

助療法としてinterferonをはじめさまざまな薬剤が試みられてきたが、標準治療は確立されていない³¹⁾。Sorafenibも含め、分子標的薬を中心とした臨床試験が行われており、今後結果が報告されるものと思われる。

おわりに

これまで、肝動脈化学塞栓術やエタノール注入法の開発、ラジオ波焼灼療法の安全な施行など、わが国が肝細胞がん治療をリードしてきた。全身化学療法の分野でもこれまでの蓄積を生かして、質の高いグローバル試験を主導していくことが必要である。

文 献

- 1) 日本肝癌研究会・編. 臨床・病理 原発性肝癌取り扱い規約(改訂第5版). 東京: 金原出版; 2008.
- 2) 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン作成に関する研究班・編. 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン(2005年度版). 東京: 金原出版; 2005.
- 3) Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003 ; 362 : 1907-17.
- 4) Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. Transection of the esophagus for bleeding esophageal varices. *Brit J Surg* 1973 ; 60 : 646-54.
- 5) Lin DY, Lin SM, Liaw YF. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1997 ; 12 : S319-28.
- 6) Van Eeden H, Falkson G, Burger W, et al. 5-Fluorouracil and leucovorin in hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 1992 ; 3 : 404-5.
- 7) Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, et al. Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant interferon Alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 421-7.
- 8) Ishikawa T, Ichida T, Sugitani S, et al. Improved survival with oral administration of enteric-coated tegafur/uracil for advanced stage IV-A hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001 ; 16 : 452-9.
- 9) Chlebowski RT, Brzechwa-Adjukiewicz A, Cowden A, et al. Doxorubicin (75mg/m²) for hepatocellular carcinoma : clinical and pharmacokinetic results. *Cancer Treat Rep* 1984 ; 68 : 487-91.
- 10) Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, et al. A phase II trial of continuous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone, and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005 ; 103 : 756-62.
- 11) Yeo W, Mok TS, Zee B, et al. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005 ; 97 : 1532-8.
- 12) Zhu AX. Development of sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2008 ; 112 : 250-9.
- 13) Furuse J. Growth factors as therapeutic targets in HCC. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008 ; 67 : 8-15.
- 14) Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008 ; 48 : 1312-27.
- 15) Poon RT, Ho JW, Tong CS, et al. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004 ; 91 : 1354-60.
- 16) Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, et al. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 6657-63.
- 17) Thomas MB, Chadha R, Glover K, et al. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007 ; 110 : 1059-67.
- 18) Zhu AX, Stuart K, Blaszkowsky LS, et al. Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007 ; 110 : 581-9.
- 19) Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 4293-300.
- 20) Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 378-90.
- 21) Cheng A, Kang Y, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region

- with advanced hepatocellular carcinoma : a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009 ; 10 : 25-34.
- 22) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, et al. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008 ; 99 : 159-65.
- 23) Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox J, et al. Preliminary results from a phase II, randomized, double-blind study of sorafenib plus doxorubicin versus placebo plus doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma[abstract]. *Eur J Cancer* 2007 ; 43 Suppl : 14th meeting.
- 24) Faivre S, Raymond E, Boucher E, et al. Safety and efficacy of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma : an open-label, multicentre, phase II study. *Lancet Oncol* 2009 ; 10 : 794-800.
- 25) Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, et al. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma : a phase II study. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 3027-35.
- 26) Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 2992-8.
- 27) Thomas MB, Morris JS, Chadha R, et al. Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 843-50.
- 28) O'Dwayer PJ, Giantonio BJ, Levy DE, et al. Gefitinib in advanced hepatocellular carcinoma : results from the Eastern Cooperative Oncology Group's Study E1203. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : abstract 4143.
- 29) Gruenwald V, Wilkens L, Gebel L, et al. A phase II open-label study of cetuximab in unresectable hepatocellular carcinoma : final results. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : abstract 4598.
- 30) Kanai F, Yohida H, Tateishi R, et al. Final result of a phase I/II trial of the oral anti-angiogenesis inhibitor TSU-68 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : abstract 4589.
- 31) Ishii H, Yamamoto J, Ikari T. Adjuvant treatments for resectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008 ; 15 : 459-62.

* * *

肝臓癌—ソラフェニブ導入と 肝炎ウイルスキャリアの管理

古瀬純司*¹・鈴木英一郎*²・長島文夫*³

abstract

肝細胞癌の化学療法では従来の抗癌剤は一定の抗腫瘍効果を認めるものの生存期間の改善は得られていなかった。2007年、切除不能進行肝細胞癌患者を対象に行われたマルチキナーゼ阻害剤ソラフェニブのランダム化比較試験により初めて生存期間の延長が報告され、ソラフェニブが肝細胞癌の標準的化学療法と位置付けられている。特徴的な毒性として手足皮膚反応、皮疹、下痢、高血圧などが挙げられ、ソラフェニブの臨床導入に際しては、その特徴の十分な理解と適切な副作用対策が必要である。今後ソラフェニブに続く新しい分子標的薬や併用療法、局所療法後の補助療法など肝細胞癌に対する化学療法の重要性が増すものと考えられる。一方、肝細胞癌ではB型およびC型肝炎ウイルスの感染を背景肝にもつ場合がほとんどであり、化学療法時の肝炎再燃が危惧されることから、抗ウイルス治療の適切な実施が必要となる。

I はじめに

肝細胞癌は多くの場合、B型肝炎あるいはC型肝炎ウイルスの感染を認め、肝硬変など慢性肝疾患が併存する。したがって、癌の進行度とともに肝障害の程度に応じて治療選択がなされ、肝切除やラジオ波焼灼療法（RFA）などの局所療法から化学療法まで、その治療法は多岐にわたる。全身化学療法はこれまで多くのレジメンが臨床試験として試みられてきたが、生存期間の延長が確認された標準治療は確立していなかった。2007年、ソラフェニブを用いたランダム化比較試験により初めて化学療法による延命効果が確認され、新しい標準治療として用いられてきている。本稿では肝細胞癌におけるソラフェニブの導入と肝炎ウイルスの管理について概説する。

II 肝細胞癌の疫学

わが国における原発性肝癌の死亡数は2006年で33,662人であり、癌の死因の10.2%を占め、肺、胃、大腸に次いで第4位にある。一方、原発性肝癌の罹患数（地域癌登録全国推計値）は2002年で40,604人、男女別罹患数は男性27,876人、女性12,728人と男性で約2倍多い¹⁾。背景肝病変として80%以上に肝硬変または慢性肝炎を有し、そのほとんどが肝炎ウイルスによるものであり、HCV抗体陽性者は約70%、HBs抗原陽性者は約15%である²⁾。

III 肝細胞癌における治療選択と全身化学療法の適応

治療選択は癌進行度と肝障害度に応じて決定され、肝切除、RFAなど局所壊死療法、肝動脈化学塞栓療法（TACE）が腫瘍数、腫瘍径、肝機能に応じて

*1 杏林大学医学部腫瘍内科教授

*2 杏林大学医学部腫瘍内科

*3 杏林大学医学部腫瘍内科准教授

選択される³⁾。肝動注化学療法は門脈腫瘍塞栓など高度進行癌に対して活発に行われてきたが、前向きな臨床試験による十分な検証は行われていない。全身化学療法は臨床試験での実施がほとんどであり、ソラフェニブのランダム化比較試験が行われるまで標準的な治療法は確立していなかった。

肝細胞癌に対する化学療法は、肝外転移例および局所治療、特にTACEが適応困難あるいは無効な例が適応となる。TACEが適応困難という具体的な基準としては、高度の門脈あるいは肝静脈の腫瘍塞栓、10cmを越すような巨大腫瘍などが当てはまる。また、早期濃染が乏しく切除もRFAもできない症例はまれであるが、TACEの効果は期待できず、化学療法の適応に含まれると考えられる。TACE無効の判断は明確な基準やコンセンサスはないが、複数回実施しても腫瘍の壊死効果（リピオドールの沈着）が得られない、あるいは新病変が多数出現するなどが当てはまる。

ソラフェニブによる比較試験によりその有効性が確認され、肝切除やRFAなど局所治療の適応とならない肝細胞癌を対象にわが国でも2009年5月に適応が承認された。局所治療との併用や治療後の補助療法としての有効性及び安全性は確認されておらず、今後臨床試験により検証される必要がある。

Child-Pugh Cの肝機能不良例では局所療法と同様、化学療法においても肝障害が増悪するリスクも大きく、原則として禁忌である。またソラフェニブをはじめ多くの分子標的薬はChild-Pugh Aの肝機能良好例を対象に臨床試験が行われており、Child-Pugh Bなど肝機能低下例での安全性は確立していないことを認識しておく必要がある。

IV ソラフェニブの臨床試験

ソラフェニブはEGFRの下流であるRAFキナーゼとVEGFR-1-3、PDGFR- β などを標的とするマルチキナーゼ阻害薬である。肝細胞癌においてもRafの高発現が認められ、RAF/MEK/ERKシグナル伝達経路が発癌に関与している⁴⁾。また肝細胞癌は血管新生の豊富な腫瘍であり、進行度や予後と血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor :

