

は用いた DC のポピュレーションの差にあるかもしれない。これは、より効率的な DC ワクチン療法を確立するために、今後は是非とも解決されるべき問題である。

最近、Tregs の制御による治療戦略を具体的に支持する報告がでた<sup>9)</sup>。熱処理 (heat shock, 43°C 1 時間) と放射線照射した melanoma cell (アポトーシス) でマウスの骨髄細胞から誘導した DC を刺激し、これを用いて予防的 DC ワクチンの可能性を検討した報告である。まず DC ワクチンを行い、その 6 日後に melanoma 細胞を移植する系で、melanoma の生着あるいは増殖を抑制した。興味あることに、DC ワクチン 1 日前に CD25 抗体投与によって Tregs を除去すると、抗腫瘍免疫は増強し、ワクチン 60 日後の時点でも半数のマウスの melanoma 細胞の生着が阻止された (予防的 DC ワクチンの成功)。これら半数のマウスはワクチン後 90 日目に melanoma 細胞を再摂取してもその生着が阻止されている。つまり、Tregs の機能を抑制することで長期間にわたりワクチン効果が維持され、予防的な DC ワクチン療法の可能性が示されたわけである。同時に、この実験系では CTL の効率的な誘導に CD4<sup>+</sup>T 細胞の関与の必要性が示されている。Tregs を制御することで DC ワクチンの効果が高められる理由としては腫瘍特異的 Tregs の存在が示唆されており、一つにはこれら腫瘍特異的 Tregs が抑制されたと想像している。これら腫瘍特異的 Tregs は変異のない腫瘍抗原に特異的なことから、免疫療法に自己抗原を使用する問題も指摘されている。しかし、Tregs の制御は自己抗原を用いた DC ワクチンの系でも強力な Th1 および CTL 誘導することが示されており、Tregs 制御による DC ワクチン効果の増強は、使用する抗原の種類に関係なくより一般的な現象だと思われる。その裏返しとして、自己抗原を用いたマウスの系では Tregs 制御により自己免疫反応が誘導されたという報告もある。しかし、冒頭で紹介した予防的 DC ワクチンの系では Tregs の制御によってもメラノサイトに対する CTL は誘導されず、自己免疫反応もみられなかったと報告されている<sup>9)</sup>。

### Ⅲ. 人工抗原提示システム (artificial antigen-presenting systems)

血液細胞から DC を誘導するには時間、人手および費用に加え、DC の質的あるいは量的不均一性など一般医療としての DC ワクチン開発のために乗り越えなければならない数々の問題がある。これを解決する一つの方法が均一な標品としての人工抗原提示システムの開発である。ここでは、phase I study を含めた前臨床試験の段階へ進んでいる内容を中心に紹介する<sup>10)</sup>。

#### 1. 細胞を応用したシステム

##### 1) 昆虫細胞

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 細胞は、細胞内のペプチドを小胞体の内部に輸送するためのトランスポーター (TAP) を欠いているために内因性のペプチドを MHC 分子に乗せることができない。これに加え、ヒトの MHC class I 遺伝子導入により恒常的に MHC class I 分子を発現させることが可能である。したがって、導入した MHC class I 分子に結合性の任意の合成ペプチドを外来性に添加すれば、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞誘導能を有する抗原提示細胞として用いることができる。本システムは、すでに 10 名の HLA-A2.1 でチロシナーゼ陽性悪性黒色腫患者を対象に phase I study が実施されている<sup>11)</sup>。HLA-A2.1, CD80 および CD54 (ICAM-1) 遺伝子導入 *Drosophila melanogaster* 細胞にチロシナーゼペプチドを乗せ、これを抗原提示細胞として *in vitro* において患者 CD8<sup>+</sup>T 細胞を刺激し、チロシナーゼ陽性細胞に対する CTL を誘導し、これを静脈経路で投与するというプロトコールである。*Drosophila melanogaster* 細胞は 37°C で死滅するため、投与される CTL へ混入することはない。基本的に 1 回 10<sup>8</sup> CD8<sup>+</sup>T 細胞が静脈投与され、計 5 回トータル 5 × 10<sup>8</sup> の CTL が投与されている。特記すべき有害事象はなかったが、CD8<sup>+</sup>T 細胞の腫瘍局所への特異的な集積は認められていない。しかし、2 例に腫瘍縮小効果が認められている。

##### 2) K32 cells

HLA-C が陽性だが HLA-A, HLA-B と DR が陰性のヒト赤白血病細胞である K562 細胞にヒト

Fc $\gamma$  レセプターである CD32 遺伝子を導入することで IgG 抗体が表面に結合可能な K562 細胞に変換し、抗 CD3 および抗 CD28 が結合した K562 細胞（いわゆる K32 細胞）が作製されている。K32 は 500 ml の血液から得たリンパ球を 1 か月以内に  $10^{10}$  個のポリクローナルな T 細胞に増殖させることができる。さらに、K32 は B7-H3, ICAM-1 や LFA-3 を恒常的に発現しており、これら抗体を結合させたビーズに比べ、増殖した T 細胞はサイトカイン産生など機能的に優れた T 細胞であると報告されている。基本的には、K32 は HLA テトラマーなどを結合することも可能で特異的な T 細胞誘導や増殖にも応用可能である。

## 2. 細胞を用いないシステム

### 1) 磁気ビーズ

MHC class I 分子の細胞外ドメインとマウス IgG の heavy-chain 部を短鎖アミノ酸で結合した MHC ダイマーをさらに磁気ビーズに結合し、これに *in vitro* で抗原ペプチドを乗せ人工抗原提示細胞として使用する試みがなされている<sup>12)</sup>。HLA-Ig/ペプチド結合物は非常に安定であり 4°C で保存可能であり、HLA-Ig/抗 CD28 結合磁気ビーズも数か月以上保存可能である。この磁気ビーズによる *in vitro* での CTL 誘導効率 (54.7%) は DC (20.4%) より高く、この CTL は腫瘍細胞に発現している内因性の抗原ペプチドを認識することも確認されている。磁気ビーズの大きな利点は、作製の容易さと抗原提示能の安定性である。さらに臨床応用からみると、細胞培養や特殊なサイトカインの必要がなく GMP-grade の標品が作製可能である。また、抗 CD28/抗 CD3 ビーズと違い、抗原特異的な CTL のみが増殖してくるので CTL として特別に選別回収の必要がない。また、約 40 cc の血液から得ることのできる  $10^6$  個の CD8<sup>+</sup> T 細胞から 2 か月以内に臨床応用可能な量の Mart-1 特異的な CD8<sup>+</sup> T 細胞を誘導可能であったと報告されている。

### 2) リポソーム

細胞間どうしの膜上の分子を介した反応には流動性のある脂質膜上での会合が重要である。したがって、コレステロールとフォスファチジルコリンからなる単層のリポソーム球体 (60 ~ 90 nm) に MHC class II 分子を結合させ抗原提示リポ

ソームを作製、この MHC 分子に抗原ペプチドを乗せ *in vitro* で抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞と混合培養することで T 細胞の増殖と IL-2 分泌が誘導可能であるという報告がある。この結果から脂質膜が HLA 拘束性の抗原提示システムの足場として有用であることが示唆された。

### 3) エキソゾーム (Exosome)

後期エンドソームが内腔にめくれてできた 60 ~ 90 nm の微小小胞が形質細胞と融合し細胞外へ放出されたものをエキソゾームと呼ぶ。エキソゾームについては、ヒツジの網状赤血球が赤血球へと成熟する過程で破棄することが必要な機能分子 (トランスフェリンレセプターなど) を細胞外へ分泌排除するための分泌小胞として紹介されたのが始まりである。ほとんどの細胞がエキソゾームを放出するが、DC の放出するエキソゾームの表面には MHC class I, MHC class II 分子や CD80, CD86 といった補助分子、さらには ICAM-1 などの接着分子も存在し、さらにその内部には抗原ペプチドの運び屋としての機能を有する HSPs が豊富に存在し、マイクロ DC とみなすことができる<sup>13)</sup>。この DC 由来エキソゾーム上の MHC 分子にはペプチド分子が結合しており、新たな抗原ペプチドを乗せることもできる。エキソゾームは少なくとも 6 か月凍結保存が可能であり、GMP-grade のエキソゾーム精製法も報告されている。それによれば、2 ~ 3 l の培養上清から 4 ~ 5 時間で GMP-grade のエキソゾームを回収できる。

エキソゾームワクチンとしては、Mo-DC 由来エキソゾームの MHC class I 分子に抗原ペプチドを乗せ、患者の皮内あるいは皮下へ投与する方法、患者腹水より癌細胞由来エキソゾームを分離しこれを患者皮内あるいは皮下へ投与する方法、あるいは Mo-DC に癌細胞由来エキソゾームを取り込ませ、この Mo-DC によって *in vitro* で末梢血より CTL を誘導しこれを静脈あるいは腹腔内ルートで患者に戻す方法などが考えられている。

このうち、Mo-DC 由来エキソゾームに HLA-A1/B35 および DP04 拘束性の MAGE-3 peptides を乗せて 9 名の stage III / IV MAGE-3 陽性悪性黒色腫患者の治療が行われている。方法は、凍結保存したエキソゾームを最初の 4 週間は

