Medical Tribune　2011年5月26日　特別企画　提供●株式会社メディネット

第8回　日本免疫治療学研究会（JRAI）学術集会

免疫療法の最適化による治療効果向上を目指して

日時：2011年2月26日（土）　9:30-18:00　　会場：東京ガーデンパレス
会長：鈴木 憲史（日本赤十字社医療センター血液内科）　共催：日本免疫治療学研究会／株式会社メディネット

■ シンポジウム「最適な免疫療法の探求」

司会	岡 正朗 氏	山口大学大学院消化器・腫瘍外科学
	谷 憲三朗 氏	九州大学病院先端分子細胞治療科
演者	中本 安成 氏	福井大学大学院医学系研究科第二内科
	門脇 則光 氏	京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学
	神垣 隆 氏	瀬田クリニック大阪
	鈴木 弘行 氏	福島県立医科大学呼吸器外科

■ 教育講演 1「癌幹細胞と多能性幹細胞」

司会	奥野 清隆 氏	近畿大学医学部外科学
講師	森 正樹 氏	大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学

■ 教育講演 2「免疫寛容のメカニズムと臨床応用の一例」

司会	大段 秀樹 氏	広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学
講師	清野 研一郎 氏	北海道大学遺伝子病制御研究所

■ ワークショップ「免疫療法の今後の可能性」

司会	中面 哲也 氏	国立がん研究センター東病院臨床開発センターがん治療開発部機能再生室
	遠藤 格 氏	横浜市立大学消化器・腫瘍外科学
演者	福島 聡 氏	熊本大学医学部附属病院皮膚科
	川名 敬 氏	東京大学医学部産科婦人科学
	阿部 有 氏	日本赤十字社医療センター血液内科
	庄 雅之 氏	奈良県立医科大学消化器・総合外科

■ 特別講演「ヒトがんに対する細胞性免疫応答：臨床応用への戦略」

司会	河上 裕 氏	慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門
講師	James C. Yang 氏	Surgery Branch, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA

シンポジウム

最適な免疫療法の探求

司会

岡 正朗 氏
（山口大学大学院消化器・腫瘍外科学）

谷 憲三朗 氏
（九州大学病院 先端分子細胞治療科）

本シンポジウムでは，肝がんの二次発がんを抑制するために行われた肝動脈塞栓療法（TAE）に樹状細胞（DC）療法を併用した臨床試験，高齢者急性骨髄性白血病（AML）に対するDC療法の臨床試験が紹介され，DC療法における効率的なCTL誘導のためのさまざまな試み，肺がん術後補助療法として行われたペプチドワクチン療法において予後因子・効果予測因子を抽出する試みが披露された。いずれも最適な免疫療法を探求したものである。

肝がんの二次発がんを制御する樹状細胞療法

中本 安成 氏
（福井大学大学院医学系研究科第二内科）

中本氏らは局所治療の際にDC療法を追加している。DCは初発がんの腫瘍抗原を認識して免疫を誘導し，別の部位に発生する二次発がんに対して抑制効果があると考えているからである。

肝動脈塞栓療法と併用する樹状細胞療法のプロトコールと治療効果

中本氏らは2001年から肝がんに対して，おもにTAEにさまざまなペプチドで刺激したDC療法を併用する臨床研究を行っている。プロトコールは，C型肝硬変を背景とする肝がん患者を対象とした。投与7日前に末梢血を採取してGM-CSFとIL-4で未熟DCを誘導し，SART-3やOK-432などで追加刺激して成熟DCを確保した。特にOK-432で刺激するとDCの成熟度が高まって取り込み能が維持され，リンパ節への移動に必要なケモカイン受容体も上昇し，IL-12の産生も成熟化に伴って亢進してくる。さらにOK-432で追加刺激したDCは，GM-CSFとIL-4だけで誘導されたDCに比べて，肝がん細胞株に対して高い腫瘍障害活性を示すことも確認した。

そして，TAEを行うと同時に経カテーテル的に成熟DCを投与し，その後にラジオ波焼灼療法（RFA）を施行した結果，無再発生存率はTAE＋OK-432刺激DC群が最も高く，二次発がんが抑制されたことが確認された（**図1**）。血清サイトカイン・ケモカインの変化を治療前後で検討すると，IL-9，IL-15，TNF-αなどのTh1タイプのサイトカイン・ケモカインはTAE＋RFA群が減少するのに比べて，TAE＋OK-432刺激DC＋RFA群のほうは増加していた。一方，Th2タイプのIL-2，IL-4，IL-10ではそれほど変化が認められなかった。さらに，骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）を末梢血アルギナーゼ活性で検討すると，TAE＋RFA群に比べてTAE＋OK-432刺激DC＋RFA群では低下していることから，免疫が誘導されていることが確認できた。

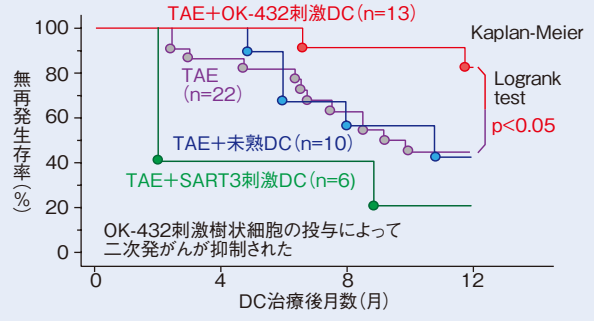
以上のことから，中本氏は「DC投与によってMDSCが低下し，Th1反応が亢進することによって抗腫瘍効果が高まる。これは肝がんばかりでなく，多くのがん種の制御に有用な戦略になる」と考えた。

