

potential antigen sources, Tu-exosomes should be selectively isolated. For this purpose we used Ab-beads to obtain, in a relatively selective manner, HER2-containing Tu-exosomes from ascitic fluid-derived exosomes of a patient with ovarian cancer. Thus, it may be possible to collect Tu-exosomes with beads coupled to antibodies to multiple tumor antigens.

Dexosomes, secreted from DCs, express both MHC class II molecules and costimulatory proteins such as CD80 and CD86; they can also stimulate naïve CD4+ T cells (21). Platelet-derived exosomes also have biological functions (13). Although the data obtained in the present study indicate that Tu-exosomes may also have biological functions, these functions remain unknown.

We determined whether Tu-exosomes can affect the proliferation of parental cells. Tu-exosomes derived from BT-474 cells stimulated the proliferation of BT-474 cells, suggesting a biological function. Membrane transfer has been reported *in vitro* in systems involving or not involving cell-cell contact. Furthermore, it has been suggested that exosomes bear combinations of ligands that can bind different cell-surface receptors simultaneously and that exosomes can fuse with target cells and exchange membrane proteins between the two cell types. Tu-exosomes bound to the surface of BT-474 cells; thus, there is a possibility that proteins in Tu-exosomes stimulated a proliferation-related signaling pathway in BT-474 cells. To examine the molecular mechanisms of Tu-exosome-mediated proliferation increases, we are investigating the expression of cell cycle-related proteins in BT-474 cells at both the mRNA and protein levels. In conclusion, Ab-beads may be useful as experimental and therapeutic tools in studies into the functional roles of exosomes.

Acknowledgements

We thank Yasuhiro Hirakawa, Takaaki Kanemaru and Kaori Nomiyama for their skillful technical assistance. Grant support: General Scientific Research Grants (15471143, 14571141, 15390380 and 16591326) from the Ministry of Education, Culture, Sports, and Technology of Japan, Public Trust Surgery Research Fund of Japan, and the Japanese Society of Strategies for Cancer Research and Therapy.

References

- Johnstone RM, Mathew A, Mason AB *et al*: Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol* 147: 27-36, 1991.
- Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W *et al*: Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273: 20121-20127, 1998.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ *et al*: Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104: 3257-3266, 2004.
- Heijnen HF, Schiel AE and Fijnheer R: Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94: 3791-3799, 1999.
- Savina A, Furlan M, Vidal M *et al*: Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278: 20083-20090, 2003.
- Riteau B, Faure F, Menier C *et al*: Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum Immunol* 64: 1064-1072, 2003.
- Hwang I, Shen X and Sprent J: Direct stimulation of naive T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells: distinct roles for CD54 and B7 molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6670-6675, 2003.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W *et al*: B lymphocytes secrete antigen presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161-1172, 1996.
- Andre F, Scharzt NE, Movassagh M *et al*: Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360: 295-305, 2002.
- Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY *et al*: Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods* 270: 211-226, 2002.
- Zitvogel L, Regnault A, Lozier A *et al*: Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4: 594-600, 1998.
- Thery C, Regnault A, Garin J *et al*: Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 147: 599-610, 1999.
- Matsumoto K, Morisaki T, Kuroki H *et al*: Exosomes secreted from monocyte-derived dendritic cells support *in vitro* naive CD4+ T cell survival through NF- B activation. *Cell Immunol* 23: 20-29, 2004.
- Janowska-Wieczorek A, Wyszczynski M, Kijowski J *et al*: Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 113: 752-760, 2005.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G *et al*: Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7: 297-303, 2001.
- Kubo M, Morisaki T, Kuroki H *et al*: Combination of adoptive immunotherapy with Herceptin for patients with HER2-expressing breast cancer. *Anticancer Res* 23: 4443-4449, 2003.
- Clayton A, Court J, Navabi H *et al*: Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods* 247: 163-174, 2001.
- Yoshida Y, Hosokawa K, Dantes A *et al*: Theophylline and cisplatin synergize in down regulation of BCL-2 induction of apoptosis in human granulosa cells transformed by a mutated p53 (p53 val135) and Ha-ras oncogene. *Int J Oncol* 17: 227-235, 2000.
- Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A *et al*: Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 114-121, 2004.
- Levine SJ: Mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *J Immunol* 173: 5343-5348, 2004.
- Thery C, Duban L, Segura E *et al*: Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3: 1156-1162, 2002.

Received June 3, 2005
Accepted July 20, 2005

Evaluation of a Dysfunctional and Short-lived Subset of Monocyte-derived Dendritic Cells from Cancer Patients

HIDEYA ONISHI¹, TAKASHI MORISAKI¹, HIDEO KUROKI¹, KOTARO MATSUMOTO¹,
EISHI BABA¹, HIROTAKA KUGA¹, MASAO TANAKA² and MITSUO KATANO¹

¹Department of Cancer Therapy and Research and ²Department of Clinical Oncology,
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Abstract. Monocyte-derived dendritic cells (Mo-DCs) were generated from peripheral blood monocytes of 12 healthy volunteers (hMo-DCs) and 11 patients (pMo-DCs) with malignancies by culture for 7 days with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-4. In this study, we focused on the cytogram pattern by FACS analysis. A gate (R1) was set up by which more than 95% of hMo-DCs were contained. Mo-DCs having lower side scatter than the R1 (R2) comprised 4.5% of hMo-DCs and 24.2% of pMo-DCs. Expressions of antigen presentation-related molecules and phagocytic ability in the R2 of pMo-DCs were lower than those in the R1 population. The R2, but not R1, in pMo-DCs decreased in number between days 7 and 14, and expression levels of antigen presentation-related molecules in the living pMo-DCs on day 14 increased. The 11 patients received dendritic cell vaccine therapy with autologous, tumor-pulsed mature Mo-DCs (day 7). The low R2 group (R2≤10%, 3 patients) had a significantly higher positive delayed-type hypersensitivity reaction against autologous tumor-pulsed Mo-DCs than that of the high R2 group (R2>10%, 8 patients) ($p<0.001$). These results indicate that the R2 of pMo-DCs may be a dysfunctional and short-lived subset.

Dendritic cells (DCs), which are known as professional antigen-presenting cells (APCs), can induce both the generation and proliferation of specific cytotoxic T lymphocytes (1-6). DCs capture and process antigens, move to the T-dependent areas of secondary lymphoid organs and stimulate naive T cells. Only DCs are capable of inducing primary sensitization against specific antigens in naive T cells

(1). The ability to present exogenous antigens to CD8+ T cells through "cross-presentation" is an important feature of DCs (7, 8). Recent advances in biotechnology have made it possible to generate DC-like APCs (Mo-DCs) from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) (9). Thus, Mo-DCs have become popular candidates for DC-based immunotherapy for patients with malignancy of various types (10-19). Unfortunately, the therapeutic efficacy of these DC vaccines has been quite limited. One possible reason is that the antigen-presenting capacity of Mo-DCs generated from cancer patients (pMo-DCs) is impaired (20-26). It has been proposed that DCs mediate both T cell immunity and T cell tolerance and that these opposite functions may be linked to the dynamic maturation of DCs (27). If pMo-DCs have impaired maturation ability, pMo-DCs administered to cancer patients may remain immature and sensitize T cells to cancer-related antigens. Although it has been shown that several tumor-secreted factors such as venous endothelial growth factor, IL-6, IL-10 and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) are able to inhibit the full maturation of functional DCs (28-30), little is known about the reasons why the antigen-presenting ability of pMo-DCs is impaired. To potentiate the efficacy of Mo-DC-based vaccine therapy, a greater understanding of antigen presentation-related functions of pMo-DCs is needed.

Our previous study showed that pMo-DCs of advanced gastrointestinal cancer patients are not only dysfunctional in antigen-presenting ability, but that they also have a relatively short lifespan (26). In this study, therefore, we focused on the identification of this dysfunctional and short-lived pMo-DC subset.

Materials and Methods

Patients. Eleven patients with stage IV carcinoma (3 pancreas, 3 rectum, 2 colon, 2 stomach and 1 gall bladder carcinoma), for whom no other standard therapy option was possible, were enrolled in the

Correspondence to: Mitsuo Katano, MD, Department of Cancer Therapy and Research, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan. Tel: 81-(92)-642-6219, Fax: 81-(92)-642-6221, e-mail: mkatano@tumor.med.kyushu-u.ac.jp

Key Words: Human, dendritic cells, tumor immunity.

