

20020840

厚生労働科学研究費補助金  
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種による  
遺伝子治療法の開発と臨床研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 谷 憲三朗  
九州大学生体防御医学研究所  
ゲノム機能制御学部門・ゲノム病態学分野

平成15(2003)年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

- GM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種に…………… 1  
よる遺伝子治療法の開発と臨床研究  
谷 憲三朗

## II. 分担研究報告書

1. GM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種に…………… 10  
よる遺伝子治療法の開発と臨床研究  
谷 憲三朗  
浅野 茂隆  
佐藤 典治
2. 特殊免疫検査への助言・腎細胞がん抗原の同定…………… 16  
奥村 康
3. 腎細胞がん摘出術の実施指導と特殊免疫検査への助言…………… 18  
赤座 英之
4. 樹状細胞療法の基礎ならびに臨床研究…………… 20  
森 正樹
5. 抗腫瘍免疫誘導における免疫抑制シグナル分子の関与に関する検討…………… 23  
東 みゆき
6. 患者検体の病理学解析…………… 26  
小柳津直樹

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 32

- IV. 研究成果の刊行物・別冊…………… 34

# 総括研究報告書

GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種による遺伝子治療法の開発と臨床研究

主任研究者： 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・教授

**研究要旨**

他臓器への転移のある第 IV 期腎癌は予後不良であり、新たな治療法の開発が強く望まれている。我々はこれまでに第 IV 期腎癌を対象とした放射線照射・GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞ワクチン(GVAX)投与実施の可能性と安全性の評価を主目的とした遺伝子治療臨床研究を行ってきた。その結果、本臨床研究は今後もさらに検討していく価値がある治療法であると判断した。本研究では、GVAX 遺伝子治療臨床研究から得られた貴重な結果を新たな治療法開発に発展させることを目的に、基礎研究並びに新たな臨床研究実施への足掛かりを作った。すなわち、本療法の経済性・汎用性を考慮し、次世代の GVAX 作製法を検討し、特に HIV(VSV)ベクターの有用性を明らかにした。さらに現在の GVAX の臨床的効果をさらに増強させる目的で、SAGE 法で同定された GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される遺伝子の同定、腫瘍由来熱ショック蛋白質 gp96 と GVAX との併用効果の検討、新規分子 TWEAK と同レセプター-Fn14 抗腫瘍免疫誘導機序の検討、ならびに GVAX 接種を受けた患者血清が認識する腎癌特異的抗原の同定などの研究を実施し、次世代の GM-CSF 免疫遺伝子治療開発への有力な示唆を得た。さらに臨床的にはペプチドパルス樹状細胞療法との併用の可能性も有望であると考えられた。また今後悪性腫瘍に対する遺伝子治療を含めたトランスレーショナルリサーチを進める上で重要になると考えられる、微小転移腎癌の早期診断法の開発ならびに日本人におけるサイトカイン・サイトカインレセプター遺伝子の SNPs 解析を行った。本研究により得られた重要な研究成果を今後臨床にトランスレーションして、新たな抗腫瘍免疫療法の確立をめざす予定である。

**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・教授  
赤座 英之 筑波大学・教授  
森 正樹 九州大学生体防御医学研究所・教授  
東 みゆき 東京医科歯科大学大学院・教授  
佐藤 典治 東京大学医科学研究所・助教授  
小柳津 直樹 東京大学医科学研究所・助教授

**A. 研究目的**

他臓器への転移のある第 IV 期腎癌は予後不良であり新たな治療法の開発が強く望まれている。一方、最近の臨床研究結果から、腎癌に対する免疫療法の有用性が示唆されている。しかし、現行のインターロイキン-2、インターフェロン α ならびに非骨髄破壊的同種細胞療法などの免疫療法においてもそれらの限界が明らかになってきている。我々はこれまでに第 IV 期腎癌を対象とした放射線照射・GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞ワクチン(GVAX)投与実施の可能性と安全性の評価を主目的とした遺伝子治療臨床研究を行ってきた。現在まで接種を完了した4患者での臨床経過ならびに各種検査結果から、GVAX 接種の安全性が確認され、各症例で抗腫瘍免疫誘導を示唆する結果が得られ本臨床研究は今後も検討していく価値があるものと判断した。本研究では、GVAX 遺伝子治療臨床研究から

得られた貴重な結果を新たな治療法開発に発展させることを目的に、基礎研究並びに新たな臨床研究実施への足掛かりを作る。すなわち、本療法の経済性・汎用性を考慮し、次世代の GVAX 作製法を検討する。さらに現在の GVAX の臨床的効果をさらに増強させる目的で、GVAX との相乗効果が期待できる新規免疫遺伝子治療法を開発する。本療法の実用化により、低廉に多数の悪性腫瘍患者に対する治療法が確立される可能性が高く、国民福祉の観点からもその臨床的安全性・有効性の検討は重要と考えられる。

**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: GVAX 接種を平成10年から13年までに東京大学医科学研究所附属病院において受けた4患者のうち生存中の3患者において、接種終了後の定期的な経過観察を、血液学的、生化学的、免疫学的に実施すると共に、画像診断により転移病巣の経過観察を行った。また FDA の規定通り定期的に末梢血を採取して複製可能レトロウイルス(RCR)が生じていないことも確認した。さらに臨床研究中に保存した、患者組織標本を免疫学的側面からより詳細かつ体系的に検討した。

患者検体の病理学的解析: GVAX 接種を受けた患者 4 人において遺伝子治療臨床研究プロトコールに沿って採取されたワクチン接種箇所ならびに DTH 部位の皮膚生検、

および第一症例において実施された治療前原発巣腎組織および治療後の腫瘍生検ならびに剖検材料を用いた組織材料はすべてホルマリン固定後パラフィン包埋した。H&E 染色に加え CD3, BMP, AE1/AE3, S100, CD68, HLA-DR, CD4/CD8 (2重染色)および CD20cy に対する免疫染色を行った。一部の標本では腫瘍細胞のアポトーシス誘導を TUNEL 法にて評価した。組織浸潤細胞の定量的評価はマイクロメーターを装着した顕微鏡を用いて連続標本上の同一視野、単位面積あたりの各浸潤細胞数を計測することで行った。

(2) GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される新規免疫遺伝子治療法の検討:(a)SAGE 法で同定された GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される遺伝子の解析: GM-CSF 遺伝子導入抗腫瘍動物モデルの 10 日目の腫瘍について、SAGE 法による遺伝子解析を行った。退縮する腫瘍で発現上昇していた分子についてはマウス皮膚から cDNA を合成・増幅後、レトロウイルスベクター (pMX neo) に組み込み、WEHI-3B 細胞に遺伝子導入し、限界希釈法により細胞クローニングを行った。同目的遺伝子導入 WEHI-3B 細胞を BALB/c マウスに皮下接種し腫瘍形成の経過について観察した。(b) 腫瘍由来熱ショック蛋白質 gp96 と GM-CSF 遺伝子導入細胞併用による治療的抗腫瘍効果の基礎的検討: C57BL/6 マウスに  $1 \times 10^5$  のマウス肺癌細胞 (LLC; Lewis Lung Cancer) を右体側皮下に移植し、LLC から精製した gp96、GM-CSF 遺伝子導入 LLC 細胞 (LLC/GM)、分泌型 gp96 融合蛋白質 (gp96-Ig) 遺伝子導入 LLC 細胞 (LLC-gp96-Ig) を左体側皮下に治療的に投与し腫瘍増大速度を測定した。各種ワクチンをうけたマウスの脾細胞を取り出し CTL assay を行った。また、各種ワクチンをうけたマウスの血清を採取し、LLC タンパクに対する抗体を Western blotting にて検討した。さらに、各種ワクチンをうけたマウスの所属リンパ節の総細胞数、CD11c 陽性細胞比率、CD11c 陽性細胞のうちの成熟細胞比率および gp96 受容体 CD91 発現を検討した。

(3) GVAX 接種を受けた患者血清が認識する腎癌特異的抗原の同定: 本臨床研究第2症例の培養腎癌細胞 mRNA から cDNA を合成した。λファージ発現ベクターに cDNA を一方向性に組み込み発現ライブラリーを構築した。常法により第2症例治療後血清を用いたスクリーニングを行い、陽性プラークを検出した。単離された陽性クローンに対する血清中抗体存在の有無を、健常人、腎細胞がん患者において比較検討した。

(4) 泌尿器癌に対する BCG 免疫療法的作用機序解析: 膀胱癌に対して臨床的有用性が確立している Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) により惹起される抗腫

瘍ワクチン効果の機序を解明し他の泌尿器癌に対する免疫療法に応用する目的で、不死化ヒト正常尿路上皮細胞株 HU35 を用いてまず RT-PCR 法にて既知の TLR-family の発現を検討した。次に HU35 に生菌 BCG を添加し、一定時間共培養後上清中の各種サイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) の濃度を測定した。同時に共培養後の HU35 より mRNA を抽出しノーザンブロット法にて TLR-2 の発現を解析した。

(5) 新規分子 TWEAK と同レセプター Fn14 の抗腫瘍免疫誘導機序の検討: 新規ヒト TWEAK レセプターとして新たに見いだされた Fn14 に対するアゴニスティック抗体を作製し、血管内皮細胞や腫瘍細胞における Fn14 の発現と、TWEAK/Fn14 の機能について in vitro で解析した。

(6) 抗腫瘍免疫誘導における免疫抑制シグナル分子の関与についての検討: 1) 新規抑制補助シグナル分子 PD-1 リガンド (PD-L1) の抗腫瘍免疫誘導への関与を検討する目的で、PD-L1 遺伝子導入マウス癌細胞のマウス in vivo における抗腫瘍免疫応答を抗体投与実験により検討した。さらに 2) 抗原感作リンパ節 DC における PD-1 リガンド等発現の解析と T 細胞との反応における in vitro あるいは in vivo 抗体投与の増殖反応およびサイトカイン産生への影響を検討した。