ラジオ波焼灼療法のアジュバントとしてケモカイン製剤が誘導する抗腫瘍効果

中本氏らは，RFAと併用するケモカイン製剤としてMIP1-α（マクロファージ炎症蛋白）の2か所のアミノ酸を変異させたECI 301を共同開発している。マウス実験では，無治療群，RFA＋PBS群，RFA＋ECI 301群で腫瘍径を観察した結果，RFA＋ECI 301群で最も縮小した。しかも，ECI 301だけの群ではそれほど縮小効果を認めなかった。

中本氏は「今後は，肝がん局所に投与するアジュバント製剤やケモカイン製剤を用いたDC療法の開発のために臨床試験を行っていく」と締めくくった。

図1―肝動脈塞栓療法と併用する樹状細胞療法の治療効果



（提供：中本 安成氏）

樹状細胞を用いた高齢者急性骨髄性白血病に対する免疫療法

門脇 則光 氏
（京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学）

AMLは年齢とともに罹患率が上昇し，予後不良の疾患である。高齢者のAMLが予後不良であるのは，高齢のために併存症が増加し，また臓器機能が低下していることと，薬剤耐性が増加するからである。したがって，腫瘍への特異性がより高い治療法，あるいは化学療法とは作用機序が異なる治療法が求められている。

門脇氏らは，高齢者AMLに対する臨床試験として，腫瘍抗原で刺激したDCを投与するDC療法（DCワクチン）を2つのプロトコールで行った（**表1**）。

プロトコール1（P1）の抗原にアポトーシス誘導自己白血病細胞を用いたのは，cross-presentationの効率を上げるためである。プロトコール2（P2）に用いたHLA-A24拘束性WT1改変ペプチドは，MHC classⅠへの結合性が増強され，*in vitro*でCTLの誘導が高まることが報告されている。

P1では，成熟刺激としてTLR2とTLR4のリガンドであると報告されているOK-432を用いた。*in vitro*でDCをOK-432で刺激すると，CTLの誘導に重要なIL-12の産生が枯渇してしまうことから，DCとともに投与して*in vivo*でIL-12を産生させた。また，DCの所属リンパ節への遊走を促進させるために，投与24時間前にOK-432を皮内投与して投与部位に炎症を誘導した。

アポトーシス誘導自己白血病細胞を抗原としたDCワクチン

P1では，凍結保存した白血病細胞にガンマ線を照射してアポトーシスを誘導し，モニタリングのためにKLHを加えて未熟DCに添加する。その後，分注・凍結保存してから，1×10^7個を2週ごとに5回，OK-432を加えて皮内投与した。

症例は4例である。有害事象は発熱（G1-2）と局所の発赤（G2）がみられた。KLH陽性は3例に，白血病細胞陽性は2例に認められた。DC投与期間に免疫反応は起こらなかった症例では，DC投与中から白血病細胞が増加していたが，免疫反応は起こった症例では白血病細胞の再増殖が遅延する傾向が認められた。

P1では自己白血病細胞を取り込んだDCワクチンによって，特定の白血病抗原に特異的なCD8＋T細胞の反応が誘導された。すなわち，腫瘍細胞そのものをDCに取り込ませることによってHLA拘束性がなくなり，さまざまな腫瘍抗原に対するCD8＋T細胞の反応が誘導できることが高齢者AMLでも示された。

HLA-A24拘束性WT1改変ペプチドを抗原としたDCワクチン

P2では，未熟DCの成熟刺激としてTNF-αとPGE_2を用い，WT1改変ペプチド，ゾレドロン酸，KLHを添加する。成熟DCはいったん分注・凍結保存してから，1×10^7個を2週ごとに5回，皮内投与・静脈内投与した。

症例は3例である。1例では免疫反応が起こらず，2例ではKLH，白血病細胞の両方に対する免疫反応が誘導された。免疫反応が起こらなかった症例では白血病細胞が速やかに増加したが，免疫反応があった2例では遅延する傾向が認められた。

免疫反応のあった1症例について免疫モニタリングとしてWT1のテトラマー解析を行った結果，DC4回投与後には改変型ペプチド刺激で増えてくるCD8＋T細胞が多数みられた。興味深いことは，DC投与終了後には，改変型ペプチド刺激で増えてくるCD8＋T細胞はほとんど検出されなくなったが，天然型ペプチド刺激で増えてくるCD8＋T細胞は4回投与後と同程度の頻度で検出され続けていた。

以上から，改変型ペプチド特異的CD8＋T細胞が増加するが，それは役に立たず（天然型ペプチドにも反応するのは，ごく一部），免疫療法が終わった後には天然型ペプチド特異的CD8＋T細胞のみが残存しており，それを増幅することによって免疫反応が維持できる可能性があることが示唆された。

門脇氏は「P1では抗原となる腫瘍細胞の数が確保できないことが問題点として残るが，AMLの共通抗原を複数発現する細胞株をDCに取り込ませる方法で，白血病細胞抗原を確保できる」と結んだ。

表1　臨床試験プロトコール

	プロトコール1	プロトコール2
抗原	アポトーシス誘導自己白血病細胞	HLA-A24拘束性WT1改変ペプチド
成熟刺激	OK-432	TNF-α + PGE_2
その他の免疫増強法	投与部位に炎症を誘導	ゾレドロン酸によるγδT細胞活性化
DCワクチンの投与方法	1×10^7個を2週ごとに5回，OK-432を加えて皮内投与	1×10^7個を2週ごとに5回，皮内投与・静脈内投与
主エンドポイント	安全性	安全性
副エンドポイント	免疫反応，臨床効果	免疫反応，臨床効果