Table I. Characteristics of study patients.

No.	Age ^a	Gender	Primary site	% of R2	DTH	Survival time ^b
1	43	M	stomach	2.8	+	10
2	38	M	rectum	5.7	+	24
3	49	F	rectum	6.2	+	16
4	64	F	colon	14.6	+	5
5	65	F	pancreas	18.0	+	10
6	72	M	colon	23.4	-	6
7	45	F	rectum	23.4	-	15
8	65	M	stomach	31.7	-	2
9	49	M	gall bladder	41.6	-	7
10	55	M	pancreas	45.1	-	2
11	72	F	pancreas	54.0	-	4

Eleven patients with advanced cancer (stage IV), who were enrolled in the present study and were not involved in any previous chemotherapy, radiotherapy, or immunotherapy. Patients were divided into a low R2 group (R2 ≤ 10%, 3 patients) and a high R2 group (R2 > 10%, 8 patients).

^ayears

^bmonths

phase I study; for ethical reasons, no control group was created. The research ethics committee of the Faculty of Medicine, Kyushu University, Japan, approved the study protocol. All patients gave written, informed consent at the time of enrollment. Patient profiles are shown in Table I. Staging was done in accordance with the American Joint Committee on Cancer criteria (31). Twelve healthy volunteers, whose sex and age were matched with those of the patients, were enrolled as control subjects. Informed consent was also obtained from the healthy volunteers.

Generation of Mo-DCs. PBMCs were isolated from heparinized peripheral blood from the patients and healthy volunteers by Ficoll Paque (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) density gradient centrifugation. PBMCs were resuspended in GMP-grade RPMI 1640 (Hy-Media, Nipro, Tokyo, Japan) with 1% human albumin (RPMI medium), plated at a density of 2x10⁶ cells/ml and allowed to adhere in 24-well culture plates (Nalge Nunk International, Chiba, Japan). After 4-h incubation at 37°C, the non-adherent cells were removed, and the adherent cells were harvested and cultured in RPMI medium supplemented with GM-CSF (200 ng/ml; Genetech Co., China) and IL-4 (500 U/ml; Osteogenetics, Wuerzburg, Germany). On day 7, non-adherent cell fractions were collected as immature Mo-DCs and examined.

Tumor cells. Autologous tumor cells were collected from malignant effusions, CT-guided biopsy specimens, or probe laparotomy specimens. Tumor specimens were minced with scalpels and passed through metal meshes of decreasing pore size. Cells were cultured in serum-free enriched culture medium (EBM2; Sanko Junyaku, Tokyo, Japan) containing basic fibroblast-growth factor, epidermal growth factors and insulin. To avoid any decrease in tumor-associated antigens, no chemical digestion was done. This procedure yielded a tumor-enriched cell line for Mo-DC-vaccine therapy. A human gastric adenocarcinoma cell line, GCTM-1, was used for *in vitro* experiments.

Flow cytometry (FACS) analysis. To analyze the cytogram and the expression of antigen presentation-related molecules in Mo-DCs, the cells were incubated for 1 h with anti-CD80 or anti-HLA-ABC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) conjugated to FITC or anti-CD11c or anti-HLA-DR conjugated to PE (BD Pharmingen). The isotype controls were IgG1 and IgG2a (BD Pharmingen). For staining, cells were washed two times with phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated for 1 h at 4°C in (FACS buffer) containing 3% BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.1% NaN₃ (Sigma) in PBS as well as the appropriate concentration of labelled mAb. After a washing with FACS buffer, the fluorescence intensity of gated Mo-DC populations was measured with a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and the data were analyzed by CELLQuest software (Becton Dickinson).

Cytogram pattern analysis of Mo-DCs. The cytogram pattern of hMo-DCs was more homogeneous than that of pMo-DCs. Mo-DCs were divided into two populations according to the cytogram pattern. A gate was set up in which more than 95% of hMo-DCs were contained; these hMo-DCs were designated as the R1 population in this study; hMo-DCs in the lower side scatter (SSC) gate were designated as the R2 population.

Capture of lysed GCTM-1 tumor cells by Mo-DCs. The membrane components of lysed GCTM-1 cells were labelled with the PKH 67 green fluorescent cell linker kit (Sigma), and Mo-DCs were labelled with PE-conjugated HLA-DR mAb (BD Pharmingen), according to the manufacturers' protocol. Fluorescence-labelled Mo-DCs and lysed tumor cells were co-cultured at an original cell ratio of 1:1 for 4 h at 37°C or 4°C, washed, and then applied to a FACS Calibur flow cytometer. The fluorescence intensity data were analyzed with CELLQuest software. Both PKH 67-positive and HLA-DR-positive cells (double-positive cells) in gated Mo-DCs populations were defined as lysed tumor cell-captured Mo-DCs.

Procedure for Mo-DC vaccine. Autologous tumor cells were resuspended in 2 ml of serum-free RPMI medium and lysed by 5 freeze and thaw cycles. Immature Mo-DCs were incubated with the lysed tumor cells overnight (Mo-DCs:tumor cells=5:1). Tumor-pulsed Mo-DCs were further cultured in the presence of 40% monocyte-conditioned medium for Mo-DC maturation, as previously described (32). Tumor-pulsed mature Mo-DCs ([1-10] x10⁶ cells) suspended in 2 ml of 1% human albumin-containing physiological saline solution were injected subcutaneously in a left supraclavicular lesion every 2 weeks for as long as possible.

Delayed-type hypersensitivity (DTH) skin-test reaction. For testing the tumor-specific response, tumor-pulsed Mo-DCs (10⁵ cells/ml) were administered intradermally before and after the treatment. A positive DTH skin-test reaction was defined as an induration greater than 5 mm after 48 h.

Statistical analysis. Fisher's exact probability test was used for statistical analyses. Calculations were carried out with StatView software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). All results with a *p* value of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Cytogram pattern of Mo-DCs on day 7. R1 and R2 populations of immature Mo-DCs on day 7 were identified

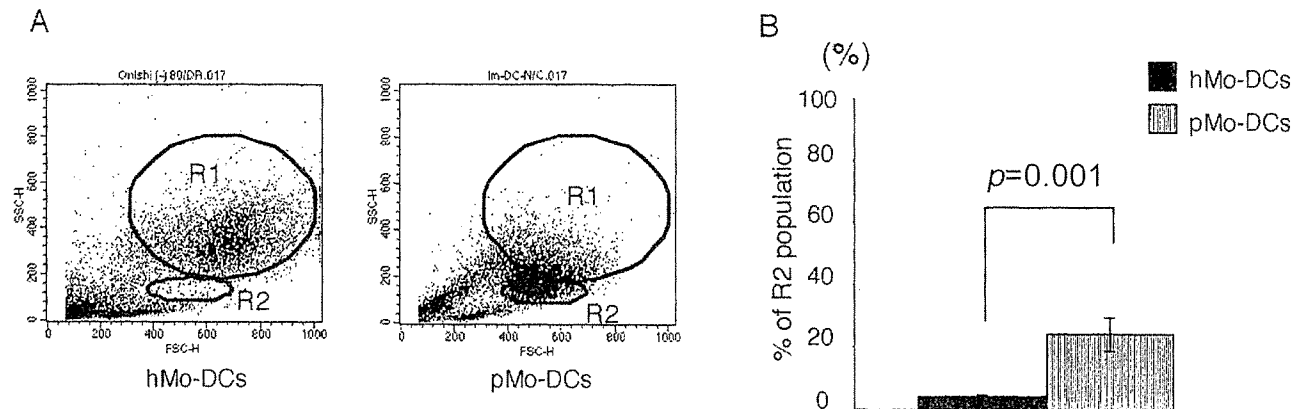


Figure 1. (A) FACS analysis of representative cytogram patterns of hMo-DCs and pMo-DCs on day 7. The R1 gate, which contains more than 95% of hMo-DCs, is determined by forward and side scatter on day 7. R2 comprises Mo-DCs not in R1. (B) Percentages of the R2 population of hMo-DCs (filled column, $n=12$) and pMo-DCs (dotted column, $n=11$) on day 7. The results are presented as mean \pm SE (bars) values.

by the cytogram pattern of FACS analysis, and hMo-DCs had a higher SSC pattern, whereas pMo-DCs had a lower SSC pattern (Figure 1A). The percentage of R2 in pMo-DCs ($n=11$, $24.2 \pm 5.2\%$) was significantly higher than that in hMo-DCs ($n=12$, $4.5 \pm 0.6\%$) ($p=0.001$, Figure 1B).