毎週皮下あるいは皮下投与し、病態の進行停止 (SD) を得られた患者ではその後3週間間隔で投与を続けた。エキソゾーム投与は総計6~120回の間であり、特別な有害事象はなく、高濃度のエキソゾーム投与を行った6例中3例に客観的な抗腫瘍反応が認められたと報告されている。しかし、エキソゾームワクチンでCTLを誘導するには、成熟DCの代わりをするようなアジュバント (たとえば、TLR-3あるいはTLR-9のリガンドであるODN CpG oligomeric sequences や double strand RNA など) の併用が必要なようである。

また、癌性腹水中にはエキソゾーム (ExAs) が豊富に蓄積しており、ExAsの応用も考えられている<sup>14)</sup>。ExAsにはMHC class I, MHC class II, hps や tetraspanins CD86 の他 HER2, MART-1, TRP-1, gp100 などの腫瘍関連抗原の存在も確認されている。2~3 lの癌性腹水から  $2 \times 10^{14}$  MHC class I 分子を発現する量のEsAsが得られており、自己EsAsでパルスした自己のMo-DCsは9症例中7例において末梢血リンパ球との混合培養において腫瘍特異的なリンパ球を誘導可能であった。われわれも、現在ExAsによる癌性腹水治療を計画している。このように、DC由来エキソゾームにペプチド抗原を乗せたり、腫瘍細胞を貪食させたDC由来エキソゾームによるワクチン療法に加え癌細胞由来エキソゾームによるワクチン療法が始まろうとしている。

#### おわりに

DCワクチン療法のここ数か月の動向について概要を紹介した。少しでも皆さんのお役に立てることを願い、私の考えるいくつかのキーとなるであろう事柄を記述し項を終えたいと思う。少なくとも臨床レベルの固形癌は、すでに免疫寛容の世界に存在している。したがって、抗腫瘍効果を得るためには、生体に新たに免疫監視システムを作り出すための新たな発想を作りださねばならない。免疫監視システムを作るには、単に免疫担当細胞の機能を強めるだけの努力では不十分であり、免疫反応の場を整える工夫をしなければならないだろう。そして、DCワクチン療法を一般的な治療として育て上げる努力が要求されるであろう。

う。そのためには、治療の手段や効果が客観的に評価できるようなDCワクチン療法を確立しなければならない。その方法の一つは人工免疫システムの開発であろう。客観的な治療法の開発は、感染症に対するワクチンのように癌予防治療への応用の扉を開いてくれるであろう。

#### 文 献

- 1) Hanks, B. A., Jiang, J., Singh, R. A., *et al.*: Re-engineered CD40 receptor enables potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines *in vivo*. *Nat. Med.* (advance online publication on 23 January 2005)
- 2) Waeckerle-Men, Y. and Groettrup, M.: PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57(3): 475-482, 2005.
- 3) Kim, T.W., Lee, J.H., He, L., *et al.*: Modification of professional antigen-presenting cells with small interfering RNA *in vivo* to enhance cancer vaccine potency. *Cancer Res.* 65(1): 309-316, 2005.
- 4) Wagner, H., Heit, A., Schmitz, F., *et al.*: Targeting split vaccines to the endosome improves vaccination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 538-542, 2004.
- 5) Suzuki, T., Fukuhara, T., Tanaka, M., *et al.*: Vaccination of dendritic cells loaded with interleukin-12-secreting cancer cells augments *in vivo* antitumor immunity: Characteristics of syngeneic and allogeneic antigen-presenting cell cancer hybrid cells. *Clin. Cancer Res.* 58(11): 58-66, 2005.
- 6) Collins, M.K. and Cerundolo, V.: Gene therapy meets vaccine development. *Trends Biotechnol.* 22(12): 623-626, 2004.
- 7) Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., *et al.*: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10(9): 942-949, 2004.
- 8) Kubo, T., Hatton, R.D., Oliver, J., *et al.*: Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J. Immunol.* 173: 7249-7258, 2004.
- 9) Prasad, S.J., Farrand, K.J., Matthews, S.A., *et al.*: Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* 174: 90-98, 2005.
- 10) Kim, J.V., Latouche, J.B., Riviere, I., *et al.*: The ABCs of artificial antigen presentation. *Nat. Biotechnol.* 22(4): 403-410, 2004.
- 11) Mitchell, M.S., Darrach, D., Yeung, D., *et al.*: Phase I trial of adoptive immunotherapy with

- cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope. *J. Clin. Oncol.* 20(4) : 1075-1086, 2002.
- 12) Oelke, M. and Schneck, J.P.: HLA-Ig-based artificial antigen-presenting cells : setting the terms of engagement. *Clin. Immunol.* 110(3) : 243-251, 2004.
- 13) Chaput, N., Taieb, J., Scharz, N.E.C., *et al.*: Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53 : 234-239, 2004.
- 14) Andre, F., Scharz, N.E., Movassagh, M., *et al.*: Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360 : 295-305, 2002.
-

## 特別企画

● モノクローナル抗体の現状と展望 ●

## 乳癌に対する Herceptin + 細胞免疫化学療法の可能性

九州大学大学院医学研究院・先端医療医学講座・腫瘍制御学分野

久保 真 森崎 隆 片野 光男

**要旨** HER2 に対するヒト化モノクローナル抗体である Herceptin (trastuzumab) の *in vivo* における抗腫瘍効果機序の一つとして、免疫細胞による抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) に着目した。その結果、HER2 強陽性再発乳癌に対する Herceptin の抗腫瘍効果発現機序の一つは ADCC と考えられた。また、taxane 系薬剤は免疫細胞である NK 細胞の perforin, granzyme B の発現を増強することにより ADCC 効果を増強する可能性が示唆され、Herceptin 療法 + 細胞免疫・化学療法は HER2 強陽性再発乳癌に対して効果的な ADCC を誘導し、Herceptin の免疫学的抗腫瘍活性を増強させると考えられた。

**索引用語** : Herceptin, 細胞免疫療法, ADCC, NK 細胞, paclitaxel

[Biotherapy 19 (5) : 424-429, September, 2005]

**Combination of Chemotherapy and Adoptive Immunotherapy with Herceptin  
for Patients with HER2-Overexpressing Breast Cancer**

Makoto Kubo, Takashi Morisaki and Mitsuo Katano

*Department of Cancer Therapy and Research, Graduate School of Medical Science, Kyushu University*

**Summary**

We focused on antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), one of the efficacy *in vivo* of Herceptin (trastuzumab) which is a humanized monoclonal antibody against HER2, for patients with HER2-overexpressing breast cancer. As a result, it seems likely that antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) plays an important role in the Herceptin-dependent cytotoxicity. Also, it is revealed that taxanes enhances cytotoxicity of natural killer cells, as a immune lymphocytes, due to inducing both perforin and granzyme B expressions. Taken together, these findings suggest that the combination of chemotherapy and Herceptin with various types of activated lymphocytes may be a reasonable therapeutic strategy for HER2-overexpressing recurrent breast cancer, inducing effectively ADCC.

**Key words** : Herceptin (trastuzumab), Adoptive immunotherapy, Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), Natural killer cells, Paclitaxel

**Address request for reprints to** : Dr. Makoto Kubo, Department of Cancer Therapy and Research, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

## はじめに

HER2 強陽性固形腫瘍に対する Herceptin の薬理・臨床学的効果は日々明らかになってきており、最近では術後補助療法においてもその効果が期待されるようになってきている。しかし、*in vivo* の抗腫瘍効果発現機序は未だ明らかではなく、生体内に存在する免疫細胞による抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) をはじめとした免疫学的機序による効果とその一つであると考えられている。今回、HER2 強陽性の進行再発固形腫瘍に対する新しい治療法の確立を目的として、主に乳癌に対する Herceptin および Herceptin + 細胞免疫・化学療法の併用効果発現機序について検討を行った。

### I. 検討 1<sup>1)</sup>

HER2 陽性細胞に対する Herceptin による直接的な細胞増殖の機序としては、Herceptin の HER2 への結合の結果招来される HER2 の down regulation あるいはアポトーシス誘導シグナルの活性化などが報告されている。しかし、*in vivo* における効果発現機序は不明な点が多く、NK 細胞をはじめとする免疫担当細胞による Herceptin 依存性の ADCC などの細胞傷害機序の関与が考えられている。そこで、ヒト乳癌細胞を用いて Herceptin 依存性細胞傷害、特に ADCC 効果について検討した。細胞傷害活性は4時間のクロミウム放出試験にて測定した。

図 1a は、用いた乳癌細胞の HER2 発現強度を FACS 解析した結果を示している。つまり、MDA-MB231 は陰性、Breast-M は弱陽性、そして BT-474 は強陽性乳癌細胞株であることがわかる。図 1b は、これらの細胞に対する末梢血単核球 (PBMC) の細胞傷害活性を Herceptin の有無で検討した結果であるが、Herceptin が共存した場合、HER2 発現株である Breast-M および BT-474 に対しては、PBMC による傷害活性に有意な Herceptin による上乗せ効果が認められる。この Herceptin による上乗せ効果は HER2 が完全に陰性である K562 細胞に対してはまったく認められず (図 1c)、HER2 強陽性である BT-474 に対しては PBMC の数 (量) に依存性に発揮さ

れた (図 1d)。NK 細胞に対してほとんど感受性を示さない BT-474 に対して、Herceptin 併用により高い PBMC による細胞傷害活性の上乗せ効果が得られたことは、Herceptin と細胞免疫療法の併用の有効性を期待させる。

