

図3 フラスコ付着性を利用したNK細胞, T細胞, 樹状細胞の分離・培養法

て癌患者ではNK細胞, NK活性のいずれも減少していたが, これらをIL-2にて活性化培養したLAK細胞においても, 同様に健常人と比較して腫瘍細胞傷害活性が低下していることが確認されている。われわれはNK細胞を選択的に活性化増殖させる培養法につき検討したところ, IL-2に加えてTNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$ もしくはOK-432の添加培養や, ある種の腫瘍細胞(K562など)との混合培養が有効と考えられた<sup>2)</sup>。癌患者においても, OK-432の併用培養法によりNK細胞の活性化増殖が増強されることも確認されている<sup>3)</sup>。NK細胞を階層的に増殖させるシグナルは未だ見つかっていないが, われわれは最近, グリコサミノグリカンがNK細胞を選択的に活性化増殖させることを発見し, 現在その詳細を解明中である。しかし, それらの培養法ではNK細胞を選択的に活性化増殖させることは可能であっても, NK細胞のみを癌免疫療法の効果細胞とした場合, 自己のHLA-Cなどからの抑制や腫瘍局在集積性の少な

さより, ヒトの癌病態に十分対応することが困難と考えられる。そのため, われわれは末梢血単核細胞からのNK細胞, T細胞, 樹状細胞の同時分離培養法の開発を試みており, この方法のなかで, 特にNK細胞の選択的活性化増殖培養に関する知見を次項で紹介する。

#### IV. フラスコ付着能の差を利用したNK細胞の選択的活性化増殖培養法の開発

現在の癌免疫療法は, 腫瘍抗原に特異的な免疫応答を利用する方法が中心となっている。その場合の効果細胞は, 強力な抗原提示細胞である樹状細胞と $\alpha\beta$ 型T細胞である<sup>4)</sup>。しかし, 単一の腫瘍抗原を標的とした特異的癌免疫療法では, 発現抗原の異なる癌細胞やMHCを欠損した癌細胞に対応できない。その欠点を補うために, 複数の腫瘍抗原を標的としたり, NK細胞, NKT細胞,  $\gamma\delta$ 型T細胞などの非特異的免疫細胞を利用する方法が注目されている。われわれは, 肝臓に対

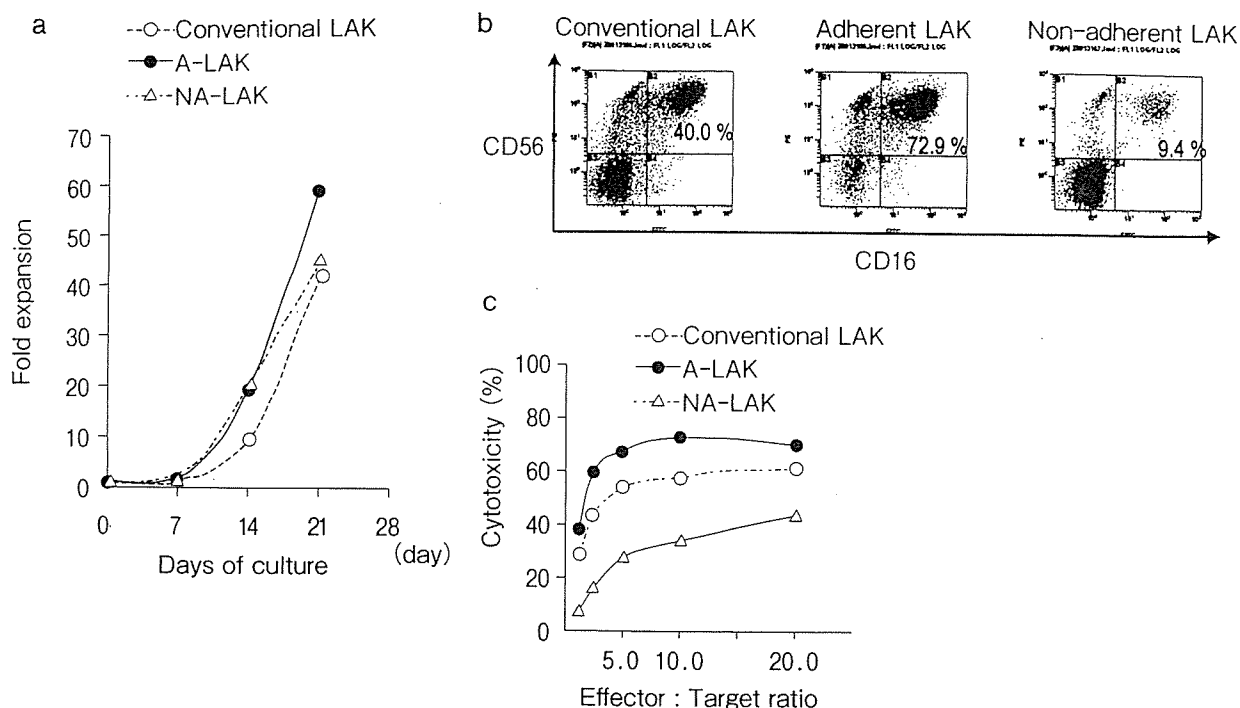


図4 A-LAKの細胞増殖率と細胞傷害活性の比較

a: 培養細胞増加率, b: 培養細胞のサブセット (21日目), c: K562に対する細胞傷害活性

して自己腫瘍抽出抗原を利用した樹状細胞ワクチンと活性化自己リンパ球の併用治療の臨床試験を実施しており、免疫細胞のフラスコ付着能の差を利用して、樹状細胞とT細胞を分離培養してきた。今回さらに、NK細胞を分離培養する方法を加えて、同一のPBMCより樹状細胞、T細胞、NK細胞を同時に分離培養して利用する方法を開発した<sup>5)</sup>。まず、健康人末梢血より単核細胞層を採取し、フラスコにて2時間静置することにより、最初に単球成分をフラスコに付着させる。このフラスコ付着単球はその後GM-CSFとIL-4を添加培養して樹状細胞を誘導し、樹状細胞ワクチンなどに利用する。回収したフラスコ非付着細胞に6,000 IU/mlのIL-2を添加してovernight静置し、さらに付着細胞と非付着細胞に分離する。この時のフラスコ非付着細胞はT細胞優位分画であり、固相化抗CD3抗体(OKT-3)刺激を加えた後にIL-2にて培養してCD3-activated T (CAT)細胞の誘導などに利用する。フラスコ付着細胞を2~3週間、6,000 IU/mlのIL-2添加培養すると、CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞が選択的に活性化増殖する。以上の方法で、同一

PBMCより、T細胞、NK細胞、樹状細胞が分離培養可能となった(図3)。この方法で分離培養したNK細胞(以下、adherent LAK, A-LAK)は通常のIL-2添加培養によるLAK細胞より細胞増加率が高率であり(図4a)、CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞含有率が多く(図4b)、K562に対する細胞傷害活性も高値であった(図4c)。次に、同様の培養法を癌患者において試みたところ、健康人ではすべてでA-LAK中にCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞の選択的増殖が認められたが、癌患者では14人中8人では同様にNK細胞の選択的増殖が認められたものの、14人中5人でNK細胞分画が増殖せず、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>T細胞が優位に増殖してくる症例が観察された(図5)。A-LAK中にCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞が増殖するI型に比較して、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>T細胞が増殖するII型では腫瘍細胞による再刺激時のType 1サイトカインであるIFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ の産生が認められず(図6a)、K562に対する細胞傷害活性も低値であった(図6b)。II型の症例では細胞培養時にOK-432を併用してもNK細胞の増殖が誘導できなかった(図7)。これに対して健康人と同じ