VEGF）との強い関連が報告されている⁵⁾。これらからRafおよびVEGFRを標的とした治療、すなわちソラフェニブの妥当性が示されている。

ソラフェニブの第I相試験により肝細胞癌例で部分奏効（PR）が得られていたことから⁶⁾、米国や欧州などでソラフェニブ 400mg、1日2回、連日経口投与の用法用量により第II相試験が行われた⁷⁾。その結果、奏効率は2%と低率であったが、十分な忍容性が確認され、無増悪期間（TTP）中央値5.5カ月、全生存期間（OS）中央値9.2カ月と有効性も十分期待される結果であった。

このような背景から、肝細胞癌においてプラセボコントロールによるランダム化比較試験SHARP（Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol）試験が実施された⁸⁾。プライマリーエンドポイントはOSと症状増悪までの期間であり、主な患者選択基準は、組織学的な肝細胞癌の確認、進行肝細胞癌、ECOG PS 0-2、Child-Pugh A、全身化学療法歴なし、などである。2005年3月から2006年4月までにソラフェニブ群299例、プラセボ群303例が登録された。OS中央値はソラフェニブ群10.7カ月、プラセボ群7.9カ月であり、両者間に明らかな有意差を認めた（ハザード比0.69, $p < 0.001$ ）（図1）。またTTP中央値もソラフェニブ群5.5カ月、プラセボ群2.8カ月であり、両者間に有意差を認めている（ハザード比0.58, $p < 0.001$ ）。

SHARP試験では欧州からの登録が90%近くと偏っていたことから、地域差の検証のためAsia-Pacific地域で同様のランダム化比較試験（Asian-Pacific trial）が行われた⁹⁾。ソラフェニブの投与量はSHARP試験と同量（400mg bid）であり、OS中央値はソラフェニブ群6.5カ月、プラセボ群4.2カ月とソラフェニブ群で有意に良好であった（ハザード比0.68, $p = 0.014$ ）（図2）。またTTP中央値もソラフェニブ群2.8カ月、プラセボ群1.4カ月と有意差を認めた（ハザード比0.57, $p < 0.001$ ）。プラセボ群に対するソラフェニブ群のTTPとOSのハザード比はSHARP試験とほぼ同等であり、肝細胞癌の疫学や地域での違いにかかわらずソラフェニブの有効性が確認された。

わが国では日本人肝細胞癌患者での薬物動態、安

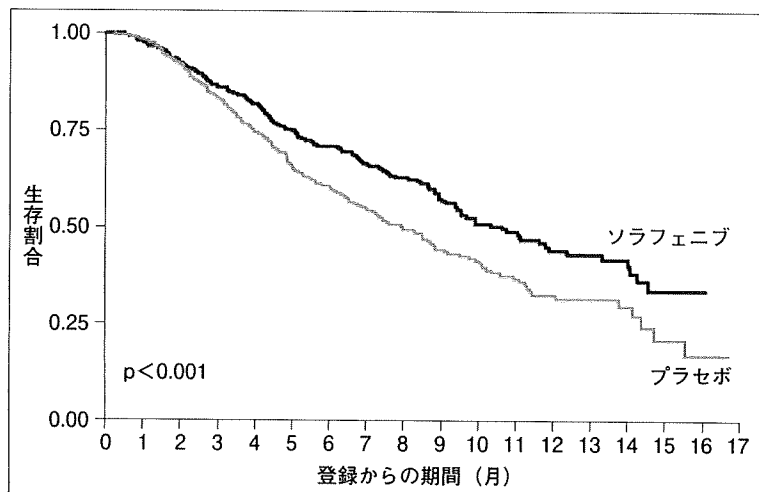


図1
ソラフェニブによるSHARP試験のOS
Median OSはソラフェニブ群10.7カ月に対し、プラセボ群7.9カ月とソラフェニブ群で有意な生存期間の延長が得られた (ハザード比 0.69 ; 95%CI 0.55~0.87, $p < 0.001$).
[参考文献8]より改変]

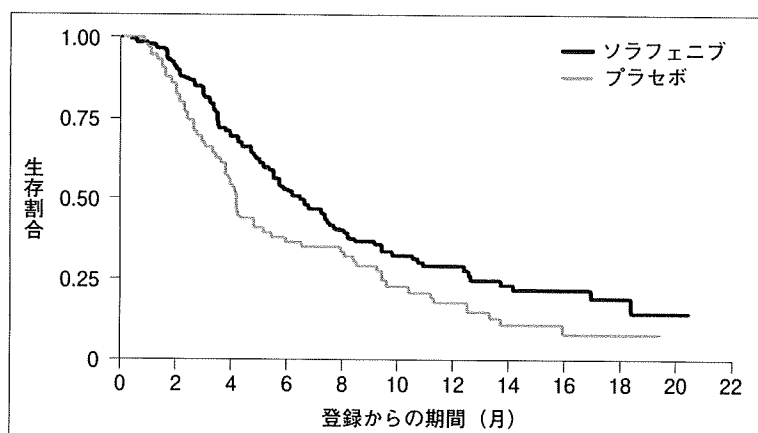


図2
ソラフェニブによるAsia-Pacific試験のOS
Median OSはソラフェニブ群6.5カ月に対し、プラセボ群4.2カ月とソラフェニブ群で有意に良好であり、SHARP試験と同等のハザード比であった (ハザード比0.68 ; 95%CI 0.50~0.93, $p = 0.014$).
[参考文献9]より改変]

全性、推奨用量などを明らかにする目的で第I相試験が行われた¹⁰⁾。その結果、他癌腫、米国・欧州と同様の薬物動態および忍容性が確認され、推奨用量も400mg、1日2回と決定された。同試験では症例数は少ないものの、有効性も同等であった。

V ソラフェニブにおける有害事象とその対策

肝細胞癌患者を対象として行われたランダム化比較試験で報告された頻度の高い有害事象は手足皮膚反応、下痢、疲労、高血圧、食思不振などである(表1)。わが国の第I相試験では、自覚症状として表れる非血液毒性は皮疹、手足皮膚反応、下痢、疲労が1/3以上の症例で認められている(表2)。これらは海外での比較試験とほぼ同様の傾向である。一方、血液毒性やリパーゼ・アミラーゼ上昇など検査して初めて分かる有害事象も明らかになっている。従来の

抗癌剤に比べ血液毒性は少ないが、肝細胞癌では汎血球減少を伴っていることが多く、注意が必要である。リパーゼ、アミラーゼの膵酵素上昇はほぼ全例に認められている。症状もなく、自然に低下する例がほとんどであるが、1例で投与開始後6カ月に急性膵炎と考えられる経過が報告されている¹⁰⁾。頻度は少ないとはいえ、腹痛など症状が出現した場合には膵炎も念頭に置いた対応が必要である。

経口剤による治療は原則として外来通院で開始されることが多く、頻度の高い有害事象については、あらかじめ患者に十分な説明を行い、対策を講じておく必要がある(表3)。皮疹、手足皮膚反応、下痢、高血圧などは治療開始から1、2週の早期に起こることが多く、発現すると患者に大きな不安を与えることになる。軽度であれば心配がないこと、悪化する場合は内服を中止して適切な治療薬を用い、早々に来院すること、などの説明を行う。治療開始時に抗

	SHARP試験 (n=297)		Asia-Pacific試験 (n=149)	
	Any Grade	Grade 3/4	Any Grade	Grade 3/4
Constitutional symptoms				
Fatigue	22%	4%	20.1%	3.4%
Weight loss	9%	2%	—	—
Dermatologic events				
Alopecia	14%	0	24.8%	0
Dry skin	8%	0	—	—
Hand-foot skin reaction	21%	8%	45%	10.7%
Rash or desquamation	16%	1%	20.1%	0.7%
Gastrointestinal events				
Anorexia	14%	<1%	12.8%	0
Diarrhea	39%	8%	25.5%	6%
Nausea	11%	<1%	11.4%	0.7%
Vomiting	5%	1%	—	—
Voice changes	6%	0	—	—
Hypertension	5%	2%	18.8%	2%
Abdominal pain	8%	2%	—	—
Bleeding	7%	1%	—	—

表1
ソラフェニブの主な有害事象
(ランダム化比較試験から)

表2 日本人での主な有害事象 (日本の第 I 相試験から)

	n=27	
	Any Grade	Grade 3/4
Hematological		
Leukocytopenia	11.1%	0
Lymphopenia	22.2%	18.5%
Thrombocytopenia	22.2%	7.4%
Non-hematological		
Hypertension	18.5%	18.5%
Fatigue	37.0%	0
Fever	11.1%	0
Weight loss	29.6%	0
Hand-foot skin reaction	44.4%	7.4%
Rash	55.6%	7.4%
Alopecia	18.5%	0
Dry skin	11.1%	0
Pruritus	29.6%	0
Anorexia	22.2%	0
Diarrhea	55.6%	3.7%
Stomatitis	11.1%	0
Lipase	88.9%	59.3%
Amylase	59.3%	14.8%