The expressions of antigen presentation-related molecules in R1 and R2 populations of Mo-DCs on day 7. The expressions of antigen presentation-related molecules in R1 and R2 populations were compared between hMo-DCs ($n=6$) and pMo-DCs ($n=6$) (Figure 2). The expressions of CD80, CD11c and HLA-ABC in the R2 population of hMo-DCs were significantly lower than those in the R1 population ($p=0.031$, 0.033 and 0.020 , respectively). The expressions of CD80, CD11c, HLA-DR and HLA-ABC in the R2 population of pMo-DCs were also significantly lower than those in the R1 population ($p=0.013$, 0.033 , 0.028 and 0.048 , respectively). When the expressions of these molecules in the R1 populations of hMo-DCs and pMo-DCs were compared, only CD80 expression in the R1 population of pMo-DCs was lower than that in the hMo-DCs ($p=0.050$). Similarly, only CD80 expression in the R2 population of pMo-DCs was significantly lower than that in the R2 population of hMo-DCs ($p=0.006$).

Phagocytic ability of pMo-DCs in R1 and R2 populations on day 7. A dot plot pattern of a representative case is shown in Figure 3A. In this case, even though 47% of the R1 population of pMo-DCs captured the lysed GCTM-1 cells, only 7.7% of the R2 population of pMo-DCs captured the lysed GCTM-1 cells. Data for pMo-DCs generated from 5 patients are shown in Figure 3B. The percentage ($10.0 \pm 2.2\%$) of Mo-DCs capturing the lysed GCTM-1 in the R2 population was significantly lower than that

($39.0 \pm 7.7\%$) in the R1 population ($p=0.023$), suggesting that the phagocytic ability of the R2 population was lower than that of the R1 population. Capture of lysed GCTM-1 cells by pMo-DCs was not due to non-specific binding because the percentage of double-positive pMo-DCs at 4°C was less than 5%.

Cytogram pattern and expressions of antigen presentation-related molecules of Mo-DCs on day 14. The percentage of the R2 population in hMo-DCs and pMo-DCs on day 14 was measured. In hMo-DCs, no significant change in cell number was found between day 7 and day 14. In pMo-DCs, however, a significant decrease in cell number was found on day 14 compared to day 7, as found in our previous study (26). A representative cytogram is shown in Figure 4A. The cytogram pattern of pMo-DCs was very similar to that of hMo-DCs on day 14. No significant difference in the percentage of the R2 population was observed between pMo-DCs ($n=8$, $5.1 \pm 1.0\%$) and hMo-DCs ($n=8$, $4.9 \pm 1.1\%$) on day 14 (Figure 4B).

The expressions of antigen presentation-related molecules in the R1 population of hMo-DCs ($n=6$) and pMo-DCs ($n=6$) on day 14 are compared in Figure 5. No significant differences in the expressions of molecules examined were observed between hMo-DCs and pMo-DCs that survived until day 14.

Relationship between the DTH reaction after Mo-DC-vaccine therapy and the R2 population of pMo-DCs. Eleven patients received Mo-DC-vaccine therapy with autologous tumor-pulsed mature Mo-DCs. Patient profiles are provided in Table I. Autologous tumor-pulsed mature pMo-DCs on day 7 were injected subcutaneously every 2 weeks. Two months after therapy, the reaction of DTH was estimated using

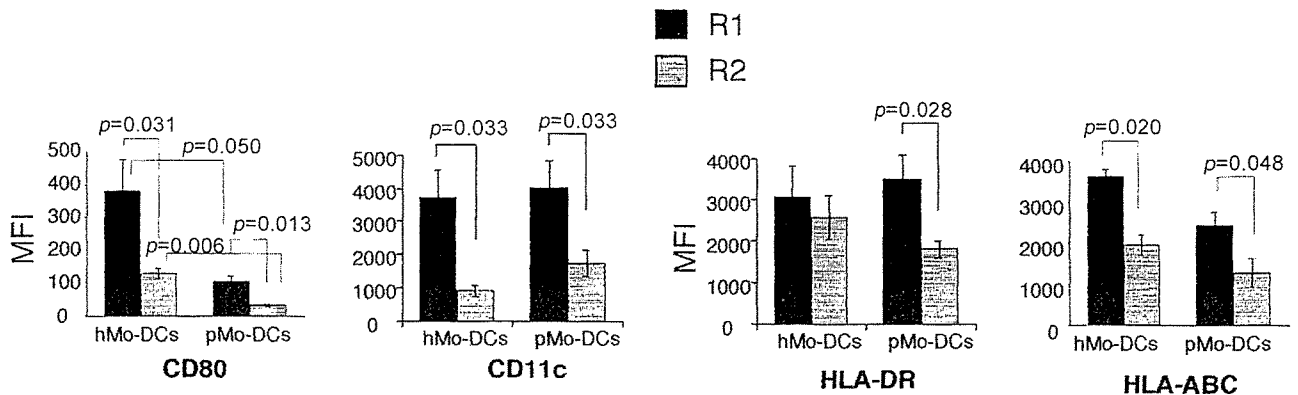


Figure 2. The expressions of antigen presentation-related molecules in R1 (filled column) and R2 (dotted column) populations of hMo-DCs (n=6) and pMo-DCs (n=6) on day 7. The results are presented as mean±SE (bars) values.

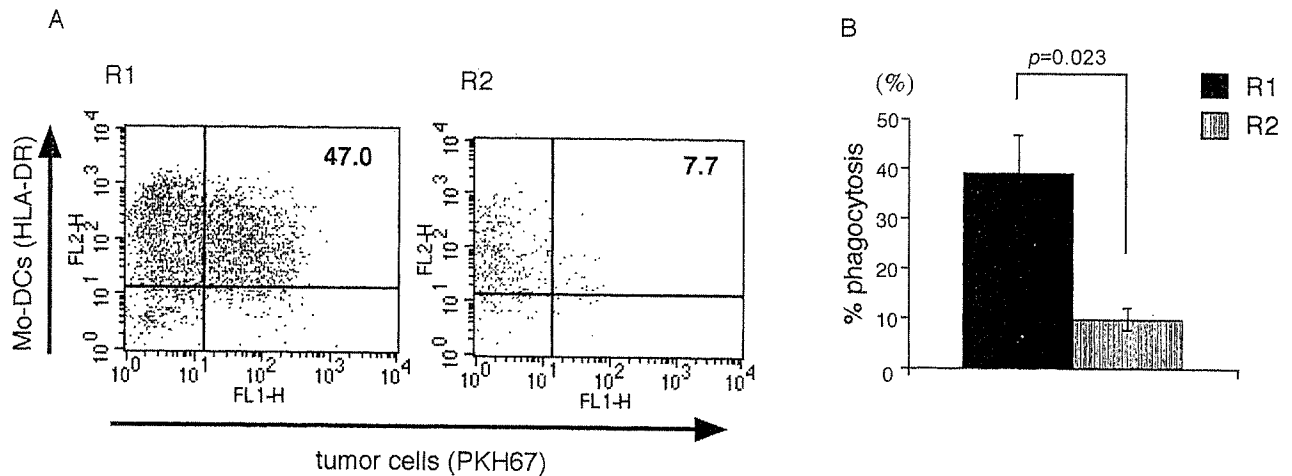


Figure 3. Phagocytic ability in immature pMo-DCs on day 7. (A) The data are the log of fluorescence intensity of the R1 and R2 populations. The percentage of double-positive cells is shown in the upper right corners. (B) Percent phagocytosis of R1 populations (filled bars) and R2 populations (dotted bars) derived from 5 different pMo-DCs. Results are presented as mean±SE (bars) values.

autologous tumor-pulsed Mo-DCs to assess the effectiveness of the immunotherapy. The patients were divided into a low R2 group (R2≤10%, 3 patients) and a high R2 group (R2 > 10%, 8 patients). The low R2 group (3/3) had a significantly stronger positive DTH reaction than that of the high R2 group (2/8) (p<0.001, Table I). Patients in the low R2 group had a significantly longer survival time than that of patients in the high R2 group (Figure 6).