（提供：門脇 則光氏）

樹状細胞療法における効率的なCTL誘導のために

神垣 隆 氏（瀬田クリニック大阪）

神垣氏は，樹状細胞（DC）療法における効率的なCTL誘導のために，腫瘍におけるMHC classⅠの発現を検討した。次に，Electroporation（EP）法による腫瘍lysateの導入を試み，さらに患者検体を用いたCTLとγδT細胞の同時誘導方法を検証した。

腫瘍におけるMHC classⅠの発現を検討

内在性蛋白（特異的腫瘍抗原を含む）はプロテアソームでペプチドに分解され，TAPを介して小胞体に運搬され，MHC classⅠとβ2-microglobulin（β2-MG）と会合することによって細胞表面に提示される。しかし，がん細胞ではプロテアソームあるいはTAPなどが機能不全になって抗原ペプチドの運搬が阻害される。あるいはβ2-MGが変異すると，抗原ペプチドが細胞表面に運ばれなくなると考えられる。

神垣氏はまず，消化器がん細胞株におけるMHC classⅠ発現と抗原提示機能分子発現の相関を検討した。その結果，膵がん細胞株（BxPC-3）および大腸がん細胞株（DLD-1やHCT-15）ではMHC classⅠの発現は非常に低く，IFN-γの刺激でもあまり上昇しないことがわかった。RT-PCRの検討でもDLD-1ではLMP2，LMP 7の発現が低下し，β2-MGも欠失しており，MHC classⅠの発現が低下していることがわかった。

次に腫瘍組織におけるMHC classⅠ発現に関して免疫組織学的検討を行った。正常細胞と同等の発現を持つものを強発現例（3+）とし，発現低下例は（2～1+），全く発現がないものは（−）で評価した。その結果，235症例の中で約12%（28例）が（−）で，β2-MGが欠失している可能性が示唆された。実際，LMP2の発現が低下している症例ではMHC classⅠの陽性細胞率も低下していた。

Electroporation法による腫瘍lysateの導入

2つ目の取組みとして神垣氏は，10症例を対象に，EP法により腫瘍lysateを導入したDCを用いてELISPOT assayにより治療前後のPBMCのIFN-γ産生能を検討した。

10症例に投与されたDC細胞数は3.9～27.4×10^6個で，EP後のviabilityは9症例で90%以上保たれていた。腫瘍lysateを導入したDCワクチン投与前後のELISPOT assayによるIFN-γ産生能を検討した結果，8例において治療前に比べ治療後でIFN-γ産生細胞は増加した。

以上から，EP法により腫瘍lysateを導入したDCワクチンにより，治療前に比べ治療後のほうが，腫瘍lysateに反応してIFN-γを産生するPBMC数が増加することがわかった。

患者検体を用いたCTLとγδT細胞の同時誘導方法を検証

3つ目の取組みとして，患者検体を用いたCTLとγδT細胞の同時誘導方法，すなわちγδT細胞の抗原提示機能を利用しながらCTL誘導が可能であるかどうかを検証した。

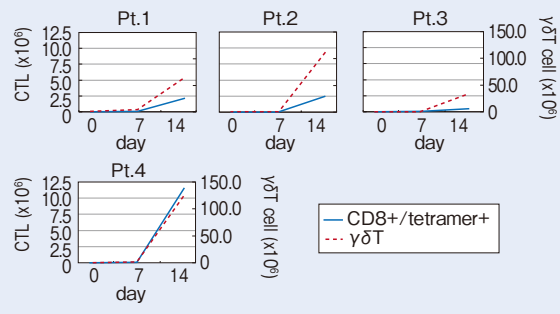
高CEA血症あるいは腫瘍組織でCEA発現が証明された消化器がんで，かつHLA-A*0201症例を対象に，HLA-A*0201拘束性CEAペプチドとしてCAP1を用いて，CEA特異的CTLの誘導を検討した。また，HLA-A*0201拘束性の陽性コントロールとしてA27L（MART-1改変ペプチド）を用い，A27L特異的CTLの誘導も検討した。

症例は5例で，臨床効果はSD3例，PD2例であった。5例中1症例においては，CTLとγδT細胞の同時誘導の検証に可能な細胞の増殖が認められず，Tetramer assayはできなかった。Tetramer assay可能であった4例は，すべての症例でγδT細胞の増殖およびA27L特異的CTLの増殖を認めたが，今回目的としたCEA特異的CTLの誘導は認められなかった（**図2**）。

HLA-A*0201拘束性ペプチドを用いたCTL誘導の検討では，ペプチドによるCTL誘導効率が異なることが示唆され，種々のペプチドによる検討が必要と考えられた。

神垣氏は「今後，治療効果を含めた詳細な検討を行っていく」と抱負を語った。

図2―A27L特異的CTLとγδT細胞の増殖



（提供:神垣 隆氏）

肺癌に対する有効な免疫療法のために

鈴木 弘行 氏（福島県立医科大学呼吸器外科）

現在，主として stageⅡ～Ⅲ肺がんに対して標準的に行われている術後補助化学療法により10数%の再発抑制効果を認める。一方で治療関連死が少なからずあり，高齢者に対する肺がん手術の効果は不明か，もしくは効果がないなど，問題点も指摘されている。したがって鈴木氏は「もう少し優しくて，効果のある補助療法はないものか」と模索している。

米国のがんワクチン開発戦略

米国におけるがん免疫療法の現況として3つの注目すべき動きがある。1つはFDAが公表した企業向けのワクチンガイダンスで，以下のことが示された。ワクチンの開発に当たっては，従来の抗がん剤と全く違う考え方で臨床的評価をする必要がある。すなわち，がん治療用ワクチンは臨床の効果発現に時間がかかる場合が多いため，臨床試験初期では効果を示さず，試験後期に曲線の分離が起こると予測されるので，それを考慮した統計学的解析が必要である。そして，従来の化学療法では腫瘍縮小は生存延長のsurrogate markerであるが，分子標的療法や免疫療法では必ずしも関連しないこと，免疫療法では従来基準でPDとなった後に効果が確認されることもしばしば見られることから，PD基準をより緩和した基準としてImmune-related Response Criteria（irRC）を提唱している。