ヒスタミン剤, 角化軟化剤, 止痢剤などをあらかじめ処方しておくことも勧められる。血圧についても自宅で定期的な測定をしてもらうよう指導する。こ

これらの対策は個々の患者からの情報収集がきわめて重要であり, 看護師・薬剤師などを含めたシステムを作る取り組みが行われている。

VI 肝炎ウイルスへの対応

疫学の項で述べたように肝細胞癌ではB型肝炎あるいはC型肝炎の感染が基礎疾患にある場合がほとんどである。特にB型肝炎患者では, 化学療法により免疫機構の均衡が破綻し, ウイルスの増殖を認め, 重症肝炎が惹起されることがあり, 対策が必要である。2009年, 免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策に関して, 厚生労働省の研究班合同報告が出されている¹¹⁾。それによるとHBs抗原陽性はもちろんHBs抗原陰性でもHBc抗体陽性あるいはHBs抗体陽性の既往感染例ではHBウイルスの再活性化によりB型肝炎が発症し, 劇症化することもあり, HBV-DNA定量で検出感度以上の場合にはエンテカビルあるいはラミブジンの核酸アナログの投与が勧められている。投与期間については明確な基準はないが, 化学療法開始前1週間から化学療法終了後少なくとも12カ月間継続することが推奨されている^{11), 12)}。

表3 ソラフェニブの主な有害事象に対する対策

	予防	処方
手足皮膚反応	窮屈な靴, 身体に密着・圧迫する衣服, 熱い湯, 過剰のマッサージ, 長時間の立ち仕事や歩行などを避ける. 冷水浴が勧められる.	保湿クリーム, 尿素, サリチル酸を含む軟膏, 重症例ではステロイド軟膏, 疼痛に対しては鎮痛消炎剤を使用する.
皮疹	皮膚を清潔に保つ. 刺激の少ない石鹸の使用. 直射日光を避ける. ぬるま湯のシャワー, など.	抗ヒスタミン剤 (軟膏, 内服). 重症例ではステロイド軟膏.
下痢		整腸剤, ロペラミドの内服など.
高血圧	自宅での連日の血圧測定を勧める. 高血圧の既往歴がある場合は特に注意.	カルシウム拮抗剤, アンジオテンシン変換酵素阻害薬, アンジオテンシンⅡ受容体ブロッカーなど血圧に応じて降圧剤を併用する.

VI おわりに

これまでエビデンスに基づく有効な全身療法がなかった肝細胞癌において, 新たな治療選択が加わった意義は大きい. 全身治療の利益を得るためには, 薬剤の特徴を十分理解したうえで適切な適応と副作用対策が肝要である.

参考文献

- 財団法人がん研究振興財団: がんの統計'08 (<http://www.fpcr.or.jp/publication/pdf/statistics2008.pdf>)
- 日本肝癌研究会追跡調査委員会: 第17回全国原発性肝癌追跡調査報告 (2002~2003). 肝臓 48: 117-140, 2007
- 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン作成に関する研究班(編): 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン 2005年版. 金原出版, 東京, 2005
- Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, et al: Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK) - MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. BMC Gastroenterol 3: 19, 2003
- Poon RT, Ho JW, Tong CS, et al: Prognostic significance of

serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. Br J Surg 91: 1354-1360, 2004

- Strumberg D, Richly H, Hilger RA, et al: Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. J Clin Oncol 23: 965-972, 2005
- Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al: Phase II study of Sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol 24: 4293-4300, 2006
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al: Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 359: 378-390, 2008
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al: Efficacy and safety of Sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Oncol 10: 25-34, 2009
- Furuse J, Ishii H, Nakachi K, et al: Phase I study of Sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 99: 159-165, 2008
- 坪内博仁ほか: 免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策 - 厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査委研究」班劇症肝炎分科会および「肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究」班合同報告 - 肝臓 50: 38-42, 2009
- Kohrt HE, Ouyang DL, Keeffe EB: Antiviral prophylaxis for chemotherapy-induced reactivation of chronic hepatitis B virus infection. Clin Liver Dis 11: 965-991, 2007



総説

ES細胞, iPS細胞由来の樹状細胞を利用したワクチン*

福島 聡^{**,**} 西村 泰治^{**} 千住 覚^{**,**}

Key Words : ES cell, iPS cell, dendritic cells, vaccine, tumor immunity

はじめに

悪性腫瘍に対して有効な免疫療法を行うためには、腫瘍細胞に特異的に発現する抗原に対して免疫応答を強力に賦活する方法の開発が不可欠である。生体外で培養した樹状細胞(DC)になんらかの方法で腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチンが、抗腫瘍免疫応答を効果的に誘導する手段として期待されている¹⁾。DC療法を医療として確立するためには、治療に用いるのに必要なDCの安定供給を可能にする技術の開発が不可欠である。筆者らは、細胞ワクチンとして用いるDCを作製するための材料として胚性幹(ES)細胞に着目し、ES細胞由来のDCを用いた免疫療法の研究を行ってきた²⁾。最近、iPS細胞作製法という画期的な技術の開発により、任意の個体の体細胞から多能性幹細胞を作製することが可能となった³⁾。筆者らは、iPS細胞は各種の再生医療のための細胞ソースとしてのみならず、細胞治療に用いるためのDCを作製するための材料として非常に有用であると考えている。本稿では、筆者らの、多能性幹細胞由来のDCを用いたさまざまな疾患の治療法に関する研究について紹介する。

多能性幹細胞をDCのソースとして用いる理由

現在、臨床的に施行されているDC療法として、腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチン法がある。この抗腫瘍免疫療法に用いられるDCは、アフレーシス(成分採血)により分離した末梢血白血球中の単球をGM-CSFなどのサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製されている。しかしながら、末梢血単球は、体外で増殖させることができないため、治療に必要な数のDCを得るためには、大量の血液をアフレーシス処理する必要がある。さらに、単球からDCへの分化誘導効率には細胞ドナーにより大きな個人差があり、アフレーシスを行っても必ずしも十分な数のDCが得られるとは限らない。このように、末梢血単球由来のDCを用いる方法は、ドナーの負担と細胞供給の不安定性という問題があり、その臨床的有効性が確認されたとしても、医療技術として広く普及するのは困難であると予想される。

ES細胞は、さまざまな細胞へ分化する能力を備えている代表的な多能性幹細胞である。ES細胞は旺盛な増殖能力を有しており、適切な条件の下で培養することにより、多能性を保ったまま無限に増殖させることが可能である。筆者ら

* Vaccine utilizing dendritic cells derived from ES cells and iPS cells.

** Satoshi FUKUSHIMA, M.D., Ph.D., Yasuharu NISHIMURA, M.D., Ph.D. & Satoru SENJU, M.D., Ph.D.: 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野〔☎860-8556 熊本市本荘1-1-1〕; Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, JAPAN