Discussion

The results of our previous study indicated that Mo-DCs from patients with advanced cancer contain a dysfunctional and short-lived Mo-DC subset (26). In this work, we focused

on the specification of the dysfunctional and short-lived Mo-DC subset to estimate the nature of pMo-DCs.

It is known that the cytogram pattern of FACS analysis differs between monocytes and Mo-DCs. When monocytes differentiate to Mo-DCs, the Mo-DC cytogram moves to the upper right. Based on these findings, to identify this short-lived Mo-DC subset, the cytogram pattern of Mo-DCs was analyzed by FACS. A gate (R1) was set up in which more than 95% of Mo-DCs generated from 12 healthy volunteers (hMo-DCs) were contained. The area having lower side scatter than R1 was named R2 and is similar to a gate for monocytes. On day 7, the percentage of the R2 population in pMo-DCs was significantly higher than that in hMo-DCs (Figure 1). In addition, pMo-DCs in R2 had significantly

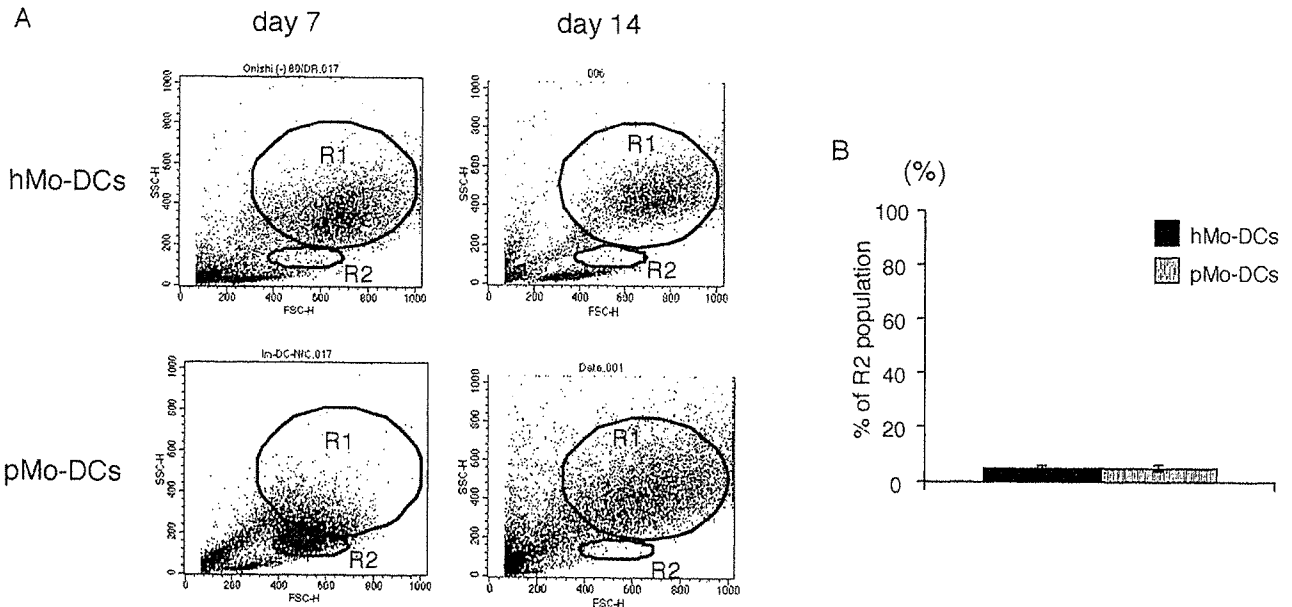


Figure 4. (A) FACS analysis of representative cytogram patterns of hMo-DCs and pMo-DCs on days 7 and 14. (B) Percentages of R2 population of hMo-DCs (filled column, $n=8$) and pMo-DCs (dotted column, $n=8$) on day 14. The results are presented as mean \pm SE (bars) values.

lower expressions of MHC and costimulatory molecules and a lower phagocytic ability than those in R1 (Figures 2 and 3). On day 14, however, the number of pMo-DCs decreased to three-quarters of that of day 7. The cytogram pattern of pMo-DCs also changed between day 7 and day 14 (Figure 4); the percentage of R1 in pMo-DCs increased. In hMo-DCs, however, neither cell number nor cytogram pattern changed between day 7 and day 14 (Figure 4). The cell number in R1 of pMo-DCs did not change significantly between day 7 and day 14, suggesting that mainly pMo-DCs in R2 were dying between day 7 and day 14. If so, R2 is a short-lived subset. Nevertheless, we cannot rule out completely the possibility that pMo-DCs in R2 changed to those in R1. This latter possibility is unlikely since it requires that Mo-DCs in R1 are short-lived.

Consistent with our previously reported findings (26), expressions of antigen presentation-related molecules of pMo-DCs were weak compared with those of hMo-DCs (Figure 2). Interestingly, most pMo-DCs in R2 disappeared between day 7 and day 14, and the difference in expressions of antigen presentation-related molecules between pMo-DCs and hMo-DCs also disappeared on day 14 (Figure 5). We conclude that the R2 population of pMo-DCs is dysfunctional and short-lived. Some investigators have shown that tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes (33). In the present study, the R2 population had almost the same cytogram pattern as monocytes. We now speculate that those pMo-DCs which belong to R2 are

insufficiently differentiated Mo-DCs. In fact, the mean fluorescence intensity of CD14 in R2 was higher than that in R1 (data not shown).

DC vaccine therapy with autologous tumor-pulsed Mo-DCs for patients with advanced malignancies is being evaluated in our laboratory. Based on our hypothesis that pMo-DCs that belong to R2 are insufficiently differentiated Mo-DCs, we analyzed the relationship between the percentage of the R2 population in pMo-DCs and the induction of tumor-specific immunological response. We used the DTH skin-test reaction against tumor-pulsed Mo-DCs as a tumor-specific response. As expected, a higher DTH-positive reaction after the therapy was induced in patients whose Mo-DCs contained a smaller R2 population (Table I). This suggests that Mo-DCs containing a smaller R2 population have a higher antigen presentation ability *in vivo*. This possibility is partly supported by the finding of a longer survival time in patients who received Mo-DCs containing a smaller R2 population (Figure 6). Our results indicate that we may be able to improve the efficacy of DC vaccine therapy by treating the R2 population in pMo-DCs. When anti-TGF- β 1 antibody was added to the initial culture of monocytes, Mo-DCs in R2 significantly decreased, and both the expressions of MHC and costimulatory molecules as well as the phagocytic ability of pMo-DCs were improved (data not shown). It has been reported that the overexpression of TGF- β 1 enhances cell invasion of fibrosarcoma, prostatic carcinoma and mammary adeno-carcinoma cells, with a consequent increase in the

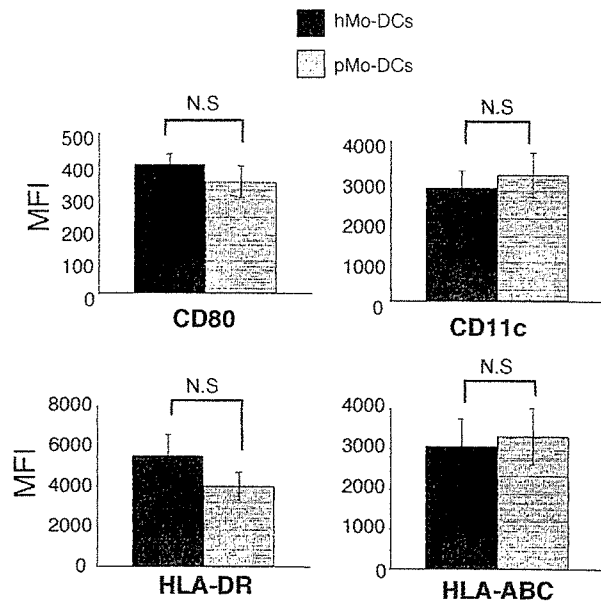


Figure 5. Expressions of antigen presentation-related molecules in R1 populations of hMo-DCs (filled column, n=6) and pMo-DCs (dotted column, n=6) on day 14. The results are presented as mean±SE (bars) values.

metastatic potential of the tumor (34-36). In addition, it has been shown that tumor-derived TGF-β1 reduces the efficacy of DC vaccine (37, 38). Although these findings suggest that TGF-β1 may partly contribute to generation of the R2 population in Mo-DCs obtained from patients with malignancies, we have no definite recommendation for overcoming this problem.