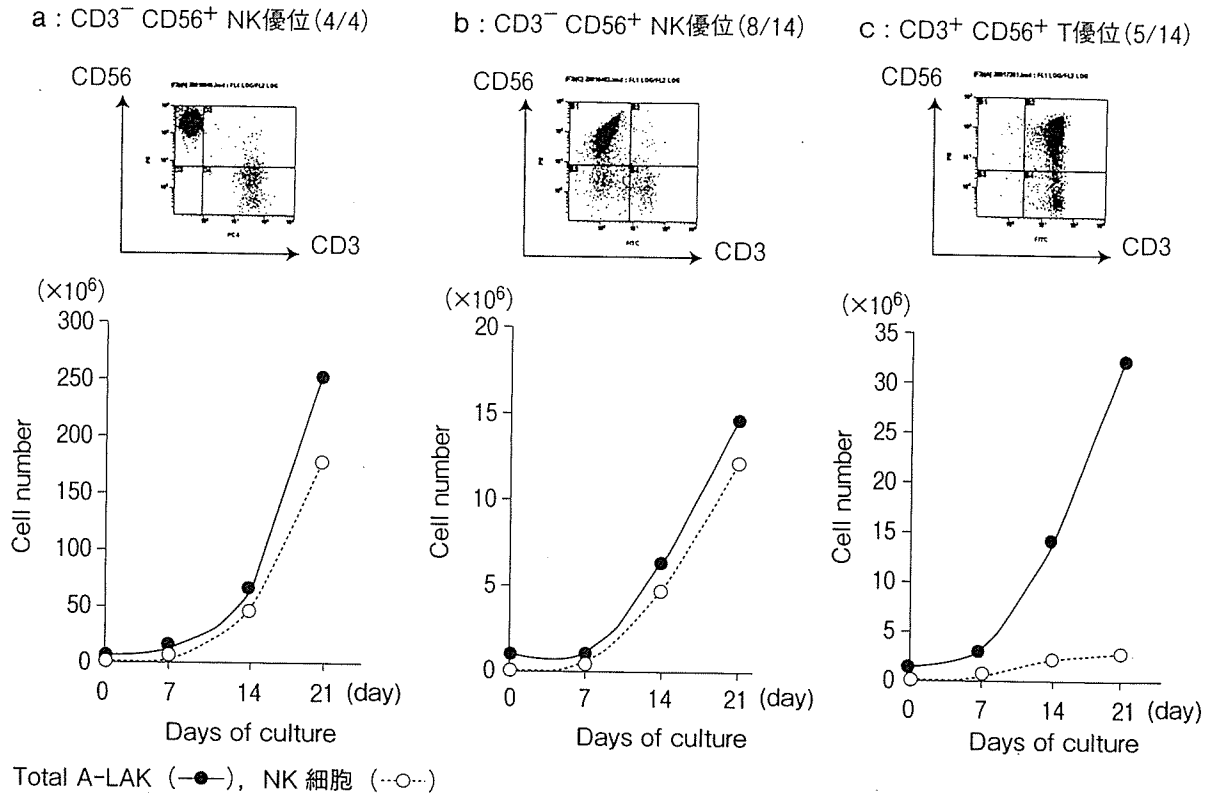


図5 健康人および癌患者 A-LAK 中のNK 細胞数の増加パターン分類

a : 健康人, b : 癌患者-I 型, c : 癌患者-II 型

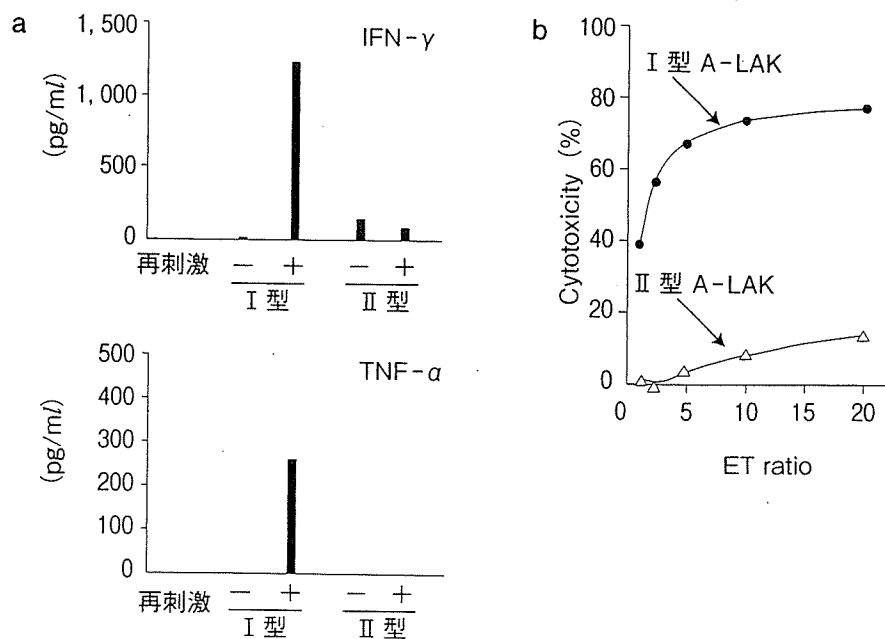


図6 I, II型における Type 1 サイトカイン産生能および細胞傷害活性の比較

a : Type 1 サイトカイン産生。2×10<sup>5</sup> 個の A-LAK 細胞を 2×10<sup>4</sup> 個の癌細胞にて再刺激した際の混合培養 24 時間後の培養上清中の IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  量を BD Human Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array にて測定。

b : K562 に対する細胞傷害活性を測定。

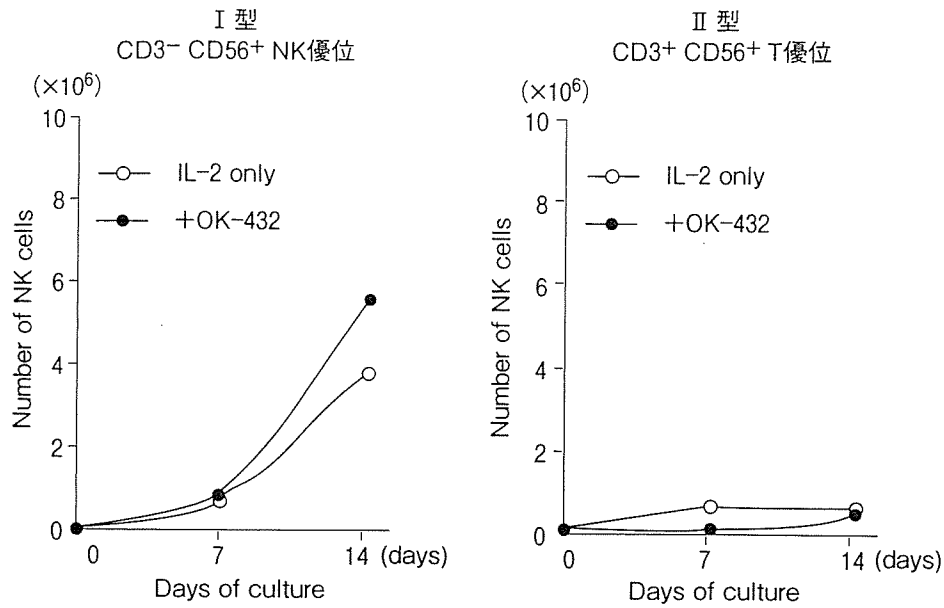


図7 細胞培養におけるOK-432併用によるNK細胞増殖効果

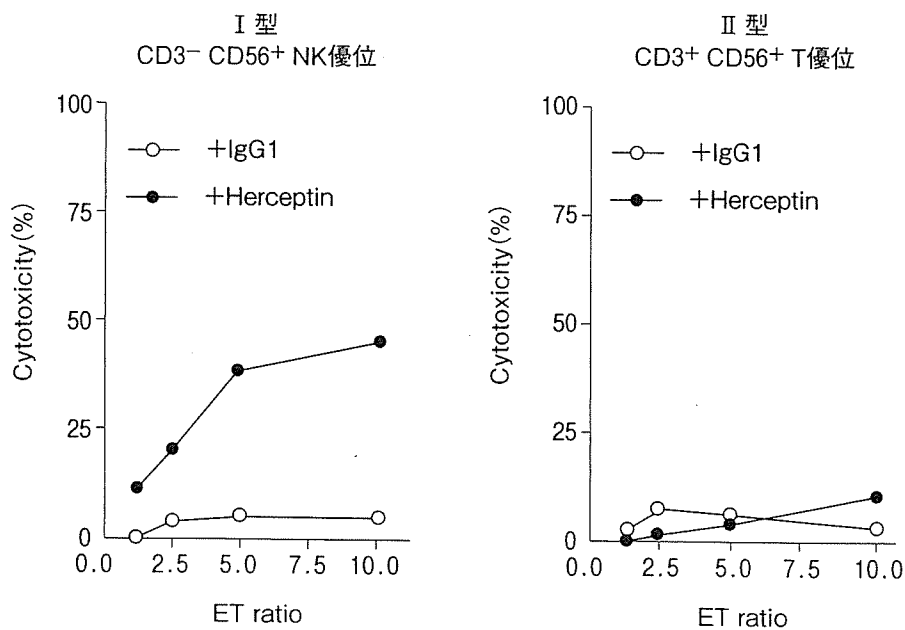


図8 抗HER2抗体併用による細胞傷害活性増強効果

CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK細胞が増殖するI型では、OK-432の併用によりさらにNK細胞増殖が増強された。II型の症例ではもともと末梢血中のCD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK細胞比率が5%以下であり、極度にNK細胞の少ない患者ではこの方法を用いてもNK細胞の選択的活性化増殖は困難と考えられ、NK細胞療法自体の実施が困難な症例が存在する

ことが認められた。

#### V. 抗体併用NK細胞療法の開発

近年、ヒト化抗体の医療への応用が目覚ましく、すでに保険適応の標準治療薬となっている“Herceptin”は乳癌に高発現するHER2分子を標的としたヒト化モノクローナル抗体であり、標

的分子の HER2 と結合する側の対側に Fc レセプターを有しているため生体内で NK 細胞の CD16 分子と結合して ADCC を誘導する。ところが、NK 細胞の減少している癌患者では Herceptin の臨床効果が低下することが報告されており、抗体療法における生体内の NK 細胞の動態が重要視されている。われわれは、健常人において Herceptin 併用による LAK 細胞の腫瘍細胞傷害活性の増強を確認し、さらに OK-432 併用培養により NK 細胞を選択的に増殖させることにより、この Herceptin 併用による細胞傷害活性増強効果がさらに高まることを報告した<sup>2)</sup>。癌患者では NK 細胞の数および機能が低下しているが、OK-432 併用培養により、Herceptin 併用効果の増強が確認されている<sup>3)</sup>。しかし、前述の A-LAK 法にて CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> T 細胞が優位に増殖する、NK 細胞の極度に低下した II 型症例では Herceptin 併用による細胞傷害活性の増強効果も認められなかった (図 8)。

この抗体併用 NK 細胞療法は、利用する抗体を変えることにより多くの腫瘍に応用が可能と考えられ、実際、肺癌や大腸癌などに高度に発現する EGFR に対する抗体医薬である Erbitax を用いることにより、EGFR<sup>+</sup>腫瘍に対する NK 細胞の細胞傷害活性増強が確認されている<sup>6)</sup>。今後、多くの抗体療法が臨床に取り入れられていくことが考えられるが、癌患者における NK 細胞の減少は抗体療法それ自体の効果を低減する重要な因子となる。抗体療法と同時に NK 細胞療法を併用することが、臨床効果増強の目的で普及していくことが期待される。

## おわりに

NK 細胞は古くて新しい免疫細胞である。近年のレセプター解析や樹状細胞との関係など学問的にも興味深い。今回、単核細胞層からの樹状細胞、T 細胞、NK 細胞の同時分離培養が可能となったことより、複数の免疫細胞を同時に利用した複合癌免疫療法の新規開発が期待され、癌細胞の MHC 抗原や腫瘍抗原の発現の多様性に対応することが可能となることが期待される。NK 細胞はこれからの癌免疫療法における重要な効果細胞であることを改めて認識させられ、今後は末梢採血から NK 細胞を階層的に増殖させられる簡易な選択的活性化増殖培養法の開発が待たれるところである。

## 文 献

- 1) 須藤俊美, 小林泰信, 有賀 淳・他: 非特異的免疫細胞治療における効果細胞の解析. 癌と化学療法 30(11): 1817-1820, 2003.
- 2) 小林泰信, 須藤俊美, 有賀 淳・他: NK-Enriched LAK 細胞の培養とその有用性. 癌と化学療法 30(11): 1776-1779, 2003.
- 3) Sudo, T., Aruga, A., Matsushita, N., et al.: OK432-activated natural killer cells enhanced trastuzumab-mediated antigen-dependent cellular cytotoxicity in patients with advanced cancer. *Anticancer Res.* (submitted)
- 4) 有賀 淳, 清水公一, 高崎 健: 消化器癌における免疫療法. 東京女医大誌 74(6/7): 1-9, 2004.
- 5) 松下典正, 小林泰信, 有賀 淳・他: 腫瘍細胞の多様性に対応した複合癌免疫細胞療法の新規開発. 癌と化学療法 31(11): 1655-1658, 2004.
- 6) 小峰啓史, 田中宜之, 有賀 淳・他: 肺癌に対する抗 EGFR 抗体併用細胞療法の基礎的検討. 癌と化学療法 32(11), 2005. (in press)