2つ目は米国がん研究所（NCI）が作成したがん抗原の順位付けで，9つのファクターを有識者にアンケートしてスコアリングした結果，スコアの高いものから治療効果，免疫原性，oncogenicity（腫瘍増殖への関連性），特異性などに比重を置いている。3つ目はバイオマーカー発見のための有機的なアプローチである。

当科の治療成績

このような米国の情勢を踏まえ，鈴木氏らは，今後はバイオマーカーも含めた予後因子，効果予測因子を明らかにすることが重要になると考え，非小細胞肺がん（NSCLC）に対するペプチドワクチン療法症例（15例）を対象に，予後因子，効果予測因子を抽出しようと試みた。NSCLCに対するワクチン療法に用いたペプチドはcancer-testis抗原であるURLC10，TTK，CDCA1とanti-angiogenic（抗血管新生）抗原であるVEGFR1，VEGFR2である。

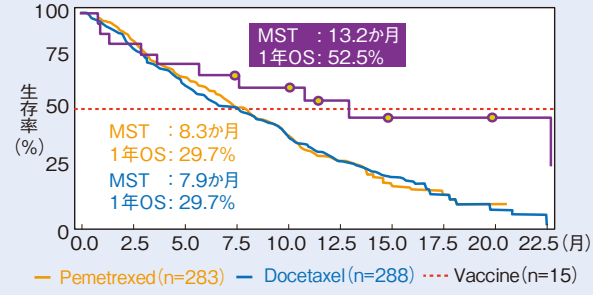
第一の臨床試験では9例にURLC10，TTK，VEGFR1，VEGFR2を用いた結果，PS0-1の5例のうち4例でSDが得られた。第二の臨床試験では6例にURLC10，CDCA1，VEGFR1，VEGFR2を用いた結果，やはりPS0-1の3例でSDが得られた。両試験症例のCTL反応をELISPOTで解析すると，多くのペプチド抗原に対してCTLが誘導された症例ほど臨床効果があることがわかった。

全症例の生存解析では1年生存率が52.5%，生存期間中央値（MST）は13.2か月であった．本来は比較することはできないが，参考までに過去の臨床試験の結果と比較してみると，二次治療のpemetrexed単剤療法では1年生存率29.7%，MST 8.3か月，docetaxel単剤療法では1年生存率29.7%，MST 7.9か月であり（**図3**），われわれの結果は遜色ないものであった。また，progression-free survivalは2.9か月で，従来の化学療法の臨床試験結果とほぼ同等だった。全生存率（OS）でも従来の化学療法と遜色ない成績だった。

今回のペプチドワクチン療法は2～6次治療（平均3.5次治療）として行われた。同時期に3次治療で化学療法を行った症例と比較すると，全症例では両群で同等のOSが得られたが，PS0-1症例に限るとワクチン療法群のほうがOSは有意に良好であった。また，予後因子，効果予測因子を解析すると，PS，治療段階，CTL反応，CRP（炎症反応）であることがわかった。

以上から，肺がんワクチンで考慮すべきことは，PSが良好で，治療時期が早期であること，CTL反応があること，CRP（腫瘍に伴う炎症の存在がない）ことが挙げられる。したがって，鈴木氏は「ワクチン療法を術後補助化学療法として，もしくはPS良好症例に対する3次治療以降の化学療法と併用することによって，何らかのメリットが出てくる可能性がある」と結論付けた。

図3―NSCLCに対するペプチドワクチン療法とpemetrexed，docetaxelの二次治療による生存率の比較



（提供：鈴木 弘行氏）

シンポジウム

総合討論

司会　始めに会長の鈴木先生からコメントをいただきます。

鈴木（憲史）　私が専門とする多発性骨髄腫は，現在では長期生存する症例もあり，がんから慢性疾患に変わりつつあります。しかし，CRPが高い症例ではサリドマイドなどの免疫を修飾する薬剤の効果が悪いのです。演者の鈴木先生が言われたように，PSの良さや治療のタイミングなどが重要であり，臨床的には炎症がある腫瘍には効果が低下する印象があるので，炎症を抑制して患者のPSを良くしてから免疫細胞療法を行うのが最適だと思っています。そういう意味で，CR症例でも微小に残存する腫瘍を排除して治癒に導ける可能性が出てきました。そのためには，効果判定も新しい基準を作っていくことが大事です。

司会　中本先生，門脇先生，神垣先生からはDC療法のお話を，鈴木先生からはペプチドワクチン療法についてお話しいただきましたが，それぞれで明らかに違うのは用量増加ができるかどうかです。DC療法を製剤化して広く認めてもらうためには有効性はもとより，安全性を確保できるかどうかが重要です。先生方のご苦労を含めて，方向性をお聞かせ下さい。

中本　末梢血から調製したDCは5×10^6です。この方法ではその倍にしかなりませんので，他施設のような方法で用量を確保していきたいと思います。また，抗腫瘍活性の高い細胞を誘導すること，あるいは全身投与できるアジュバントで治療効果を長く継続させることも必要です。

門脇　製剤化に関しては，AMLは固形がんと違い，病変の主座から必然的に血球減少症が起こってくるので，単球を確保しにくいのです。AML以外に関しては，おそらく量的に確保することは多くの場合に問題になりません。例えば，1回の操作で十分に5回～10回の投与量は採取できます。患者の負担にもなりません。質的なフェノタイプやサイトカイン産生能については検討を行うことも可能です。