In conclusion, Mo-DCs in the R2 population are a dysfunctional and short-lived subset. The percentage of R2 population in Mo-DCs may be a useful index for evaluating the quality of Mo-DCs to be used in DC-based vaccine therapy.

Acknowledgements

We are grateful for the clinical samples provided by Drs. Masayuki Sada and Mitsunari Nakamura (Sada Hospital, Fukuoka, Japan). We also thank Kaori Nomiya for skillful technical assistance. This study was supported by a Grant-in-Aid for General Scientific Research (12557106 and 13470240) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- Banchereau J and Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252, 1998.
- Ohshima Y and Delespesse G: T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J Immunol* 158: 629-636, 1997.

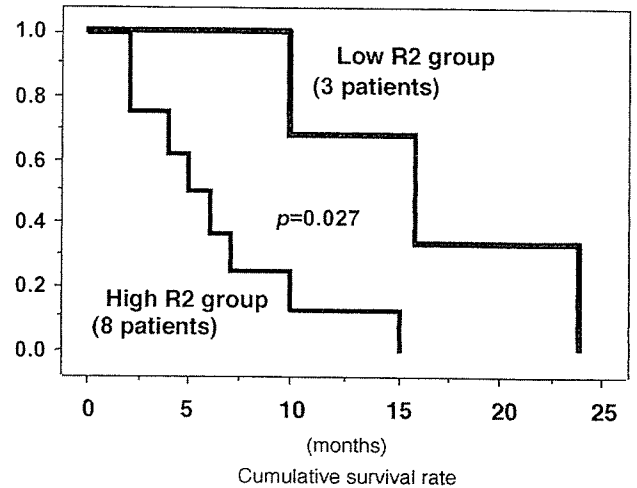


Figure 6. Comparison of the cumulative survival rates of the low R2 group (R2≤10%) and high R2 group (R2>10%), in advanced cancer patients who underwent immunotherapy. The curve for the low R2 group is above the high R2 group at all time-points.

- Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S and Bevan MJ: Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol* 158: 3270-3276, 1997.
- Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G and Rock KL: Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158: 2723-2730, 1997.
- Nair S, Zhou F, Reddy R, Huang L and Rouse BT: Soluble proteins delivered to dendritic cells via pH-sensitive liposomes induce primary cytotoxic T lymphocyte responses *in vivo*. *J Exp Med* 175: 609-612, 1992.
- Porgador A and Gilboa E: Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 182: 255-260, 1995.
- Carbone FR, Kurts C, Bennett SR, Miller JF and Heath WR: Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 19: 368-373, 1998.
- Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL and Bhardwaj N: Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via αβ5 and CD36 and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1359-1368, 1998.
- Sallusto F and Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α. *J Exp Med* 179: 1109-1118, 1994.
- Marten A, Flieger D, Renoth S, Weineck S, Albers P, Compes M, Schottker B, Ziske C, Engelhart S, Hanfland P, Krizek L, Faber C, von Ruecker A, Müller S, Sauerbruch T and Schmidt-Wolf IG: Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother* 51: 637-644, 2002.

- 11 Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E and Vieweg J: Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 63: 2127-2133, 2003.
- 12 Tjoa BA, Simmons SJ, Elgamal A, Rogers M, Ragde H, Kenny GM, Troychak MJ, Boynton AL and Murphy GP: Follow-up evaluation of a phase II prostate cancer vaccine trial. *Prostate* 40: 125-129, 1999.
- 13 Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E and Vieweg J: Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 109: 409-417, 2002.
- 14 Nestle FO, Alrijic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G and Schadendorf D: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4: 328-332, 1998.
- 15 Enk A, Jonuleit H, Saloga J and Knop J: Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73: 309-316, 1997.
- 16 Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles T, Czerwinski D, Taidi B, Engleman E and Levy R: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2: 52-58, 1996.
- 17 Ladhams A, Schmidt C, Sing G, Butterworth L, Fielding G, Tesar P, Strong R, Leggett B, Powell L, Maddern G, Ellem K and Cooksley G: Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells. *J Gastroenterol Hepatol* 17: 889-896, 2002.
- 18 Hernando JJ, Park TW, Kubler K, Offergeld R, Schlebusch H and Bauknecht T: Vaccination with autologous tumor antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynecological malignancies; clinical and immunological evaluation of a phase I trial. *Cancer Immunol Immunother* 51: 45-52, 2002.
- 19 Schott M, Seissler J, Lettmann M, Fouxon V, Scherbaum WA and Feldkamp J: Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4965-4969, 2001.
- 20 Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP and Gaborovich DI: Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 6: 1755-1766, 2000.
- 21 Gaborovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D and Carbone DP: Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 3: 483-490, 1997.
- 22 Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, Marelli-Berg F, Dazzi F, Simpsom E, Goldman JM, Melo JV, Lechler RI, Bellantuono I, Ridley A and Lombardi G: Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* 101: 3560-3567, 2002.
- 23 Wolfram RM, Budinsky AC, Brodowicz T, Kubista M, Kostler WJ, Kichler-Lakomy C, Hellan M, Kahlhammer G, Wiltshcke C and Zielinski CC: Defective antigen presentation resulting from impaired expression of costimulatory molecules in breast cancer. *Int J Cancer* 83: 239-244, 2000.
- 24 Hasebe H, Nagayama H, Sato K, Enomoto M, Takeda Y, Takahashi TA, Hasumi K and Eriguchi M: Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. *Biomed Pharmacother* 54: 291-298, 2000.
- 25 Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M and Lemoli RM: Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma; the role of interleukin-6. *Blood* 100: 230-237, 2002.
- 26 Onishi H, Morisaki T, Baba H, Kuga H, Kuroki H, Matsumoto K, Tanaka M and Katano M: Dysfunctional and short-lived subsets in monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer. *Clin Immunol* 105: 286-295, 2002.
- 27 Steinman RM, Turley S, Mellman I and Inaba K: The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191: 411-416, 2000.
- 28 Gaborovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HF, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D and Carbone DP: Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2: 1096-1103, 1996.
- 29 Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S and Girolomoni G: Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 166: 4312-4318, 2001.
- 30 Geissmann F, Revy P, Regnault A, Lepelletier Y, Dy M, Brousse N, Amigorena S, Hermine O and Durandy A: TGF- β 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162: 4567-4575, 1999.
- 31 Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP and Myers MH: American Joint Committee on Cancer, eds. *Manual for Staging of Cancer*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: J. B. Lippincott, 1988.
- 32 Kuroki H, Morisaki T, Matsumoto K, Onishi H, Baba E, Tanaka M and Katano M: Streptococcal preparation OK-432; a new maturation factor of monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 52: 561-568, 2003.
- 33 Peguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D and Portoukalian J: Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 170: 3488-3494, 2003.
- 34 Samuel SK, Hurta RAR, Kondaiah P, Khalil N, Turley EA, Wright JA and Greenburg AH: Autocrine induction of tumor protease production and invasion by a metallothionein-regulated TGF- β 1. *EMBO J* 11: 1599-1605, 1992.
- 35 Steiner MS and Barrack ER: Transforming growth factor- β 1 overproduction in prostate cancer; effects on growth *in vivo* and *in vitro*. *Mol Endocrinol* 6: 12-25, 1992.
- 36 Welch DR, Fabra A and Nakajima M: Transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7678-7682, 1990.
- 37 Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ, Ramanathapuram LV, Arteaga CL and Akporiaye ET: Transforming growth factor β inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res* 63: 1860-1864, 2003.
- 38 Kao JY, Gong Y, Chen CM, Zheng QD and Chen JJ: Tumor-derived TGF- β reduces the efficacy of dendritic cell/tumor fusion vaccine. *J Immunol* 170: 3806-3811, 2003.