臨床の場合においては、PBMC は IL-2 などで活性化された後に、いわゆる活性化リンパ球として用いられる。したがって、PBMC を IL-2、OKT3 あるいは OK-432 (ピシバニール) などで活性化し、Herceptin による細胞傷害活性の上乗せ効果を再度検討した。PBMC に比べ、IL-2 および OK-432 活性化リンパ球の細胞傷害活性は増強し、この傷害作用は Herceptin の共存によりさらに増強した (図 1e)。こうした研究成果を基に、2003 年に「HER2 陽性の難治性の再発乳癌に対する Herceptin + 細胞免疫療法併用療法」(九州大学医学部倫理委員会承認) がスタートした。

次に、この PBMC 傷害作用における Herceptin の上乗せ効果の機序を解析した。その結果、Herceptin による上乗せ効果は、Fc レセプターの阻害剤である大量の  $\gamma$ -globulin あるいは抗 CD16 抗体によりほぼ完全に消失した (図 1f)。つまり、PBMC 中の NK 細胞を中心とした CD16 (Fc  $\gamma$  R III) 陽性細胞による ADCC が Herceptin の上乗せ効果の主体であることが示唆された。

### II. 検討 2<sup>2)</sup>

現実の臨床の場に目を移すと、HER2 強陽性再発乳癌に対しては Herceptin と taxane 系薬剤を併用した免疫化学療法が実施されており、最近の大規模な前向き臨床試験の結果もこの免疫化学療法の有用性を支持する結果であった。これらの成果と検討 1 の結果を受けて、免疫担当細胞の細胞傷害活性に及ぼす taxane 系薬剤の影響を検討した。taxane 系薬剤は従来の抗癌剤に比べ骨髄抑制作用が比較的小さいといわれているが、当初われわれは、taxane 系薬剤が免疫担当細胞介在の細胞傷害活性を抑制すると予想した。具体的な実験方法は、PBMC と paclitaxel を 24 時間共培養し、その後 paclitaxel を洗浄にて除去し、この paclitaxel 処理 PBMC の BT-474 に対する細胞傷害活性を測定した。結果は予想に反して 1~1,000 nM の paclitaxel 処理により PBMC の傷害活性は

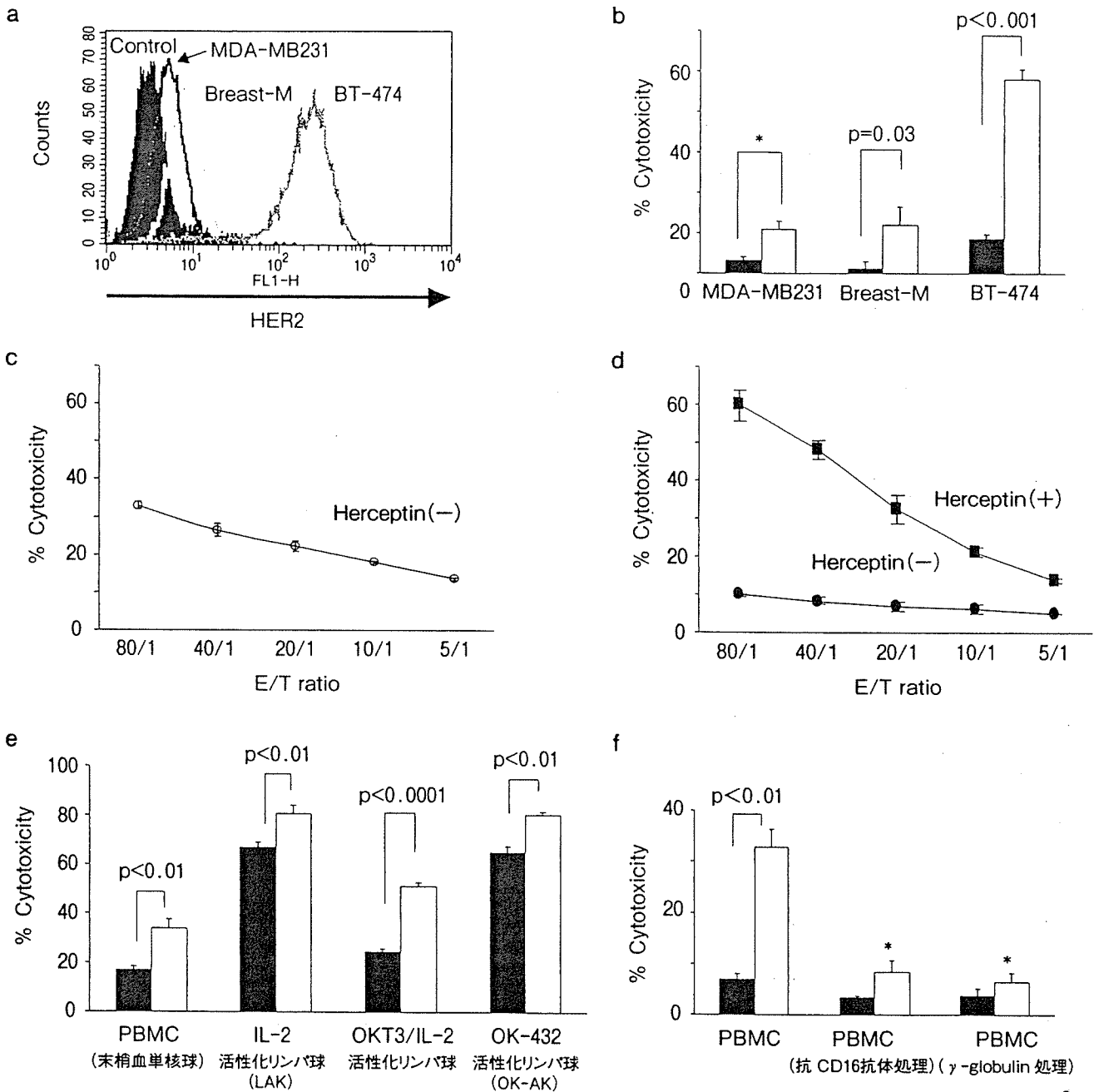


図1 Herceptin 依存性細胞傷害活性について。細胞傷害活性は4時間クロミウム放出試験により測定・定量化した。

■; Herceptin (-), □; Herceptin (+), bar; SD。

a: Flow cytometry による乳癌細胞株のHER2発現の解析。

b: HER2発現の異なる乳癌細胞株をtarget細胞とし、健康人末梢血単核球(PBMC)をeffector細胞とした場合の細胞傷害活性。Effector/target細胞比は40とした。\*; not significant。

c: 乳癌患者PBMCをeffector細胞, K562をtarget細胞とした場合の細胞傷害活性のdose-dependency curve。

d: 乳癌患者PBMCをeffector細胞, BT-474をtarget細胞とした場合のHerceptin依存性細胞傷害活性のdose-dependency curve。

e: PBMC, IL-2, OKT3/IL-2, OK-432で活性化した活性化リンパ球をeffector細胞, BT-474をtarget細胞とした場合のHerceptin依存性細胞傷害活性の増強。Effector/target細胞比は20とした。

f: 抗CD16抗体,  $\gamma$ -globulin処理(assay前30分間)によるPBMCのHerceptin依存性細胞傷害活性の消失。Effector/target細胞比は20とした。