## 特別企画

● モノクローナル抗体の現状と展望 ●

## 悪性腫瘍に対する抗体併用細胞療法の基礎的検討

東京女子医科大学大学院医学研究科・外科系専攻

須藤 俊美 有賀 淳

**要旨** われわれは、悪性腫瘍に対する免疫療法として患者自己免疫細胞を利用した細胞療法の開発を研究している。今回、非特異的細胞傷害活性を有する活性化免疫細胞投与と悪性腫瘍の標的分子に対する特異的モノクローナル抗体である Herceptin の併用による腫瘍特異的細胞傷害活性増強効果を検討し、抗体医薬併用細胞療法の可能性を検討した。健常人の末梢血単核細胞より IL-2 添加培養にて誘導した LAK 細胞の細胞傷害活性は Herceptin の併用により HER2 強陽性腫瘍および HER2 弱陽性腫瘍に対して増強効果が認められたが、HER2 陰性腫瘍では認められなかった。LAK 細胞中の細胞傷害性効果細胞の主体である CD3 陰性 CD56 陽性 NK 細胞の選択的活性化増殖培養において OK-432 の添加が有効であり、OK-432 添加培養で CD3 陰性 CD56 陽性 NK 細胞を選択的に活性化増殖させた場合に、Herceptin 併用による著明な細胞傷害活性の増強および Type 1 サイトカイン産生の増強が認められた。以上より、Herceptin を併用した細胞療法の可能性が示され、効果細胞である NK 細胞の選択的活性化増殖培養に OK-432 の利用が有効と考えられた。

索引用語：細胞療法，抗体療法，Herceptin，OK-432，NK 細胞

[Biotherapy 19 (5) : 430-434, September, 2005]

**Cancer Cell Therapy with HER2-Specific Monoclonal Antibody**

Toshimi Sudo and Atsushi Aruga

*Division of Surgery, Graduate School of Medicine, Tokyo Woman's Medical University*

**Summary**

We are presently attempting to develop a new cancer cell therapy using the patient's own autoimmune cells for immunotherapy against malignant tumors. We are now investigating the tumor-specific cytotoxic enhancing effect of the use of Herceptin, a specific monoclonal antibody against malignant tumor target molecules, together with the administration of activated immune cells with nonspecific cytotoxicity. An enhanced effect was found on HER2-positive tumor and HER2 weakly-positive tumor by combination with Herceptin due to LAK cell cytotoxicity induced by culture of peripheral blood mononuclear cells with IL-2 added. However, this effect was not recognized in HER2-negative tumors. The addition of OK-432 was effective in selective enhancement of CD3-negative, CD56-positive NK cells, the main cells with cytotoxic effects among LAK cells. When CD3-negative, CD56-positive NK cells selectively underwent activated propagation, there was a remarkable enhancement of cytotoxicity due to the combination with Herceptin as well as enhanced production of Type 1 cytokine. Based on the foregoing, the feasibility of cancer cell therapy in combination with Herceptin was demonstrated, and the use of OK-432 in the selective culture of effective NK cells was considered to be efficacious.

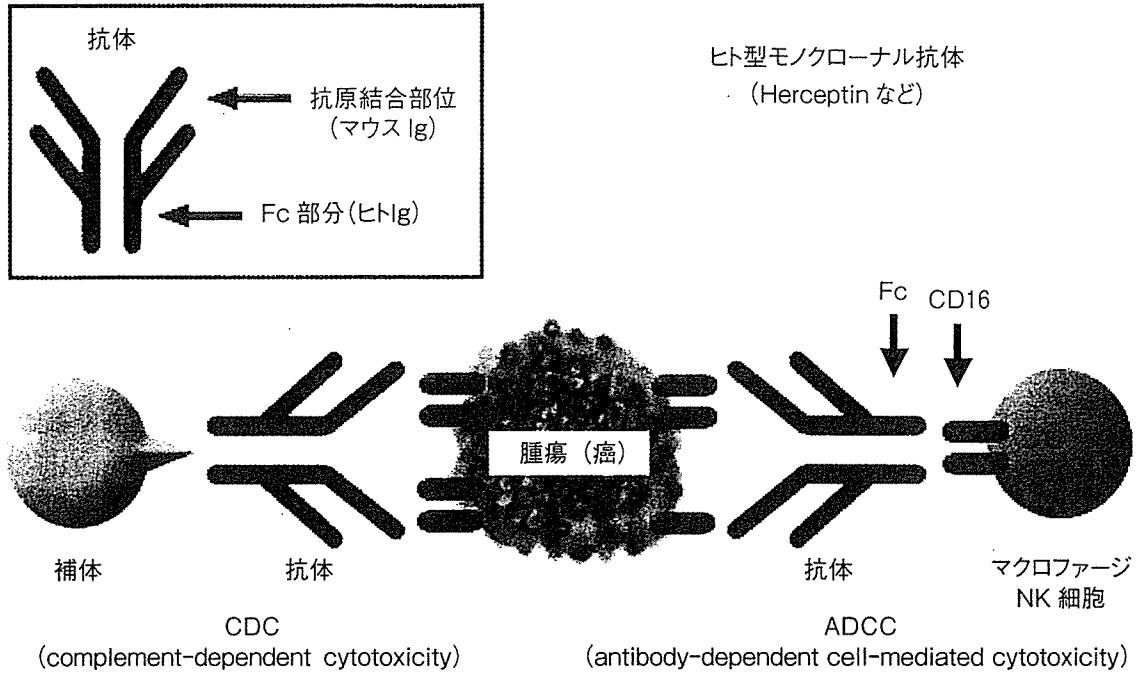


図1 モノクローナル抗体を併用した細胞療法

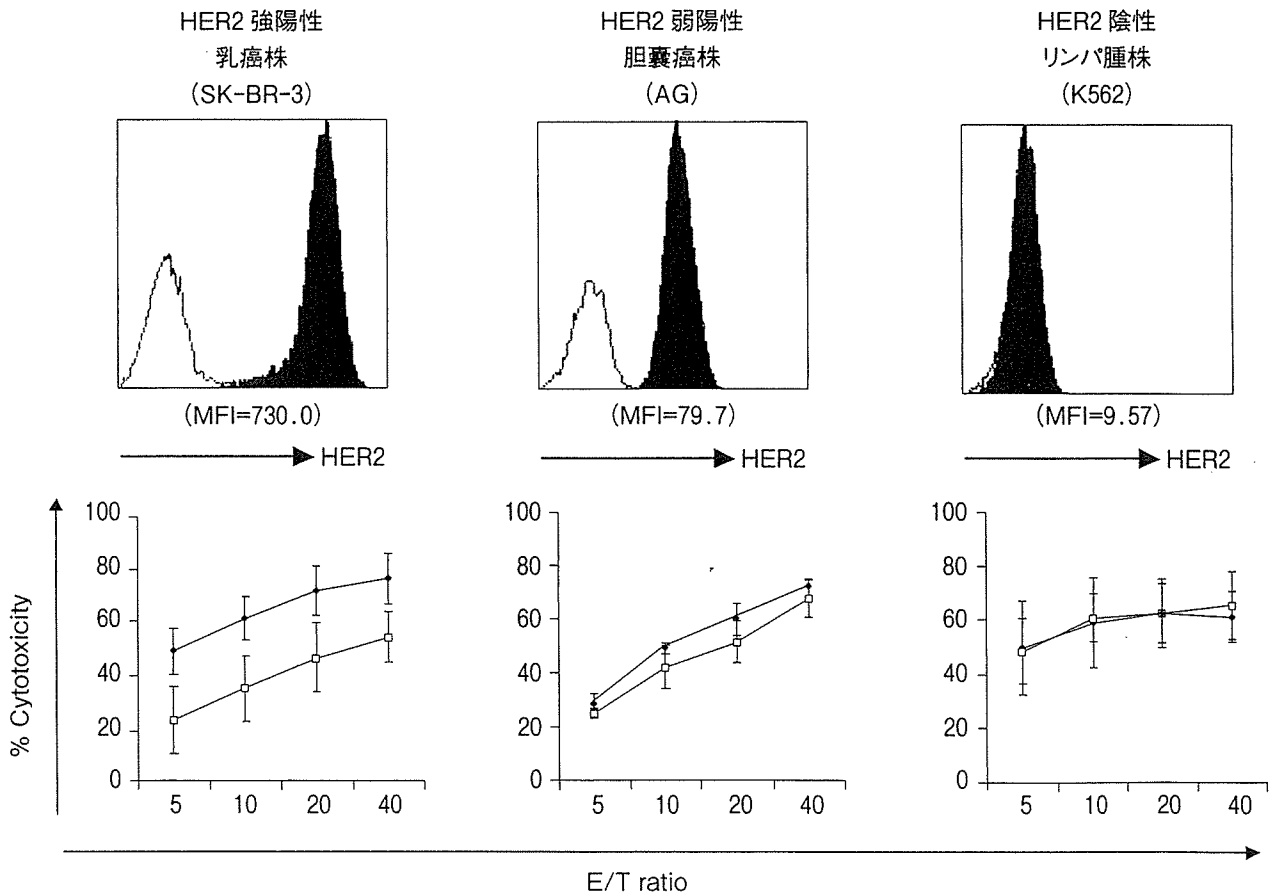


図2 Herceptin 併用による LAK の細胞傷害活性増強効果

□: ヒト IgG1 添加 ◆: Herceptin 添加

養することにより、CD3 陰性 CD56 陽性 NK 細胞比率を OK-432 非添加時の 20% から 70% に増加させることが可能であった。さらに、OK-432 添加にて NK 細胞を選択的に活性化増殖させることにより、Herceptin 添加による HER2 陽性腫瘍に対する細胞傷害活性は著明に増強し、同時に腫瘍細胞に反応した IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  の産生も著明に増加した (図 3)。同 PBMC を固相化抗 CD3 モノクローナル抗体 (OKT3) と IL-2 にて活性化培養した CAT 細胞では 90% 以上が CD3 陽性 CD56 陰性 T 細胞であり、Herceptin 併用による細胞傷害活性の増強効果は認められなかった (図 4)。以上より、抗体医薬併用細胞療法における効果細胞として NK 細胞の選択的活性化増殖培養が効果的であることが示された。