Received March 2, 2005

Accepted May 25, 2005

特集

● 癌に対する細胞療法の新しい展開 ●

樹状細胞 (DC) ワクチン療法の現況と将来

九州大学大学院医学研究院・先端医療医学部門・腫瘍制御学分野

片野 光男 森崎 隆 中村 光成
松本耕太郎 田崎 哲 中村 雅史

要旨 われわれは、臨床レベルの癌はすでに免疫寛容の世界に存在していると考えているので、強力な抗腫瘍免疫を誘導するには生体に新たに免疫監視システムを作り上げなくてはならない。したがって、免疫監視システムで重要な役割を演じている樹状細胞 (DC) の抗原提示能を向上させるための進行中の工夫に焦点を当てて紹介する。工夫の一つは、DC の活性化状態および生存時間を延長するための工夫である。二つ目は、腫瘍局所の免疫学的環境を免疫監視の世界に調整するための工夫である。そして最後に、現在進行中の人工免疫システムの開発について簡単に紹介する。

[Biotherapy 19 (4) : 330-338, July, 2005]

Present and Future Outlook for Dendritic Cell (DC)-Based Vaccine Against Cancer

Mitsuo Katano, Takashi Morisaki, Mitsunari Nakamura,
Kohtaro Matsumoto, Akira Tasaki and Masafumi Nakamura

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

Summary

We propose that tumors discovered in a clinical setting are already in the world of immune tolerance. In order to induce powerful antitumor immunity, therefore, we will have to develop a new immune surveillance system in the body. We focused on the ongoing noteworthy devices to improve antigen-presenting ability of dendritic cells (DCs) which play a key role in the world of immune surveillance. One approach is to develop strategies capable of prolonging both the activation state and life span of DCs. A second way is to adjust the immunological environment of tumor sites to the immune surveillance world. Finally, we briefly introduce the ongoing trials concerning artificial antigen-presenting systems.

Key words : Dendritic cells, Cancer, Vaccine therapy, Immunotherapy, Artificial antigen-presenting system

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

はじめに

癌抗原の存在は十分予想されるものの、そのエビデンスを提示するには長い時間を必要とした。しかし、ここ10年の間に特異的な免疫反応を誘導可能な癌抗原が次々と報告された。また、これら癌抗原による特異的T細胞(CTL)誘導の機序が分子レベルで明らかとなり、CTL誘導には癌抗原を抗原ペプチドの形で対応するT細胞に提示(抗原提示)する、いわゆる抗原提示細胞が必要なことが理解されるようになった。そして、樹状細胞(DC)こそが生体においてナイーブなT細胞を活性化し、抗原特異的な免疫反応を誘導する抗原提示のプロフェッショナル細胞であることもわかってきた。DCはDC前駆細胞として骨髄から種々の組織へ遊走し、未熟な状態で組織中に存在している。未熟な状態では、旺盛な抗原補足能を有しておりスカベンジャー細胞として機能している。しかし、いったん成熟化すると抗原補足能は低下し、MHC分子やCD86などの補助分子や接着分子の発現が亢進するとともに抗原ペプチドをMHC分子に乗せ細胞表面へ提示し、スカベンジャー細胞から抗原提示細胞へと変身する。さらに、成熟化によりCCR7といったリンパ管への浸潤を可能にするケモカインレセプター発現も亢進し、成熟DCは二次リンパ組織へ移動し、そこで抗原特異的なナイーブT細胞を活性化する。すなわち、癌関連抗原で刺激したDCを利用すれば、癌細胞を特異的に攻撃するCTLを生体に誘導し得る可能性がでてきた。しかし、現時点では生体から十分な量のDCsを採取することは不可能である。そんな折、末梢血や臍帯血あるいは骨髄細胞から*ex vivo*においてDC様の抗原提示細胞を誘導する技術が開発された。これら成果が集合し、癌に対するDCワクチン療法が現実のものとなり、種々のDCワクチン療法のphase Iあるいはphase I/II studyがスタートした。理論的には非常に期待される治療法であるが、現時点での臨床効果は期待どおりとはいえない。

この臨床効果が期待を下回っている一つの理由として、われわれは、少なくとも臨床レベルの進行癌は免疫監視の世界にいるというより免疫寛容の世界に存在していると考えている。つまり、進

行臨床癌という状態と初期の発癌という状態における宿主免疫のかかわり方を区別して異なった次元で扱うべきだと思っている。しかし実際は、健康なヒトあるいは初期の発癌モデルを用いて得られた免疫反応の結果に基づいて、進行癌それも極めて進行した癌に対して免疫療法の理論が組み立てられているのが現状である。つまり、癌に対する免疫反応を誘導するには意識的に癌を免疫監視の世界へ引きだす努力が必要であろう。このような観点から、現在考えられているDCのCTL誘導能を高めるための工夫と腫瘍局所を免疫反応誘導に適した場に変える工夫および、臨床効果の客観的評価を可能にするであろう人工抗原提示細胞開発について解説する。

I. 樹状細胞(DC)の抗原提示能を高める工夫

1. DCによる抗原提示時間の延長

DCの抗原提示能を高めることはDCワクチンの臨床効果を高めるための基本的な条件である。現在行われている抗原提示能を高める工夫のうち、DCのT細胞への抗原提示時間を延長させる試みについて紹介する。

最近の研究成果は、*in vivo*でのT細胞免疫反応の誘導には活性化DCとT細胞との反応時間を長くすることの重要性を示唆している。つまり、領域リンパ節での抗原刺激DCの寿命はリンパ節到達後48時間程度だという報告があり、DCワクチンの問題点の一つは、誘導したDCの生存期間(life span)が短いためにリンパ臓器でのT細胞活性化が十分でないことである。DCの抗原提示能(抗原提示分子発現、補助分子発現、サイトカイン産生、クロスプレゼンテーション)や生存にDC表面に発現するCD40(TNFファミリーに対するレセプターの一つ)へのCD40Lの結合シグナルが重要であることはよく知られている。したがって、DCのCD40にシグナルを入れることがDCの抗原提示能を上げ、かつ寿命を延長する方法である。問題は、CD40がB細胞、マクロファージ、血管内皮細胞といった多くの細胞で発現していることであり、CD40抗体やCD40Lの臨床応用時にこれら他の細胞に有害事象をもたらす可能性がある。これらの問題を克服するために、CD40の細胞外ドメインを欠き

CD40の細胞質ドメインに薬剤 (AP20187) 結合ドメインと細胞膜結合配列 (myristoylation-targeting sequence, M) が結合したキメラ蛋白 (ここでは inducible CD40, iCD40) を恒常的に発現する DC (iCD40 DCs) を作製する試みがなされている¹⁾。この iCD40 DC に AP20187 を投与すると細胞内に侵入した AP20187 が CD40 の薬剤結合ドメインに結合し、その結果 CD40 は三量体を形成し、恒常的に CD40 シグナルが活性化した状態になる。CD40 の細胞外ドメインを欠いているため、iCD40 DC の活性化は CD40L 非依存性であり、活性化は AP20187 によってコントロールできる。腫瘍抗原ペプチドをパルスした iCD40 DC ワクチンは、AP20187 依存性に活性化され CTL を誘導しマウス移植腫瘍細胞の増殖を抑制する。ICD40 DC の代わりに通常の DC を用いた場合、抗腫瘍効果は非常に弱い。Hanks らは¹⁾ この理由として、通常の DC では CD40 の細胞外ドメインから入ってくる活性化シグナルをブロックするような逆のフィードバック機序が働いている可能性があるが、CD40 の細胞外ドメインを欠いた iCD40 DC ではフィードバック機序が働けないために活性化が強かつ持続する可能性を想定している。また、iCD40 DC は AP20187 依存性に生存期間も延長する。

前述のように、有効な CTL を誘導するには DC による T 細胞への長時間の抗原提示が必要であるが、外から合成ペプチドを MHC class I 分子に乗せた MHC/ペプチド複合体の作用は数時間程度である。この問題を解決するために、従来、外科手術時の吸収糸として臨床使用されてきた poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres (PLGA-MS) を抗原供給源として利用する方法が試みられている²⁾。MHC class I および class II に乗るペプチドや蛋白を PLGA-MS (数 μ m) に包埋し末梢血単球由来 DC (Mo-DC) にパルスすると、Mo-DC に効率よく取り込まれ Mo-DC 内部で抗原を約 30 日近くにわたって放出すると予想される。したがって、抗原包埋 PLGA-MS は単独でワクチンソースとして使用可能であり、マウスの系では抗原特異的な抗体および CTL が誘導されている。DC は PLGA-MS 摂取によって成熟化は誘導されず、遊走能も影響