*** 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚病態治療再建学分野

**** 独立行政法人科学技術振興機構CREST

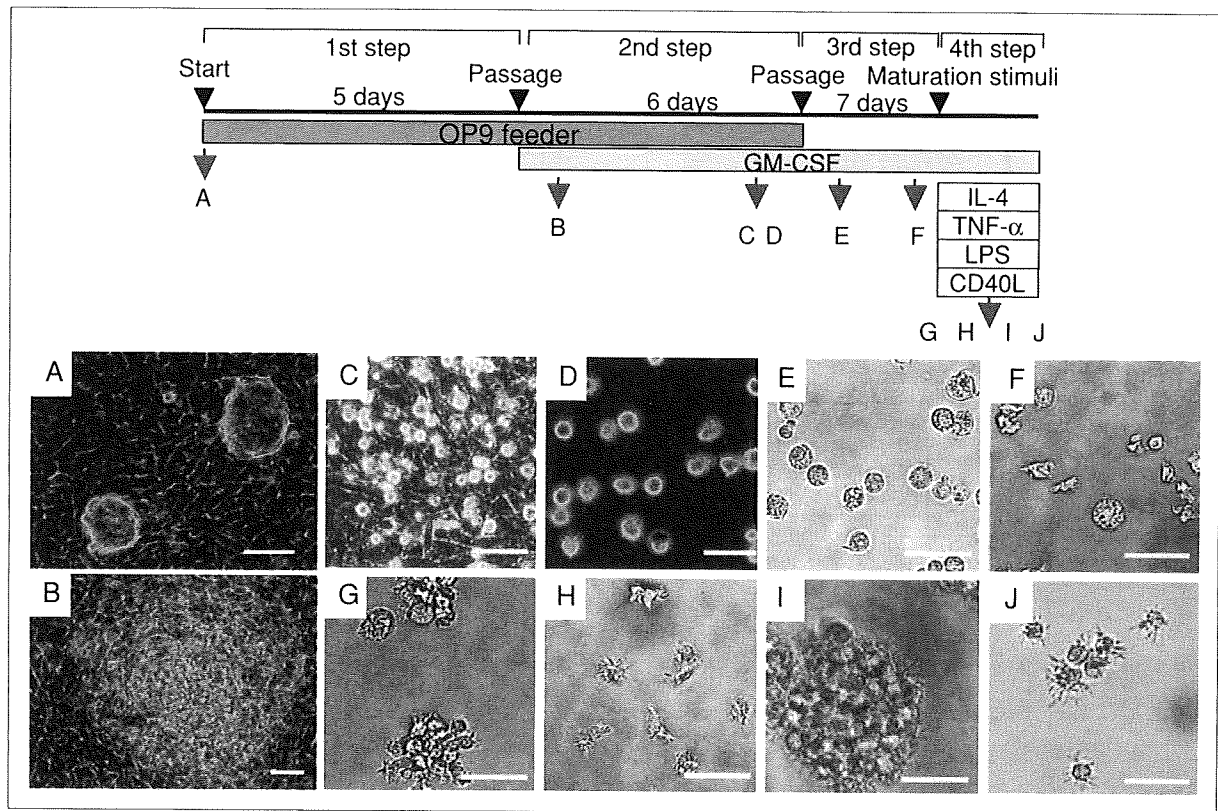


図1 ES-DCの誘導プロトコール

は、無限増殖能を有するES細胞を材料としてDCを作製することが可能になれば、細胞ドナーへ負担をかけることなく必要な数のDCを作製できるようになると考えた。また、ES細胞は電気穿孔法あるいはリポフェクション法により、ウイルスベクターを使用することなく、簡便に遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに遺伝子導入細胞のクローンを作製することもできる。これにより、抗原蛋白質あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能をさまざまに修飾したDCを作製することができるという利点もある。

マウスES細胞由来のDCによる免疫制御

ES細胞を血液細胞への分化を誘導するOP9細胞と共培養し、適切なタイミングでDCへの分化を促すサイトカインを加えることにより、DCへの分化誘導ができる。マウスES細胞からDC(ES-DC)を作製する以下のような培養プロトコールを示す(図1)。ES-DCは、MHCクラスII分子を介した抗原提示機能と一次MLR刺激活性を有し

ていた。これをさらにTNF- α 、IL-4、および抗CD40刺激抗体の同時添加、あるいはLPSなどで刺激すると、著明な樹状突起を有し、より強力なT細胞刺激活性を有する成熟DCとなる。ES-DCは、GM-CSFに依存して分化すること、および、表面マーカー(CD11b陽性)から、ミエロイド系DCに相当すると考えている。

筆者らは、モデル腫瘍抗原として卵白アルブミン(OVA)抗原を発現するES-DCを作製した²⁾。このOVA発現ES-DCをES細胞と同系のマウス個体に移入することにより、OVA抗原に特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)を感作することができた。また、このES-DCは、*in vitro*でマウスの脾臓由来の非感作T細胞と共培養することによっても、OVA抗原特異的なCTLを活性化することができた。さらに、マウスにこのDCを投与することによりOVA抗原に対して感作すると、OVAを発現するマウス腫瘍細胞(MO4)を移植した場合にこれを拒絶できた⁴⁾。モデル抗原であるOVAを用いた場合だけでなく、腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能である。GPC3は、筆者らの研究室がヒトの肝細

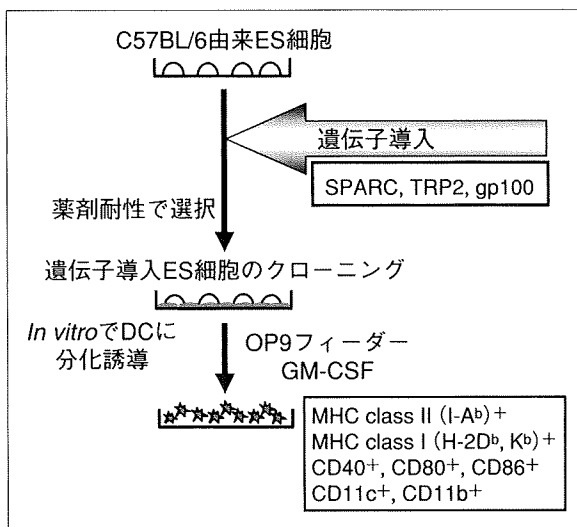


図2 メラノーマ抗原遺伝子導入ES-DCの作製法

胞がんおよびメラノーマに発現する腫瘍抗原として同定したものである⁵⁾。前述の方法を用いてES-DCにGPC3を強制発現させたものをマウス個体に予防的に投与することにより、GPC3を発現するマウスメラノーマ細胞B16-F10に対する拒絶効果を誘導することが可能であった⁶⁾。

筆者らは、細胞ワクチンとして使用するES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを発現させることにより、ES-DCが抗原特異的T細胞に遭遇する効率を改善し、抗原を負荷したDCによる免疫効果を向上させる、という試みも行った。生体移入したES-DCがリンパ組織へ遊走できなくても、ES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを強制発現させておけば、ES-DCが存在する場所へT細胞が集まり、その場所で抗原特異的なT細胞を活性化できるのではないかと考えたのである。前述したOVA遺伝子を導入したマウスES細胞に、さらに、T細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、このES細胞からOVAとケモカインを同時に発現するES-DCを作製した³⁾。T細胞に対する遊走活性を有するケモカインとして、生理的に存在するDCからは産生されない、SLC(CCL21)、Mig(CXCL9)、およびlymphotactin(XCL1)の3種類を選択した。前述のOVA遺伝子を導入したES細胞に、さらに、これらのケモカインの遺伝子をそれぞれ導入した。OVAとそれぞれのケモカインを同時に発現するES-DCを作製し、これらのES-DCをマウスに投与したときの免疫効

果を比較した。その結果、この3種類のケモカインのいずれについても、OVAを単独で発現するES-DCよりも、OVAとケモカインを同時に発現するES-DCの方が、より効果的にCTLを活性化できることがわかった。さらに、SLCあるいはMigをOVAと同時に発現するES-DCは、OVA単独発現のES-DCよりも、抗腫瘍効果の誘導においても優れていた。とくにSLCの共発現により、もっとも強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた⁴⁾。

種々の自己免疫疾患は、さまざまな自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、免疫系による攻撃により組織傷害が生ずるものである。免疫抑制剤を用いた治療では、免疫応答能が全般的に低下する結果、感染症に罹患する危険性が高まるという問題がある。そこで、免疫応答能全体を低下させず、標的となっている自己抗原に対する免疫応答のみを特異的に抑制する治療法の開発が切望されている。われわれは、これまで、自己免疫疾患の治療法として、自己免疫の標的となっている自己抗原と免疫抑制分子を同時に発現させたES-DCを生体に投与するという手法をマウスモデルで検討している。そして、ES-DCに自己抗原と同時にPD-L1あるいはTRAILを強制発現させたものを投与することにより、自己免疫疾患[実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)]を治療できることを報告している⁷⁾。

複数抗原を標的とし、NKT細胞の活性化を併用したマウスES-DCによる免疫療法

本稿では、これまでに行ってきたES-DCによるがん免疫療法に対して、さらに強力な効果を得るために複数の抗原を標的とし、NKT細胞の活性化も併用したマウスモデルでの臨床前研究の結果を紹介する。まず、最初にメラノーマ抗原を発現するマウスES-DCを3種類作製した(図2)。C57BL/6マウスのES細胞に、メラノーマ関連抗原として、SPARC, TRP2, gp100 3つの遺伝子をそれぞれ電気穿孔法で導入した。SPARCは当研究室で同定した新規がん抗原であるが、メラノーマで高発現する⁸⁾。TRP2, gp100はすでに広く認知されているメラノーマ関連抗原であるが、gp100については、マウスメラノーマに対して、mouse gp100で免疫するよりも、humanのgp100