神垣　薬事申請を含めて細胞製剤情報を作成していますが，その情報には薬剤と違って限界があります。それと個人的な意見ですが，腫瘍lysateを使う場合はHLA拘束性の呪縛から解放された免疫細胞療法を確立することを目標としていますので，ペプチドのみならず，蛋白，mRNAを含めて広く検討していきたいと思います。

鈴木（弘行）　免疫療法の標準化を考える場合に，治療法の標準化と評価の標準化を考える必要があります。治療法に関してワクチン療法は，かなり標準化しているといえますが，評価についてはモニタリングなどの問題があります。統計の手法も重要です。さらに全く手付かずの問題として画像を含めた臨床効果の評価法の確立があります。細胞療法においてはさらに難しい問題が出てくると考えられますが，何らかのインタートライアルを行うことで問題点が抽出されてくるのではないかと考えています。

司会　細胞療法の臨床的な効果判定をどのようにするのか。中本先生から端的に方向性をお聞かせ下さい。

中本　もちろん抗腫瘍効果ですが，われわれはRECIST基準の指標と相関するような免疫反応のモニタリングを考えています。例えば，CTLのフェノタイプではエフェクターメモリーのタイプが増えてきます。もう少し治療効果を出すためにはセントラルメモリーのタイプが必要ではないか。それをアジュバントに追加することでCTLの増加をみてみたいと考えています。

門脇　免疫療法は効き方がゆっくりであることから，長期にみないとわかりませんので，生存率が指標の1つになります。

神垣　治療効果の判定は生存率でみるしかありません。しかし，常に並行してRECISTによる評価もしておく必要があると思います。それと，adoptiveをする場合には，イメージングも含めて集積性は重要なファクターになってくるので，それを恒常的にみることができるシステムがあればよいと思っています。

鈴木（弘行）　生存期間が延長するのが皆さんの印象だと思います。実際に治療をしていて感じるのは，PDでも，もしかしたら効果があるのかもしれないということです。免疫療法の評価法を考慮する際には，従来のPD基準の呪縛から臨床家をどのように解き放つかが重要ではないかと感じています。

教育講演 1　癌幹細胞と多能性幹細胞

がん幹細胞は，がんを構成する細胞階層の基盤となる細胞であり，がん細胞を生み出す基となる細胞である。がん幹細胞は細胞周期が遅く，抗がん剤や放射線治療に耐性を有し，がんの再発・進展に重要な役割を果たしている。森氏らは，がんの根治に向けて，がん幹細胞を標的とした治療法の研究を進めている。

がん幹細胞マーカーCD13の阻害と抗がん剤投与で著明な抗腫瘍効果

外科学の重要研究課題は，がんと再生医療であり，両者が重複している部分に，がん幹細胞，人工多能性幹細胞（iPS細胞），ヒト多能性幹細胞（Muse細胞）の概念が提唱されるようになってきた。

がん幹細胞の概念は，1994年にカナダのJohn Dickらが提唱し，97年にDickらが造血器腫瘍の中にがん幹細胞を発見した。その後，大腸がん，乳がん，脳腫瘍などの固形がんにもがん幹細胞が認められ，2005年には森氏らが消化器がんにがん幹細胞が存在することを報告した。

これまで，がん幹細胞に関するさまざまな検討が行われており，マウスを用いた実験では，1個のがん細胞を移植しても腫瘍を発生する確率は低いが，1個のがん幹細胞を移植すると腫瘍が高い確率で発生することが明らかになっている。また，1個の大腸がん幹細胞をクローニングしたところ，多様ながん細胞の塊が形成されたとの報告もある。

がん幹細胞の発生については，さまざまな考え方があるが，正常な幹細胞ががん化してがん幹細胞化するという報告が現在までに支持されている。また，これまでの研究で，がん幹細胞には冬眠型がん幹細胞の存在が認められ，重要な役割を果たしていると考えられている。

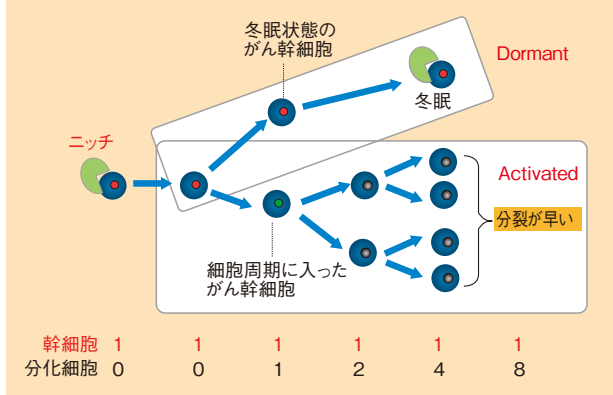
森氏らは，モデルマウスから1個の膵臓がん幹細胞を採取して培養したところ，細胞周期に入った分化細胞が母細胞から分化したがん幹細胞の周囲に塊を形成することを確認した（**図4**）。この分化細胞は母細胞であるがん幹細胞の性質を有しておらず，母細胞から分化したがん幹細胞機能の維持に関係しているとみられる。このがん幹細胞が冬眠型がん幹細胞である。

森氏らは実際に臨床検体を用い，冬眠型がん幹細胞が存在するか否かについて検討した。まず，がん幹細胞が大量に出現するSP（Side Population）細胞を解析して，がん幹細胞マーカーとして糖蛋白のCD13とCD31を同定し，これら新規マーカーを肝臓がん細胞で検索した。その結果，CD13は細胞周期が静止期（G0）にあるがん幹細胞に30%の割合で認められ，CD31は間期（G2/M）にほとんどが局在していた。つまり，がん幹細胞には冬眠型が存在することが明らかになった。