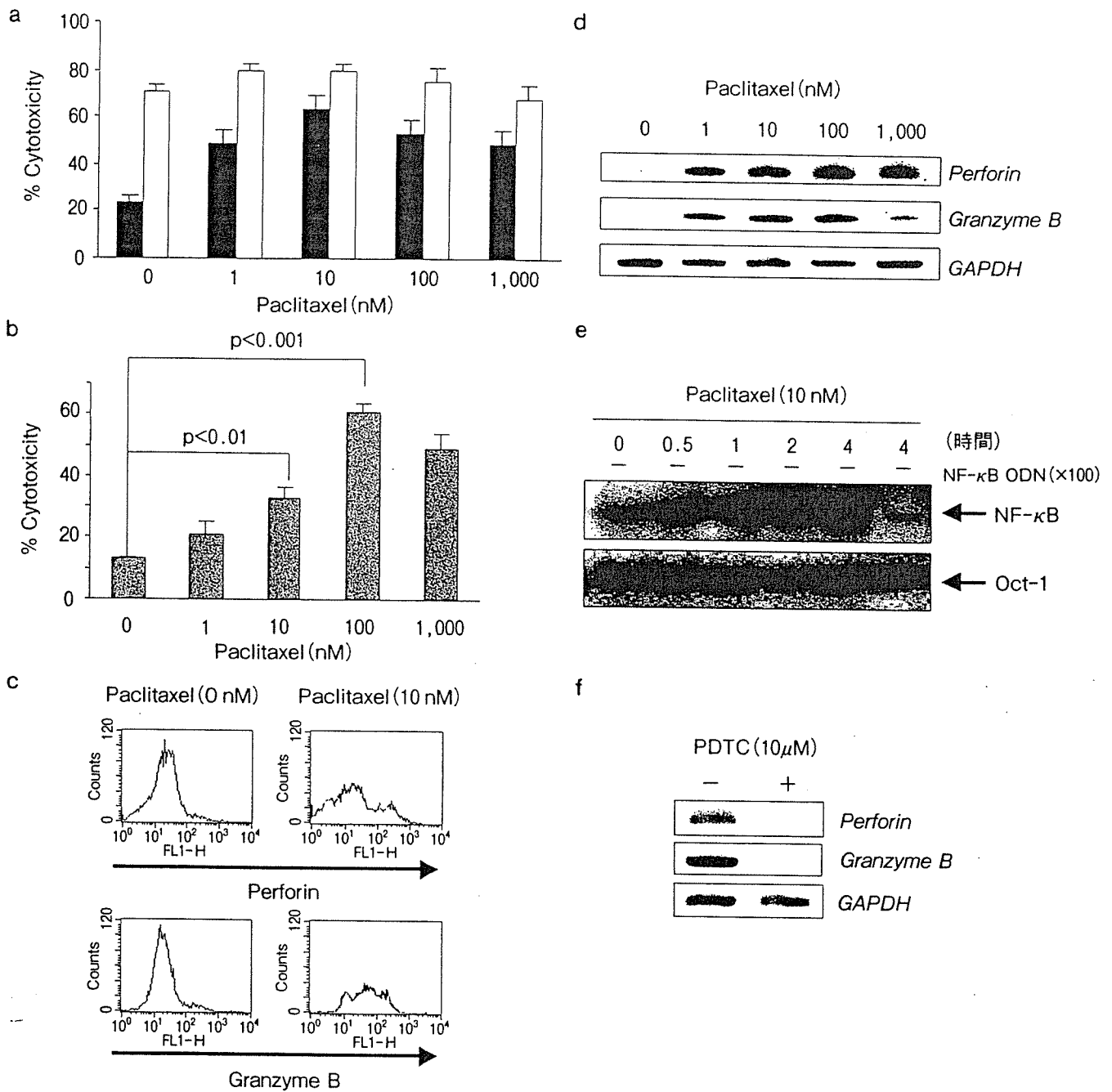


図2 免疫細胞の細胞傷害活性に与える paclitaxel の影響について。0~1,000 nM paclitaxel にて24時間前処理した。bar ; SD。

a : PBMC の細胞傷害活性に与える paclitaxel の影響。Effector/target 細胞比は20とした。

■ ; Herceptin (-), □ ; Herceptin (+)。

b : NK 細胞の細胞傷害活性に与える paclitaxel の影響。Effector/target 細胞比は10とした。

c : 10 nM paclitaxel にて24時間前処理したNK細胞内perforin, granzyme B発現のflow cytometryによる解析。

d : 0~1,000 nM paclitaxel にて24時間前処理したNK細胞内perforin, granzyme BのmRNA発現のRT-PCRによる解析。

e : 10 nM paclitaxel にて0~4時間前処理したNK細胞内NF-κB発現のGel shift assayによる解析。

f : 10 nM paclitaxel にて4時間前処理したNK細胞内perforin, granzyme BのmRNA発現に与えるNF-κB活性化阻害(PDTC)のRT-PCRによる解析。



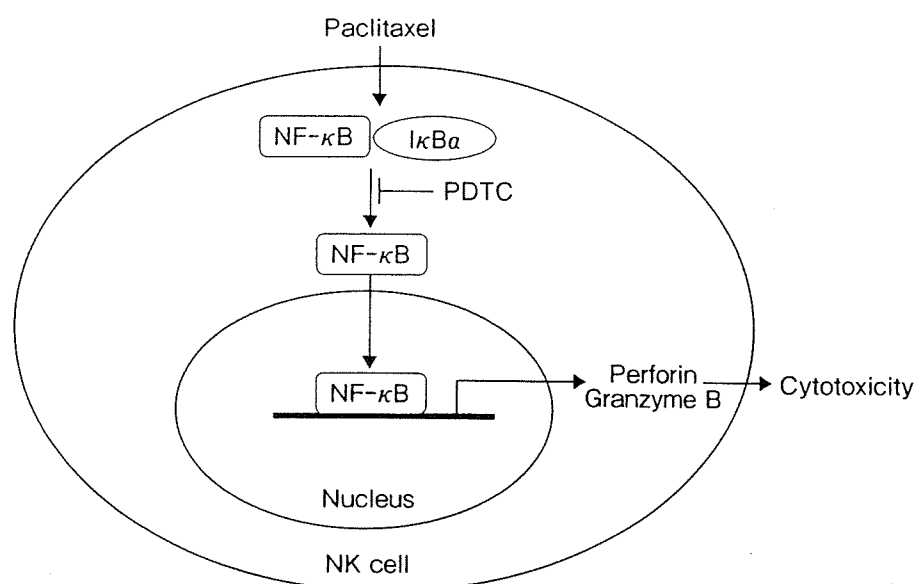


図3 nM レベル paclitaxel がNK 細胞の細胞傷害活性を増強するメカニズムの仮説

有意に増強した (図2a)。この paclitaxel による PBMC に対する増強効果は Herceptin 併用時においても認められた。ここで示してはいないが、同じ taxane 系薬剤である docetaxel の場合も同様の結果であった。

taxane 系薬剤による PBMC の細胞傷害活性増強はどのような細胞によって担われているのかを、ADCC の中心的役割を演じていると予想される NK 細胞に焦点を当てて検討した。実験は、抗体結合 magnetic beads による negative selection 法により 95% 以上に純化された CD16<sup>+</sup> 56<sup>+</sup> NK 細胞を用いた。実験方法は、図2aと同様であるが、NK 細胞の BT-474 に対する細胞傷害活性および Herceptin 併用時の ADCC 活性は paclitaxel 処理により有意に増強した (図2b)。

paclitaxel 処理による NK 細胞の傷害活性増強の機序を探るために、NK 細胞の細胞傷害の作用分子である perforin および granzyme B の産生に及ぼす paclitaxel の影響を調べた。paclitaxel は NK 細胞によるこれらの分子の発現を蛋白レベル (図2c: FACS 解析) および mRNA レベル (図2d: RT-PCR) で増強することがわかった。

次に、paclitaxel がどのような機序で NK 細胞における perforin および granzyme B 産生を誘導するのかを検討した。ここではその一部を示し

ているが、paclitaxel は転写因子である NF-κB の活性化を誘導し (図2e: Gel shift assay), paclitaxel による perforin および granzyme B の誘導は NF-κB の阻害剤である PDTC により有意に抑制された (図2f)。また、ここでは示していないが、NF-κB 活性化や perforin および granzyme B の分泌を抑制することで paclitaxel による NK 細胞の傷害活性増強作用は有意に抑制された。

以上の結果から、paclitaxel は NK 細胞に NF-κB 活性化を誘導し、この NF-κB 活性化は細胞傷害作用を有する perforin や granzyme B の産生を誘導し、結果として NK 細胞の傷害活性を増強することが示唆された (図3)。

#### おわりに

Herceptin と taxane 系薬剤の併用療法においては、taxane 系薬剤の臨床濃度において生体内の免疫細胞の抗腫瘍能を活性化する可能性が示唆された。taxane 系薬剤の投与濃度や投与時期を考慮することにより、Herceptin 療法や活性化リンパ球移入療法などの免疫療法を組み合わせた新しい治療法、すなわち細胞免疫化学療法の可能性が示唆された。

文 献

- 1) Kubo, M., Morisaki, T., Kuroki, H., *et al.*: Combination of adoptive immunotherapy with Herceptin for patients with HER2-expressing breast cancer. *Anticancer Res.* 23 : 4443-4450, 2003.
- 2) Kubo, M., Morisaki, T., Matsumoto, K., *et al.*: Paclitaxel probably enhances cytotoxicity of natural killer cells against breast carcinoma cells by increasing perforin production. *Cancer Immunol. Immunother.* 54 : 468-476, 2005.

---

0914-2223/05/¥500/論文/JCLS



## Original article

# Titration of serum p53 antibodies in patients with gastric cancer: a single-institute study of 40 patients

KEIJI SHIMIZU, YUJI UEDA, and HISAKAZU YAMAGISHI

Department of Surgery, Division of Digestive Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-dori Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

### Abstract

**Background.** Alterations of the *p53* tumor suppressor gene are the most commonly observed genetic abnormalities in many different types of human malignancies. The accumulation of mutant *p53* often leads to the production of p53 antibody (p53-Ab) in the sera of patients with various cancers. To evaluate the clinical implications of serum p53-Abs in patients with gastric cancer, we compared p53-Abs with conventional tumor markers such as carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen (CA)19-9.

**Methods.** Serum samples were obtained preoperatively from 40 patients with histologically confirmed gastric adenocarcinoma, including 28 (70%) patients in stage Ia. The serum p53-Abs were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay, using a new version of a highly specific, quantitative p53-Abs Kit (MESACUP Kit II).

**Results.** p53-Abs were detected in 6 (15%) of 40 patients with gastric cancer, including 3 patients with early gastric cancer. Seven (17.5%) of the 40 patients were positive for CEA in serum. However, none of 7 patients with high CEA levels were positive for p53-Abs. No significant correlation of p53-Abs with patient age, sex, pathological parameters, tumor markers such as CEA and CA19-9, or poor survival ( $P = 0.116$ ) was observed.

**Conclusion.** Although we employed the latest version of the p53-Abs Kit, the sensitivity of serum p53-Ab in gastric cancer patients was relatively low. No correlation was found between the presence of p53-Ab and the staging of cancer or survival. However, serum p53-Ab was detectable in patients with gastric cancer even in the early stages of disease. In addition, it may be independent of CEA and CA19-9.