を受けないとされている。また、ペプチド刺激 Mo-DC の CTL 刺激は 4 日であったが、PLGA-MS 刺激 Mo-DCs の CTL 刺激期間は 9 日後にも確認されている。臨床使用に際しての問題は、PLGA-MS の最適な消毒法が未だ確立されていない点である。また、ワクチンに際しては DC の成熟化が必要であり、その方法としては抗原と CpG-ODN をともに包埋した PLGA-MS が有効だと思われる。

抗原提示時間を長くする方法には DC の細胞寿命を延長させる方法もある。遺伝子銃により皮下投与された DNA は DC に効率よく取り込まれるために DNA ワクチンに利用される。最近、種々の抗アポトーシス蛋白が DC の細胞寿命を延長可能なことがわかってきた。したがって、DC に腫瘍関連遺伝子と抗アポトーシス蛋白関連 DNA を同時に導入することで腫瘍関連ペプチドを発現する DC の細胞寿命を延長し、より強力な抗腫瘍免疫を誘導する試みが行われ、動物モデルにおいて成功している。しかし、抗アポトーシス遺伝子の導入は発癌誘導の問題がある。そこで Kim らは³⁾、DC のアポトーシス関連蛋白をノックアウトすることで DC の細胞寿命を延長させることを思いつき、その方法としてアポトーシス関連因子 (Bak と Bax) の siRNA を遺伝子銃により皮下投与し DC に組み込んだ。本法により、腫瘍関連 DNA とアポトーシス関連因子 (Bak と Bax) の siRNA を同時投与することにより DC の寿命は延長し、領域リンパ節内の腫瘍関連蛋白発現 DC の数は有意に増加し、抗腫瘍効果は著明に増強した。

2. クロスプレゼンテーション

外来性抗原刺激 DC による CTL 誘導能を高めるためには、外来抗原のクロスプレゼンテーション (外来抗原ペプチドを MHC class I 分子に乗せて細胞表面に提示すること) 効率を高め、さらにこの DC を長期間にわたりメモリー T 細胞を誘導可能な抗原提示能の高い抗原提示のプロフェッショナル細胞に変換させることが重要である。すなわち次の 2 点、効率のよいクロスプレゼンテーション誘導のための抗原刺激と十分な DC の活性化である。外来抗原をクロスプレゼンテーションの系に乗せるには抗原をレセプター依存性

に phagocytosis の形で取り込ませる重要性が指摘されている。たとえば、抗原とラテックスビーズの結合物、菌体、アポトーシス細胞、腫瘍細胞、腫瘍細胞由来エクソソームなどによる DC 刺激がそれである。さらに、Fc レセプター依存性の抗原取り込みもクロスプレゼンテーション効率の高いことが報告されている。この抗原のレセプター依存性の取り込みが効率よいクロスプレゼンテーションを誘導する理由として、抗原が効率よくエンドソームへ取り込まれることが考えられる。すなわち、phago-endosome がクロスプレゼンテーションにおいて重要な役割をしていると思われる⁴⁾。また、DC の十分な活性化の手法としては TLR ファミリーへのシグナルが有効である。TLR4 などのように DC の膜上に発現している TLRs は DC が十分に抗原を取り込む前に DC を成熟活性化してしまう可能性があるが、DC のエンドソームで発現している TLR3 や TLR9 は DC 活性化のよい標的となる。これらの点を考慮して、TLR9 のリガンドである非メチル化 CpG dinucleotides と腫瘍蛋白抗原との結合物 (Ag-CpG) をワクチンソースとして使用する方法が提唱されている⁴⁾。その理論を繰り返すと、Ag-CpG は DC 上の DNA レセプターを介してエンドソームに取り込まれる。エンドソーム形成時に小胞体が形質細胞と融合し、小胞体の一部が解放され TLR9 や MHC class I 分子がエンドソーム内へ移行する。次いで、TAP やプロテオソームといった MHC class I 分子への抗原処理関連器がエンドソームの細胞質側へ集まってくる。これにより、エンドソーム内の抗原がプロセスされ、CD8 エピトープが MHC class I に乗り、細胞膜へ移行する (クロスプレゼンテーション)。一方、エンドソーム内の CpG-ODN は TLR9 に結合し Toll/IL-1 レセプターシグナル系を活性化させ DC を成熟活性化する。すなわち、クロスプレゼンテーション能の高い活性化 DC が誘導されることになる。

3. アロ DC

末梢血中には、アロ抗原を認識する T 細胞が 1~10% くらい存在しているといわれている。これは外来抗原に反応する T 細胞の割合よりも高い。この事実は、ワクチン源としてのアロ抗原の

有用性を示唆している。最近、同種同系の DC と癌細胞との融合細胞よりも、同種異系の DC と癌細胞の融合細胞で免疫したほうが *in vitro* および *in vivo* の系において CTL 誘導能および抗腫瘍効果が強く、同種異系の DC と癌細胞の融合細胞のほうがワクチン源として有用である可能性が報告された⁵⁾。その一つの理由として、通常行われているように同系 DC と癌細胞の融合細胞により免疫したマウスの脾臓細胞と癌細胞を共培養すると Th1/Th2 (IL-4, IL-10) サイトカインをとともに誘導するが、アロ DC と癌細胞の融合細胞による免疫マウス脾臓細胞では Th1 サイトカイン (IFN- γ) のみが誘導されており、このサイトカインプロファイルの差が関係していると予想している。また、このサイトカイン産生パターン之差は、「末梢血中には、アロ抗原を認識する T 細胞の割合が外来抗原に反応する T 細胞の割合よりも高い」ということが関係しているかもしれない。すなわち、アロ DC によるアロ抗原認識 CD4⁺T 細胞への多量の刺激が IFN- γ 誘導を優位にするのかもしれない。

また、アロ DC と IL-12 遺伝子導入癌細胞の融合細胞は IFN- γ 誘導作用がさらに高められ、抗腫瘍効果も高く、臨床設定での今後の治療モデルとなる可能性がある。

4. 遺伝子治療

現在、種々の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを細胞に感染させ、任意の蛋白を発現させ治療する方法、いわゆる遺伝子治療が試みられている。この試みは、癌に対する DC ワクチン療法においても始まっている。DC ワクチンに遺伝子治療を応用する場合、特に次の点が重要である。抗原提示細胞以外の細胞に感染しないウイルスベクターの選択が必要となる。抗原提示能の不完全な細胞によって抗原が提示されれば、免疫学的トレンランスを誘導する危険性がある。この点からは、DC に特異的に感染するウイルスベクターが理想的である。もう一つは、DC に取り込まれることによって TLRs シグナルなどを刺激し DC に成熟活性化を誘導する働きを有するウイルスベクターである。レンチウイルスベクターは DC に特異的に感染し、細胞毒性を示さず、ウイルス蛋白発現なしに安定的に DC に抗原蛋白を発現し、かつ

DCの成熟活性化を誘導可能であることが示されており、DCワクチンのためのウイルスベクターの最有力候補の一つであると思われる。事実、マウスモデルの系においてレンチウイルスベクターの直接投与による抗原特異的なCTLが、効率よく長期間にわたり誘導可能であったことが報告されている⁶⁾。