次に，乳がん再発から14年経って再々発した症例を示したうえで，放射線化学療法やホルモン療法を施行していたにもかかわらず14年の歳月を経て再々発したのは，冬眠型がん幹細胞が関与した可能性があることを示唆した。これを裏付ける報告として，正常造血幹細胞が骨髄骨梁の骨芽細胞と結合し，冬眠状態にあるというマウスを用いた検討結果がある。また，冬眠状態は6か月程度続いたことから，ヒトに換算した場合は数年に及ぶ冬眠と考えられる。

また，転移したがん細胞は静止期の1個のがん細胞が血管外壁に結合した後，細胞周期に入った細胞が静止期のがん細胞の周囲に塊を形成することを認めた。こ

図4―非対称性細胞分裂



（提供:森 正樹氏）

れは，がん細胞が転移臓器の血管外壁に結合した時に，いったん休止状態になり，その後に分化する可能性を示している。

がん幹細胞は抗がん剤に耐性を示すと考えられているが，森氏らは実際に抗がん剤を用いて検討した結果，静止期のがん細胞は抗がん剤に耐性を示し，細胞周期に入ったがん細胞は抗がん剤により死滅することを認めた。がん幹細胞が抗がん剤に耐性を示すのは，静止期にある冬眠型であるという理由も考えられるが，がん幹細胞は非がん幹細胞と比べトランスポーターが多く，抗がん剤が細胞内に浸入しても排出する能力が高いことが明らかになっている。

がん幹細胞内は過酸化物質（ROS）が低値で，ROSを抑制することも認められた。一方，静止期のがん幹細胞マーカーであるCD13の阻害剤を用いて検討したところ，がん幹細胞内のROSが高値を示した。がん幹細胞は遺伝子の損傷修復機能が高いことも認められている。

このようながん幹細胞の特性を踏まえて森氏らは，担がんマウスモデルにCD13阻害剤に加え，ROSを誘発する抗がん剤を投与した結果，著明に高い抗腫瘍効果が確認された。

消化器がん細胞へのiPS因子導入（再プログラミング）により類正常化

森氏らは，iPS因子をマウス消化器がん細胞へ導入した結果，がん細胞が正常のiPS細胞の性質を示すこと（再プログラミング）を認めた。再プログラミングにより造腫瘍性が抑制あるいは喪失することも確認した。また，vitamin A/Dによる分化誘導で，がん細胞の浸潤能や増殖が低下し，5-FU添加後には細胞生存も低下した。

こうしたがん細胞の類正常化は，がん細胞にiPS因子を導入したことで，がん抑制遺伝子p16が活性されたことに起因すると考えられる。森氏らは，マイクロRNAのみを用いて安全なiPS細胞を作製することに成功しており，現在，マイクロRNAを使ったがん細胞の正常化を試みている。

森氏は「がん幹細胞を標的とした治療は，がんの根治につながる治療法としての有用性が期待される。われわれが開発したマイクロRNAは遺伝子の組み込みによらず，分化方向が決まった細胞に再び多分化能を獲得させる再プログラミングが可能であり，今後も研究を進めて臨床応用していきたい」とまとめた。

教育講演2　免疫寛容のメカニズムと臨床応用の一例

臓器移植において免疫拒絶反応を抑制するために免疫抑制剤を用いると，感染症，腎毒性，女性多毛症などの副作用がしばしば出現する一方で，減量・中止によって拒絶反応を引き起こす場合もみられる。そこで，拒絶反応が起こらないようにするため免疫学的寛容の導入が研究されてきた。清野氏らは，免疫寛容の機序解明を進めると同時に，免疫学的寛容を導入する臨床試験を施行中である。

講師

清野 研一郎 氏
（北海道大学
遺伝子病制御研究所）

司会

大段 秀樹 氏
（広島大学大学院
先進医療開発科学講座
外科学）

免疫寛容にはNKT細胞の存在が必須

免疫学的寛容の導入法は，胸腺におけるクローン除去や骨髄キメラの誘導（中枢性寛容）と補助シグナルブロックや調節性T細胞の誘導（末梢性寛容）に分類できる。

混合骨髄キメラの作製は，新生児では前処置が不要であるが，成人では免疫抑制剤などの前処置が必要になる。成長したサルを用いた同種移植実験では，混合骨髄キメラを作製してキメラ状態にすることで免疫寛容を導入し，移植後に免疫抑制剤を減量・中止したが，ドナーから移植した皮膚には拒絶反応が起こらなかったという報告がある。これをヒトの腎臓移植に臨床応用したところ，5例中4例で移植後に免疫抑制剤を中止しても拒絶反応が起こらなかったと報告されている。

一方，末梢性免疫寛容の導入には，T細胞活性化における第2シグナルの遮断が拒絶反応を回避するために重要である。T細胞は，抗原提示細胞からT細胞受容体（TCR）とCD4を介する第1シグナル，CD40LやCD28を介する第2シグナルが伝達されて，IL-2を産生

することで活性化し，拒絶反応を引き起こすので，第2シグナル受容体を抗体などで阻害することでT細胞が不活化し，移植後に生着することが知られている。

マウスを用いた実験では，第2シグナルを遮断して心移植した後，免疫抑制剤を投与しなくても心臓の拍動が続き，ドナーからの皮膚移植も拒絶されず生着したが，免疫寛容状態が長期にわたり維持される機序は不明であった。清野氏らは，臓器移植マウスモデルとT細胞の第2シグナル阻害の系を用いて検討した結果，心移植免疫寛容の維持にはNKT細胞が必須であることを突き止めた。そこで，T細胞第2シグナルを遮断したNKT細胞欠損マウスを用いて同種心移植免疫寛容の維持について検討したところ，正常マウスは移植片の長期生着を認めたが，NKT細胞欠損マウスでは経時的に脱落した（**図5**）。