**Key words** Gastric cancer · p53 Antibody · Tumor marker

### Introduction

Conventional tumor markers such as carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen (CA)19-9, squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag), tissue polypeptide antigen (TPA), and cytokeratin fragment (CYFRA)21-1, are not suitable for the screening or monitoring of patients with malignant tumors, because of low sensitivity and specificity. It has been suggested that oncogenes and tumor suppressor genes and their products may be useful in biochemical tests for cancer [1]. The tumor suppressor *p53* gene, located on chromosome 17p13.1, frequently undergoes mutation in the genesis of human cancer [2]. The frequency of *p53* mutations in all malignant tumors was reported to be at least 50% [3, 4]. The mutated *p53* gene leads to the synthesis of a mutant protein with a longer than normal half-life, and massive overexpression of the protein products [5, 6]. The accumulation of mutant p53 protein has been found to be immunogenic in cancer patients and to result in the production of p53 antibody (p53-Ab) in serum [7].

The p53-Ab in the sera of cancer patients can be detected by immunoprecipitation or Western blotting, or by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [7–10]. Circulating p53-Abs in patients have been reported for various types of carcinomas [9, 10], including breast cancer, hematopoietic malignancy, esophageal cancer, colon cancer, ovarian cancer, lung cancer, pancreatic cancer, and gastric cancer [11–15]. Several studies have demonstrated that the p53-Ab in sera served as an early marker of malignant disease, as an indicator for monitoring patients with malignant tumors during treatment, and as a prognostic factor for patients with several types of tumors [11, 16–18]. Because these studies attempted to evaluate the clinical value of p53-Ab under different conditions, the role of p53-Ab in patients with malignant tumors has not been clearly established yet.

Gastric cancer is widely prevalent in the world and is one of the leading malignancies in terms of incidence and cause of cancer death in East Asia and South America. In Japan, the mortality rate of gastric cancer is showing a decreasing trend, reflecting advances in medical technology, such as early detection and treatment with an endoscope. It is necessary to evaluate the clinical usefulness of new early diagnostic markers of malignancies (for example, in gastric cancer) which could be found in the early stage of tumorigenesis. In this regard, reports on p53-Ab in the sera of patients with gastric cancer have not been adequate [15, 19–22].

In this study, we examined 40 patients with gastric cancer, including 28 (70%) patients in the early stages of the disease, for the presence of circulating antibodies against the tumor suppressor protein p53 and we examined these findings in relation to conventional tumor markers, tumor characteristics, and the clinical status of the patients. The serum levels of p53-Abs were assessed by ELISA, using a new version of a highly specific, quantitative p53-Ab Kit [23].

## Patients and methods

### Patients

Forty patients with primary gastric cancer who underwent gastric resection at the Department of Surgery, Division of Digestive Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan, between July and December 2000 were enrolled in this study. Written informed consent was obtained from each patient. No patients had received preoperative radiotherapy or chemotherapy. There were 28 (70%) male and 12 (30%) female patients, with an average age of 60.6 years (range, 28–86 years).

### Serum and tumor samples

Serum samples were collected from each patient before and 28 days after surgery. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until they were assayed. After resection, the tumor specimens were subjected to routine processing for the control of resection margins; also, exact histological investigation included an evaluation of staging in accordance with the International Union Against Cancer (UICC)/TNM classification.

### Enzyme immunoassay for serum p53 antibodies

Serum p53-Ab levels were assessed by (ELISA) with the anti-p53 EIA Kit II (MESACUP anti-p53 Test; Medical and Biological Laboratories (MBL), Nagoya, Japan). In brief, the samples were added, for 1 h at

$37^{\circ}\text{C}$ , to microtiter wells coated with wild-type human p53 protein or a control protein to detect nonspecific interactions. After washing, a peroxidase-conjugated goat antihuman immunoglobulin G that binds p53-Ab was applied for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Then substrate solution was added for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . After the addition of stop solution, color development was assessed by measuring absorption at 450 nm, using a photospectrometer. Levels of p53-Abs were determined from a calibration curve constructed from the specific signals of standards. The cutoff value for serum p53-Abs was 1.3 U/ml. The specificity of this assay is greater than 95.5% [23].

### CEA and CA19-9 assays

Serum CEA concentrations were measured with an immunoradiometric assay, using a CEA RIABEAD Kit (Abbott Japan, Tokyo, Japan). Serum CA19-9 concentrations were also measured with an immunoradiometric assay, using a CA19-9 RIA Kit (TFB, Tokyo, Japan). According to the manufacturers, the cutoff values for serum CEA and CA19-9 were 2.5 ng/ml and 37 U/ml, respectively.

### Statistical analysis

Fisher's exact test, Student's *t*-test, and the Mann-Whitney *U*-test were used to determine the significance of differences between two groups. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method. The logrank test was adopted to compare two groups. Cox regression analysis was performed to determine which factors would be useful in predicting overall survival. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

## Results

### Detection of serum p53 antibody in gastric cancer

We tested serum samples from 40 patients with gastric cancer for the presence of p53-Abs. Six (15.0%) of the 40 patients were positive for serum p53-Abs: the mean age of this group was 63 years (range, 40–77 years), and the male/female ratio was 2:1. The other 34 (85.0%) patients were negative for serum p53-Abs: their mean age was 60.2 years (range, 28–86 years), and the male/female ratio was 2.4:1. Based on the UICC/TNM classification, 3 of the 6 p53Ab-positive patients were in stage Ia; none of the 6 patients was in stage IV, but p53-Abs were also detected at stages II, IIIa, and IIIb. No significant differences between the p53Ab-positive and -negative groups were observed in age, sex, or tumor staging (Table 1).

We analyzed the histopathological factors of tissue type, tumor invasion, lymph node metastasis, and dis-

**Table 1.** Correlation between the presence of serum p53 antibody (Ab) and clinicopathological features in gastric cancer

Variables	Total	Serum p53 antibody		P value
		Positive	Negative	
Number of patients	40	6	34	
Age (years)	60.6	63	60.2	0.64
Sex (M:F)	2.3:1	2.0:1	2.4:1	0.88
Stage				
Ia	28	3	25	
Ib	3	0	3	
II	4	1	3	0.3
IIIa	1	1	0	
IIIb	2	1	1	
IV	2	0	2	

**Table 2.** Correlation between the presence of serum p53-Ab and histopathological findings in gastric cancer

	Serum p53 antibody		P value
	Positive	Negative	
Tissue type			
Differentiated	2	21	0.272
Undifferentiated	4	13	
Tumor invasion			
Mucosa or submucosa	3	25	0.363
Deeper than submucosa	3	9	
Lymph node metastasis			
Negative	3	31	0.111
Positive	3	3	
Distant metastasis			
Negative	6	33	0.909
Positive	0	1	

tant metastasis. Four (66.7%) of the 6 p53Ab-positive patients had histologically undifferentiated adenocarcinomas, compared to 13 (38.2%) of the 34 p53Ab-negative patients ( $P = 0.272$ ). Three (50%) of the 6 patients with lymph node metastasis were positive for serum p53-Ab, whereas only 3 (8.8%) of the 34 patients without lymph node metastasis were positive ( $P = 0.111$ ). There were no significant differences in these factors between the groups who were positive and negative for p53-Ab (Table 2).

#### Sensitivity of serum CEA, CA19-9, and p53 antibody in gastric cancer

The correlation between the presence of serum p53-Ab and the two tumor markers CEA and CA19-9 was analyzed. The sensitivities of CEA and CA19-9 in this study were 17.5% (7/40) and 10% (4/40), respectively. The 7

**Table 3.** Correlation between the presence of serum p53-Ab and tumor markers in gastric cancer

	Serum p53 antibody		P value
	Positive	Negative	
CEA			
Positive	0	7	0.426
Negative	6	27	
CA19-9			
Positive	1	3	0.762
Negative	5	31	

patients positive for CEA did not express p53-Abs, and CEA was not detected in any p53-Ab-positive patients (Table 3).

We analyzed the sensitivity of serum p53-Ab and CEA according to stage based on the UICC/TNM classification. Three (10.7%) of the 28 patients in stage Ia were positive for serum p53-Ab, whereas none (0%) of these 28 patients was positive for CEA. In stage IV, both patients were positive for CEA, but neither was positive for p53-Ab (Table 4).

Three (50%) of the 6 p53Ab-positive patients became negative postoperatively, while 5 (71.4%) of the 7 CEA-positive patients became negative postoperatively (Table 4).

#### Detection of serum p53 antibody in stage Ia gastric cancer

We focused on the stage-Ia patients to investigate the clinical usefulness of the levels of serum p53-Ab as a marker for the early detection of gastric cancer. Table 5 demonstrates that only p53-Ab was positive in patients with stage Ia gastric cancer, whereas CEA and CA19-9 were not positive. No significant differences between the p53Ab-positive and -negative groups were observed in regard to tissue type or tumor invasion.

#### Survival rates

The 4-year survival rates for patients with sera that was positive or negative for CEA, CA19-9, and p53-Ab are shown in Table 6. The median follow-up time for all 40 patients was 31.7 months (range, 1–48 months). The 4-year survival rate was 82.9% for the p53Ab-negative patients and 60% for the p53-Ab-positive patients. However, there was no significant difference in the rate of survival between the p53-Ab-positive group and the p53Ab-negative group ( $P = 0.116$ ). In contrast, the overall survival of patients positive for CEA was significantly shorter than that in the CEA-negative patients ( $P = 0.0008$ ) (Table 6).