(7) 悪性腫瘍細胞への新規遺伝子導入法の開発: レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法での GM-CSF 遺伝子導入細胞作製効率は 100% ではなく、遺伝子治療臨床研究をより多くの患者に実施する上では、さらに効率の高いベクターの導入が必須である。本研究では HIV-1 由来の第三世代 HIV (VSV) ベクターを改良し、既存の MLV (VSV) ベクターとの比較検討を、現在最も遺伝子導入が困難であるヒト白血病細胞ならびにヒト CD34 陽性細胞を対象に実施した。

(8) 日本人におけるサイトカイン・サイトカインレセプター遺伝子の SNPs 解析: 遺伝子治療臨床研究が phase II あるいは phase III に進んだ場合、治療に最適な患者の選別に役立つ事を期待して正常日本人の SNPs 頻度を検索した。すなわち、サイトカイン・サイトカインレセプター遺伝子の SNPs 解析を direct sequencing 法と、SNaPshot 法を用いて行い、JSNP に未登録の遺伝子については、Denaturing HPLC 法でスクリーニングを行い、direct sequencing で確認した。

(9) 微小転移腎癌の早期診断法の開発: 既知癌遺伝子を含む約 4,000 クローンの cDNA アレイを用いて腎癌細胞株の遺伝子発現と細胞株の生物学的特徴の関連性を検討した。SKRC 腎癌細胞株 6 株 (SKRC-1, 6, 17, 29, 52, 59) から

Trizol 法により total RNA を抽出し、33P ラベル下に逆転写反応により cDNA を合成、アレイ上にハイブリダイズし、シグナルを画像解析により検出した。腎近位尿管上皮細胞株を対照として遺伝子発現の亢進減弱およびそのパターンを GeneSpring によるクラスター解析により検討した。樹立時の細胞株の由来(転移巣由来 17, 29, 52, 原発巣由来 1, 6, 59)と、形態的特徴と遺伝子発現のパターンについて検討した。

(10)樹状細胞療法の臨床研究: 手術不能の消化器癌(HLA-A2 かつ MAGE-3 を発現、あるいは HLA-A24 かつ MAGE-1,2 または 3 を発現)患者に対して、現在19例目の治療を実施している。15例目までの解析は終了した。MAGE の発現は癌組織から RT-PCR 法または免疫組織化学染色法にて確認した。樹状細胞は末梢血単核球より GM-CSF, IL-4 存在下の混合培養にて作製した。

(倫理面への配慮)

1. 本遺伝子治療臨床研究ならびに免疫・細胞療法の対象となった患者は定められた本邦の各種指針に基づき治療適応の有無を慎重に各施設倫理委員会において検討後、詳細な説明および同意書を用いて腎がんもしくは各悪性腫瘍の病名告知・予後告知も行い、その後の精神的サポートを十分に行っている。これら臨床研究結果の内容で患者のプライバシーに深く関連する内容に関しては一切公表していない。特に遺伝子治療を受けた患者に対しては遺伝子治療臨床研究で発生した海外での副作用などの事象に関する情報については常に知り得た情報を提供し続けている。また診療内容・副作用の報告を担当省へ規定通り行い、公開性を保っている。

2. 遺伝子治療臨床研究を実施された患者においては FDA で定められた接種患者末梢血中の RCR 出現の有無を定期的に確認すると共に全身性の副作用の有無を患者生存中は定期的に観察している。

3. 遺伝子組み換え実験や前臨床動物実験は各大学の倫理等規約に則って実施している。

4. 正常人の SNPs 解析を行うにあたっては、研究所の倫理委員会の承認を受けている。正常ボランティアからは書面で承諾を頂き、DNA サンプルは連結不可能匿名化した後、解析にあてるようにしてある。

### 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: 規定の GVAX 接種を完了し、生存中の患者3名(第2-4症例)については、東大医科研もしくは順天堂大附属病院にて現在経過観察中である。3

患者には接種中問題となる副作用は出現せず、接種開始よりそれぞれ3年10ヶ月、3年4ヶ月、2年4ヶ月間生存中である。これら患者の末梢血中には自家腎癌細胞に対する CTL が検出され、各症例においてはオリゴクローン性の Tリンパ球の増生が GVAX 接種後に検出された。なお各患者の末梢血中には RCR は認められなかった。以下に患者検体を用いた詳細な病理解析結果を報告する。

患者検体の病理学的解析:

[ワクチン接種部位皮膚病理解析] 浸潤細胞数は初回ワクチン接種後(day8)の生検組織ではいずれの症例でも少数の単核球浸潤の増加を認めたのみであった。2 回接種後(day 19)真皮上層の細血管周囲に有意な単核球浸潤増加を認め、3 例において3回接種後(day35)に最大の単核球浸潤を観察、以後減少傾向を示した(1例のみ day 74 にてピークを観察)。細胞浸潤の主座は初期には真皮表層、以後より深部の汗腺、毛胞周囲および皮下脂肪織へと波及した。その免疫組織学的解析では浸潤単核球主体は CD3<sup>+</sup> T 細胞であり CD20<sup>+</sup> B 細胞の浸潤は殆ど認められなかった。また CD68 陽性単球/マクロファージは3回目のワクチン接種以降主として真皮深部に有意に増加した。T 細胞の CD4:CD8 の構成比は常に CD4<sup>+</sup> T 細胞優位の細胞浸潤であった。表皮の形態変化は全検体を通じ観察されず S100 陽性樹状細胞は表皮 Langerhans 細胞に限定され接種後一旦その数を減じ以後回復傾向にあった。また真皮では(1標本を除き)S100 陽性細胞を同定できなかった。HLA-DR 発現は2回目接種以降浸潤 T 細胞でその発現が有意に増加した。上記の単核球浸潤とはほぼ同期して真皮深層に好酸球浸潤を観察した。BMP 染色により好酸球の多くは脱顆粒を示した。

[DTH 反応の皮膚生検材料解析]ワクチン接種前(day0)の正常人組織(NRC)、腎癌細胞(RCC)接種による DTH 反応は両者共に有意な細胞反応は観察しなかった。2回目の DTH 反応(day28)では、以後の最終DTH反応まで共通する強い T細胞浸潤を観察し、その構成は CD4<sup>+</sup> T 細胞優位でありこの構成に関しては NRC,RCC の両者に有意な差はなかった。NRC、RCC に対する浸潤細胞構成についても有意な差は認めなかったが、細胞浸潤数は RCC 接種部位周辺により強くまた HLA-DR も有意に増強していた。

[腫瘍内浸潤細胞解析] 1 例においてのみワクチン投与前後の腫瘍組織における病理組織学的対比検討が可能であった。治療前原発巣材料を用いた解析では腫瘍内、腫瘍外腎組織ともに CD4 > CD8 T 細胞主体、B 細胞、マクロファージを混じる細胞浸潤を観察した。腫瘍細胞のアポトーシスは同定し得なかった。治療開始後7ヶ月にて施行

された皮膚転移巣生検材料では腫瘍内 T 細胞は CD8 T 細胞優位へと明らかに転換し、かつ B 細胞数は減少、マクロファージの増加を観察した。TUNEL 法により有意な腫瘍細胞のアポトーシス誘導を同定し得た。治療開始後 9 ヶ月で施行された剖検材料の腎、肝および肺転移巣の解析では腫瘍内浸潤 T 細胞は共通して CD8 T 細胞優位でありマクロファージの浸潤も強く細胞性免疫の作動が示唆された。興味深いことに近傍の腫瘍外の腎、肝、肺組織に存在する T 細胞は依然 CD4 T 細胞が優位であった。剖検時の腎組織においては糸球体に明確な形態学的変化は観察せずまた間質への有意なリンパ球浸潤も認めず自己免疫性腎炎を示唆する所見は認められなかった。

(2) GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される新規免疫遺伝子治療法の検討: (a) SAGE 法で同定された GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される遺伝子の解析: GM-CSF 遺伝子導入 WEHI-3B 細胞を接種してから 10 日目の、退縮直前の腫瘍の SAGE による遺伝子解析結果からは、ケモカイン遺伝子等の発現が上昇していた。その他、血管新生を阻害する plasminogen activator inhibitor 1 やマトリックスメタロプロテアーゼインヒビターなどの腫瘍の増殖、転移を抑制する遺伝子の発現が上昇していた。本研究では特にケモカイン分子に着目した。発現上昇していたケモカインの中から特に樹状細胞活性化に関連するケモカインとして TARC と RANTES を選択し WEHI-3B 細胞に遺伝子導入した。さらにそれぞれと GM-CSF を共発現する WEHI-3B 細胞も作製した。これまでの結果では、TARC 産生 WEHI-3B 細胞は GM-CSF 産生 WEHI-3B 細胞とはほぼ同様に腫瘍増殖が抑制された。TARC と GM-CSF を共に産生する WEHI-3B 細胞はさらに強く増殖が抑制され、80% の確率で腫瘍が消失した。一方、RANTES 産生 WEHI-3B 細胞は GM-CSF 産生 WEHI-3B 細胞よりも強く腫瘍増殖が抑制され、RANTES と GM-CSF を共に産生する WEHI-3B 細胞では 50% の確率で腫瘍が消失した。(b) 熱ショック蛋白質 gp96 と GM-CSF 遺伝子導入細胞併用による治療的抗腫瘍効果の基礎的検討: C57BL/6 マウスの LLC 治療モデルにおいて、LLC 由来 gp96、LLC/GM、LLC-gp96-Ig のいずれも単独投与で親株細胞の増殖をわずかながら抑制したが、LLC 単独、あるいは正常肝由来 gp96 では抑制効果はみられなかった。LLC 由来 gp96 の親株細胞に対する治療的抗腫瘍効果は LLC/GM との併用によって有意に増強された。一方で LLC-gp96-Ig と LLC/GM との併用による相乗効果は認められなかった。In vivo depletion study では、LLC 由来 gp96 と LLC/GM 併用群でみられた抗腫瘍効果は CD8-depleted mice ではほぼ消失し、

