

8. Yasuda, H., Nagata, M., Arisawa, K., Yoshida, R., Fujihira, K., Okamoto, N., Moriyama, H., Miki, M., Saito, I., Hamada, H., Yokono, K., and Kasuga, M. Local expression of immunoregulatory IL12p40 gene prolonged syngeneic islet graft survival in diabetic NOD mice. *J. Clin. Invest.* 102(10): 1807-1814, 1998.

9. Tanaka, H., Yoshizawa, H., Yamaguchi, Y., Ito, K., Kagamu, H., Suzuki, E., Hamada, H., and Arakawa, M. Successful adoptive immunotherapy of murine nonimmunogenic tumor with specific effector cells generated from gene-modified tumor-primed lymph node cells. *J. Immunol.* in press, 1999. (Accepted, 981215)

10. Shinoura, N., Yoshida, Y., Sadata, A., Hanada, K., Yamamoto, S., Kirino, T., Asai, A., and Hamada, H. Apoptosis by retrovirus- and adenovirus-mediated gene transfer of Fas ligand to glioma cells: implication for gene therapy. *Human Gene Therapy* 9(14): 1983-1993, 1998.

11. Yoshida, Y., Sadata, A., Zhang, W., Shinoura, N. and Hamada, H. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Human Gene Therapy* 9(17): 2503-2515, 1998.

12. Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., Saito, I., and Hamada, H. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for pro-apoptotic genes. *Human Gene Therapy* 9(18): 2683-2689, 1998.

13. Inaba, M., Sawada, H., Sadata, A., and Hamada, H. In vitro circumvention of 5-fluorouracil resistance in human stomach cancer cells by adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene. *Jp. J. Cancer Res.* 90 (3): in press, 1999.