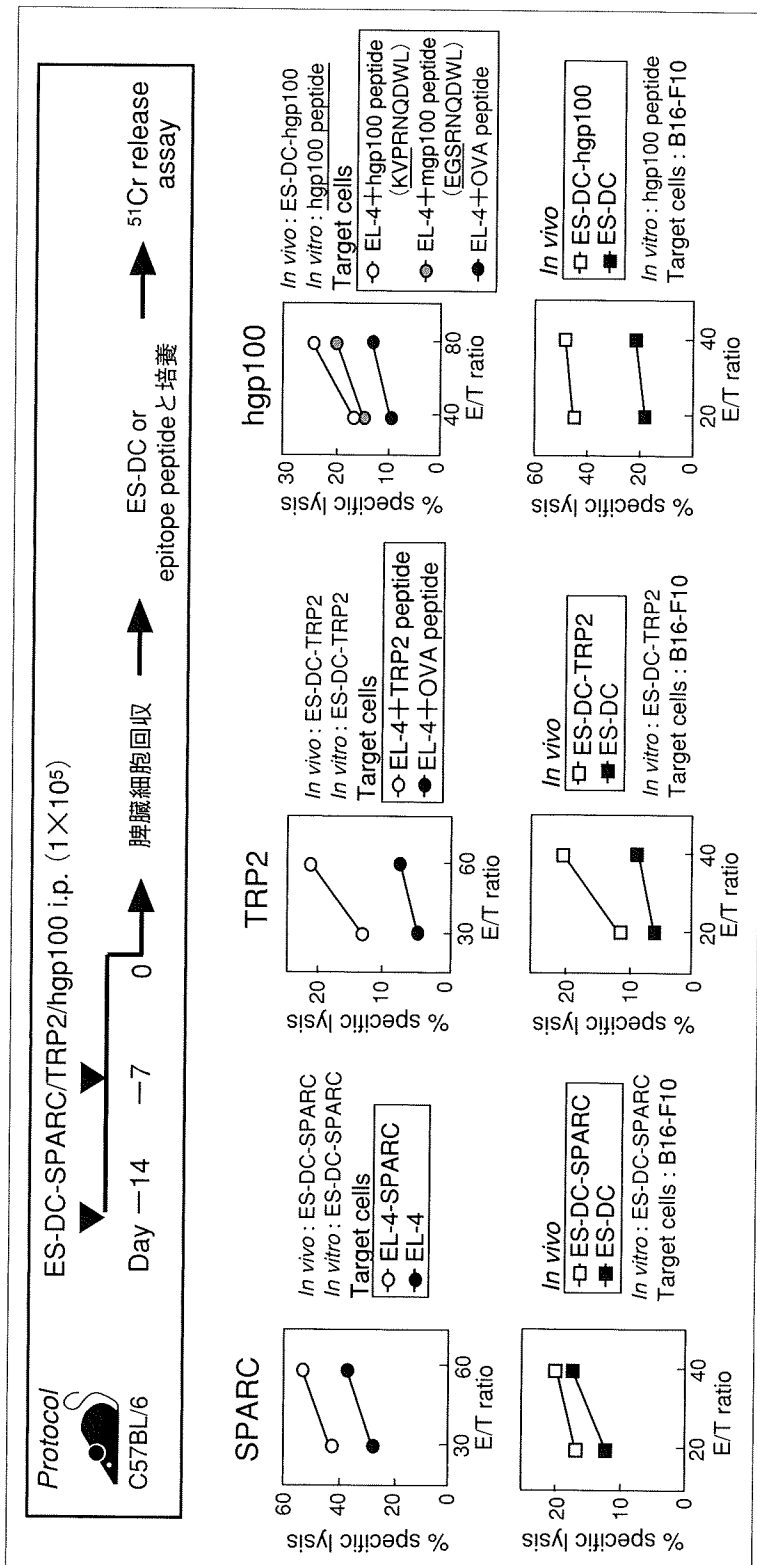


図3 遺伝子導入ES-DCによる抗原特異的CTLの誘導

(hgp100)で免疫するほうが、より強いレスポンスが得られることが知られているため、本研究では human gp100 を遺伝子導入した、クローニングした遺伝子導入ES細胞を前述したプロトコールによりDCに分化させた。それぞれの抗原の発現はES-DCに分化した段階でRT-PCR, およびFACSにより確認した。次にSPARC, TRP2, hgp100を発現したそれぞれのES-DCを腹腔内注射し、マウス体内で抗原特異的CTLが誘導できるかを検討した。それぞれのES-DCで1週間おきに2回免疫し、1週間後脾臓細胞を回収した。In vitroでそれぞれの抗原と5日間培養し、 ^{51}Cr release assayで抗原特異的CTLの検出を行った(図3)。免疫するES-DCの抗原の有無、標的細胞の抗原の有無での結果を比較することにより、遺伝子改変ES-DCによって抗原特異的なCTLが誘導されたことが確認された。

次に、抗腫瘍効果を転移モデルで検証した。腹膜播種や原発巣からのリンパ節転移などでの抗腫瘍効果を評価するために、マウスメラノーマの高転移株B16-BL6細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、転移巣を定量化するシステムを用いた。腹膜播種の予防モデルにおけるそれぞれのES-DCの効果を示す(図4)。ES-DC-SPARC, ES-DC-TRP2, ES-DC-hgp100による免疫は、medium対照群に対しては有意に腫瘍の増殖を抑制したが、 1×10^4 の腫瘍細胞を腹腔内接種する条件では、遺伝子導入していないES-DCとの有意差が認められなかった。それに対して、これら3種類のES-DCを混合して免疫したところ、腫瘍を完全に拒

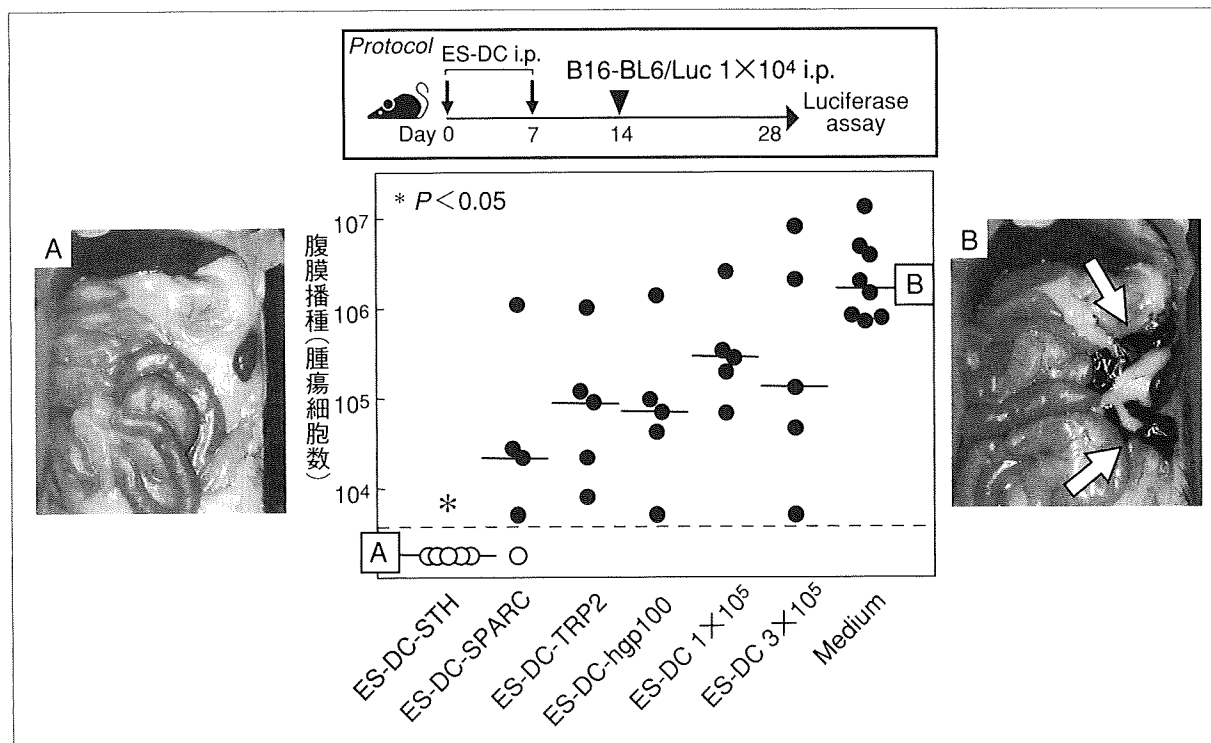


図4 複数抗原標的ES-DCの腹膜播種予防モデルでの効果
 ES-DC-STH : ES-DC-SPARC+TRP2+hgp100.

絶した。つまり、複数の抗原を標的とすることで、単一抗原で免疫するより、より効果的に腫瘍の増殖を抑制することが腹膜播種モデルで示された。

複数抗原を標的とした免疫療法のシエマを示す(図5)。個々の抗原を認識できるT細胞のプリカーサーには限りがある。よって複数の抗原を標的としたほうが、最終的に動員できるエフェクターの総数は多くなると考えられる。さらに抗腫瘍効果を増強するために、 α -GalCerを用いた。 α -GalCerはDCに発現するCD1d分子によって提示され、効果的にNKT細胞を活性化することが知られている。活性化したNKT細胞は、自身が腫瘍細胞を直接攻撃するだけでなく、IFN- γ を大量に産生しエフェクターT細胞を活性化、またNK細胞も活性化するため、これらの相乗効果が期待できる(図5)。腹膜播種モデルで α -GalCer負荷ES-DCの効果を評価した(図6)。図4で示した実験に比べて接種する腫瘍細胞数を5倍に増やしたところ、3種類の抗原ES-DCによる免疫は抗原なしのES-DCとの有意差が認められなかった。一方、 α -GalCerを負荷した抗原なしのES-DCは部分的な効果を示した。さらに α -GalCerをロー