CD4-および NK1.1-depleted mice においてもその効果は部分的に減弱した。LLC 由来 gp96 と LLC/GM の併用ワクチンをうけたマウスから採取した脾細胞は LLC に対する特異的殺細胞効果を認め、これは CD8 陽性 T リンパ球によるものであった。ワクチンをうけたマウスの血清を用いた Western blotting では、gp96、LLC/GM 単独投与群で新たな band の出現を認め、これらのワクチンが抗体系の反応を生じていることが示唆された。しかし併用群では band の増強は認められず、併用による治療的抗腫瘍効果の増強には関与していない可能性が考えられた。ワクチンをうけたマウスの所属リンパ節の総細胞数及び CD11c 陽性細胞比率は gp96、LLC/GM 単独投与群で有意に増加し、併用群では更なる増加を認めた。またこれらの CD11c 陽性細胞のうち、成熟細胞比率は併用群で最も高かった。しかし CD91 の発現には優位な差を認めなかった。

(3) GVAX 接種を受けた患者血清が認識する腎癌特異的抗原の同定: (a) ライブラリー構築とスクリーニング: パッケージ直後の力価が  $1.1 \times 10^6$  サイズの cDNA 発現ライブラリーが構築できた。LacZ 発現による cDNA 組み込み率判定は 95% 以上であった。またクローニングサイト両側にある T3/T7 プロモータ配列を用いた PCR により cDNA インサート長は約 0.5–2.0 kb (平均約 1 kb) であった。第 2 症例の治療開始後 1–3 ヶ月の血清を用いて、1 次/2 次スクリーニングを行い 8 クローンの陽性プラークが得られた。これらのインサートの塩基配列決定の結果、7 種類の既知遺伝子が抗原としてクローン化されたことがわかった。(b) 各抗原に対する血清中抗体の出現頻度: 健康人 (n=6) の血清中抗体の存在を検討した結果、7 抗原中 3 抗原に対して健康人でも血清中に抗体を認めた。また遺伝子治療を受けた症例については、現在検討中ではあるが少なくとも 1 抗原において 4 例中 3 例で抗体が産生されていたが、この抗原に対しては正常人にも抗体が存在していた。

(4) 泌尿器癌に対する BCG 免疫療法的作用機序解析: BCG 添加 12 時間後に TLR-2 mRNA 発現の増強傾向を認めた。また BCG 添加後の培養上清中では IL-6 が添加前の約 10 倍の濃度で検出された。これに対して、その他のサイトカインでは IFN- $\gamma$  及び IL-10 が微量に検出されたが BCG 添加前と比較して有意差はなかった。

(5) 新規分子 TWEAK と同レセプター Fn14 の抗腫瘍免疫誘導機序の検討: 新たに見いだされた TWEAK レセプターである Fn14 に対する抗体を作成し、Fn14 を介して TWEAK が血管内皮細胞に炎症性サイトカインの分泌や接着分子の発現を誘導することを明らかにした。さらに、Fn14 は細胞内領域に death domain を持たないのにも関わ

らず、ある種の腫瘍細胞にはアポトーシスやネクローシスシグナルを伝達することを明らかにした。本結果から TNFファミリーに属する分子が血管新生や炎症にも関与することが明らかになった。

(6) 抗腫瘍免疫誘導における免疫抑制シグナル分子の関与についての検討: 1) 同系マウスに移植したところ、PD-L1<sup>NRS1</sup>のみが拒絶され、その拒絶には T 細胞が関与していた。一方、抗 PD-L1 あるいは抗 PD-1 抗体投与により親細胞株の腫瘍生着は拒絶されたが PD-L1<sup>NRS1</sup>腫瘍は生着した。親細胞株 NRS1 においても IFN- $\gamma$ 存在下の培養により PD-L1 発現が誘導され、また、NRS1 移植後の腫瘍塊の組織において PD-L1 陽性である癌細胞が多く認められた。

2) DNFB 塗布により誘導されるマウス接触生過敏感症(CH)モデルにおいて、感作時の抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-L1 抗体投与において有意な耳介腫脹の増強が認められたが、抗 PD-L2 抗体投与では変化しなかった。感作後所属リンパ節において抗 PD-1 抗体投与群で、全リンパ球総数の増加が認められ、T 細胞に PD-1 および PD-L1 の発現が、CD11b<sup>+</sup>DC/マクロファージに PD-L1/L2 の発現が認められた。さらに抗原を獲得し所属リンパ節に遊走してきた DC のなかに CD86<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup>と CD86<sup>-</sup>PD-L1<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>の DC サブセットが存在することが示された。抗原感作リンパ節 DC 刺激によるナイーブ T 細胞の増殖反応および IFN- $\gamma$ 産生は、抗 PD-L1 抗体あるいは抗 PD-1 抗体投与により非常に強く増強された。

(7) 悪性腫瘍細胞への新規遺伝子導入法の開発: 10 種の白血病細胞株の大部分で、HIV(VSV)ベクターにより、ほぼ 100%の導入効率が 2 ヶ月間引き続き認められたが、MLV(VSV)ベクターでは 10-40%であり発現は経時的に減弱した。11 種の患者由来白血病細胞での遺伝子導入効率は、HIV(VSV)ベクターにより 8 細胞で 60%以上、MLV(VSV)ベクターにより 9 細胞で 60%未満の遺伝子導入効率であった。PHA 刺激後 IL-2 存在下で培養した健康人末梢血リンパ球(PBL)での遺伝子導入効率は、HIV(VSV)ベクターで平均 86%、MLV(VSV)ベクターでは 19%であった。未刺激の PBL では HIV(VSV)ベクターにより平均 39%の細胞で GFP 発現を認めたが、MLV(VSV)ベクターによる発現は認めなかった。臍帯血由来ヒト CD34 陽性細胞では HIV(VSV)ベクターによる遺伝子導入効率はサイトカイン刺激時で 90%以上で、未刺激時でも約 30%であったが、MLV(VSV)ベクターでは遺伝子導入不可能であった。また、遺伝子導入後二週間目に形成された造血細胞由来コロニーへの遺伝子導入効率は何れのベクターでも 100%であったが、染色体 DNA

への遺伝子の組み込みは HIV(VSV)ベクターでは平均 97%のコロニーで認められ、MLV(VSV)ベクターでの平均 3%と大きな差が認められた。

(8) 日本人におけるサイトカイン・サイトカインレセプター遺伝子の SNPs 解析: SNPs 検索は 60 箇所を検索できるようになった事に加え、未登録 SNPs を 10 箇所明らかにした。

(9) 微小転移腎癌の早期診断法の開発: 62 遺伝子によるクラスター化が可能であった。転移巣由来株 3 株のうち SKRC-17 と-29 の 2 株は強い関連性を示し、SKRC-52 は他のどの株とも関連性が低かった。この SKRC-52 は他の細胞株に比較し顕著な線維芽細胞型を呈し、その遺伝子背景が異なることが RNA 発現プロファイリングでも示された。また転移巣由来株 SKRC-17, 29 と原発巣由来株 SKRC-1, 6, 59 の比較から転移巣由来株で発現が亢進している遺伝子セットが抽出された。

(10) 樹状細胞療法の臨床研究: ワクチン投与に起因するグレード 3 以上の副作用は全例に認められなかった。画像評価による腫瘍効果判定では 3 例に腫瘍縮小が認められた。治療開始後、腫瘍マーカーの減少を 8 例に認め、治療終了後のペプチドに対する特異的 CTL の誘導を 8 例中 4 例に認めた。Th1/Th2 バランスの上昇が、解析した 6 例中 3 例に認められた。そのうち、手術不能進行食道癌 1 例では、腫瘍進展の改善が認められ手術実施が可能となった。また、食道癌再発 1 症例では、化学療法・放射線耐性であったが本治療により嘔吐の改善など PS の向上が認められた。

#### D. 考察

(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: GM-CSF 遺伝子導入ワクチンの作製は必ずしも全例では可能ではなく、より簡便かつ低廉な方法の導入が望まれたことから、今後はアデノウイルスベクターを用いた方法ならびに高 GM-CSF 産生同種腫瘍細胞の使用を行っていくことが重要であると考えた。臨床的には GM-CSF 遺伝子導入ワクチン細胞接種により患者体内に抗腫瘍免疫を誘導できることが *in vitro* で確認できたが、抗腫瘍効果自体に関しては本法のみでは十分ではなく、低量インターロイキン-2 との併用で可能であった。今後新しいワクチン細胞作製法を導入すると共に樹状細胞療法や低量 IL-2 などの免疫療法との併用を行うことで、より強い抗腫瘍免疫効果を目指した臨床研究を実施する予定である。

病理学的には当該腫瘍免疫活性化療法には理論的には以下の 3 フェーズ (priming phase, induction phase, ならび



に effector phase)があることから、各フェーズについての安全性(有害事象の有無)と有効性(抗腫瘍免疫の作動状態)を解析した。特に Priming phase においてはワクチン接種箇所での時系列に応じた T 細胞を主体とした有意な細胞浸潤誘導を免疫反応惹起の結果として認めた。なお、本研究で用いたマーカー S100 は dermal precursor DC の指標であり成熟して真皮へ遊走後 S100 抗原発現は低下するため真皮内における mature DC の動向は検索しきれない。この点の解析は induction phase において実際どのような抗原提示がなされているかの解析を含め今後の課題である。effector phase の解析結果から、治療後の腫瘍細胞の有意なアポトーシス誘導、CD8 T 細胞優位への転換、と意図した腎癌特異的腫瘍免疫誘導を強く示唆する所見を得た。1例のみの解析所見であるが当該療法の有効性を客観的に評価し得た貴重な解析結果であると思われる。特に本所見が IL-2 投与以前の生検検体で観察されることからワクチン接種に反応しての結果であると思われる、その意味で腫瘍抗原特異的免疫誘導の証拠であると考えられた。また腫瘍外組織においてはこのような変化が観察されないことから感作腫瘍免疫担当細胞は高い特異性をもって腫瘍局所へ遊走・ホーミングしていることが示唆された。