#### IV. 考 察

近年の抗体医薬の開発は目覚ましく、これからの癌治療における有力な治療薬として期待されている。しかし、癌患者ではしばしば生体の免疫能が低下しており、NK 細胞の数および機能の減少が確認されている。よって、癌患者においては抗体医薬の作用、特に ADCC など介する作用が減弱することが考えられ、免疫細胞自体を強化する細胞療法との併用が重要となると推測される。われわれは悪性腫瘍に対する免疫細胞治療の研究を行ってきたが、当初の LAK 細胞などの非特異的免疫作用を応用した方法から最近では癌抗原特異的免疫細胞治療へと推移している<sup>4)</sup>。一般的には、抗原特異的免疫細胞療法が細胞傷害活性や Type 1 サイトカイン産生能などで LAK 細胞に代表される非特異的免疫療法より優れていると考えられているが、腫瘍分子特異的抗体を併用することに

より非特異的免疫細胞の細胞傷害活性が腫瘍特異的となり、増強することが今回確認された。この抗体医薬併用細胞療法の抗腫瘍効果をさらに上げるためには ADCC の主体である CD16 陽性 NK 細胞の働きが特に重要である。今回われわれは体外で NK 細胞の選択的活性化増殖法を確立し、臨床応用への可能性が示されたと考える。今後、多くの腫瘍特異的分子に対するモノクローナル抗体が医薬品として開発されることが推測され、それらの抗体医薬と NK 細胞療法の併用が多種の疾患にて検討されていくことが期待される<sup>5)</sup>。

#### おわりに

HER2 陽性腫瘍に対する Herceptin 併用細胞療法の有効性が示され、抗体併用細胞療法の可能性が示唆された。効果細胞として NK 細胞が重要であり、その選択的活性化増殖培養に OK-432 の利用が有効と考えられた。

#### 文 献

- 1) Sudo, T., Aruga, A., Matsushita, N., *et al.*: OK432-activated natural killer cells enhanced trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with advanced cancer. *Anticancer Res.* (submitted)
- 2) 須藤俊美, 小林泰信, 有賀 淳・他: 非特異的免疫細胞治療における効果細胞の解析. *癌と化学療法* 30(11): 1817-1820, 2003.
- 3) 小林泰信, 須藤俊美, 有賀 淳・他: NK-Enriched LAK 細胞の培養とその有用性. *癌と化学療法* 30(11): 1776-1779, 2003.
- 4) 有賀 淳, 清水公一, 高崎 健: 消化器癌における免疫療法. *東京女医大誌* 74(6/7): 1-9, 2004.
- 5) 小峰啓史, 田中宜之, 中尾真修・他: 肺癌に対する抗 EGFR 抗体併用細胞療法の基礎的検討. 第 26 回癌免疫外科研究会抄録集, 2005, p. 73.



## 4 術後肝癌再発抑制 を目指した 樹状細胞療法

しみず こういち  
■ 清水 公一<sup>1)</sup>  
あるが あつし  
・ 有賀 淳<sup>2)</sup>

東京女子医科大学消化器病センター外科助手<sup>1)</sup>  
同大学院医学研究科がん免疫細胞治療学教授<sup>2)</sup>



清水公一  
1991年千葉大学医学部卒業。同年、東京女子医科大学消化器病センター外科入局。97年、米国ミシガン大学腫瘍外科に留学。樹状細胞療法の研究に従事。2000年東京女子医科大学消化器病センター助手、大腸癌化学療法、肝臓外科を専門。2001年腫瘍免疫・免疫細胞療法チーム主任、臨床試験担当責任医師兼任。研究テーマは腫瘍免疫、大腸癌化学療法、肝臓外科。趣味は北海道旅行、テニス、スキー。

Key words : 樹状細胞ワクチン 再発抑制 肝細胞癌

### Abstract

進展因子や肝内転移を伴う肝細胞癌は、治癒切除後の転移再発を抑制することが必要である。肝細胞癌に対して、自己リンパ球移入療法や癌ワクチン療法が施行され、奏功例や再発抑制効果が報告されている。自己癌抽出抗原を使用して、樹状細胞癌ワクチンと自己リンパ球移入の併用療法を、HCV陽性肝細胞癌の切除術後に施行し、再発抑制効果が得られるかを検討した。自己癌に対する獲得免疫が誘導された免疫反応陽性群では、手術単独群と比較して再発が約70%抑制された。

### はじめに

ウイルス発癌である肝細胞癌では、外科切除にて肉眼的治癒切除が得られても、転移再発や多中心性再発の危険がある。特に進展因子(vp, vv, b)あるいは肝内転移(im)を伴う肝細胞癌では、治癒切除(区域切除以上)を施行しても、高率に転移再発をきたす。肝細胞癌の外科切除成績を向上させるためには、転移再発予防対策が必要である。

### 1. 背景

肝細胞癌に対しては、さまざまな癌免疫療法が研究・実施されてきた。1980年代後半から1990年代前半にかけては、肝動脈内に留置カテーテルを挿入してLAK細胞を注入する治療や、LAK細胞を点滴静注する治療が、切除不能多発性肝細胞癌を対象に施行され、臨床効果が認められた例も報告された<sup>1), 2), 3)</sup>。しかし、肝動脈留置カテーテルから化学療法のみ行う場合と化学療法に加えてLAK細胞とIL-2を投与する場合とで、肝細胞癌術後の再発予防効果を調べる比較がなされたが、免疫化学併用療法の上乗せ効果は証明できなかった<sup>4)</sup>。1990年前半からは癌特異的細胞傷害性リンパ球であるCTL療法や、LAK細胞より簡便に培養する方法を用いたCAT療法が行われた。我々の施設は、切除不能多発性肝細胞癌に対して、肝動脈留置カテーテルからCTL細胞を投与して、3例の癌の消失、2例の癌の縮小を報告した<sup>5)</sup>。国立がんセンターは、肝細胞癌術後にCAT細胞を静脈投与することで、手術してから5年後の無再発生存率がCAT療法では38%、手術単独では22%となり、有意

*Dendritic cell-based Immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: Koichi Shimizu, Atsushi Aruga, Department of Surgery, Institute of Gastroenterology, Tokyo women's Medical University (TWMU)*

に無再発生存率が向上することを報告した<sup>6)</sup>。しかし、手術してから5年後の全生存率はCAT療法では68%、手術単独では62%となり、手術後にCAT療法を行うことで生存率そのものが向上することは証明できなかった。

一方1990年代後半になってから、癌ワクチン療法が注目されるようになり、自己癌を利用した腫瘍ワクチン療法あるいは樹状細胞癌ワクチン療法が研究・実施されはじめた。多発性肝細胞癌に対して樹状細胞癌ワクチン療法を行うことで1例の腫瘍縮小、2例のAFPの低下が報告された<sup>7)</sup>。またB型肝炎併存の肝細胞癌で、手術後に自己腫瘍ワクチン療法を行うと無再発生存期間、全生存期間がともに延長することが報告された<sup>8)</sup>。

以上のことを踏まえて、肝細胞癌術後の転移再発を抑制して治療成績を向上させるために、我々の施設では、腫瘍抽出抗原をパルスした樹状細胞癌ワクチンと、抗CD3抗体とIL-2で培養・誘導した自己リンパ球を併用投与しているので、その概略を解説する。

## 2. 方法

我々は、各治療毎にアフエレーシスを施行し、末梢血単核球(PBMC)をGM-CSFとIL-4で7日間培養し、樹状細胞を誘導している。最後の2日間はTNF- $\alpha$ を使用して樹状細胞の成熟化を促し、同時に腫瘍抽出抗原をパルスしている(図1)。またPBMCから抗CD3抗体とIL-2を用いて自己リンパ球を培養・誘導している(図2)。樹状細胞療法を施行しながら、毎回アフエレーシスで採取したPBMCには、徐々に抗原特異的な前駆細胞(CD4とCD8 T細胞)の比率が増加する。その結果、培養・誘

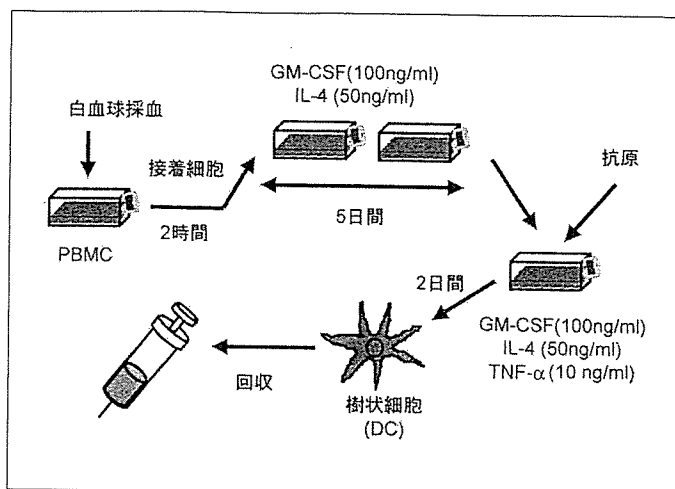


図1 樹状細胞の誘導・調整

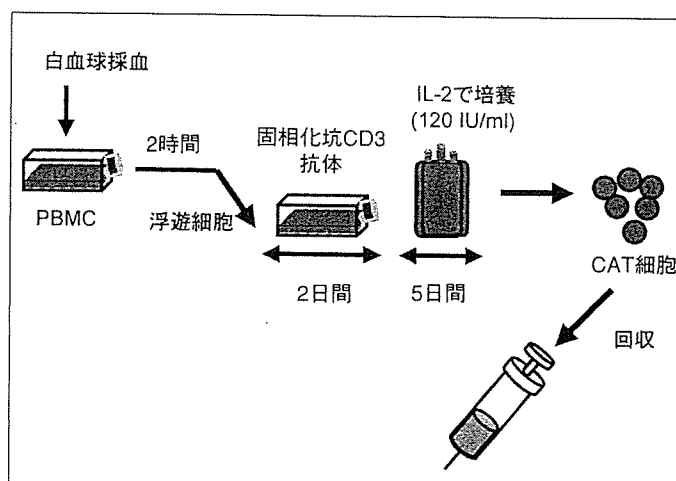


図2 自己リンパ球の培養・調整

導された自己リンパ球は、抗原特異的な細胞障害性CD8 T細胞と、抗原特異的にサイトカイン産生をするヘルパーCD4 T細胞を含むようになる。外科切除で摘出した腫瘍から抽出抗原を作製し、ヘルパー蛋白であるkeyhole limpet hemocyanin (KLH)を混合して樹状細胞にパルスする。KLHは、サロゲートマーカーになると同時に、腫瘍特異的ヘルパーCD4細胞の応答を強めることで、細胞障害性CD8 T細胞の抗腫瘍効果を増強する<sup>9)</sup>。