**Table 4.** Correlations between sensitivity of serum CEA and p53 Ab according to clinical stage

	Serum p53 antibody	CEA	P value
Stage			
Ia	10.7% (3/28)	0% (0/28)	0.49
Ib	0% (0/3)	66.7% (2/3)	0.19
II	25% (1/4)	50% (2/4)	0.56
IIIa	100% (1/1)	0% (0/1)	0.31
IIIb	50% (1/2)	50% (1/2)	1
IV	0% (0/2)	100% (2/2)	0.12
Negative conversion post-surgery	50% (3/6)	71.4% (5/7)	0.52

**Table 5.** Correlation between the presence of serum p53-Ab, histopathological findings, and tumor markers in stage Ia patients

	Serum p53 antibody		P value
	Positive	Negative	
Tissue type			
Differentiated	2	19	0.853
Undifferentiated	1	6	
Tumor invasion			
Mucosa	2	15	0.906
Submucosa	1	10	
CEA			
Positive	0	0	0.49
Negative	3	25	
CA19-9			
Positive	0	0	0.49
Negative	3	25	

However, Cox regression analysis of all factors listed in Tables 1 and 2 revealed that lymph node metastasis, but not p53 Ab or CEA, was an independent prognostic factor in gastric cancer ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

At present, there is no satisfactory tumor marker for the diagnosis or monitoring of malignant disease. It is expected that a new biological marker which shows high sensitivity and specificity and can be used with relative ease will be established.

p53-Ab is an autoantibody induced by mutation of the p53 tumor suppressor gene, and has been detected in the sera of patients with various types of cancers. Since its initial description more than 20 years ago, the usefulness of serum p53-Ab in patients with various cancers has been reported [9–15]. Gastric cancer remains a major cause of cancer-related deaths in the world. Serum CEA is generally used for the diagnosis

**Table 6.** Association between 4-year survival rates and tumor markers in patients with gastric cancer

	Survival rate (%)	P value
CEA		
Positive	25.7	0.0008
Negative	92.3	
CA19-9		
Positive	50	0.118
Negative	85.4	
p53-Ab		
Positive	60	0.116
Negative	82.9	

and monitoring of gastric cancer, but only a limited proportion of patients benefit. Therefore, potential new biological markers, such as p53-Ab, E-cadherin, or hepatocyte growth factor (HGF) for patients with gastric cancer, have received attention [24–26]. Because gastric cancer can be diagnosed at an early stage by endoscopy, it is suitable for testing a potential biological marker for early diagnosis. Nevertheless, only a small number of reports regarding the evaluation of p53-Abs in the sera of patients with gastric cancer have been published to date [15, 19–22].

The present study demonstrated that, in 15% (6 of 40) of patients, gastric cancer was detectable by p53-Ab ELISA assay preoperatively. This is comparable with previous observations in patients with gastric cancer [15, 19–23]. No significant correlation between p53-Abs and either tumor stage, tissue grade of differentiation, depth of tumor invasion, lymph node metastasis, or distant metastasis was observed. The positive rate for CEA and CA19-9 in the sera of patients with gastric cancer was 17.5% (7 of 40) and 10% (4 of 40), respectively, which is similar to results reported by other groups [27, 28]. Most interestingly, the 6 patients positive for p53-Abs did not show high levels of CEA, and only 1 patient positive for p53-Ab showed a high CA19-9 level. The presence of p53-Ab was not associated with serum CEA

or CA19-9 ( $P = 0.426$  and  $P = 0.762$ , respectively). It was supposed that p53-Ab might be an independent marker of CEA or CA19-9. The positivity rate for the diagnosis of gastric cancer increased to 32.5% when p53-Ab and CEA were combined in this study.

Because alterations in the *p53* gene result in an accumulation of the protein in tumor cells, the presence of serum p53-Ab was described as an early event that could predate the diagnosis [29]. Our results demonstrated that, of 28 patients with stage Ia gastric cancer tested preoperatively, 3 were positive for p53-Ab in serum, whereas none was positive for serum CEA or CA19-9. A *p53* mutation may be not only an advanced-stage phenomenon but may also be an early event of carcinogenesis. Several studies have reported that p53-Ab can be found in the serum of individuals at high risk of developing cancer, including heavy smokers and workers exposed to vinyl chloride [16, 29, 30]. In contrast, no association between *p53* abnormalities (overexpression/mutation) and *Helicobacter pylori* infection was found in patients with gastric adenocarcinoma; therefore, mutations of the *p53* gene do not seem to be a predominant event in gastric carcinogenesis [31]. These contradictory findings might be explained by a report that 39.1% of patients with gastric cancer positive for p53-Ab in sera had tumor tissues that stained negative for p53 protein [19].

Although there have been several reports that the presence of p53-Ab in serum was a prognostic factor for patients with various types of malignancies, the prognostic value of p53-Abs in patients with gastric cancer is still controversial [15, 19, 21]. We did not find a significant correlation between the presence of p53-Abs in the sera of patients with gastric cancer and overall survival, despite the finding that the 4-year survival rate was about 20% higher in the p53-Ab-negative patients than that in the -positive patients. On the other hand, high levels of CEA could be associated with prognosis. However, Cox regression analysis revealed that lymph node metastasis, but not p53 Ab or CEA, served as an independent prognostic factor in gastric cancer in this series.

The p53-Abs circulating in patients with various types of cancer can be detected by several methods, including immunoprecipitation, Western blotting, and ELISA [7–10]. Because none of these methods give satisfactory rates of detection, further improvement is needed. We employed the latest version of an ELISA kit, which has the advantage of quantitative analysis, for the detection of p53-Ab. Using this assay, Shimada et al. [23], in a multiinstitutional study, reported 20.4% positivity for p53-Abs in 1085 patients with 15 types of malignant tumors, and they determined a cutoff value of 1.3 U/ml with over 95.5% specificity by analyzing serum samples of 205 healthy controls. This assay could thus contribute to achieving high true-positive rates with low false-

positive rates. Recently, a new protocol for the rapid and sensitive detection of p53-Abs in serum by immunomagnetic electrochemiluminescence (IM-ECL) was developed [32]. Further study will be needed to fully elucidate the importance of this detection method.

Here, we measured circulating p53-Ab levels in the sera of 40 patients with gastric cancer using a new version of the p53-Abs ELISA kit. The presence of p53-Ab was demonstrated in 15% (6 of 40) of the patients with gastric cancer preoperatively. No correlation was found between the presence of p53-Ab and the staging of cancer or survival. However, circulating p53-Ab was detectable in patients with early-stage gastric cancer, and was independent of the currently available tumor markers CEA and CA19-9.

**Acknowledgments** This work was part of a multiinstitutional analysis by the Japan p53 Antibody Research Group, conducted by Drs. H. Shimada and T. Ochiai (Chiba University Graduate School of Medicine).

## References

1. Diamandis EP. Oncogenes and tumor suppressor genes: new biochemical tests. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992;29:269–305.
2. Levine A, Momand J, Finlay C. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453–5.
3. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 1994;57:1–9.
4. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the *p53* tumor suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13:1009–22.
5. Lane D, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990;4:1–8.
6. Davidoff A, Humphrey P, Iglehart J, Marks J. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5006–10.
7. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30:403–8.
8. Caron FC, May LF, Mouriesse H, Lemerle J, Chandrasekaran K, May P. Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B-cell lymphoma. *Int J Cancer* 1987;39:185–9.
9. Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJA, Kellen JA, Bunting PS. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int J Cancer* 1994;58:480–7.
10. Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, Garay E, Bussel A, Wild C, et al. p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification and characterization. *Clin Cancer Res* 1995;1:1463–9.
11. Peyrat JP, Bonneterre J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 1995;345:621–2.
12. Lethinen T, Luostarinen T, Dillner J. Serum p53 accumulation and altered antibody response to Epstein-Barr virus proteins precede diagnosis of haemopoietic malignancies of lymphoid origin. *Br J Haematol* 1996;93:104–10.