(2) GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される新規免疫遺伝子治療法の検討:(a)SAGE 法で同定された GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される遺伝子の解析;本研究結果から GM-CSF 遺伝子導入腫瘍移植動物モデルにおいて、TARC および RANTES が抗腫瘍効果誘導に強く関与することが示唆された。抗腫瘍免疫の誘導機序として TARC は IL-4 を産生する Th2 細胞を遊走することによる樹状細胞の成熟化と抗体依存性細胞傷害作用の促進、RANTES は細胞傷害性 T 細胞の遊走がその主因と考えられた。(b) 腫瘍由来熱ショック蛋白質 gp96 と GM-CSF 遺伝子導入細胞併用による治療的抗腫瘍効果の基礎的検討:マウス肺癌に対する腫瘍由来 gp96 と GM-CSF 遺伝子導入細胞との併用により、CD11c 陽性細胞の成熟と特異的殺細胞効果を持つ CD8 陽性 T リンパ球の増加とともに、治療的抗腫瘍効果が有意に増強され、今後の新しい抗腫瘍免疫療法としての発展が期待された。

(3) GVAX 接種を受けた患者血清が認識する腎癌特異的抗原の同定:本研究では治療によって新たに認識されるようになった抗原に着目していることから、これらの抗原に対し治療前後で血清中抗体の反応性に差異が生じているかを検討したが、現在の方法では検出感度が不十分な点もあり、抗原タンパク質を精製して ELISA, Western blotting など定量的解析を可能にするアッセイ系の確立

が重要であると考え作成中である。

(4) 泌尿器癌に対する BCG 免疫療法の作用機序解析: BCG 免疫療法の機序として BCG 添加後に尿路上皮細胞では TLR-2 の発現の増強とともに IL-6 が分泌されることの重要性が示唆され、今後これらの知見を踏まえてさらに各種免疫担当細胞との相互作用についての検討も重要であると考えられた。

(5) 新規分子 TWEAK と同レセプター Fn14 の抗腫瘍免疫誘導機序の検討:TWEAK の腫瘍細胞死誘導や血管新生の促進は Fn14 を介して発揮されることを明らかにした。Fn14 の発現は種々の上皮系腫瘍細胞や増殖因子で刺激した血管内皮細胞などに認められるため、今後、TWEAK /Fn14 をターゲットとした新たな腫瘍制御法を確立したい。

(6) 抗腫瘍免疫誘導における免疫抑制シグナル分子の関与についての検討:1)癌細胞上の PD-L1 の過剰発現は T 細胞による抗腫瘍免疫を増強させるのに対し、内在性に発現される PD-L1 は抗腫瘍免疫抑制に働いていることが示唆され、PD-L1 の機能は、癌細胞の抗原性と本経路以外の補助刺激分子との相互関係により強く影響を及ぼす可能性が考えられた。また、本研究での腫瘍拒絶には、PD-1 ではなく第2レセプターを介して PD-L1 との反応に関わっている可能性もあり、今後の検討が必要と思われる。2)PD-1:PD-L1 経路の阻害が抗原特異的免疫を増強させることから、PD-1:PD-L1 経路が抑制的に働くことが示された。感作リンパ節において PD-L2 の強い発現があるにもかかわらずその機能的関与が認められないことから、CD86 を強く発現している DC では CD28 補助シグナルの正の強い刺激に圧されて PD-1 抑制シグナルは無効となり、わずかな CD86 を発現した PD-L2/PD-L1 の DC において、PD-1:PD-L1 経路の抑制機能が発揮されている可能性が示唆された。CD86<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>PD-L2 抗原提示 DC がトレランス誘導 DC として抗原特異的 T 細胞反応抑制に関与している可能性が示された。DC によるトレランス誘導機序に PD-L1 が関与している可能性が示され、抗腫瘍免疫への応用が可能と考えられた。

(7) 悪性腫瘍細胞への新規遺伝子導入法の開発: HIV(VSV)ベクターによる遺伝子導入効率や、MLV(VSV)ベクターによる方法と比べかなり良好で、血液細胞に対する遺伝子導入法として極めて優れていた。特に患者由来白血病細胞、未刺激状態の末梢血単核球および臍帯血造血細胞への遺伝子導入法としては HIV(VSV)ベクターのみが実用レベルに達していると考えられる。また、染色体 DNA への遺伝子組み込み効率は著しく高く、これが

長期間の導入遺伝子発現が可能な理由の一つであることが示唆された。

(8) 日本人におけるサイトカイン・サイトカインレセプター遺伝子の SNPs 解析: 今後さらに検体数を増やし、治療反応性の個体判定を可能にする SNPs 検索を体系的に実施していく予定である。

(9) 微小転移腎癌の早期診断法の開発: cDNA アレイによる遺伝子発現解析を行なうとことで、転移に関連する遺伝子セットの検出が可能であった。さらに遺伝子数 20,000 以上のアレイを用いた網羅的遺伝子解析により、腎癌特異的あるいはその転移に特異的な遺伝子の検索を行う予定である。

(10) 樹状細胞療法の臨床研究: 本療法の安全性が15例ではあるが確認できたことは十分に評価できる。また、既存のすべての治療を受けたにもかかわらず治療効果が得られなかった症例が対象であったのにも関わらず、腫瘍マーカーの減少、また画像解析での腫瘍退縮、さらに PS の改善が認められたことは本治療が有意義であったことを強く示唆した。

## E. 結論

自家腎癌を用いた GM-CSF 遺伝子導入ワクチンの作製は6例とも安全に作製はできたが、GM-CSF の十分な産生量が4例で確保が可能であった。同ワクチン細胞接種を受けた4例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と共に、患者体内に検出可能な腫瘍特異的免疫反応の誘導を短期もしくは長期的に *in vitro* 研究により観察できた。また剖検し得た1例における組織所見においても CD8 細胞を中心とする抗腫瘍免疫の誘導所見や腫瘍細胞のアポトーシス所見を同定し得た。さらに自己免疫性腎炎を含めこの療法に随伴しての有害事象は認められなかった。臨床的にも1例で安定状態、1例で混合反応をワクチン接種期間に認めた。また2例では低量 IL-2 の併用により、長期(接種終了より2年以上)に安定した状態が続いている。以上の結果から、本遺伝子治療は実施可能であり、安全性も高く、抗腫瘍免疫を患者体内で誘導できた。臨床的効果に関しては低量 IL-2 の全身療法との併用により、得られる可能性が示唆された。一方で、今後の臨床展開を考慮した場合に多数患者での検討を必要とすることから、GM-CSF 遺伝子導入ワクチン細胞の作製においてはその効率をほぼ100%にする必要があり、他の方法、例えばレトロウイルスベクターとともに遺伝子治療臨床研究で現在頻用され、本目的での安全性が高いと考えられるアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法、

GM-CSF 高発現同種細胞と自家腫瘍細胞の混合接種法などを導入する必要があるものと考えられた。将来的には本研究結果から得られたように HIV(VSV)ベクターの導入も有望な方法であると考えられるが、本方法は HIV ベクターを基本骨格としているためにさらに安全面での検討が重要であり、臨床領域への導入までにはまだ時間を要するものと考えられる。

GM-CSF 免疫遺伝子治療臨床研究結果から、GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞ワクチン接種のみでは十分な抗腫瘍効果を期待しにくいことが示唆されたものの、その腫瘍特異的免疫誘導効果は明らかに認められたことから、今後 GM-CSF 遺伝子導入腫瘍ワクチンの抗腫瘍免疫効果をより増強する方法との併用療法の開発が強く望まれる。その候補として、本基礎研究結果からケモカイン遺伝子(特に TARC 遺伝子)、gp96 分子、TWEAK/Fn14 遺伝子などとの併用療法が考えられた。特に、TARC 遺伝子ならびに gp96 分子に関しては実際に *in vivo* での抗腫瘍免疫誘導効果を観察しており、今後詳細な前臨床研究の実施は重要であると考えられた。また、ペプチドパルス樹状細胞療法は抗癌剤や放射線に対して抵抗性を示す進行消化器癌に対しても効果を発揮することが本研究成果として示されており、その抗腫瘍免疫誘導機序の面からも GM-CSF 遺伝子治療との併用効果が最も直接的に期待できるパートナーである可能性も高く、今後の新規遺伝子治療臨床研究での検証が必要であると考えられた。

一方、本臨床研究第1症例で経験した、GM-CSF 遺伝子導入ワクチン細胞の接種により一部の転移腫瘍は著明に縮小したものの、他の部分では進行していたという事実から、腫瘍細胞の免疫寛容化の問題を今後どのように解決していくかが極めて重要である。CTLA-4 と同じ CD28 ファミリーに属する新規抑制補助シグナル分子 programmed death-1 (PD-1) およびそのリガンド PD-L1 と PD-L2 の研究成果から、PD-L1 の免疫寛容誘導への関与が示され、今後抗腫瘍免疫寛容解消にむけての新たな免疫療法開発に対する示唆が得られたものと期待される。

さらに将来の遺伝子治療等の新規開発薬剤治療においては腫瘍の発現解析を行い、どのような腫瘍が転移しやすいか、どのような腫瘍が治療に反応するか、どのような遺伝子型をもった患者が治療に対して副作用が出現しにくいかなどの体細胞並びに腫瘍細胞のゲノム情報を駆使した治療の実施が行われてくるものと考えられ、腫瘍細胞のマイクロアレイ解析ならびに SNPs 解析を併用した今後の臨床研究の実施は極めて重要であると考えられた。

本研究により得られた以上の重要な研究成果を今後臨床にトランスレーションして、新たな抗腫瘍免疫療法

の確立をめざす予定である。

## F. 健康危険情報

今回行った遺伝子治療臨床研究では4名に遺伝子導入ワクチン細胞接種箇所に発赤、腫脹、掻痒感といったグレード2の局所副作用(1名で1回のみ水疱形成・グレード3局所副作用)と2名に37度台の発熱といったグレード1の全身性副作用を認めたがいずれもプロトコール上、遺伝子治療臨床研究を進める上での中止基準にはあたらず、自然に軽快した。また一般臨床検査の範囲内では、遺伝子治療が原因と思われる明らかな副作用の出現は観察されなかった。一部の患者で一過性の好酸球増多が認められたが、これも短期間のうちに正常範囲へ復した。