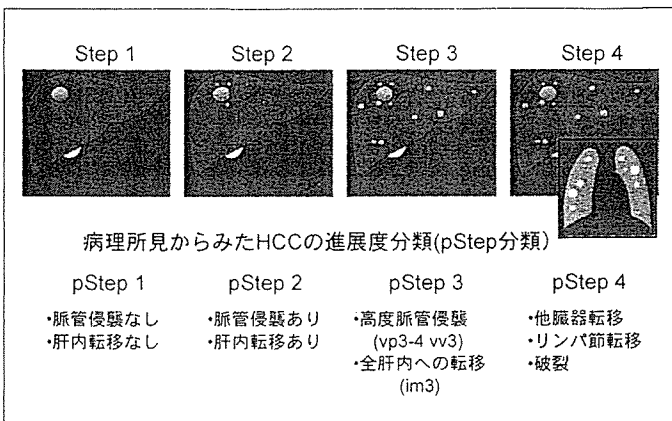


図3 HCCの進展度分類 (Step分類)

でも、約75%の症例で再発（特に転移再発）を起こしてくる。消化器病センター外科の切除例の検討では、術前画像診断で原発性肝癌取り扱い規約の単純結節周囲増殖型、多結節癒合型や塊状型を呈する肝細胞癌の80%以上が、病理所見で pStep2以上の進展度を示した。したがって、術前の肉眼型が単純結節周囲増殖型、多結節癒合型や塊状型を示す肝細胞癌が転移再発高危険群である。

#### 4. 転移再発予防対策

##### 1) 目的

術前の画像診断で単純結節周囲増殖型、多結節癒合型や塊状型を示すHCV陽性肝細胞癌を対象に、術後補助免疫細胞療法として癌免疫療法（免疫群）を行い、無再発生存率と全生存率の向上が認められるか否かを検討した。

##### 2) 方法

1999年10月1日より、2005年8月31日まで、HCV陽性で腫瘍の最大径が2 cm以上、術前CT画像で単純結節周囲増殖型（多結節癒合型や塊状型を含む）を示す肝細胞癌の患者を登録した。インフォームドコンセントにて同意の得られた症例は免疫群に振り分け、同意の得られない症例は手術単独治療（手術単独群）としてクリニカルコントロールとした。術後摘出標本の病理所見から被膜外浸潤、脈管浸潤あるいは肝内転移を満たす症例を適格症例とした。プライマリーエンドポイントは全生存期間、セカンダリーエンドポイントは無再発生存期間とした。

##### 3) 治療

免疫群は、T細胞移入と自己癌抽出抗原提

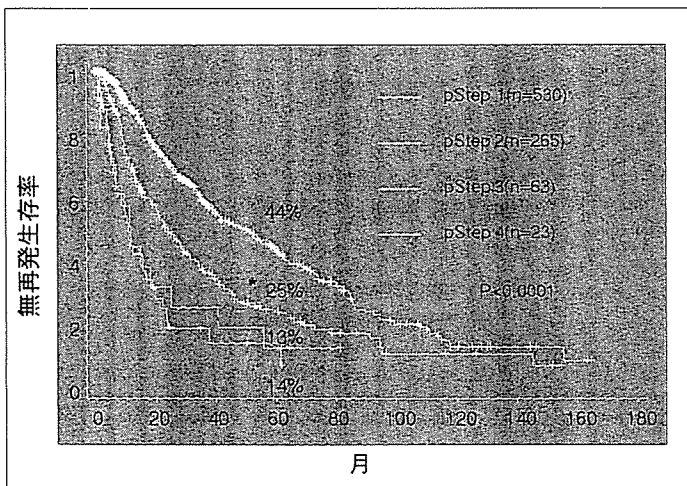


図4 無再発生存曲線

### 3. 肝細胞癌の転移再発高危険群

病理学的検討で、肝臓内に病変がとどまり脈管浸襲や肝内転移が認められない pStep 1、脈管浸襲や肝内転移を認める pStep2、高度の脈管浸襲(Vp3-4, vv3)や全肝内への転移(im3)を認める pStep3、他臓器転移、リンパ節転移や破裂を認める pStep4に分類すると（図3）、pStep2の5年無再発生存率は25%である（図4）。つまり、脈管浸襲や肝内転移を伴う肝細胞癌では、肝切除術で肉眼的治癒切除を行っ

示樹状細胞癌ワクチンの併用療法とした。手術直後から投与を開始すること、手術後3ヶ月以内に獲得免疫を成立させること（自己癌に対して免疫反応が陽性化すること）を目安にして、獲得免疫の成立を示す免疫反応の陽性化までは併用療法を継続した。T細胞移入療法は静脈投与あるいは肝動脈注入のいずれかとした（図5）。

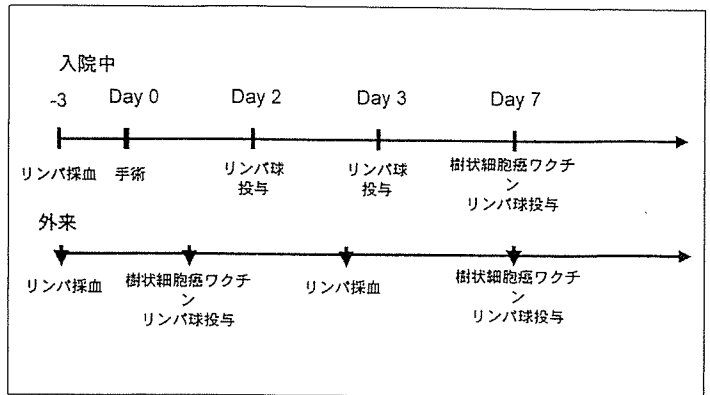


図5 癌免疫療法の概要  
術後3ヶ月以内に、樹状細胞ワクチンと自己リンパ球移入の併用療法を最低計4回施行し、皮内反応を陽性化させることを目標とした。陽性化することで、無再発生存期間の延長、全生存期間の延長が認められるか否か？をエンドポイントにした。

4) 患者登録

1999年10月から2005年8月までに95例の患者が登録された。インフォームドコンセントで同意の得られなかった68例は手術単独群、同意の得られた27例は免疫群として、病理所見で被膜外浸潤、脈管浸潤あるいは肝内転移の認められなかった症例は除外し、手術単独群62例、免疫群20例を適格症例として登録した（図6）。

5) 患者背景因子

性差、年齢、Child-pugh分類、非癌肝の状態、肝トランスアミナーゼ値、腫瘍径、ICGR15、stage、脈管浸潤、肝内転移、術式に各群で差がないかを検討したが、有意差は認められなかった。

6) 結果

登録された全82症例の無再発生存曲線は図7のようになった。手術単独群の50%無再発生存期間は14ヶ月(95% CI 9-19ヶ月)、免疫群では15ヶ月(95% CI 11-29ヶ月)であった。免疫群で、免疫反応が陽性化した群（自己癌に対する免疫応答が誘導された群）でサブセット解析を行ったところ、免疫陽性群では手術単独群と比較して有意差をもって、50%無再発生存期間が延長していた(not reached vs 14ヶ

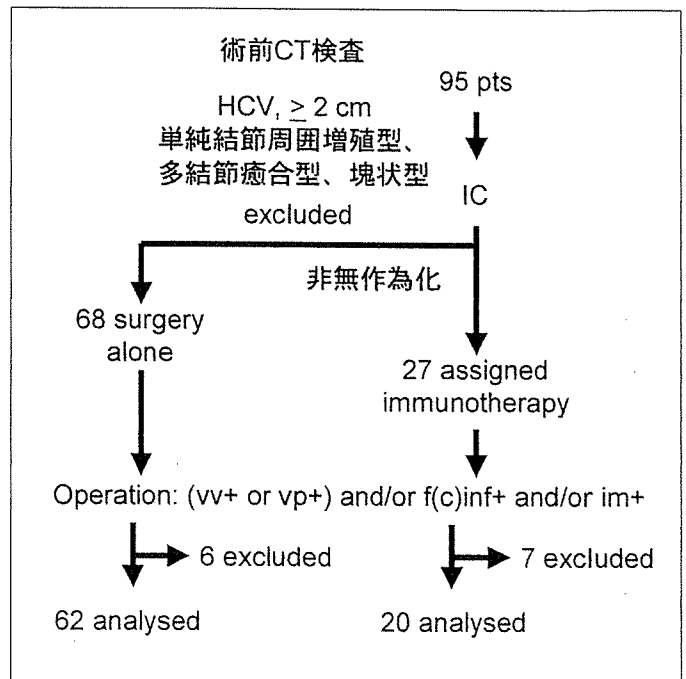


図6 患者登録

月, p=0.0158)（図8）。Coxの比例ハザードモデルで解析すると、手術単独群と比較して免疫反応陽性群は、ハザード比は0.293 (95% CI 0.104-0.822)でp=0.020であった。つまり免疫反応陽性群では、手術単独群と比較して、再

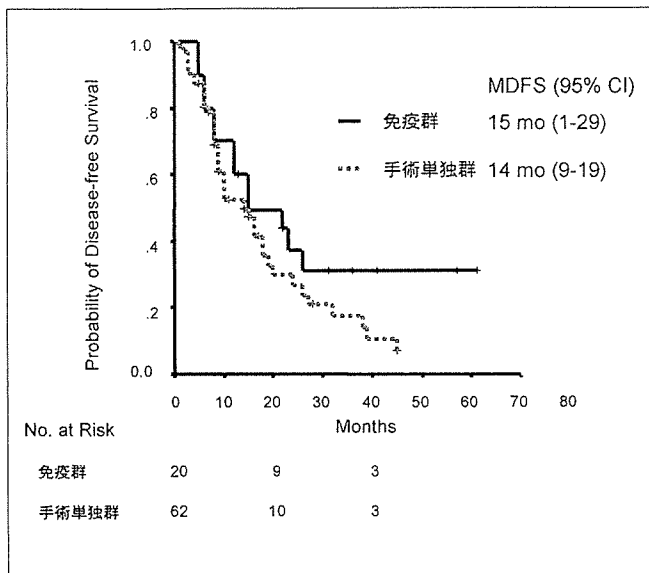


図7 無再発生存曲線

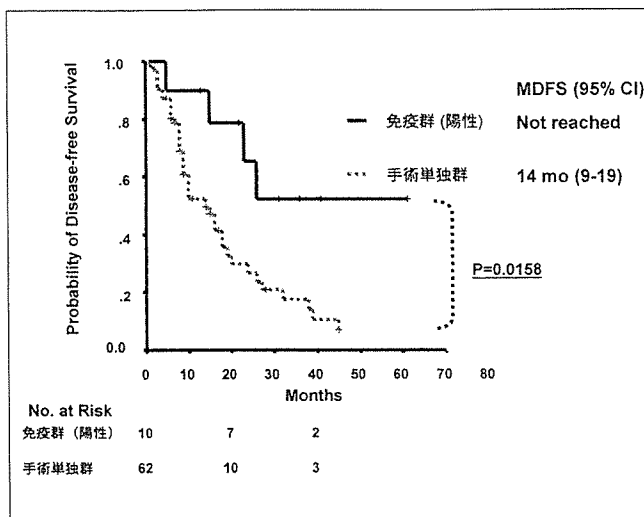


図8 免疫群 (陽性) の無再発生存曲線

発が約70%程度抑制された。

## 7) まとめ

進展因子あるいは肝内転移を伴うHCV陽性肝細胞癌の治癒切除後に、補助免疫細胞療法を施行することで再発抑制が得られた。抗原に対する獲得免疫が確立（免疫反応の陽性化）しないと再発抑制効果は認められなかったこ