ドした3種類の抗原遺伝子導入ES-DCは腫瘍を完全に拒絶した。つまり、複数抗原標的ES-DCと α -GalCerの相乗効果が観察された。ここまでのデータはすべて免疫が成立したところへ腫瘍を接種する予防モデルであったが、次にソケイリンパ節転移および、腹膜播種の治療モデルでのデータを示す。腫瘍をfootpadあるいは、腹腔内に接種した、3日後、および10日後に各種ES-DCで治療を行った(図7)。 α -GalCerを負荷した3種類の抗原ES-DCはソケイリンパ節転移、腹膜播種のいずれにおいても有意に強い治療効果を示した⁹⁾。

ヒトES細胞からのDCの作製

以上のように、遺伝子導入により腫瘍抗原を発現させたマウスES-DCをマウス個体に移入することにより、抗原特異的なCTLを活性化し、抗腫瘍免疫効果を誘導できることが示された。これらの結果は、ES-DCを用いた抗腫瘍免疫療法が臨床的にも有用ではないかと期待させるものである。筆者らは、ES-DCの臨床応用をめざして、ヒトのES細胞からES-DCを作製する分化誘導法の開発を行った¹⁰⁾。ヒトのES細胞は、マウスのES

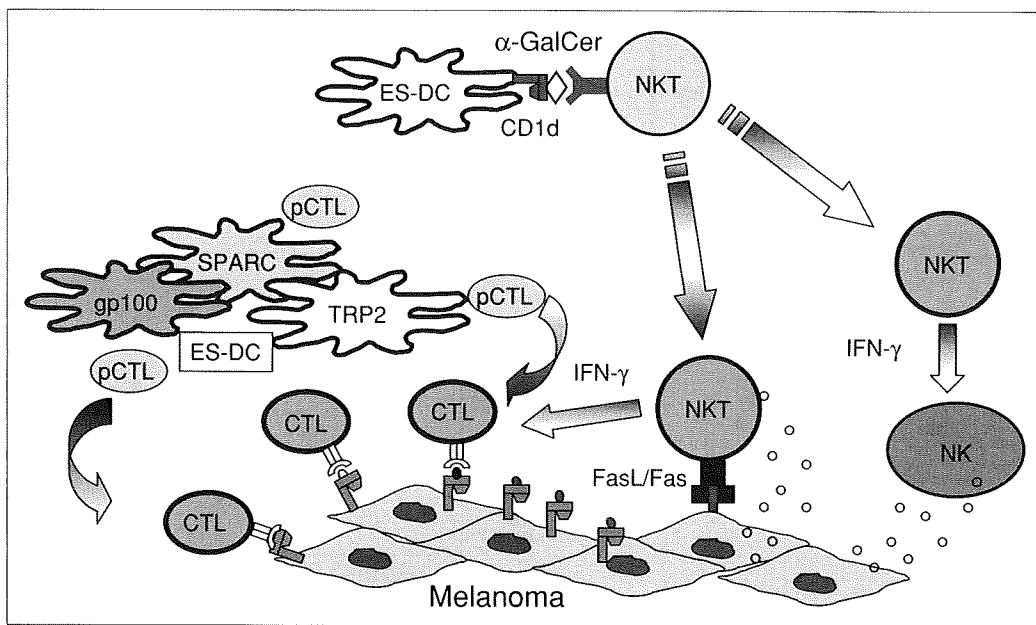


図5 α-GalCerを負荷した複数抗原標的ES-DCによる免疫療法のシエーマ
pCTL：CTLプリカーサー。

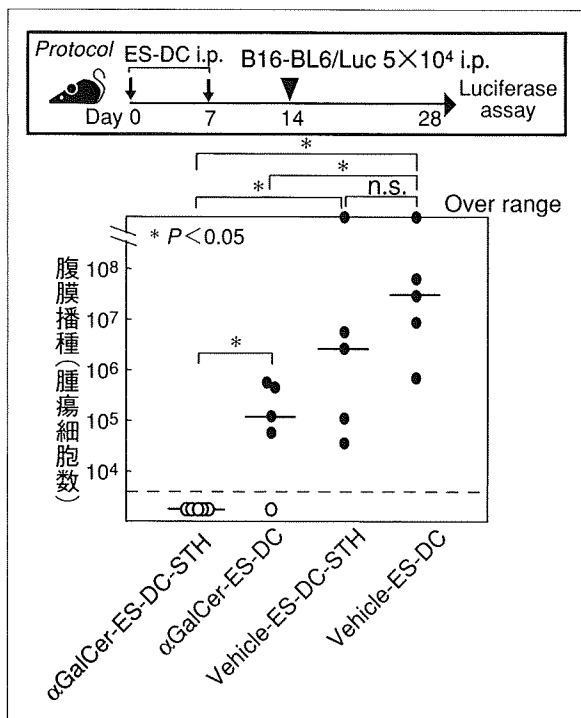


図6 抗原遺伝子導入ES-DCとα-GalCerの相乗効果

細胞に比べて上皮性の細胞に分化しやすい傾向があるが、マウスの場合と同様にOP9細胞をフィーダー細胞として用いることにより、血液細胞を含む中胚葉系細胞への分化を誘導することが可能であった。筆者らのヒトのES-DC分化誘導法では、培養系へGM-CSF、およびIL-4を添加するこ

とにより効率よい分化誘導が可能であった。ヒトES-DCもマウスES-DCと同様に蛋白質抗原をプロセスしてT細胞へ提示する活性やアロMLR刺激活性など、DCとしての機能を備えていた。また、マウスES-DCの場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変ES-DCを作製することも可能であった。

マウスiPS細胞からのDCの作製

筆者らは、マウスのES-DCを作製する方法に準じて、マウスiPS細胞由来のDC[iPS cell-derived dendritic cells (iPS-DC)]を作製することに成功している¹²⁾。分化誘導の過程における形態の変化や最終的に産生されるDCの機能において、iPS細胞はES細胞とほぼ同等であったが、差異も認められた。iPS細胞は、われわれがこれまでに扱ってきたいろいろな系統のES細胞株と比較すると、すべてのステップにおいて分化の速度がやや遅く、最終的にDCへ分化するまでの期間がやや長くなる傾向があった。また、ES細胞からの分化誘導では、分化段階が進んで成熟するにつれ細胞の増殖能力が低下する、つまり、分化誘導のステップのあとのほうになると細胞があまり増えない傾向があった。ところが、iPS細胞の場合は、分化段階が進み、成熟したDCに近い段階でもある程度の増殖能力を保持している、という

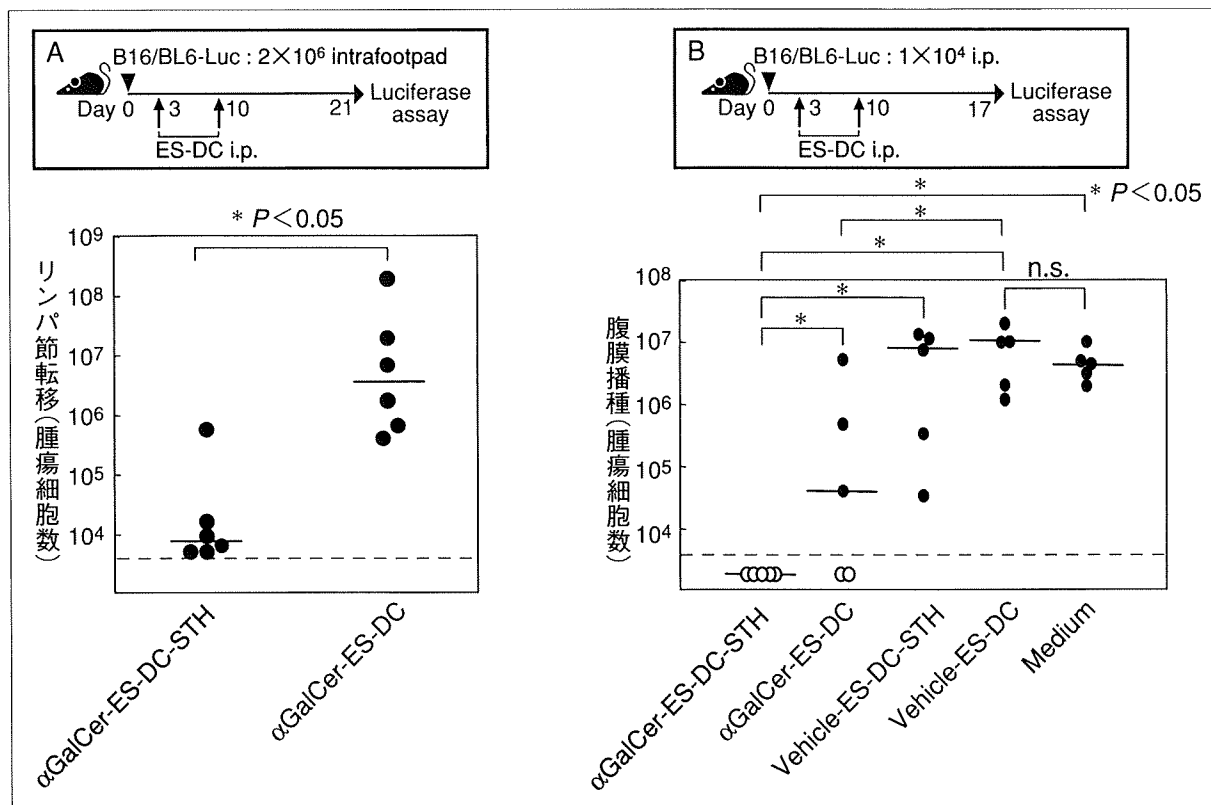


図7 α -GalCer負荷複数抗原標的ES-DCのソケイリンパ節転移、腹膜播種治療モデルでの効果

違いも認められた。結果的に、Nanog-iPS細胞からは、マウスES細胞よりも、同じ数の未分化細胞から分化誘導培養をスタートした場合、より数多くのDCを得ることができた。