また、ペプチドパルス樹状細胞療法臨床研究の過程においては、有害事象は特に認められなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Duda, DG, Sunamura, M., Lozonschi, L., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Motoi, F., Horii, A., Tani, K., Asano, S., Nakamura, Y., Matsuno, S. Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumor angiogenesis. *Br. J. Cancer* 86: 490-496, 2002
- 2) Ohata, J., Sakurai, J., Saito, K., Tani, K., Asano, S., Azuma, M. Differential graft-versus-leukemia effect by CD28 and CD40 costimulatory blockade after graft versus-host disease prophylaxis. *Clin Exp Immunol* 129:61-68, 2002
- 3) Tani, K. Immunotherapy using GM-CSF gene for metastatic renal cell cancer. International Symposium: Cancer Gene Therapy. 213-223, 2002 (Eds) Ochiai, T., Matsubara, H.
- 4) Kawai, K., Tani, K., Yamashita, N., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Fujime, M., Okumura, K., Kakizoe, T., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R., Yamauchi, A., Noguchi, M., Asano, S., Akaza, H. Advanced renal cell carcinoma treated with granulocytemacrophage colony-stimulating factor gene therapy: A clinical course of the first Japanese experience. *Int. Journal of Urology*, 9:462-466. 2002
- 5) Harada, N., M. Nakayama, H. Nakano, Y. Fukuchi, H. Yagita, and K. Okumura. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *BBRC* 299. 488-493. 2002
- 6) Tanaka F, Yamaguchi H, Ohta M, Mashino K, Sonoda H, Sadanaga N, Inoue H, and Mori M. Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo, *Int. J. Cancer*, 101: 265-9, 2002
- 7) Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta

M, Shibuta K, Inoue H, Mori M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma, *Cancer Res.* 62: 2937-41, 2002

- 8) Iwasaki A., Kawai K., Hayashi H., Ikeda N., Toida I., Ohtani M., Akaza, H.: Immunological protection induced by Bacillus Calmette-Guerin (BCG) treatment in a murine bladder tumor model. *Int J Urol* 9:219-224, 2002
  - 9) Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, T.A., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. *Bone Marrow Transplantation* 29: 197-204, 2002
  - 10) Iwai H., Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K., Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of ICOS-B7h costimulation. *J Immunol.*, 169:4332-4339. 2002
  - 11) Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll D M, Okumura K., Azuma M., Yagita H. Expression of PD-1 ligands by murine T cells and antigen-presenting cells. *J Immunol.*, 169, 5538-5545. 2002
  - 12) Akaza H., Homma Y, Okada K, Yokoyama M., Usami M., Hirao Y., Tsushima T., Ohashi Y., Aso Y. and the Prostate Cancer Study Group. A prospective and randomized study of primary hormonal therapy for patients with localized or locally advanced prostate cancer unsuitable for radical prostatectomy: results of the 2-year follow-up. *Brit J Urol Int.*, 91: 33-36, 2003
  - 13) Nakayama, M., K. Ishidoh, Y. Kojima, N. Harada, E. Kominami, K. Okumura, and H. Yagita. Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Mediates Multiple Pathways of TWEAK-Induced Cell Death. *J Immunol*, 170: 41-348. 2003.
  - 14) Bai, Y., Soda, Y., Izawa, K., Tanabe, T., Kang, X., Tojo, A., Hoshino, H., Miyoshi, H., Asano, S. and Tani, K. Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector. *Gene Therapy* 2003 (in press)
  - 15) Kojima, T., Yamazaki, T., Tamura, Y., Ogura, S., Hizawa, N., Yamaguchi, E., Tani, K., Kinoshita, I., Nishimura, M. and Dosaka-Akita, H. Tumor-derived Gp96 combined with GM-CSF gene-transduced tumor cells inhibit tumor growth in mice through migration and maturation of CD11c+ cells. *Human Gene Ther.* 2003 (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) Nakayama, M., Ishidoh, K., Kojima, Y., Harada, N., Kominami, E., Yagita, H., and Okumura, K. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. TNF superfamily conference 2002. San Diego, USA. 2002.

- 2) Harada, N., Nakayama, M., Nakano, H., Yagotam H., and Okumura, K. Por-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). TNF superfamily conference 2002. San Diego, USA, 2002

Mori M:

Dendritic Cell Vaccination with MAGE Peptide for Gastrointestinal Cancer.

Meeting of the Korean Association.. The 28th Annual  
Seoul, Korea, June 21, 2002

- 4) Oyaizu N., Kawai K., Yamashita N., Tojo A. Nakazaki Y., Takahashi K. Ooiwa M., Soda Y., Hanazawa K., Wakumoto Y., Okumura K., Akaza H., Fujime M., Cliff S., Ando D., Mulliga R., Asano S., Tani K.

Immunohistochemical Evaluation of Renal Cell Carcinoma Treated with GM-CSF-Gene Transduced Lethally Irradiate Autologous Tumor Cell Vaccine(GVAX), The 5<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Society of Gene Therapy., Boston, June 5-9, 2002

- 5) Soda Y., Tani K., Bai Y., Saiki M., Nakazaki Y., Li X., Chen M., Izawa K., Sasaki E., Nishioka C., Ooiwa M., Takahashi K., Tojo Miyoshi H., Katagiri T., Takahashi T., Nakamura Y., Asano S.

Influence to Gene Expression of Human Cord Blood Hematopoietic Cells by Gene Transduction Using a Third-generation Self-inactivating Lentiviral Vector  
The 5<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Society of Gene Therapy, , Boston, June 5-9, 2002

- 6) Tsushima F, Iwai H, Omura K, Yagita H, Okumura K., Azuma M. Role of PD-1 and its ligands in Murine Contact Hypersensitivity. *Biology* 2002 American Association of Immunologist, April 20-24, 2002

- 7) 田中 文明、増野 浩二郎、山口 博志、太田 光彦、井上 裕、森 正樹

樹状細胞の癌局所投与を用いた新しい腫瘍特異的免疫化学療法の開発

第61回日本癌学会総会、東京 (2002.10.2.)

- 8) 河合弘二、及川剛宏、西條薫、大野忠夫、赤座英之 : 転移腎癌に対する自家 CTL を用いた細胞療法、第61回日本癌学会総会、東京 (2002.10.1-3)

- 9) 別府良人、長谷英徳、中崎有恒、谷憲三朗 GM-CSF 遺伝子導入抗腫瘍動物モデルで形成された腫瘍の SAGE による遺伝子解析で発現増強していた chemokine の抗腫瘍効果における役割

第25回 日本分子生物学会年会、横浜 (2002.12.11)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特になし。

# 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

分担研究報告書

GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種による遺伝子治療法の開発と臨床研究

主任研究者 谷憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態分野・教授  
分担研究者 浅野茂隆 東京大学医科学研究所・分子療法研究分野・教授  
佐藤典治 東京大学医科学研究所附属病院・ゲノム診療部・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」への参加に同意が得られた後、安全性に問題がなく GM-CSF 遺伝子産生量が十分確保された GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞ワクチンを作製でき、その接種を受けた第 IV 期腎細胞がん患者4名について、患者における接種後の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出現の有無をそれぞれ免疫学的もしくは画像診断により評価した。4患者への接種は著明な副作用の出現なく完了し、全ての患者で一過性もしくは長期にわたる培養自家腎癌細胞に対する細胞障害性T細胞の出現を認めた。この中で3患者は接種開始後現段階(平成15年3月)で、3年9ヶ月、3年1ヶ月ならびに2年3ヶ月生存中であり、特に2患者においては病状の安定化と良好な生活の質の維持を認めている。基礎研究としては、1) GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される分子を同定し、マウスでの in vivo 研究を実施した。2) GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞ワクチン接種を受けた患者の接種後血清を用いて SEREX 法により本免疫遺伝子治療が患者体内に誘導した抗腫瘍免疫に関連性の深い抗原分子の検出を行った。さらに3) 今後の遺伝子治療臨床研究で重要となると考えられる新規遺伝子導入ベクターの検討ならびに副作用出現予測などを目的とした SNP 検索を実施した。

#### A. 研究目的

他臓器への転移を認める第 IV 期腎癌患者に対しては、現在有効な治療手段はなく、多くの患者は2年以内に死亡しており、新たな治療法の開発が強く望まれている。近年導入された骨髄非破壊的同種移植療法も、HLA 一致同種ドナーが必要であり、移植後の移植片対宿主病による患者 QOL の著明な低下が発生する可能性から、一般的医療に至るまでにはなっていない。一方、最近の臨床研究結果から、腎癌に対する免疫療法の有用性が示唆されている。また放射線照射・GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍細胞(以下 GVAX と省略)の抗腫瘍免疫誘導能もマウスを用いた前臨床研究結果より示唆されており、米国等において、進行期のメラノーマ、腎癌、肺癌、前立腺癌、膵臓癌などの患者を対象に、GVAX を用いた臨床研究が実施され、結果も報告されてきている。本療法はいずれの臨床研究においても安全性が高く、患者体内に接種細胞数に応じた抗腫瘍免疫が誘導されている。現在我々が実施中の第 IV 期腎癌を対象にした臨床研究では此迄の結果を元に、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新たな GVAX 投与量を設定し、その投与実施の可能性と安全性の評価を行う。同時に実際に患者に誘導された抗腫瘍免疫を、免疫学的検査と画像診断で詳細に検討・評価する。

さらに本療法の経済性・汎用性を考慮すると、今後新たな GM-CSF 遺伝子導入細胞作成法の導入が必要であ

る。その候補としてはアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入・細胞処理を簡略化する方法と、遺伝子導入同種細胞株を用いる方向性があり、本研究では次期の遺伝子治療臨床研究の方向性を決定する。さらに本研究では GM-CSF 遺伝子導入細胞接種が患者体内で誘導する抗腫瘍免疫を分子生物学的に詳細に解析し、関与する新規分子の検出、併用治療法開発の可能性についても検討し、治療法開発につなげることを目的とする。