次に，NKT細胞欠損マウスに対して，さまざまなサイトカインを欠損させたマウスのNKT細胞を移入後，移植と寛容誘導を行った結果，IL-4およびIFN-γ欠損NKT細胞を移入したマウスは移植片の長期生着がみられたが，IL-10欠損NKT細胞を移入したマウスは移植片が拒絶された。実際に，免疫寛容群のNKT細胞ではIL-10が高値を示し，IFN-γは低値であったが，拒絶群はIL-10が低値，IFN-γが高値を示した。同時に樹状細胞（DC）産生サイトカインについても検討した結果，免疫寛容群ではIL-10が高値，IL-12が低値であったが，拒絶群ではIL-10が低値，IL-12が高値を示した。また，IL-10とIL-12を高産生するDCは制御性DCであるとの報告から，寛容マウス由来DCを用いて検討したところ，制御性DCは同種異系間のリンパ球混合反応（MLR）を抑制した。

以上の検討から，寛容誘導によりNKT細胞のサイトカインプロファイルがIL-10高産生に変わり，IL-10依存性の寛容シグナルによってIL-10高産生の制御性DCが誘導され，IL-10産生性の末梢性制御性T細胞（Tr1）を誘導して免疫抑制するという，IL-10を軸とした細胞間相互作用機序が明らかになった。さらに，NKT細胞の受容体であるCXCR6とそのリガンドでDCが産生するCXCL16の相互作用などがNKT細胞による免疫抑制において重要であることを突き止めた。

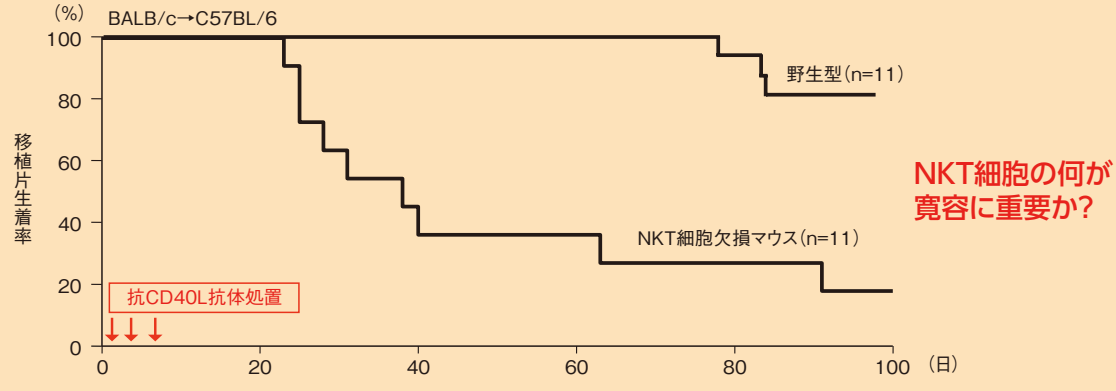
寛容状態にしたT細胞を用いてヒト腎臓移植で免疫寛容を導入

清野氏らは現在，東京女子医大、順天堂大学と，第2シグナル阻害で麻痺状態にしたT細胞（anergic T cell）を用いた免疫寛容誘導の共同研究を進めている。サル腎移植におけるanergic T cellを用いた寛容誘導の検討では，2年間以上，免疫抑制剤を使用せず生存するなどの結果を報告している。

大動物を用いた検討が良好であったため，2008年からヒト臨床試験においても腎臓移植における免疫寛容の導入を施行した。プロトコールは，ドナーリンパ球とレシピエントT細胞を培養し，第2シグナルを遮断しながらanergic T cellを誘導して，腎移植後に移入し，anergic T cellを移入するまでは免疫抑制剤を投与した。対象は13例（男性10例，女性3例）で，anergic T cellの移入後も免疫抑制剤を使用し，全例免疫抑制剤を減量中である。

清野氏は，これまでの結果について「従来の免疫抑制療法と比較し，おおよそ半分の内服量まで減量を一時試みた。しかし，一部で拒絶反応を認めたために免疫抑制剤の過度の減量を中止した。5例ではこれまで拒絶は認めていない。現在，プロトコールの改変を検討中で，次のフェイズを目指す考えである」とまとめた。

図5―同種移植免疫寛容の維持にはNKT細胞が必要



（提供:清野 研一郎氏）

ワークショップ　免疫療法の今後の可能性

ワークショップでは，多能性幹細胞由来樹状細胞を用いたワクチン療法，子宮頸がんに対する乳酸菌HPVワクチンの開発，再発・難治性B細胞性リンパ腫に対するrituximab併用γδT細胞療法の安全性と有効性の検討，消化がんにおける腫瘍内浸潤メモリーT細胞の臨床的意義の4演題が報告された。いずれも新たな手法により良好な試験結果が出ており，臨床への応用が期待される。

司会

中面 哲也 氏
（国立がん研究センター東病院臨床開発センターがん治療開発部機能再生室）

遠藤 格 氏
（横浜市立大学消化器・腫瘍外科学）

多能性幹細胞由来樹状細胞を用いたワクチン療法

福島 聡 氏（熊本大学医学部附属病院皮膚科）

福島氏らは，胚性幹細胞由来の樹状細胞（DC）であるembryonic stem cell-derived dendritc cells（ES-DC）を用いて,より強力な治療効果を有するがん免疫療法と,安定して供給できるDCワクチンの開発を進めている。今回は,複数抗原を標的とした遺伝子改変ES-DCによる免疫療法の効果をマウスメラノーマの皮下接種および転移モデルにおいて検討した。