13. Breveren von MC, Hollstein MC, Cawley HM, De Benedetti VGM, Bennett WP, Liang L, et al. Circulating anti-p53 antibodies in oesophageal cancer patients are found predominantly in individuals with p53 core domain mutations in their tumors. *Cancer Res* 1996;56:4917-21.
14. Marxsen J, Schmiegell W, Roder C, Harder R, Juhl H, Henne-Bruns D, et al. Detection of the anti-p53 antibody response in malignant and benign pancreatic disease. *Br J Cancer* 1994;70:1031-4.
15. Nakajima K, Suzuki T, Shimada H, Hayashi H, Takeda A, Ochiai T. Detection of preoperative serum anti-p53 antibodies in gastric cancer. *Tumor Biol* 1999;20:147-52.
16. Trivers GE, Cawley HL, DeBenedetti VM, Hollstein M, Marion MJ, Bennett WP, et al. Anti-p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl chloride. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1400-7.
17. Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, Piedbois P, Rotman N, Kouyoumdjian JC, et al. Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer. *Gut* 1997;40:356-61.
18. Houbiers JG, van der Burg SH, van de Watering LM, Tollenaar RA, Brand A, van de Velde CJ, et al. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995;72:637-41.
19. Maehara Y, Kakeji Y, Watanabe A, Baba H, Kusumoto H, Kohnoe S, et al. Clinical implications of serum anti-p53 antibodies for patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1999;85:302-8.
20. Würfl P, Weigmann F, Meye A, Fittkau M, Rose U, Berger D, et al. Detection of p53 autoantibodies in sera of gastric cancer patients and their prognostic relevance. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1147-51.
21. Wu CW, Lin YY, Chen GD, Chi CW, Carbone DP, Chen JY. Serum anti-p53 antibodies in gastric adenocarcinoma patients are associated with poor prognosis, lymph node metastasis and poorly differentiated nuclear grade. *Br J Cancer* 1999;80:483-8.
22. Shiota G, Ishida M, Noguchi N, Takano Y, Oyama K, Okubo M, et al. Clinical significance of serum p53 antibody in patients with gastric cancer. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998;99:41-51.
23. Shimada H, Ochiai T, Nomura F. Titration of serum p53 antibodies in 1085 patients with various types of malignant tumors. *Cancer* 2003;97:682-9.
24. Chan AO, Chu KM, Lam SK, Wong BC, Kwok KF, Law S, et al. Soluble E-cadherin is an independent pretherapeutic factor for long-term survival in gastric cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2288-93.
25. Juhasz M, Ebert MP, Schulz HU, Rocken C, Molnar B, Tulassay Z, et al. Dual role of serum soluble E-cadherin as a biological marker of metastatic development in gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:850-5.
26. Tanaka K, Miki C, Wakuda R, Kobayashi M, Tonouchi H, Kusunoki M. Circulating level of hepatocyte growth factor as a useful tumor marker in patients with early-stage gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:754-60.
27. Kodera Y, Yamamura Y, Torii A, Uesaka K, Hirai T, Yasui K, et al. The prognosis value of preoperative serum levels of CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 1996;91:49-53.
28. Ishigami S, Natsugoe S, Hokita S, Che X, Tokuda K, Nakajo A, et al. Clinical importance of preoperative carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:41-4.
29. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Tredaniel J, Legros Y, Cazals D, et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Med* 1995;1:701-2.
30. Zalcman G, Schlichtholz B, Tredaniel J, Urban T, Lubin R, Dubois I, et al. Monitoring of p53 auto antibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. *Clin Cancer Res* 1998;4:1359-66.
31. Berloco P, Russo F, Cariola F, Gentile M, Giorgio P, Caruso ML, et al. Low presence of p53 abnormalities in *H. pylori*-infected gastric mucosa and in gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterol* 2003;38:28-36.
32. Tan G, Xing D, Tan S, Chen Q. Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of p53 antibodies in human serum. *J Immunol Methods* 2004;288:47-54.



特集

Biotherapy Frontier 2005

## 癌の細胞療法—変遷と今後の展開—

京都府立医科大学大学院医学研究科・消化器腫瘍制御外科

上田 祐二 山岸 久一

要旨 固形癌に対する免疫細胞療法の変遷と問題点を概説し、今後の方向性の一つとして現在われわれが取り組んでいる、完全閉鎖系体外循環による免疫細胞療法の開発研究について言及した。

固形癌に対する免疫細胞療法は、樹状細胞の *in vitro* 誘導と数々の腫瘍拒絶抗原の解明を契機に、培養 T 細胞を用いた受動免疫療法から樹状細胞を用いた能動免疫療法へと 1990 年代後半に大きく流れを変えた。しかし、よくデザインされた臨床試験でその有効性が客観的に評価された報告は未だごくわずかである。今後は造血幹細胞移植や化学療法を併用した集学的細胞療法の開発研究が盛んになるであろうが、抗腫瘍効果が不十分であれば普遍性、安全性、経済性の面から、真の癌医療として定着していくのは困難であろう。

*in vitro* での細胞処理が必要な免疫細胞療法は、治療に至るまでの労力、経費ともに莫大でなおかつ培養過程における微生物汚染の危険性を避けて通れない。したがって、われわれはポリスチレン系極細繊維を充填された 2 種類の癌治療用体外循環カラムの開発研究を行っている。一つは免疫抑制性サイトカインを血中から効率的に吸着除去することを目的とし、もう一つは免疫賦活剤を固相化することにより血中の免疫担当細胞を直接活性化することを目的としている。安全に、簡便に、繰り返し施行可能な完全閉鎖系体外循環による免疫細胞療法の新しい治療体系の構築をめざしている。

[Biotherapy 19 (2) : 115-124, March, 2005]

## Present Status and Future Prospect of Immune-cell Therapy for Solid Cancer

Yuji Ueda and Hisakazu Yamagishi

Department of Surgery, Division of Digestive Surgery,  
Kyoto Prefectural University of Medicine

## Summary

Immune-cell therapy for solid cancer is still a challenge. Adoptive immunotherapy with cultured killer T lymphocytes and interleukin-2 have been actively tried since the middle of the 1980's. However, the mainstream has become dendritic cell-based, tumor-specific active immunotherapy since the latter half of the 1990's. Despite much effort, immune-cell therapy has not yet achieved an adequate anti-tumor effect comparable with that of chemotherapy. In addition, there are many problems with immune-cell therapy which needs *in vitro* cell processing. It is labor- and resource-consuming, and cannot avoid the risk of microbial contamination. In view of these problems, we started research on a new immunotherapy technique with direct hemoperfusion. We have succeeded in developing a direct hemoperfusion column for cancer immunotherapy which consists of extra-fine synthetic fibers removing immunosuppressive cytokines from the peripheral blood of advanced cancer patients. This column can be an effective immunotherapy technique in conjunction with immune-cell therapy or chemotherapy. We are now planning a pre-marketing clinical trial of this column.

**Key words:** Cell therapy, Cancer therapy, Dendritic cell, Direct hemoperfusion, Review

**Address request for reprints to:** Dr. Yuji Ueda, Department of Surgery, Division of Digestive Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

## はじめに

癌の免疫細胞療法の臨床研究の歴史は、熱狂と落胆の繰り返しである。1980年代後半に開始されたT細胞移入による受動免疫療法は、1990年代後半には樹状細胞(dendritic cell, DC)を用いた能動免疫療法へと大きく流れを変えたが、未だ総じて満足な抗腫瘍効果を達成し得ていない。生体が有する免疫細胞の力で癌を治すことは誰もが願う究極の理想であるが、煩雑で高価な“細胞療法”という治療形態が、普遍性・経済性の面から時代のニーズに合致するの否かという問いかけを、今後は無視できないであろう。抗腫瘍効果が十分でなければなおさらである。

本稿では固形癌に対する免疫細胞療法の変遷と問題点を概説し、今後の方向性の一つとして現在われわれが取り組んでいる、完全閉鎖系体外循環による免疫細胞療法の開発研究について言及する。

### I. 癌の免疫細胞療法—受動免疫療法から能動免疫療法へ—

固形癌に対する免疫細胞療法の臨床応用開始の契機は、T細胞増殖因子であるインターロイキン(interleukin, IL)-2の発見とそのリコンビナント製剤としての利用開始にまでさかのぼることができる<sup>1)</sup>。T細胞やナチュラル・キラー(natural killer, NK)細胞を*in vitro*でIL-2存在下に培養すると、NK非感受性の腫瘍細胞を広範に非特異的に傷害することのできるリンフォカイン活性化キラー(lymphokine-activated killer, LAK)細胞へと増殖を伴う分化を遂げる<sup>2)</sup>。このLAK細胞を用いた受動免疫療法である養子免疫療法(adoptive immunotherapy, AIT)が、IL-2をアジュバントとして併用しつつ1980年代後半より様々な固形癌に対して試みられた。当初欧米においてメラノーマや腎癌に対してその有効性が示されたが<sup>3)</sup>、消化器癌を中心とした他癌腫に対する治療効果は、本邦を中心に精力的にその臨床研

究が展開されたとおり、肝転移や癌性胸腹膜炎に対する局所療法を除けば極めて弱かった<sup>4,5)</sup>。その後、より腫瘍特異性の高い腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)やサイトカイン遺伝子導入リンパ球を用いたAITの臨床研究が再びメラノーマや腎癌に対して欧米で積極的になされ、これら免疫原性が高い腫瘍に対するAITに関する多くの知見が集積された<sup>6)</sup>。しかし、効果を期待するためには、*ex vivo*でIL-2や抗CD3抗体存在下にエフェクターであるT細胞を $10^{10} \sim 10^{11}$ 個のオーダーにまで多量に培養・増殖させる必要があるAITは、後述するように臨床応用上多くの問題点を内包していた。

その後、1994年にSallustoらにより末梢血単球から*in vitro*で顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)とIL-4存在下に、生体内で最も強力な抗原提示細胞であるDCの誘導が可能なが明らかにされ<sup>7)</sup>、DCを用いた能動免疫療法(DCワクチン療法)への道が開かれた。また、ほぼ時を同じくして、メラノーマのみならず種々の悪性腫瘍に発現する腫瘍拒絶抗原が分子レベルで明らかにされはじめたことが、この流れに拍車をかけた<sup>8)</sup>。すなわち、1990年代後半から癌の免疫細胞療法の流れは、培養T細胞を用いた受動免疫療法からDCを用いた能動免疫療法へ大きくシフトした<sup>9)</sup>。

世界中で数多くのグループが、DCと種々の形態の腫瘍抗原との組み合わせで、様々な癌腫に対しDCワクチン療法の臨床研究・臨床試験を手掛けてきたが、以下に列挙するとおり未だ十分に明らかにされていない多くの問題点がある<sup>10)</sup>。