#### 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:平成14年度は GVAX 接種を平成10年から13年までに東京大学医科学研究所附属病院において受けた4患者のうち生存中の3患者において、接種終了後の定期的な経過観察を、血液学的、生化学的、免疫学的に実施すると共に、画像診断により転移病巣の経過観察を行った。さらに臨床研究中に保存した、患者血液ならびに組織標本をさらに免疫学的側面から詳細に検討した。また FDA の規定通り定期的に末梢血を採取して複製可能レトロウイルス(RCR)が生じていないことも確認した。また採取した検体を病理学的に詳細に解析した。

(2) GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される新規免疫遺伝子治療法の検討:(a)SAGE 法で同定された GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される遺伝子の解

析:GM-CSF 遺伝子導入抗腫瘍動物モデルの10日目の腫瘍について、SAGE 法による遺伝子解析を行った。退縮する腫瘍で発現上昇していた分子についてはマウス皮膚から total RNA を抽出し、RT-PCR 法によりその cDNA を特異的に増幅し pCR4blunt-TOPO (invitrogen 社)にサブクローニングした。目的遺伝子をレトロウイルスベクター (PMx neo) に組み込み、WEHI-3B 細胞に遺伝子導入し、限界希釈法により細胞クローニングを行った。クローニングした目的遺伝子を導入した WEHI-3B 細胞を BALB/c マウスに皮下接種し腫瘍形成の経過について観察した。(b) 腫瘍由来熱ショック蛋白質 gp96 と GM-CSF 遺伝子導入細胞併用による治療的抗腫瘍効果の基礎的検討:C57BL/6 マウスに  $1 \times 10^5$  のマウス肺癌細胞 (LLC; Lewis Lung Cancer)を右側皮下に移植し、LLC から精製した gp96、GM-CSF 遺伝子導入 LLC 細胞 (LLC/GM)、分泌型 gp96 融合蛋白質 (gp96-Ig) 遺伝子導入 LLC 細胞 (LLC-gp96-Ig)を左側皮下に治療的に用い腫瘍増大速度を測定した。各種ワクチンをうけたマウスの脾細胞を取り出し CTL assay を行った。また、各種ワクチンをうけたマウスの血清を採取し、LLC タンパクに対する抗体を Western blotting にて検討した。さらに、各種ワクチンをうけたマウスの所属リンパ節の総細胞数、CD11c 陽性細胞比率および CD11c 陽性細胞のうちの成熟細胞比率および gp96 受容体 CD91 発現を検討した。

(3) GVAX 接種を受けた患者血清が認識する腎癌特異的抗原の同定:本臨床研究第2症例の培養腎癌細胞から mRNA を抽出し、cDNA を合成した。λファージ発現ベクター(Zap Express)に cDNA を一方向性に組み込み発現ライブラリーを構築した。常法によりファージライブラリーをニトロセルロース膜に吸着させ、これと第2症例の治療後血清を反応させて、陽性プラークを検出した。単離された陽性クローンに対する血清中抗体の存在の有無を、健常人、腎細胞がん患者において比較検討した。

(4) 悪性腫瘍細胞への新規遺伝子導入法の開発:レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法での GM-CSF 遺伝子導入細胞作製効率は 100%ではなく、遺伝子治療臨床研究をより多くの患者に実施する上では、より効率の高いベクターの導入が必須である。本研究では HIV-1 由来の第三世代 HIV(VSV)ベクターの transfer vector を改良し、既存の MLV(VSV)ベクターとの比較検討を、現在最も遺伝子導入が困難であるヒト白血病細胞ならびにヒト CD34 陽性細胞を対象に実施した。

(5) 日本人におけるサイトカイン・サイトカインレセプター遺伝子の SNPs 解析:遺伝子治療臨床研究が phasell

あるいは phasell に進行した場合、治療に最適な患者の選別に役立つ事を期待して正常日本人の SNPs 頻度を検索した。すなわち、サイトカイン・サイトカインレセプター遺伝子の SNPs 解析を direct sequencing 法と、SNaPshot 法を用いて行い、JSNP に未登録の遺伝子については、Denaturing HPLC 法でスクリーニングを行い、direct sequencing で確認した。

#### (倫理面への配慮)

1. 本遺伝子治療臨床研究の対象となった患者には詳細な説明および同意書を用いて腎がんの病名告知・予後告知も行い、その後の精神的サポートを十分に行っている。これら臨床研究結果の内容で患者のプライバシーに深く関連する内容に関しては一切公表していない。特に遺伝子治療を受けた患者へは遺伝子治療臨床研究で発生した海外での副作用などの事象に関する情報については常に知り得た情報を提供し続けている。また診療内容・副作用の報告を担当省へ規定通り行い、公開性を保っている。
2. FDA で定められた接種患者末梢血中の RCR 出現の有無を定期的に確認すると共に全身性の副作用の有無を患者生存中は定期的に観察している。
3. 遺伝子組み換え実験や前臨床動物実験は各大学の倫理等規約に則って実施している。
4. 正常人の SNPs 解析を行うにあたっては、当研究所の倫理委員会の承認を受けている。正常ボランティアからは書面で承諾を頂き、DNA サンプルは連結不可能匿名化した後、解析にあてるようにしてある。

#### C. 研究結果及び考察

- (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:規定の GVAX 接種を完了し、生存中の患者3名については、東大医科研もしくは順天堂大附属病院にて現在経過観察中である。3 患者(第2-4症例)には接種中間題となる副作用は出現せず、接種開始よりそれぞれ3年10ヶ月、3年4ヶ月、2年4ヶ月間生存中である。これら患者の末梢血中には自家腎癌細胞に対する CTL が検出され、各症例においてはオリゴクローン性の Tリンパ球の増生が GVAX 接種後に検出された。なお各患者の末梢血中には RCR は認められなかった。生存中の各患者の経過概略を以下に示す。1) 71歳男性(第2症例)、右腎細胞癌、仙骨転移:平成 11 年 4 月に右腎臓摘出、同年6月より平成 12 年 2 月まで計 17 回の遺伝子導入細胞の接種を行った。この間接種部分の第2度の副作用(発赤、硬結、搔痒感)以外は著明な全身性副作用の出現なく、患者末梢血 T 細胞中には自家腎癌細胞に対して持続的に CTL 活性が検出された。また平成12年5月に仙骨転移病巣を生検したところ、生検部分は全て壊死に陥っており、同部位に末梢血と同様なオリゴクローン性の T細胞の浸潤を認めた。同患者は接種中ならびに接種後も2年6ヶ月間安定状態が続いた。

その後平成13年12月に右大腿部に転移病巣1カ所が認められ、同部分に放射線照射後、低量 IL-2 を全身投与し、現在まで安定状態が15ヶ月続いている。2) 57 歳女性、左腎細胞癌、多発性肝転移、多発性肺転移、平成12年2月より9月まで15回の遺伝子導入細胞の接種を行った。その間、接種局所の第2度の副作用以外は著明な全身性の副作用は認められておらず、接種後肝臓転移病巣の増殖速度の鈍化を一旦認めましたが、その後も依然病巣は増大傾向にある。末梢血ならびに皮内反応部分にはオリゴクローン性のT細胞浸潤を認めた。末梢血中に自家腎癌細胞に対するCTL活性を認め、そのレベルは接種期間中持続された。平成12年9月29日に本附属病院を退院後順天堂大学病院へ転院し、本人の希望でインターロイキン2 (IL-2) またはインターフェロン $\alpha$  の接種を開始したが、開始1週目より各薬剤によると考えられる肝機能異常が出現したため中止し、肝機能異常が改善した段階で外来通院とした。その後腫瘍増大を認めたもののPS01-2 で経過していたが、平成14年12月に右腸骨およびL4 転移、平成15年1月に舌根部一喉頭、平成15年2月に右中前頭葉部に各々腎癌転移を認め、手術並びに放射線照射を実施された。現在 PS4 にて順天堂大学附属病院で入退院を繰り返しながら経過観察中である。3) 50 歳男性、左腎細胞癌、多発性肺転移:2000年7月に胸部異常陰影を健康診断で発見され、腎癌肺転移との最終診断を受けた。同8月に適応症例と判断され9月20日に左腎臓摘出術を施行した。10月25日に遺伝子導入自家腎癌細胞を全て回収した。安全性確認後、12月13日より平成13年2月20日迄計6回の遺伝子導入細胞の接種を行った。この間接種部分の第2度の副作用に加え、第6回目は接種部分に搔痒感を原因とした擦過によると考えられた水疱が形成された(局所第3度)ものの著明な全身性副作用の出現はなく、患者末梢血リンパ球中には自家腎癌細胞に対して低いレベルではあるが持続的に CTL 活性が検出された。接種中肺転移病巣には混合反応(一部縮小、一部増大)を認めた。患者は6回目の接種を終了した段階の MRI 検査上、右前側頭葉皮質に径1cm弱の腫瘍ならびに周辺浮腫像を認めたため追加接種は行わず、同部位への $\gamma$ ナイフ治療と腫瘍摘除、低量 IL-2 投与を行った。その後安定状態が1年7ヶ月続いている。

(2) GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される新規免疫遺伝子治療法の検討: (a) SAGE 法で同定された GM-CSF 遺伝子治療との併用が期待される遺伝子の解析; GM-CSF 遺伝子を導入した WEHI-3B 細胞を接種してから10日目の退縮する直前の腫瘍の SAGE