われわれは、さらに、遺伝子導入により抗原を発現させたiPS-DCによる抗腫瘍細胞ワクチンの実験も行った。ES細胞の場合と同様にして、OVA抗原発現iPS-DCを作製しマウス個体へ投与すると、マウス体内においてOVA特異的なCTLが誘導された。そして、OVA抗原発現iPS-DCによる細胞ワクチンを施したマウスは、OVA抗原を発現するメラノーマ(MO4株)に対して拒絶あるいは増殖抑制効果を示した。すなわち、抗原遺伝子を発現させたiPS-DCの投与により、抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を惹起することができた。

おわりに

ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞の臨床応用にむけた技術は現在めざましく進歩している¹¹⁾¹²⁾。よってこれらを癌の免疫療法に用いることができるようになる日はそう遠くはないと考えている。その際に本稿で述べた知見を反映さ

せることで、より強力な臨床効果が得られると期待している。

文 献

- 1) Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005 ; 5 : 296.
- 2) Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 2003 ; 101 : 3501.
- 3) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861.
- 4) Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, et al. Enhanced priming of antigen-specific CTLs *in vivo* by embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein : application to antitumor vaccination. *J Immunol* 2004 ; 172 : 776.
- 5) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocel-

- lular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 306 : 16.
- 6) Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, et al. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 2414.
 - 7) Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, et al. Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J Immunol* 2007 ; 178 : 918.
 - 8) Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T, et al. Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cysteine and glypican-3 levels. *Clin Cancer Res* 2005 ; 11 : 8079.
 - 9) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, et al. Multiple antigen-targeted immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunother* 2009 ; 32 : 219.
 - 10) Senju S, Suemori H, Zembutsu H, et al. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 2007 ; 25 : 2720.
 - 11) Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata S, et al. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by beta 2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells. *J Immunol* 2008 ; 181 : 6635.
 - 12) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, et al. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009 ; 27 : 1021.

* * *

iPS細胞から樹状細胞への 分化誘導技術と将来の臨床応用

Generation of dendritic cells from iPS cells aiming at future clinical application

Keywords

iPS細胞
ES細胞
樹状細胞
細胞療法
抗腫瘍免疫

千住 覚

- 1) 熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野
- 2) 熊本大学発生医学研究所 幹細胞部門 iPS細胞研究担当
- 3) 科学技術振興機構 CREST

Summary

We have previously established methods to generate dendritic cells (DC) from mouse and human embryonic stem (ES) cells. We designated them as ES-DC and mouse models have demonstrated the induction of anti-cancer immunity and prevention of autoimmune disease by *in vivo* administration of genetically engineered ES-DC. For the future clinical application of ES-DC, the histoincompatibility between patients to be treated and available human ES cells and the ethical concerns associated with use of human ES cells may be serious obstacles. Recently developed induced pluripotent stem (iPS) cell technology is expected to resolve these issues. We generated and characterized DC derived from mouse iPS cells. The iPS cell-derived DC (iPS-DC) possessed the characteristics of DC including the capacity of T cell-stimulation, antigen-processing and presentation, and cytokine production. Genetically modified iPS-DC expressing antigenic protein primed T cells specific to the antigen *in vivo* and elicited efficient antigen-specific anti-tumor immunity. The issues related to the future medical application of iPS-DC will be discussed.

Senju, Satoru

- 1) Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University
 - 2) iPS Cell Research Laboratory, Division of Stem Cell Research, Institute of Embryology and Genetics, Kumamoto University
 - 3) CREST, JST
- E-mail : senjusat@gpo.kumamoto-u.ac.jp

はじめに

我々は、過去約10年間にわたって、マウス、サル、およびヒトのES細胞由来から樹状細胞への分化誘導法の開発、および、これを用いた免疫制御療法に関する研究を行ってきた。iPS細胞の発見により、これまでのES細胞を用いた研究の成果を医療応用できる可能性がより具体的なものとなった。我々が実現を目指す医療技術は、治療の目的で移植した細胞が、患者の体内において数日から数週間の間生存し、何らかの治療効果を発揮するということを期待するものである。したがって、移植細胞が必ずしも長期的に生着する必要はなく、再生医療というよりは、iPS細胞を基盤とした細胞医療、あるいは細胞医薬品の作製、というべきかもしれない。本稿では、我々の研究の背景、マウスES細胞の場合との異同等を含めたマウスのiPS細胞から樹

状細胞への分化誘導に関連する知見、そして、iPS細胞今後の臨床応用に向けての問題点を述べる。

研究の背景

樹状細胞は、強力なT細胞活性化能力を有する抗原提示細胞である。近年、抗原特異的な癌免疫療法が注目され、標的となるヒトの癌抗原を同定する研究と並行して、樹状細胞を利用したさまざまな免疫療法(細胞ワクチン)の試みがなされている。多くの場合、臨床的に細胞ワクチンとして用いられるヒトの樹状細胞は、患者末梢血中の単球(モノサイト)から分化させることにより作製されている。単球は体外では増殖させることができないため、細胞治療を行うのに十分な数の樹状細胞を調整するためには大量の単球を必要とする。そこで、末梢血白血球をアフレーシス(成分採血)装置を用いて分離し、その中の単球を選別して樹状細胞に分化させるという方法が採られている。しかしながら、アフレーシスはある程度のリスクを伴う侵襲的操作であるうえ、担癌患者などでは、しばしば、末梢血中の単球数の減少や樹状細胞への分化能力の低下により、質的あるいは量的に十分な樹状細胞が調整できないという問題がある。

我々は、過去約10年間にわたり、樹状細胞を生体外で産生するための材料として胚性幹細胞(ES細胞)を用いる方法について研究を行っており、マウス¹⁾およびヒト²⁾のES細胞から樹

状細胞(ES-DC)を作製する技術を開発している。さらに、未分化なES細胞の段階において電気穿孔法による遺伝子改変を行い、これを樹状細胞へ分化誘導することにより遺伝子改変樹状細胞を作製する方法を確立している。そして、マウスを用いた研究により、遺伝的改変を行った樹状細胞をマウス個体に投与することにより、免疫応答を制御し抗腫瘍免疫を誘導できることなどを明らかにしている³⁾⁻⁸⁾。また、免疫応答の抑制的な制御が可能であることも明らかにしている⁹⁾⁻¹⁰⁾。最近のiPS細胞の発見(発明)は、このような我々の研究の成果を臨床応用するための道を大きく開くものであった。

マウスのiPS細胞からの樹状細胞の作製

これまでに我々がES細胞を用いて確立した樹状細胞分化誘導法を用いて、マウスのiPS細胞から樹状細胞を作製できるのかどうか検討を行った¹¹⁾。本研究では、京都大学再生医科学研究所の山中教授らの研究グループにより樹立されたマウスiPS細胞の分与を受け実験に用いた。

まず、よりES細胞に近い性質を有しているとされるNanog-iPS細胞¹²⁾を、マウスのES細胞の場合に準じて分化誘導することを試みた。分化誘導の最初のステップとして、未分化なiPS細胞を、単層培養しているOP9フィーダー細胞の上へ播種し、培養を開始した。この操作により、ES細胞の場合と同様に、iPS細胞のコロニー

が、未分化なドーム状の形態から平坦な形状に変化した。分化誘導開始から6~7日の後、トリプシンとEDTAを用いて培養皿から細胞を回収し、新たに調整しておいたOP9フィーダー細胞上へ再度播種し、培養液中にGM-CSFを添加して培養を継続した。その結果、フィーダー細胞上に浮遊性あるいは弱付着性の球形の細胞が出現し、徐々に増殖すると同時に、細胞のサイズが大きくなり、また、球形からやや不規則な形態へと変化した。分化誘導開始から12~13日の後、この細胞をピペッティングで回収して、フィーダー細胞なしでさらに培養を継続することにより、樹状細胞様の形態を示す細胞を作製することができた。そして、IL-4、抗CD40抗体、あるいは、OK432などを添加することにより、成熟度の高い樹状細胞を作製することができた(図)。

iPS細胞由来の樹状細胞(iPS cell-derived dendritic cells:iPS-DC)は、樹状細胞様の形態を有するのみでなく、細胞表面にMHCクラスII、CD80、CD86を発現し、また、IL-12とTNF- α を産生した。すなわち、T細胞に対する抗原提示細胞として必要な分子を発現しており、また、蛋白質抗原のプロセッシング機能を有していた。さらに、樹状細胞に特徴的な性質ともいえる、アロ(同種異系)のT細胞に対する非常に強力な増殖反応(一次MLR)誘導活性を有していた。