とから、免疫反応陽性化を術後早期に達成することが治療効果を得るために必要であると考えられた。

おわりに

HCV陽性肝細胞癌では、長期予後は肝障害（肝不全死、静脈瘤破裂死など）や多中心性再発も関与してくるため、補助療法が全生存期間を改善するかどうかの評価は難しい。我々の補助免疫細胞療法が、HCV陽性肝細胞癌術後の全生存期間を改善するかは、今後の観察を待たなくてはならない。しかし、獲得免疫を利用した免疫療法が、さまざまな感染症の発症やHPV由来の子宮頸がん発癌を抑制することから、進行癌術後の微小遺残に対して、樹状細胞癌ワクチンを中心とした補助免疫細胞療法が今後普及することを期待してやまない。

文献

1. Ichida, T., Higuchi, K., Arakawa, K., *et al*: Cancer Chemother Pharmacol. 23 Suppl: S45-48, 1989.
2. Onishi, S., Saibara, T., Fujikawa, M., *et al*: Hepatology.. 10: 349-353, 1989.
3. Yeung, A. W., Pang, Y. K., Tsang, Y. C., *et al*: Cancer. 71: 3633-3639, 1993.
4. Kawata, A., Une, Y., Hosokawa, M., *et al*: Am J Clin Oncol. 18 : 257-262, 1995.
5. Haruta, I., Yamauchi, K., Aruga, A. *et al*: J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 19: 218-223, 1996.
6. Takayama, T., Sekine, T., Makuuchi, M., *et al*: Lancet, 356: 802-807, 2000.
7. Iwashita, Y., Tahara, K., Goto, S., *et al*: Cancer Immunol Immunother. 52: 155-161, 2003.
8. Kuang, M., Peng, B. G., Lu, M. D., *et al*: Clin Cancer Res.. 10: 1574-1579, 2004.
9. Shimizu, K., Thomas, E. K., Giedlin, M., *et al*: Cancer Res. 61: 2618-2624, 2001.

BioInformation

第29回 日本嚙下医学会総会・学術講演会

日本嚙下医学会では下記日程にて総会・学術講演会を開催いたします。

会 期：2006年2月2日（木）～3日（金）

会 場：京都府立医科大学 図書館ホール

会 場：久 育男（京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室）

※本誌バックナンバーも会場にて展示販売の予定です。

お気軽にお立ち寄り下さい。

## 特別企画

● 癌免疫療法の効果判定法について ●

## 皮内反応は腫瘍抗原に対する特異的免疫反応と 臨床効果の指標になるか

\*<sup>1</sup> 東京女子医科大学消化器病センター・外科, \*<sup>2</sup> 東京女子医科大学大学院医学研究科・がん免疫細胞治療学

清水 公一\*<sup>1</sup> 竹下 信啓\*<sup>1</sup> 小寺 由人\*<sup>1</sup>  
山本 雅一\*<sup>1</sup> 高崎 健\*<sup>1</sup> 有賀 淳\*<sup>2</sup>

**要旨** 自己腫瘍抽出抗原をパルスした樹状細胞癌ワクチン療法と自己リンパ球移入療法の併用療法を行い、自己腫瘍抽出抗原に対する皮内反応の有無が、特異的免疫反応と臨床効果の指標になるかどうかを検討した。併用療法施行後、皮内反応が陽性化すると、末梢血液中のリンパ球数(%リンパ球)が増加し、増加したリンパ球の主体はT細胞であった。増加したT細胞は自己腫瘍抽出抗原特異的にサイトカインを産生する細胞集団であった。皮内反応陽性化と同時に認められた、末梢血液中のリンパ球やT細胞の増加、T細胞からの自己腫瘍特異的なサイトカイン産生増加は、皮内反応が減弱・陰性化すると併用療法前のベースラインに戻った。肝細胞癌術後の補助免疫療法として、併用療法を施行し皮内反応が陽性化した群では、無再発生存期間の延長が認められた。皮内反応が腫瘍抗原に対する特異的免疫反応と臨床効果の指標になることが推測された。

[Biotherapy 20 (2) : 190-196, March, 2006]

### Can DTH Responses to Tumor Lysates *In Vivo* Predict Tumor Lysate-Specific Immune Responses and Clinical Responses?

Koichi Shimizu\*<sup>1</sup>, Nobuhiro Takeshita\*<sup>1</sup>, Yoshihito Kotera\*<sup>1</sup>, Masakazu Yamamoto\*<sup>1</sup>,  
Ken Takasaki\*<sup>1</sup> and Atsushi Aruga\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>Department of Gastroenterological Surgery, Institute of Gastroenterology, \*<sup>2</sup>Cancer Immunotherapy and Cell Therapy, Graduate School of Medicine, Tokyo Women's Medical University

#### Summary

We sought to determine the correlation of delayed-type hypersensitivity (DTH) responses to tumor lysates *in vivo* with immune responses to lysates *in vitro* and clinical responses. Patients received tumor lysate-pulsed dendritic cells (TP-DC) intradermally with T cells activated with interleukin-2 and antibody to CD3 (AT) intravenously 4 times at 2-week intervals. After the final treatment, patients with positive DTH to tumor lysates revealed an increase in the number of peripheral blood lymphocytes (PBL) compared to those with negative DTH. An increase in the number of T cells in PBL was observed in patients with positive DTH. Furthermore, patients with positive DTH revealed significant IFN-gamma production by T cells stimulated with TP-DC. The duration of positive DTH was within 6 months after the final treatment correlated with the decrease in the number of PBL *in vivo* and the decrease in the production of IFN-gamma *in vitro* by T cells. In adjuvant settings for hepatocellular carcinoma, patients with positive DTH experienced less tumor relapse compared to those with negative DTH. A significant correlation among the number of PBL, the DTH responses and clinical responses was observed. DTH responses could be a useful guide to assess patients by immunological and clinical evaluation.

**Key words** : Dendritic cell, DTH, Immune response, Clinical response

**Address request for reprints to** : Dr. Koichi Shimizu, Apt. 501 Domiru-shu, 10-16 Inari-dai, Itabashi-ku, Tokyo 173-0002, Japan

はじめに

同定された人工抗原ペプチドや自己腫瘍抽出抗原（以下、ライセート）をパルスした樹状細胞癌ワクチン療法の臨床試験が国内外で行われている。臨床試験ではいろいろな測定方法で、生体内（*in vivo*）で抗原特異的免疫反応が誘導されているかどうかを検討されている。われわれの施設では、ライセートをパルスした樹状細胞癌ワクチン療法（以下、TP-DC）と自己リンパ球移入療法（以下、AT）の併用療法（以下、ATVAC）を施行し、生体内での腫瘍（抗原）特異的免疫反応の検出を試みており、また免疫反応と臨床効果が相関するかを検討している。

I. 免疫反応の検出

*in vivo*での免疫反応の検出は、3か所の部位で行われている。ライセートをパルスした樹状細胞癌ワクチン療法では（図1）、投与された樹状細胞は所属リンパ節へ遊走し、リンパ節内で腫瘍抗原をT細胞に提示し、腫瘍抗原特異的T細胞を誘導する。1か所目の検出部位は末梢血液である。誘導された腫瘍抗原特異的T細胞は末梢血液中に流れだしてくるので、ELISPOTや古典的なサイトカイン産生測定、セルライン化した自己腫瘍株を標的とした細胞傷害性試験などで、末梢血液中にどれぐらい腫瘍抗原特異的T細胞が混じっているかを *in vitro* で測定する。2か所目の

検出部位は皮膚である。皮膚での delayed-type hypersensitivity (DTH) テストで皮膚反応を測定する。測定の簡便さから、汎用されている。3か所目の検出部位は腫瘍内部である。腫瘍を摘出あるいは生検して組織を得て、腫瘍細胞内にどの程度免疫担当細胞（主としてT細胞）が集積しているか、あるいは腫瘍浸潤リンパ球を培養して、腫瘍抗原特異的なサイトカイン産生や細胞傷害活性が認められるかを測定する。

II. 方法

1. 患者

進行消化器癌患者を対象に、インフォームド・コンセントで同意が得られた後、外科切除にて腫瘍組織を十分量摘出し、遺残した測定可能病変に対してあるいは術後の補助治療として、ATVACを施行した。

2. 治療スケジュール

成分採血装置を使用して患者から末梢血単核球を採取し、標準的方法で樹状細胞と自己リンパ球を誘導した。第I相、第II相臨床試験では採血1週間後に ATVAC を施行した。樹状細胞は鼠径部に皮内注射、自己リンパ球は点滴静注した。1週ごとに採血と治療を繰り返し、計4回の投与を行った。肝細胞癌を対象とした第II相臨床試験では、進展因子や肝内転移を伴いやすい単純結節周囲増殖型の患者で、治癒切除後に ATVAC を施行した。