による遺伝子解析では、ケモカイン遺伝子等の発現が上昇していた。その他、血管新生を阻害する plasminogen activator inhibitor 1 やマトリックスメタロプロテアーゼインヒビターなどの腫瘍の増殖、転移を抑制する遺伝子の発現が上昇していた。最近では免疫遺伝子治療に使用する分子としてケモカインが検討され始めているため、抗腫瘍効果を検討する分子としてケモカインを選択した。発現上昇していたケモカインの中から今回は樹状細胞と関連するケモカインとして TARC と RANTES を選択し WEHI-3B 細胞に遺伝子導入した。さらにそれぞれと GM-CSF を共発現する WEHI-3B も作製した。これまでの結果では、TARC 産生 WEHI-3B 細胞は GM-CSF 産生 WEHI-3B 細胞とほぼ同様に腫瘍増殖が抑制された。TARC と GM-CSF を共に産生する WEHI-3B 細胞はさらに強く増殖が抑制され、80%の確率で腫瘍が消失した。一方、RANTES 産生 WEHI-3B 細胞は GM-CSF 産生 WEHI-3B 細胞よりも強く腫瘍増殖が抑制され、RANTES と GM-CSF を共に産生する WEHI-3B 細胞では 50%の確率で腫瘍が消失した。以上の結果は、GM-CSF 遺伝子導入腫瘍移植動物モデルにおいて、TARC および RANTES が抗腫瘍効果誘導に強く関与することを示唆した。抗腫瘍免疫の誘導機序として TARC は IL-4 を産生する Th2 細胞を遊走することによる樹状細胞の成熟化と抗体依存性細胞傷害作用の促進、RANTES は細胞傷害性 T 細胞の遊走が考えられた。

(b) 腫瘍由来熱ショック蛋白質 gp96 と GM-CSF 遺伝子導入細胞併用による治療的抗腫瘍効果の基礎的検討: C57BL/6 マウスの LLC 治療モデルにおいて、LLC 由来 gp96、LLC/GM、LLC-gp96-Ig のいずれも単独投与で母細胞の増殖をわずかながら抑制したが、LLC 単独、あるいは正常肝由来 gp96 では抑制効果はみられなかった。LLC 由来 gp96 の母細胞に対する治療的抗腫瘍効果は LLC/GM との併用によって有意に増強された。一方で LLC-gp96-Ig と LLC/GM との併用による相乗効果は認められなかった。In vivo depletion study では、LLC 由来 gp96 と LLC/GM 併用群でみられた抗腫瘍効果は CD8-depleted mice ではほぼ消失し、CD4- および NK1.1-depleted mice においてもその効果は部分的に減弱した。LLC 由来 gp96 と LLC/GM の併用ワクチンをうけたマウスから採取した脾細胞は LLC に対する特異的殺細胞効果を認め、これは CD8 陽性 T リンパ球によるものであった。ワクチンをうけたマウスの血清を用いた Western blotting では、gp96、LLC/GM 単独投与群で新たな band の出現を認め、これらのワクチン



が抗体系の反応を生じていることが示唆された。しかし併用群では band の増強は認められず、併用による治療的抗腫瘍効果の増強には関与していない可能性が考えられた。ワクチンをうけたマウスの所属リンパ節の総細胞数及びCD11c陽性細胞比率はgp96、LLC/GM単独投与群で有意に増加し、併用群では更なる増加を認めた。またこれらのCD11c陽性細胞のうち、成熟細胞比率は併用群で最も高かった。しかしCD91の発現には優位な差を認めなかった。

(3) GVAX 接種を受けた患者血清が認識する腎癌特異的抗原の同定: (a)ライブラリー構築とスクリーニング; パッケージ直後の力価が  $1.1 \times 10^6$  サイズの cDNA 発現ライブラリーが構築できた。LacZ 発現による cDNA 組み込み率判定は 95%以上であった。またクロニングサイト両側にある T3/T7 プロモータ配列を用いた PCR により cDNA インサート長は約 0.5~2.0 kB (平均約 1 kB)であった。第2症例の治療開始後1~3ヶ月の血清を用いて、1次/2次スクリーニングおこない8クローンの陽性プラークが得られた。これらのインサートの塩基配列決定の結果、7種類の既知遺伝子が抗原としてクローン化されたことがわかった。(b)各抗原に対する血清中抗体の出現頻度; 健康人(n=6)の血清中抗体の存在を検討した結果、7抗原中3抗原が健康人でも抗体が産生されていた。また遺伝子治療を受けた症例については、現在検討中ではあるが少なくとも1抗原において4症例中3症例で抗体が産生されていたが、この抗原に対しては正常人でも抗体が存在していた。

(4) 悪性腫瘍細胞への新規遺伝子導入法の開発: 10種の白血病細胞株の大部分で、HIV(VSV)ベクターにより、ほぼ 100%の導入効率が 2ヶ月間引き続き認められたが、MLV(VSV)ベクターでは 10-40%であり発現は経時的に減弱した。11種の患者由来白血病細胞での遺伝子導入効率は、HIV(VSV)ベクターにより8細胞で60%以上、MLV(VSV)ベクターにより9細胞で60%未満の遺伝子導入効率であった。PHA刺激後IL-2存在下で培養した健康人末梢血リンパ球(PBL)での遺伝子導入効率は、HIV(VSV)ベクターで平均86%、MLV(VSV)ベクターでは19%であった。未刺激のPBLではHIV(VSV)ベクターにより平均39%の細胞でGFP発現を認めたが、MLV(VSV)ベクターによる発現は認めなかった。臍帯血由来ヒトCD34陽性細胞ではHIV(VSV)ベクターによる遺伝子導入効率はサイトカイン刺激時で90%以上で、未刺激時でも約30%であったが、MLV(VSV)ベクターでは遺伝子導入不可能であった。また、遺伝子導入後二週間目に形成された造血

細胞由来コロニーへの遺伝子導入効率は何れのベクターでも100%であったが、染色体DNAへの遺伝子の組み込みはHIV(VSV)ベクターでは平均97%のコロニーで認められ、MLV(VSV)ベクターでの平均3%と大きな差が認められた。

(5) 日本人におけるサイトカイン・サイトカインレセプター遺伝子のSNPs解析: SNPs検索は60個所を検索できるようにした事に加え、未登録SNPsを10個所明らかにした。対象患者が少ない場合治療効果に関連するSNPsを統計学的に見つける事は不可能であるが、将来 phase II, phase III へすすんだ場合、これらSNPsを用いて治療反応性の個体を判定する事が出来るかもしれない。

#### D. 結論

自家腎癌を用いたGM-CSF遺伝子導入ワクチンの作製は6例とも安全に作製はできたが、GM-CSFの十分な産生量が4例で確保できた。同ワクチン細胞接種を受けた4例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と共に、患者体内に検出可能な腫瘍特異的免疫反応の誘導を短期もしくは長期的に観察できた。臨床的にも1例で安定状態、1例で混合反応をワクチン接種期間に認めた。また2例では低量IL-2の併用により、長期に安定した状態が続いている。以上の結果から、本遺伝子治療は実施可能であり、安全性も高く、抗腫瘍免疫を患者体内で誘導できた。臨床的效果に関しては低量IL-2の全身療法との併用により、得られる可能性が示唆された。一方で、今後の臨床展開を考慮した場合に多数患者での実施を必要とすることから、GM-CSF遺伝子導入ワクチン細胞の作製においてはその効率をほぼ100%にする必要があり、他の方法を導入する必要があるものと考えられた。この観点から既存のアデノウイルスベクターならびに以下の新規HIV(VSV)ベクターを用いる方法は今後さらに検討をしていくべき方法であると考えられた。さらに同種GM-CSF産生細胞の導入も検討していく考えである。

基礎研究成果では、1)GM-CSF遺伝子導入抗腫瘍動物モデルにおいてケモカインのTARCおよびRANTESは抗腫瘍作用に関与する分子であることが示唆された。今後、これらケモカインによる抗腫瘍作用機序の検討を行うと共に次期免疫遺伝子治療への応用を検討していく予定である。2)マウス肺癌に対する腫瘍由来gp96とGM-CSF遺伝子導入細胞との併用により、CD11c陽性細胞の成熟と特異的殺細胞効果を持つCD8陽性Tリンパ球の増加とともに、治療的抗腫瘍効果は有意に増強され、癌免疫療法において新たな治療戦

略になると考えられた。3)スクリーニングについては、手技的に改善の余地があるため続行して行い陽性クローン数を増やす。また、本研究では治療によって新たに認識されるようになった抗原に着目していることから、これらの抗原に対し治療前後で血清中抗体の反応性に差異が生じているか検討しているが、現在の方法では検出感度が不十分であるため、抗原タンパク質を精製してELISA, Western blottingなどで測定できるようにアッセイ系の確立を試みている。4) HIV(VSV)ベクターによる遺伝子導入効率、MLV(VSV)ベクターによる方法と比べかなり良好で、血液細胞に対する遺伝子導入法として極めて優れていた。特に患者由来白血病細胞、未刺激状態の末梢血単核球および臍帯血造血細胞への遺伝子導入法としては HIV(VSV)ベクターのみが実用レベルに達していると考えられる。また、染色体 DNA への遺伝子組み込み効率は著しく高く、これが長期間の導入遺伝子発現が可能な理由の一つであることが示唆された。5) 将来の遺伝子治療においては腫瘍の発現解析を行い、どのような腫瘍が反応するか、どのような遺伝子型をもった患者が反応しやすいかといったゲノム情報を駆使した上で治験を進める事になるものと考えられ、SNPs 解析を併用した今後の臨床研究の実施は重要であると考えられた。

以上の研究成果を今後臨床にトランスレートして、新たな抗腫瘍免疫療法の確立をめざす予定である。

## E. 健康危険情報

特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ooi, J., Iseki, T., Ito, K., Mori, Y., Sato, H., Takahashi, T., Ishii, N., Tomonari, A., Tojo, A., Tani, K., Asano, S. Successful unrelated cord blood transplantation for relapse after autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 43:653-655, 2002
- 2) Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, T.A., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. *Bone Marrow Transplantation* 29: 197-204, 2002
- 3) Duda, DG., Sunamura, M., Lozonschi, L., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Motoi, F., Horii, A., Tani, K., Asano, S., Nakamura, Y., Matsuno, S. Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumor angiogenesis. *Br. J. Cancer* 86: 490-496, 2002