II. 免疫の場の微小環境を改善する工夫

CD4⁺T細胞中には、自己抗原に反応するT細胞の機能を押さえ込む作用をもつCD4⁺CD25⁺regulatory T cells (Tregs) と呼ばれるサブセットが存在する。Tregsは末梢血中のT細胞の5~10%を占めている。このTregsは癌患者末梢血や腫瘍組織中に増加しており、これがDCワクチン療法の効果も抑制していると考えられている。最近、卵巣癌患者の末梢血、腹水、リンパ節、腫瘍組織中のTregsの数をFACS解析で、Tregsの遊走を卵巣癌移植免疫不全マウスの尾静脈からTregsを注入する系で、またTregsの抗腫瘍効果抑制を卵巣癌移植免疫不全マウスを腫瘍抗原刺激DCによるワクチン療法の系で検討した興味ある報告がなされた⁷⁾。その内容は、これまで報告されたようにTregsは主としてリンパ臓器に存在しているが、進行癌においてはTregsはリンパ節から腫瘍局所に移動し集積することを示唆する結果であった。また、腫瘍局所のTregsのリンパ節への移動はほとんどみられないことから、癌患者Tregsはリンパ節におけるナイーブT細胞の活性化を抑制するというよりは、リンパ節外での免疫反応を抑制することにより抗腫瘍免疫を抑制していると想定される。リンパ節と腫瘍局所のTregsは、リンパ節へのホーミング分子であるCCR7やCD62Lを同程度に発現しているにもかかわらず、腫瘍局所からリンパ節への移動がないことから、これらの分子が実際ホーミング分子として働いているかは未だ不明である。末梢血のTregsはCCR4とCCR8を発現しており、*in vitro*の系ではCCL1、CCL17やCCL22に向かって遊走することが知られている。また、腫瘍局所のTregsもCCR4を発現しており、CCL22抗体処理によってTregsの腫瘍局所への集積が抑制されたので、Tregsは卵巣癌細胞や腫瘍浸潤

マクロファージの発現しているCCL22に向かって腫瘍局所に遊走してることが想像されている。さらに、腫瘍局所のTregsは実際にCTL活性を抑制し、抗腫瘍活性を抑制することも示された。興味深いもう一つのデータは、臨床標本を用いた解析結果である。ヒト卵巣癌において、卵巣癌組織中のTregsの数は予後と逆相関を示し、卵巣癌局所のTregsによる免疫反応抑制が癌の進展に関与していることが示唆されている。すなわち、腫瘍局所のTregsの制御やTregsの腫瘍局所への遊走阻止が新たな治療戦略となる可能性がでてきた。

Tregsは、IL-2に対する高親和性レセプターIL-2R α 鎖(CD25)を恒常的に発現するとともにT細胞の活性化を抑制するレセプターであるCTLA-4も恒常的に発現している。Tregsの基本的な特徴は、*ex vivo*の系ではTCR刺激に不応答(アネルギー)であり、反応性T細胞のIL-2産生抑制やIL-2感受性を抑制することで反応性T細胞を不応答にすると考えられる(免疫抑制機能)。多量の外来性IL-2添加はTregsに应答性を回復させ、T細胞に対する抑制機能をも減弱させる。また、成熟DCはTregsの抑制機能を抑制するとともにTregsの増殖を誘導することができる。これらの報告は、TregsのTCR刺激に対する不応答性と免疫抑制機能が連動していることを示唆している。しかし最近、Tregsの免疫抑制機能は成熟DCによって抑制することが可能で、このためにはTLRからのシグナルは必要でないこと、一方、TregsのTCR不応答性の克服にはDCのTLRを介した活性化が必要であることが報告された⁸⁾。TLR活性化DCがTCR应答性を回復させる機序としてはDCの産生するIL-6とIL-1が共同してTregsのIL-2に対する反応性を高めることによると考えられている。つまり、TregsのTCR应答性(増殖能)にはTLRを介したDCの成熟化が必要だが、Tregsの免疫抑制反応を制御するには必要ではないということである。結論としては、Tregsの免疫抑制機能と不応答性は別々の機序によって制御されているらしい。一方で、Tregsの免疫抑制反応を消失させるにはTLRを介したDCの産生するサイトカインが必要だとする論文もある。この両論文の違い

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⁹⁾。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⁺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⁹⁾。

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¹⁰⁾。

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⁺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¹¹⁾。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⁺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 10⁸ CD8⁺T 細胞が静脈投与され、計 5 回トータル 5 × 10⁸ 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⁺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

Fcγ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¹²⁾。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⁺ 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⁺ 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⁺ 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¹³⁾。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の代わりに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¹⁴⁾。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 2×10^{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⁺ CD25⁺ 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 1¹⁾

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 などでも活性化された後に、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 γ -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 γ 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 2²⁾

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

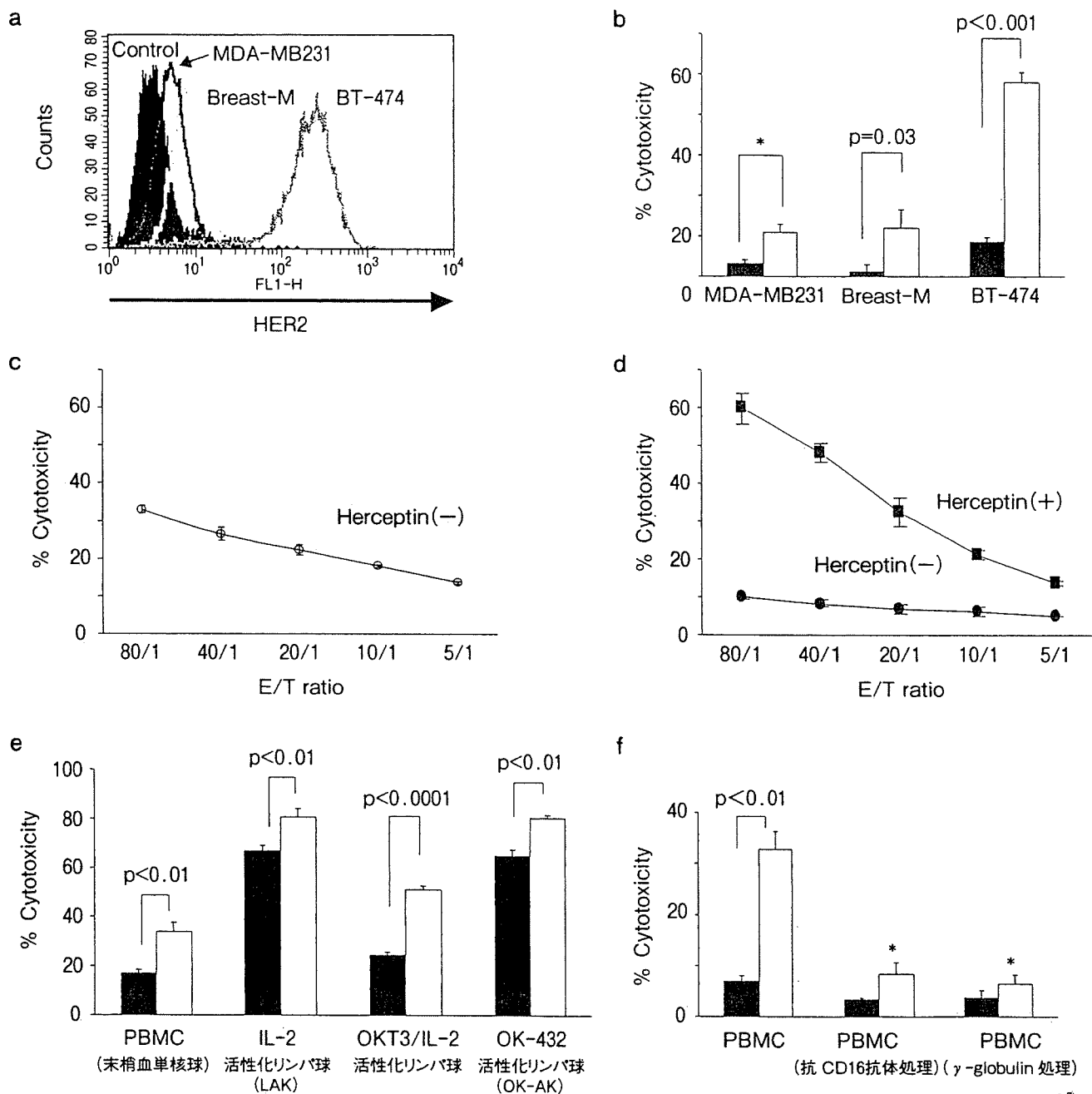


図1 Herceptin 依存性細胞傷害活性について。細胞傷害活性は4時間クロミウム放出試験により測定・定量化した。■; Herceptin (-), □; Herceptin (+), bar; SD。

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, γ -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。