#### 1. DCの至適投与細胞数は?

GM-CSFとIL-4で誘導される単球由来DCは、増殖を伴わない分化を遂げるため、培養に供する末梢血単核細胞のせいぜい5%前後しか回収されず、増殖を伴う分化T細胞を用いるAITと大きく異なる<sup>11)</sup>。phase I試験でDCの投与細胞数を

段階的に増やし、その効果を検討している報告も散見されるが、投与細胞数と免疫学的効果・腫瘍縮小効果の間には、有意な相関を認めないとする報告が多い<sup>12,13)</sup>。

## 2. 成熟 DC か未成熟 DC か?

McIlroy らは、メラノーマを対象とした DC ワクチン療法の総数 10 の臨床試験の 167 例をメタアナリシスし、腫瘍縮小を誘導する規定因子を検討した結果、患者の年齢、性別、化学療法歴の有無、DC の投与量、投与ルートなどは有意な因子ではなく、TNF- $\alpha$  を用いた DC の成熟化のみが腫瘍の縮小を誘導する唯一の規定因子であったと結論付けている<sup>12)</sup>。これと同一の見解を示す報告は多く、DC ワクチン療法の効果発現において成熟 DC が強く関与していることはほぼ間違いなさそうである<sup>14,15)</sup>。

## 3. DC と組み合わせる最適な腫瘍抗原の形態は?

腫瘍抗原として特定の HLA-class I 分子に結合するペプチドや tumor lysate, whole の腫瘍細胞を DC と融合させる方法 (DC-tumor hybrid) などが用いられているが、どれが最も優れるかは結論がでていない。メラノーマにおいて最も多くの腫瘍拒絶抗原ペプチドが同定され臨床応用も多くなされているが、ペプチドより tumor lysate が優れるという報告もある<sup>16)</sup>。DC と腫瘍細胞の融合はポリエチレングリコールを用いる方法と電気融合法があるが、効率的に真の DC-tumor hybrid を作製することは容易ではない。最近 Hayashi, Shimizu らは、融合効率の高い画期的な電気融合法をマウスの系で開発し、DC-tumor hybrid が DC ワクチン療法における最適の抗原形態であることを報告しているが<sup>17,18)</sup>、DC-tumor hybrid は現時点においては、他抗原に匹敵する臨床効果を誘導しているとはいえない<sup>19)</sup>。

## 4. DC の至適投与ルートは?

静脈内投与で免疫学的効果、臨床効果を誘導し得たとする報告もあるが<sup>20)</sup>、皮内・皮下投与が一般的である。手技的に煩雑であるが、リンパ節内投与は最近でもよい治療成績が散見される<sup>21,22)</sup>。

## 5. 最適な免疫学的効果判定方法は?

従来 DC ワクチン療法は臨床応用開始初期の

phase I 試験として試みられてきたため、安全性とともに治療前後の当該抗原に対する免疫学的応答性の変化が多く検討されてきた。これには簡便な皮内テストから煩雑な *in vitro* の assay まで種々の方法があるが、臨床試験を施行している施設間の技術格差が大きいと、信頼できる情報が乏しい。また、免疫学的効果が得られてもそれが腫瘍の縮小に結び付いているのはごくわずかの症例である<sup>23)</sup>。今後は surrogate endpoint である免疫学的効果は付随的なものとし、化学療法と同様の primary endpoint である、腫瘍縮小効果と生存期間の延長効果を厳密に評価していくべきと考えられる。

いずれにしても、DC ワクチン療法に限らずすべての *in vitro* での細胞処理を必要とする免疫細胞療法は、治療を成立させるための労力と経費が莫大であるため、以上のような問題点を解明・解決していくために、本邦でも多施設共同臨床研究の推進が望まれる。一方、2004 年 6 月の米国臨床腫瘍学会 (ASCO) において、転移性メラノーマに対する first-line therapy として、標準的化学療法 (ダカルバシン) と複数のメラノーマ抗原ペプチド (MAGE1, MAGE3, gp100, Melan-A など) をパルスした成熟 DC を用いた免疫療法の効果を比較したヨーロッパでの多施設共同第 III 相臨床試験の結果が報告された<sup>24)</sup>。2001 年 1 月～2003 年 6 月までの間に全 108 例が登録されたが、奏効率 (化学療法群 : 5.5%, DC 群 : 3.8%), 全生存期間、無増悪生存期間ともに両群で有意差なしという結果であった。本発表は、学会当日まで抄録内容が一切公開されない late breaking abstract として大きな期待と関心を集め、われわれも当日会場に居合わせたか、超満員のフロアからは落胆のため息があちらこちらから聞かれた。労力、経費ともに莫大な DC ワクチン療法が、メラノーマにおいてでさえ従来の化学療法の効果を凌駕できなかったこの結果は、今後の癌の免疫細胞療法の開発研究の趨勢に影響を及ぼさざるを得ないであろう。

## II. 免疫細胞療法の新しい流れ

### 1. 免疫細胞療法としての同種造血幹細胞移植 造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する骨髓破

壊的大量化学療法後の骨髄救済療法として発展してきた。免疫細胞療法と異なり *in vitro* での細胞処理がほとんど不要なため、悪性腫瘍に対する細胞療法の原点でありなおかつ理想の姿でもある。ドナーを必要とする同種造血幹細胞移植は、1990年代から顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) の臨床応用開始を契機として、しだいに骨髄移植から末梢血幹細胞移植 (peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT) へと移行した。その後、免疫抑制主体の骨髄非破壊の前処置化学療法を用いた同種 PBSCT が、poor risk の造血器腫瘍患者に対する安全な幹細胞移植としてのみでなく、同種抗原を標的として移植片対腫瘍効果 (graft versus tumor effect, GVT) を誘導する免疫細胞療法としての性格を有していることが明らかにされた。1998年ごろから、腎癌に対する高い奏効率が Childらを中心に報告されたが<sup>25)</sup>、その後の諸家の報告では奏効率の再現性に乏しく、メラノーマや他癌腫に対する効果も乏しいようである<sup>26)</sup>。難治性の固形癌に対する新しい免疫細胞療法としての期待が大きかったが、非血縁ドナーの利用、ドナー由来の DC ワクチン療法の併用など治療戦略の見直しが迫られている<sup>27-29)</sup>。また、前処置化学療法と PBSCT を伴わず、HLA 一致同胞をドナーとして誘導した抗原特異的 T 細胞のみを養子移入する同種 T 細胞療法も、治療後に抗原特異的免疫応答の増強が誘導されることが明らかにされており、今後の展開が注目される<sup>30,31)</sup>。

## 2. 集学的免疫細胞療法

最近 Rosenberg らは、転移性メラノーマに対して化学療法と AIT の組み合わせによる、たいへん有望な集学的治療プロトコルの開発を報告している<sup>32)</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> の表面抗原を有する抑制性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) は DC, 細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL), ヘルパー T 細胞 (T helper, Th) などのあらゆる抗腫瘍エフェクターを抑制する T 細胞であるが<sup>33-37)</sup>、彼らはこの Treg を効率的に骨髄非破壊的前処置化学療法で血中から除去した後に、*in vitro* で大量に増殖させた TIL を養子移入するプロトコルを確立した。対象症例 35 例中腫瘍が半分以上に縮小した部分寛解 (partial response,

PR) が 18 例でそのうち 4 例が完全寛解 (complete response, CR) であったと報告している。利用している TIL はクローンではなくヘテロな腫瘍特異性をもったキラー細胞集団であり、有効症例の何例かの患者血中には治療終了後数か月にわたり、末梢血リンパ球の 70% 以上を移入した抗腫瘍性 T 細胞集団が占めている。化学療法による Treg の制御の後にヘテロな TIL を大量に養子移入するこのプロトコルは、二つの予備臨床試験を経て綿密に設計されており<sup>38,39)</sup>、明確な理論構築の後に期待された抗腫瘍効果を実現している<sup>32)</sup>。

その他、進行胃癌に対して自己 PBSCT による骨髄救済処置を伴う大量化学療法後に PBSC 由来 DC を用いたワクチン療法を連続して施行する試みや<sup>40)</sup>、HER2 を共通の標的として抗体療法と CTL 療法を併用することによる効果増強の試みなども報告されている<sup>41)</sup>。

これら免疫細胞療法の効果を相殺するのではなく、増強するための化学療法や分子標的治療薬の至適併用療法が、集学的免疫細胞療法として今後の臨床研究の一翼を担うであろう。

## III. 本邦における免疫細胞療法の 問題点と完全閉鎖系体外循環 による免疫細胞療法の構築

われわれは、難治性消化器癌を主たる対象疾患とし、1980年代後半から IL-2 を用いた AIT の臨床応用を<sup>4)</sup>、そして 1998 年から単球由来 DC と腫瘍抗原ペプチドを用いた DC ワクチン療法の臨床応用を開始した<sup>9,13,40)</sup>。これら *in vitro* での細胞処理を伴う免疫細胞療法の本邦での基盤整備は未だ不十分で、明確な GMP 基準が開示されていない。また基盤整備が進んだとしても、繰り返し述べてきたように細胞培養のための施設、薬剤経費が莫大であるため、多くの患者に還元できる医療として定着させるには困難が多い。なおかつ培養過程における微生物汚染の危険性を避けて通れない。治療に用いる細胞の培養・処理は、医師や研究者が片手間にすべき仕事ではなく、専門の技師や依頼を受けた企業の担当者が厳密な清潔環境 (GMP 基準) の管理下で扱うべき業務であり、今後はそのような方向へ進まなければならない。