- 4) Ohata, J., Sakurai, J., Saito, K., Tani, K., Asano, S., Azuma, M. Differential graft-versus-leukemia effect by CD28 and CD40 costimulatory blockade after graft versus-host disease prophylaxis. *Clin Exp Immunol* 129:61-68, 2002
  - 5) Tani, K. Immunotherapy using GM-CSF gene for metastatic renal cell cancer. *International Symposium: Cancer Gene Therapy*. 213-223, 2002 (Eds) Ochiai, T., Matsubara, H.
  - 6) Asano S. Maxizyme for Lymphomas and leukemia *International Symposium: Cancer Gene Therapy*. 255-274, 2002 (Eds) Ochiai, T., Matsubara, H.
  - 7) Kawai, K., Tani, K., Yamashita, N., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Fujime, M., Okumura, K., Kakizoe, T., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R., Yamauchi, A., Noguchi, M., Asano, S., Akaza, H. Advanced renal cell carcinoma treated with granulocytemacrophage colony-stimulating factor gene therapy: A clinical course of the first Japanese experience, *Int. Journal of Urology*, 9:462-466, 2002
  - 8) Tomonari, A., Shirafuji, N., Iseki, T., Ooi, J., Nagayama, H., Masunaga, A., Tojo, A., Tani, K. and Asano, S. Acquired pulmonary alveolar proteinosis after umbilical cord blood Transplantation for acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology* 70:154-157, 2002
  - 9) Nagayama, H., Ooi, J., Tomonari, A., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Takahashi, T.A. and Asano, S. Severe immune dysfunction after lethal neutron irradiation in a JCO nuclear facility accident victim. *Int. Journal of Hematology*, 76:157-164, 2002
  - 10) Bai, Y., Soda, Y., Izawa, K., Tanabe, T., Kang, X., Tojo, A., Hoshino, H., Miyoshi, H., Asano, S. and Tani, K. Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector. *Gene Therapy* 2003 (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1 Soda Y, Tani K, Bai Y, Saiki M, Nakazaki Y, Li X, Chen M, Izawa K, Sasaki E, Nishioka C, Oiwa M, Takahashi K, Tojo A, Miyoshi H, Katagiri T, Takahashi T, Nakamura Y, Asano S: Influence to gene expression of human cord blood hematopoietic cells by gene transduction using a third-generation self-inactivating lentiviral vector. 5th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, June 2002
  - 2 Bai Y, Soda Y, Takata I, Kuwabara T, Warashina M, Tanabe T, Saiki M, Chen M, Li X, Miyoshi H, Sugita K, Nakazawa S, Tojo A, Taira K, Tani K, Asano S: Induction of Ph1-positive acute lymphoblastic leukemia cell death with Maxizyme targeting minor bcr-abl fusion gene using the third-generation lentiviral vector system. 5th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, June 2002

- 3 Li X, Tani K, Soda Y, Bai Y, Saiki M, Sasaki E, Izawa K, Nishioka C, Nakazaki Y, Miyoshi Y, Tojo A, Asano S: Development of gene therapy targeting neutrophil disorders using gene-modified neutrophils. 5th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, June 2002
- 4 Oyaizu N, Kawai K, Yamashita N, Tojo A, Nakazaki Y, Takahashi K, Oiwa M, Soda Y, Hanazawa K, Wakumoto Y, Okumura K, Akaza H, Fujime M, Clift S, Ando D, Mulligan R, Asano S, Tani K: Immunohistochemical evaluation of renal cell carcinoma treated with GM-CSF-gene transduced lethally irradiated autologous tumor cell vaccine (GVAX). 5th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, June 2002
- 5 Soda Y., Tani K., Bai Y., Takata I., Kuwabara Tl., Warashina M., Tanabe T., Saiki M., Chen M., Li X., Miyoshi H., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Taira K., Asano S. Death of Ph1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Cells with Transduction of Maxizyme Targeting Minor Bcr-Abl Fusion Gene Using a Third-Generation Lentiviral Vector System 第8回日本遺伝子治療学会、東京(2002.7.19)
- 6 Bai Y., Soda Y., Tani K., Saiki M., Nakazaki Y., Li X., Chen M., Izawa K., Sasaki E. Nishioka C., Oiwa M., Takahashi K., Tojo A., Miyoshi H., Katagiri T., Takahashi T., Nakamura Y., Asano S. Influence of Gene Transduction with a Third-Generation Selfinactivating Lentiviral Vector to the Gene Expression of Human CD34-Positive Hematopoietic Cells. 第8回日本遺伝子治療学会、東京(2002.7.19)
- 7 Soda Y., Bai Y., Tani K., Izawa K., Tanabe T., Chen M., Li X., Cho S.G, Miyoshi H., Tojo A., Asano S. EFFICIENT GENE TRANSDUCTION AND INTEGRATION INTO HUMAN BLOOD CELLS WITH A NEW THIRD-GENERATION LENTIVIRAL VECTOR. 29th International Society of Hematology, Korea, Aug 2002.
- 8 Cho S.G, Shuto Y., Soda Y., Nakazaki Y., Izawa K., Takahashi S., Tani K., Tojo A., Asano S. Anti-NK cell treatment induces stable mixed chimerism after fullyMHC-mismatched nonmyeloablative BMT 29th International Society of Hematology, Korea, Aug 2002..
- 9 Izawa K., Tani K., Nakazaki Y., Sugiyama H., Hibino H., Soda Y., Tojo A. and Asano S. HEMOPOIETIC ACTIVITY OF COMMON MARMOSET CD34+ CELLS ISOLATED BY A NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY MA24. 29th International Society of Hematology, Korea, Aug 2002.
- 10 Li X., Tani K., Soda Y., Bai Y., Saiki M., Izawa K., Nakazaki Y., Miyoshi H., Tojo A. and Asano S. Development of HIV(VSV) vectors targeting neutrophil disorders: study of promotor activities in myeloid cells. 29th International Society of Hematology, Korea, Aug 2002.
- 11 Bai Y., Soda Y., Tani K., Saiki M., Nakazaki Y., Li X., Chen M., Izawa K., Sasaki E., Nishioka C., Oiwa M., Takahashi K., Tojo A., Miyoshi H., Katagiri T., Takahashi T., Nakamura Y. and Asano S. Influence on gene transduction with a third-generation SIN lentiviralvector:DNA microarray analysis of gene-transduced hematopoietic progenitorcells. 29th International Society of Hematology, Korea, Aug 2002.
- 12 Soda Y., Tani K., Bai Y., Chen M., Izawa K., Saiki M., Kuwabara T., Warashina M., Tanabe T., Miyoshi H., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Taira K. and Asano S.: Maxizyme, a Novel Ribozyme, Induces Cell Death of Philadelphia Chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia (Ph+ ALL). 44th annual meeting and exposition of the American Society of Hematology, Philadelphia, Dec 2002
- 13 Harata M., Soda Y., Ooi J., Chen M., Takizawa T., Tojo A., Maruyama K., Tani K. and Asano S.: Development of a New Targeting Therapy for Ph+ ALL: Anti-CD19 Antibody-binding Liposome Containing STI571 Efficiently Killed Ph+ ALL Cells. 44th annual meeting and exposition of the American Society of Hematology, Philadelphia Dec 2002

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## 特殊免疫検査への助言・腎細胞がん抗原の同定

分担研究者: 奥村 康 順天堂大学医学部免疫学・教授

### 研究要旨

新規に見いだされた TNF ファミリー分子 TWEAK と、そのレセプターである Fn14 を介したシグナルが、血管新生に重要であることを明らかにし、炎症反応におけるこの分子の重要性を示唆した。

### A. 研究目的

腫瘍拒絶における免疫学的エフェクター機構は、主に腫瘍抗原を認識したキラー細胞による直接の腫瘍細胞の傷害であると推定される。これまでに perforin-granzyme 系による細胞傷害活性の重要性が報告されているが、TNF ファミリーに属する分子もまた、腫瘍拒絶に重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。今回、TNF ファミリーに属する新たに見いだされた分子 TWEAK と、そのレセプターである Fn14 の、腫瘍拒絶および他の生体反応における意義を明らかにするために研究を行った。

### B. 研究方法

新規にヒト TWEAK レセプターとして新たに見いだされた Fn14 に対するアゴニスティック抗体を作製し、血管内皮細胞や腫瘍細胞における Fn14 の発現と、TWEAK/Fn14 の機能について *in vitro* 解析した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は「順天堂大学動物施設の利用内規」、および「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」に基づき、学内での審査を受け、十分な倫理面への配慮をしつつ行われた。

### C. 研究結果

新たに見いだされた TWEAK レセプターである Fn14 に対する抗体を作成し、Fn14 を介して TWEAK が血管内皮細胞に炎症性サイトカインの

分泌や接着分子の発現を誘導することを明らかにした。さらに、Fn14 は細胞内領域に death domain を持たないのにも関わらず、ある種の腫瘍細胞にはアポトーシスやネクローシスシグナルを伝達することを明らかにした。これにより、TNF ファミリーに属する分子が血管新生や炎症にも関与することが明らかにされた。

### D. 考察

TWEAK の腫瘍細胞死誘導や血管新生の促進は Fn14 を介して発揮されることを明らかにした。Fn14 の発現は種々の上皮系腫瘍細胞や増殖因子で刺激した血管内皮細胞などに認められるため、今後、TWEAK/Fn14 をターゲットとした新たな腫瘍制御法を確立したい。

### E. 結論

これまでの研究で、TNF ファミリー分子の多面的な機能を明らかにし、これらの秩序だった制御が遺伝子免疫療法において重要であることを示した。今後、サイトカイン、細胞傷害活性分子、補助シグナル、ケモカイン等の腫瘍に対する直接作用のみならず、血管新生等の腫瘍周辺組織への作用をも考慮した、包括的な腫瘍拒絶の機構を解析する必要があると考えられ、これが臨床応用へ重大な示唆を与えるものと思われる。さらに、可溶性の TNF ファミリー分子も一部知られており、それらが腫瘍の悪性度等に相関する可能性も考えられ、この分野の解析もこれから進めて行きたい。