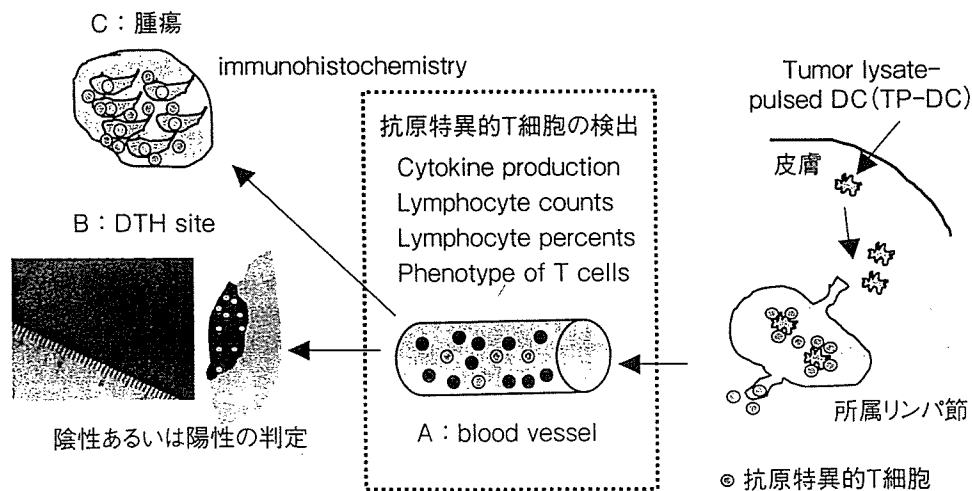
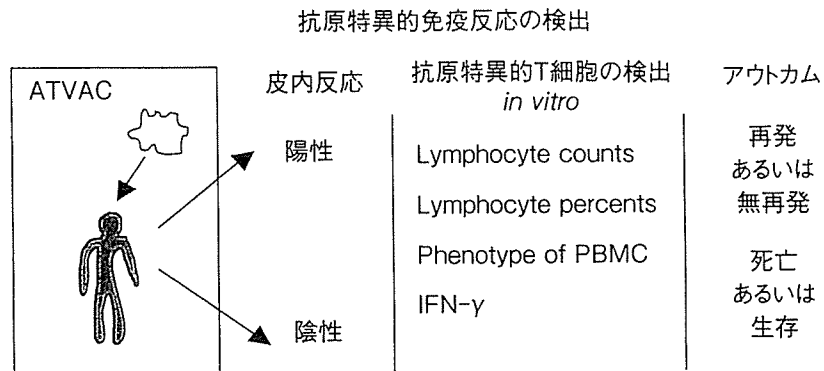


図1 免疫反応の検出



■ *In vitro*での抗原特異的T細胞の検出と皮内反応がどのように関係してくるのか?  
 ■ 皮内反応はアウトカムと関係してくるのか?

図2 検討方法

表1 結果 (ATVAC: 第I相臨床試験)

DC dose	n	Positive DTH (lysates)	Positive DTH (KLH)	Adverse events	
				Fever	Skin
10 <sup>6</sup>	4	0/4	0/4	0/4	0/4
2×10 <sup>7</sup>	7	1/7	4/7	0/7	4/7
10 <sup>8</sup>	16	13/16	16/16	4/16	16/16

Positive 14 pts      Negative 13 pts

3. 測定スケジュール

4回目のATVAC投与終了後、1か月 (post), 3か月, 6か月, 12か月後に特異的免疫反応の有無, 皮内反応, 臨床効果を測定・検討した。

4. 測定・検討項目 (図2)

1) 末梢血液中のリンパ球

末梢血液を採取し, 血液中のリンパ球分画 (絶対数と%), リンパ球の細胞表面マーカーを調べた。

2) DTH反応 (皮内反応)

ライセートを皮内に注射し, 48時間後に皮内反応を測定した。皮膚の硬結を測定し長径5 mm以上を陽性とした。

3) サイトカイン産生

患者末梢血単核球 (PBMC) を採取し, ライセートをパルスした自己樹状細胞あるいはアンパルスした樹状細胞と混合培養し, 上清を回収してIFN-γ産生をELISA法にて測定した。

4) 無再発生存期間 (DFS)

単純結節周囲増殖型の肝細胞癌では, 治癒切除後にATVACを施行し, 再発抑制効果があるかを検討した。外科切除後3か月に1回, 超音波検査あるいはCT検査と腫瘍マーカー検査で再発をチェックした。

III. 結 果

1. 皮内反応と末梢血液中リンパ球の増加には関係がある

ATVACの第I相臨床試験では, 用量試験として1×10<sup>6</sup>個, 2×10<sup>7</sup>個, 1×10<sup>8</sup>個の樹状細胞を投与して, 皮内反応と末梢血液中のリンパ球を測定した。表1のように, 27例中14例で皮内反応が陽性となり, 13例で皮内反応が陰性であった。陽性群と陰性群で, 末梢血液中のリンパ球分画がどのように変化しているかを検討すると, 図3のように陽性群では陰性群と比較して有意に%



リンパ球（絶対リンパ球数）が増加していた（陽性群：治療前 24.9%，治療後 44.8%，陰性群：治療前 24.2%，治療後 29.3%， $p < 0.0001$ ）。

2. 皮内反応の減弱・陰性化と末梢血液中のリンパ球の減少には関係がある

皮内反応の有無と末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）に関係があるか、さらに検討した。外科切除後の補助治療として ATVAC を投与して、皮内反応が陽性化した無再発症例で、4回の投与終了1か月、3か月、6か月、12か月後に皮内反応と末梢血液中リンパ球を測定した（図4）。6例で検討したところ、1例を除き投与終了

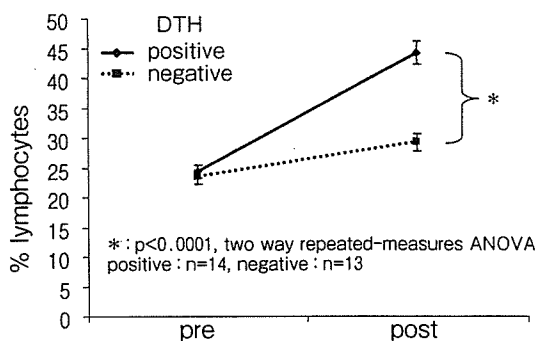


図3 皮内反応陽性群ではリンパ球分画，リンパ球数は増加した

Pts with the positive DTH to tumor lysates after the fourth treatment revealed the increase in the number of PBL compared to those with the negative DTH (from 24.9% to 44.8% vs from 24.2% to 29.3%, respectively;  $p < 0.0001$ ).

後12か月以内に皮内反応は陰性化した。陽性の1例も皮内反応は減弱化した。皮内反応の減弱・陰性化に伴い、末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）は減少し、ATVAC治療前のベースラインに戻った（図5）。以上のことから、皮内反応の有無と末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）の増加が関係していることがわかった。

3. 末梢血液中のリンパ球の増加はT細胞が主体である

皮内反応が陽性化した群では、末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）が増加していることから、リンパ球のうちどのサブセットが増加しているかをフローサイトメトリーで調べた（表2）。陽性群ではT細胞が50.9%から75.2%に増加していた。一方、陰性群ではT細胞は52.8%から47.3%で増加は認められず、皮内反応陽性群では増加しているリンパ球の主体はT細胞であることがわかった。

4. 増加したT細胞はライセート特異的な細胞集団である

末梢血液中に増加しているT細胞が、ライセート特異的な細胞集団を含んでいるかどうかを検討した。ATVAC治療前の患者PBMCと治療後のPBMCを、ライセートをパルスした樹状細胞、あるいはアンパルスの樹状細胞と混合培養して、PBMCから産生されるIFN- $\gamma$ の量を比較した。皮内反応陽性である患者12のPBMCは、治療前より治療後で多量のIFN- $\gamma$ を産生した（図6）。

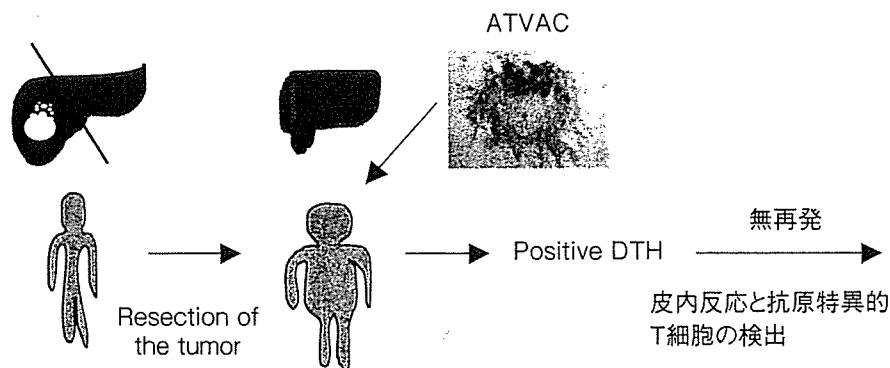


図4 皮内反応陽性群では、皮内反応と抗原特異的T細胞群は計時的にどのように変化していくだろうか（免疫記憶の検出）

Patients who had had primary tumor(s) underwent tumor resection. After the resection of the tumor(s), pts received TP-DC/CAT 4 times as described. Pts with the positive DTH were followed every 3 months after the final treatment. Immunologic and DTH responses (T cell-memory) were assessed in pts with no relapse.

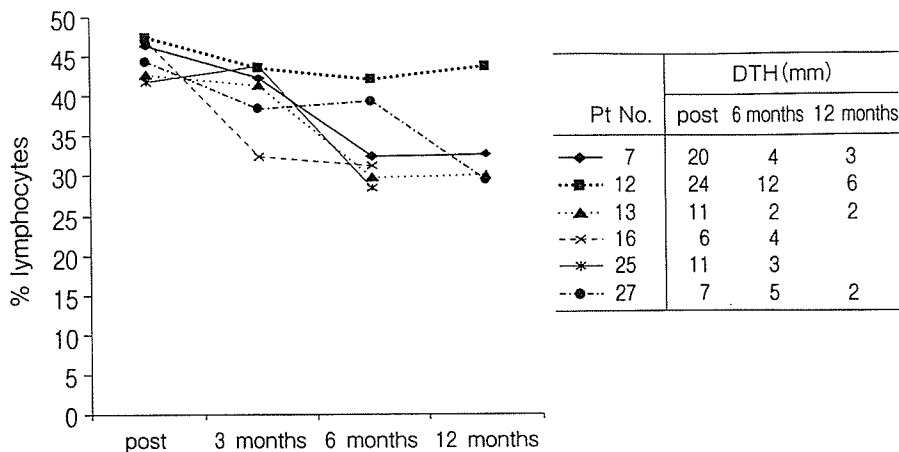


図5 陽性群では、最終治療後6か月以内に皮内反応が陰性化し、リンパ球分画・リンパ球数が減少した  
 In 4 of 6 pts with the positive DTH, the duration of the positive DTH was within 6 months. A significant correlation between the number of PBL and the DTH responses was observed. Twelve months after the final treatment, 5 of 6 pts who had previously experienced the positive DTH revealed the negative DTH with the decrease in the number of PBL.