以上の分化誘導の過程における形態の変化や最終的に産生される樹状細胞

Ⅱ. iPS細胞作製・制御などの医療基盤技術 (CREST 課題研究)

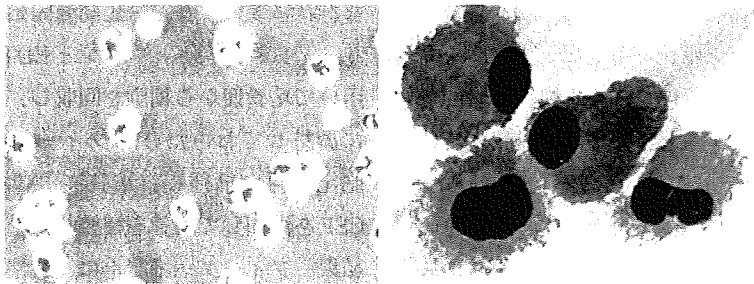


図 マウス iPS 細胞由来の樹状細胞の形態 (→ 巻頭 Color Gravure 参照)

の機能において、iPS細胞はES細胞とほぼ同等であったが、微妙な差異も認められた。iPS細胞は、我々がこれまでに扱ってきたいろいろな系統のES細胞株と比較すると、すべてのステップにおいて分化の速度がやや遅く、最終的に樹状細胞へ分化するまでの期間が2割程度長くなる傾向があった。また、ES細胞からの分化誘導では、分化段階が進んで成熟するにつれ細胞の増殖能力が低下する、つまり、分化誘導のステップのあとのほうになると細胞があまり増えない傾向があった。ところが、iPS細胞の場合は、分化段階が進み、成熟した樹状細胞に近い段階でもある程度の増殖能力を保持している、という違いも認められた。結果的に、Nanog-iPS細胞からは、マウスES細胞よりも、同じ数の未分化細胞から分化誘導培養をスタートした場合、より数多くの樹状細胞を得ることができる、という結果であった。

我々は、さらに、遺伝子導入により抗原を発現させたiPS-DCによる抗腫

瘍細胞ワクチンの実験も行った。まず、未分化なiPS細胞に、モデル抗原であるOVA (ovalbumin：卵白アルブミン)の発現ベクターを導入した。次に、この抗原遺伝子導入iPS細胞から、前述の方法によりiPS-DCを作製した。このOVA抗原発現iPS-DCをマウス個体へ投与すると、マウス体内においてOVA特異的なCTL(細胞傷害性T細胞)が誘導された。そして、OVA抗原発現iPS-DCによる細胞ワクチンを施したマウスは、OVA抗原を発現するメラノーマ(MO4株)に対して拒絶あるいは増殖抑制効果を示した。すなわち、抗原遺伝子を発現させたiPS-DCの投与により、抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を惹起することができた。

おわりに

前述したように、筆者らの経験では、樹状細胞への分化の過程において、iPS細胞とES細胞では多小の差異が存在する。しかしながら、機能的な樹

状細胞に分化させることができる、という点でiPS細胞が少なくともES細胞と同等のポテンシャルを有していることは確実である。

我々は、ヒトのiPS細胞からも機能的な樹状細胞を作製できる、という知見を得ている(未発表)。体細胞から作製できるiPS細胞の場合は、基礎的な研究の段階においても、また、臨床応用の段階でも、ES細胞に比べるとその使用に際しての倫理的問題という障壁ははるかに低い。さらに、iPS細胞は、治療の対象となる患者自身から作製することが可能である。このため、ES細胞とレシピエントの間の組織不適合性の問題も、ES細胞の代わりにiPS細胞を使用することによりクリアされる見込みとなった。

ヒトiPS細胞作製法に関連してさまざまな改良が報告されてはいるものの、現在のiPS細胞作製技術では、1人のドナーからのiPS細胞の樹立に相当な費用と時間を必要とする。したがって、治療対象者すべてについての個別のiPS細胞の作製は、医療経済的に成立しない可能性、また、時間がかかりすぎて治療に必要なタイミングで細胞を供給できない可能性がある。このような問題の解決策として、日本人集団において頻度の高いHLAタイプのホモ接合体の方々にドナーになっていただいてiPS細胞を作製し“iPS細胞バンク”を設立する、という構想¹³⁾は非常に有用であると考えられる。しかしながら、頻度が低いHLAハプロタイプでは、ホモ接合のドナーが得ら

れない可能性があるので、バンクでのカバーは難しいかもしれない。

筆者らは最近、マウス ES 細胞を用いた研究において、MHC クラス I 分子の細胞表面の発現に必須の分子である TAP (transporter associated with antigen processing) あるいは β_2 ミクログロブリンの遺伝的改変により、分化した後に任意の MHC クラス I 分子のみを発現する ES 細胞を作製する手法を報告した⁷⁾。頻度が低い HLA ハプロタイプについては、ヒトの iPS 細胞にこのような遺伝的改変を施すことにより任意の HLA を発現する iPS 細胞を作製する、という方法が有効であろう。

●文献

- 1) Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al: Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 101 : 3501-3508, 2003
- 2) Senju S, Suemori H, Zembutsu, et al: Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 25 : 2720-2729, 2007
- 3) Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, et al: Enhanced priming of antigen-specific CTL *in vivo* by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein; application to anti-tumor vaccination. *J Immunol* 172 : 776-786, 2004
- 4) Matsuyoshi H, Hirata S, Yoshitake Y, et al: Therapeutic effect of alpha-galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Sci* 96 : 889-896, 2005
- 5) Fukuma D, Matsuyoshi H, Hirata S, et al: Anti-cancer immunotherapy with semi-allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells genetically engineered to express a model tumor antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 335 : 5-13, 2005
- 6) Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, et al: Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing Glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res* 66 : 2414-2422, 2006
- 7) Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata S, et al: Activation of antigen-specific CTL by beta 2-microglobulin or TAP1 gene-disrupted and recipient-matched MHC class I gene-introduced allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *J Immunol* 181 : 6635-6643, 2008
- 8) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, et al: Multiple antigen-targeted immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunother* 32 : 219-231, 2009
- 9) Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, et al: Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J Immunol* 174 : 1888-1897, 2005
- 10) Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, et al: Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J Immunol* 178 : 918-925, 2007
- 11) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, et al: Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27 : 1021-1031, 2009
- 12) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448 : 313-317, 2007
- 13) Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K: HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol* 26 : 739-740, 2008

6. 多能性細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法

千住 覚
Senju Satoru

熊本大学大学院 医学薬学研究部 免疫識別学分野 准教授

Summary 樹状細胞は、強力なT細胞刺激能力を有する抗原提示細胞であり、免疫応答の制御機構において中心的な役割を担っている。筆者らは従来より、ES細胞から樹状細胞への分化誘導法の開発、およびES細胞由来の樹状細胞による免疫制御についてのマウスを用いた基礎研究を行ってきた。最近のiPS細胞作製技術の開発により、任意の個体の体細胞からES細胞と同等の多能性幹細胞を比較的簡単に作製することが可能となった。これによって、任意のレシピエントとHLAの一致したヒト多能性幹細胞の樹状細胞を作製することが現実的に可能となった。筆者らは、細胞治療に用いるための樹状細胞を作製するための材料として、iPS細胞は非常に有用であると考えている。本稿では、多能性幹細胞由来の樹状細胞の医療応用をめざした研究について紹介する。

はじめに

悪性腫瘍に対して有効な免疫療法を確立するためには、腫瘍特異的抗原に対して細胞性免疫応答を強力に誘導するワクチン技術の開発が不可欠である。自己免疫疾患や炎症性疾患の治療においては、これらの疾患の本態である異常をきたしている免疫系を、免疫抑制をきたすことなく正常に戻すような免疫制御の技術が望まれている。一方、移植医療における最大の技術的課題は、拒絶反応およびGVHD (graft versus host disease) の抑制であり、このために、免疫応答をアロ抗原特異的

に制御する医療技術の開発が待たれている。

生体内の各組織に分布する樹状細胞は、組織内に侵入した感染性微生物等の異物を認識・貪食し、所属リンパ組織において、異物に由来する抗原ペプチド (エピトープ) をMHC分子上に提示する。抗原特異的なT細胞がこれを認識して活性化されることにより、免疫応答が開始される。樹状細胞は一方で、T細胞の抗原刺激に対する反応を抑制する分子であるPD-L1を発現している。また、通常のT細胞のみならず、制御性T細胞 (regulatory T cells) の増殖を促進する活性も強いことが知られている。このことから、免疫応答を抑制的

GVHD (graft versus host disease)