表2 皮内反応陽性群で増加したリンパ球はT細胞が優位であった

	DTH reactivity to autologous tumor			
	Positive (14 pts)		Negative (13 pts)	
	Pre-vac	Post-vac	Pre-vac	Post-vac
% lymphocytes	24.4±1.1%	44.2±2.0%	23.4±1.2%	29.2±1.5%
% T cells	50.9±1.2%	75.2±2.2%	52.8±1.5%	47.3±1.3%
% B cells	22.1±1.0%	11.0±1.1%	20.5±1.3%	18.2±0.9%

The significant increase in the number of T cells as well as PBL was evident in patients with the positive DTH as compared with those in patients with the negative DTH.

一方、皮内反応が陰性の患者19のPBMCでは、治療後もIFN- $\gamma$ 産生は増加しなかった。他の陽性患者でも同様の傾向が認められた。以上のことから、皮内反応陽性群では末梢血液中にT細胞主体のリンパ球増加が認められ、増加しているT細胞はライセート特異的な細胞集団であることがわかった。さらに患者13で、皮内反応とPBMCから産生されるIFN- $\gamma$ の量を計時的に測定した。ATVACが4回投与終了後、患者13は皮内反応が陽性を示し、治療前と比較して高い量のIFN- $\gamma$ 産生が認められた。治療3か月後、6か月後で皮内反応が減弱し陰性化すると、IFN- $\gamma$ 産生も低下し、治療前のベースライン量にほぼ戻った(図7)。以上のことから、皮内反応は患

者PBMC中のライセート特異的T細胞集団の増加を反映し、T細胞集団が減少すると皮内反応も減弱・陰性化することがわかった。

5. 皮内反応は臨床効果と関係がある

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) を対象に、進展因子や肝内転移を伴いやすく再発リスクの高い単純結節周囲増殖型のHCC (stage III or step 2) の外科切除後にATVACを施行し、皮内反応が陽性化することで、再発抑制が得られているかを検討した(図8)。図9のように、手術単独群では、median disease-free survival (MDFS)は16か月(95% CI 10~22か月)、clinical controlの単純結節型では、MDFSは42か月(95% CI 12~72か月)、手術プラス

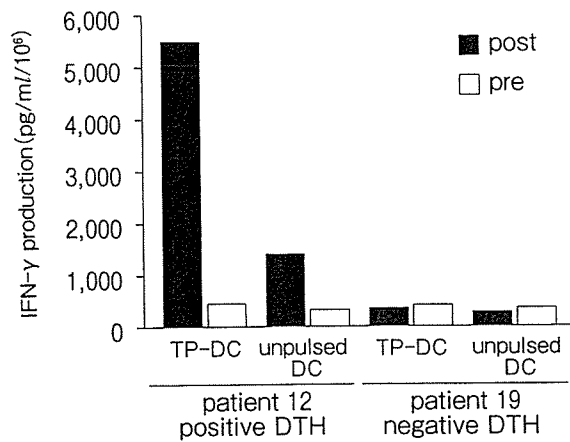


図6 皮内反応陽性群で増加したT細胞は、抗原(ライセート)特異的にIFN-γを産生した  
 $2 \times 10^6$  PBMC were added to 24-well plates with either  $1 \times 10^5$  TP-DC or unpulsed DC in AIM-V medium supplemented with 2% autologous serum. Cells were incubated for 48 hours and then supernatants were collected to measure the IFN-γ production by T cells.

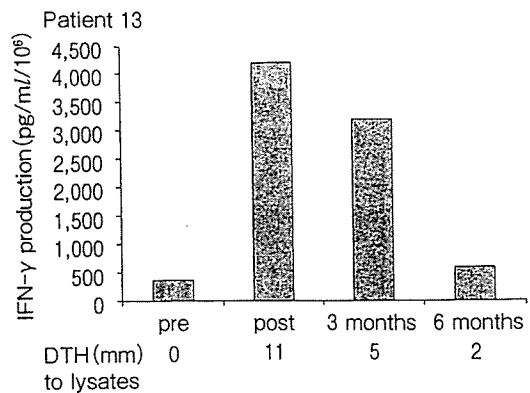


図7 皮内反応が陰性化しリンパ球数がベースラインレベルまで減少すると抗原(ライセート)特異的IFN-γ産生は減少した  
 Every 3 months after the final treatment, immunologic and DTH responses were followed in pt 13 with the positive DTH. The decrease of the IFN-γ production by T cells correlated with the decrease of the DTH response was evident.

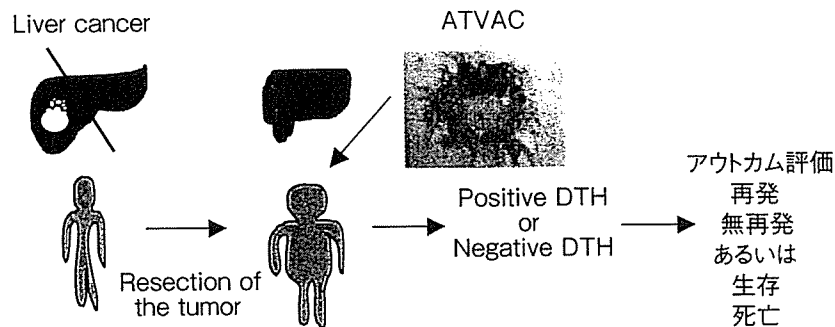


図8 ATVAC：第II相臨床試験

Patients who had had primary liver cancer underwent liver resection. After the resection of the tumor(s), pts received ATVAC. Pts were followed to assess the DTH responses and the clinical outcome.

ATVAC群(陽性群)は、MDFSはnot reachedで手術単独群と比較して $p=0.0269$ で、単純結節型とほぼ同等のDFSを示した。以上のことから、皮内反応の有無は臨床効果と関係があることがわかった。

#### IV. 考 察

癌治療の効果判定は、臨床医が患者に最適な治療を判断、選択、提供するために必要な基準である。手術不能あるいは転移性進行癌では、奏効率、time to progression (TTP)や全生存期間(OS)が効果判定の基準である。また外科切除後

であれば、OSやDFSが効果判定の基準となる。OSを延長させることが「真の臨床効果」であるので、真の臨床効果と強い相関を示すものが、サロゲートマーカーとして臨床効果を予測する指標となる。

同定された人工抗原ペプチドをパルスした樹状細胞癌ワクチン療法では、末梢血液中にペプチド特異的なT細胞を検出・増加が認められ、特異的免疫反応が誘導された報告が多い。しかし、標準的治療(化学療法や放射線療法など)が無効である進行癌を対象に臨床試験が施行されているため奏効率は極めて低く、またTTPやOSの延長

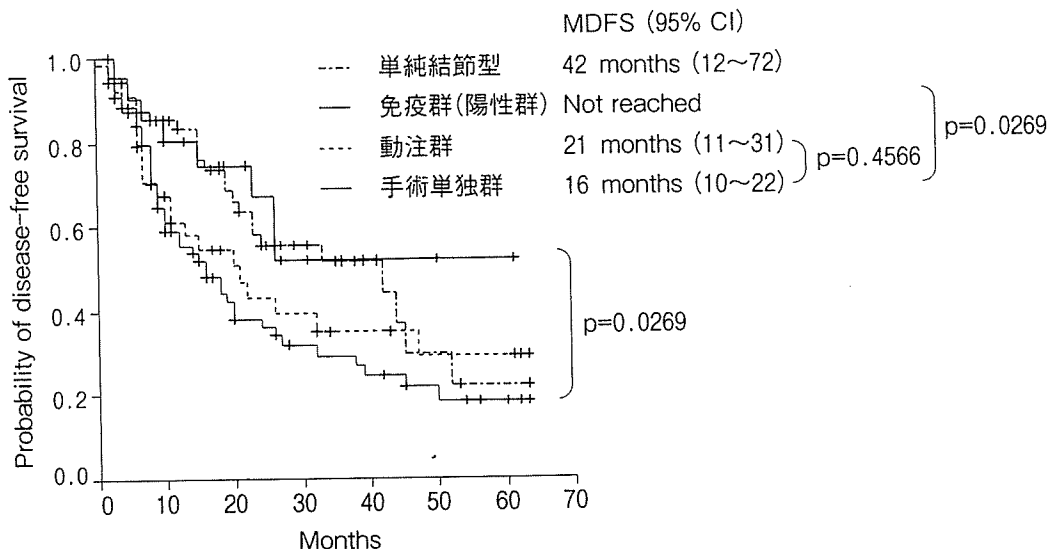


図9 肝細胞癌術後の補助免疫療法で皮内反応が陽性化した群では、手術単独群と比較して無再発生存期間の延長が認められた

を証明する試験デザインになっていないため、特異的免疫反応が臨床効果の指標になるかを明確に示した報告は少ない。

ライセートをパルスした樹状細胞癌ワクチン療法では、抗原エピートプが同定されていないため、特異的免疫反応が誘導されているかは皮内反応や ELISPOT, サイトカイン産生試験で測定している。皮内反応は、肉眼的に医療側、患者側ともに確認でき簡便であることから、臨床現場で使用するには便利である。

われわれの施設は、ライセートをパルスした樹状細胞癌ワクチンと自己リンパ球移入を併用した ATVAC の臨床試験を施行し、皮内反応が特異的免疫反応の指標になるかをまず検討した。皮内反応陽性群では、末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）が増加しており、増加したリンパ球の主体はライセート特異的な T 細胞集団であった。皮内反応の陽性化、減弱・陰性化と、%リンパ球やライセート特異的 T 細胞集団の増減はよ

く関係していた。したがって、皮内反応が特異的免疫反応のよい指標になることがわかった。

次に、肝細胞癌を対象に再発予防補助治療として ATVAC の臨床試験を施行し、皮内反応陽性群で DFS の延長が認められたので、皮内反応が臨床効果のよい指標になることが推測された。

今回の検討で、皮内反応陽性化が特異的免疫反応とよく相関し、かつ DFS の延長という臨床効果ともよく相関したことから、皮内反応陽性化を治療継続の目安とする可能性が示された。

今後、OS の延長をエンドポイントとする臨床試験をデザインすることで、現在測定されているいろいろな特異的免疫反応が臨床効果とよく相関することが証明されると考えられる。

おわりに

臨床現場で簡単に測定できる皮内反応が、特異的免疫反応と臨床効果の指標となる可能性が示された。