メラノーマ抗原を発現するマウス胚性幹細胞由来樹状細胞（ES-DC）の作製

メラノーマ抗原を発現するマウスES-DCは4種類作製した。作製方法は，マウスのES細胞に腫瘍関連抗原としてGPC3，SPARC，TRP2，gp100の4つの遺伝子をそれぞれ電気穿孔法で導入し，さらに薬剤耐性により選択した後，遺伝子導入ES細胞をクローニングして，*in vitro*でDCに分化誘導させた（**図6**）。そして，GPC3，SPARC，TRP2，hgp100を発現したそれぞれのES-DCを腹腔内投与したマウスの脾臓細胞をクロム放出試験で解析した結果，各マウス体内に抗原特異的CTLの誘導を認めた。

ES-DCワクチンはメラノーマ皮下接種マウスで抗腫瘍効果

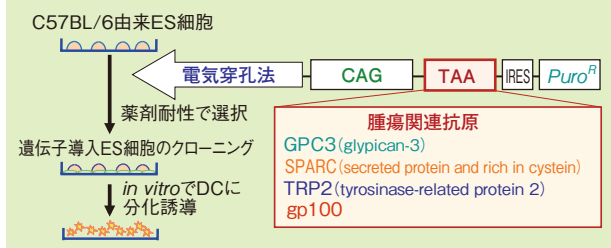
マウスをES-DC-SPARC，ES-DC-TRP2，あるいは抗原なしのES-DCで2回免疫し，1週間後にメラノーマを皮下接種して腫瘍径を観察した。腫瘍細胞を5×10^3個接種した場合では，溶媒のみを投与した対照群で腫瘍が増大したが，抗原なしのES-DCによる免疫群はある程度の抗腫瘍効果を示し，ES-DC-SPARC，ES-DC-TRP2で免疫した群は腫瘍を完全に拒絶した。しかし，腫瘍細胞数を10倍の5×10^4個に増やしたところ，ES-DC抗原の有無による差がなくなった。そこで，複数抗原をミックスしたES-DC-GPC3＋SPARC＋TRP2で免疫した結果，接種する腫瘍細胞数をさらに2倍の1×10^5個に増やしても,対照の抗原なしのES-DCに比べて有意に腫瘍の増殖を抑制し，生存期間も延長した。

ES-DCワクチンはメラノーマ転移マウスでも抗腫瘍効果

抗腫瘍効果を転移モデルで検証するために，腹膜播種，肺転移，リンパ節転移を定量的に測定できるモデルを構築した。そして，皮下接種マウスの時と同じ免疫をした結果，腹膜播種予防モデルにおいてはES-DC-SPARC＋TRP2＋hgp100で免疫した群が効果的にメラノーマ腹膜播種を拒絶した。さらに，α-GalCerをES-DCに負荷させることで，より強力な抗腫瘍効果が得られるかどうかを検討した結果，α-GalCerを負荷した複数抗原標的ES-DCは，腫瘍を完全に拒絶した。肺転移予防モデルおよびリンパ節転移予防モデルにおいても同様の結果を得ている。

福島氏は「人工多能性幹細胞（iPS細胞）においても同様の方法でDCを誘導し，モデル抗原を遺伝子導入したiPS-DCの投与により，抗原特異的CTLの誘導と腫瘍の効果的な拒絶を認めている」と締めくくった。

図6―メラノーマ抗原を発現するマウスES-DCの作製法



（提供:福島 聡氏）

子宮頸癌に対する乳酸菌HPV治療ワクチンの開発

川名 敬 氏（東京大学医学部産科婦人科学）

ヒトパピローマウイルスE7蛋白質を導入した乳酸菌HPVE7ワクチンを作製

子宮頸がんでは，がん形質の維持にヒトパピローマウイルス（HPV）のE7蛋白質（HPVE7）が恒常的に発現していることが知られている。また，末梢血中にE7特異的細胞傷害活性（E7-CTL）が検出される患者は前がん病変（C2-3）になりにくい。E7はウイルス由来の外来蛋白質であるため安全性が高いという報告もある。以上のことから，HPVE7を標的としたがん免疫療法としてHPV治療ワクチンの研究が盛んに行われているが，これまで実用化に至った例はない。

川名氏らは，子宮頸部リンパ球が子宮頸部粘膜にホーミングするという報告に着目した。そして，実際に子宮頸部リンパ球の3分の1程度はCCR9，インテグリンβ7などの腸管リンパ球特異的なホーミング受容体を発現していることを確認したことから，安全性が高く，腸管に親和性の高い乳酸菌を担体に利用した経口ワクチンを開発した。

乳酸菌にはヘルパーT細胞1型（Th1細胞）の誘導能が確認されている*Lactobacillus casei*を採用した。これに発がん性を消失させ抗原性を維持する処置として，E7 Rb-binding siteの3つのアミノ酸を置換した変異E7遺伝子を導入して死菌化させ，乳酸菌HPVE7ワクチン（GLBL101c）を作製した。

前臨床研究として，マウスにGLBL101cを経口投与した結果，腸管上皮内粘膜リンパ球に粘膜型E7-CTLの誘導を認めた。この誘導能は脾臓リンパ球との比較において高値を示した。また，従来使用されている筋注・皮下注ワクチンと比べても誘導能は高かった。

子宮頸がん前がん病変CIN3に対する第I/IIa相探索的臨床試験を実施

そこで川名氏らは，GLBL101cを製剤化し，子宮頸がん前がん病変に対する第I/IIa相探索的臨床試験を実施し，安全性の評価と病理学的有効性を検討した。また，子宮頸部リンパ球・末梢血中の抗E7細胞性免疫（IFN-γ産生細胞，granzyme B産生細胞）の誘導（E7-specific cell-mediated immunity; E7-CMI）についても解析した。

対象はHPV16陽性の前がん病変（CIN3）患者7人で，1カプセル（250mg）1日1回5日間経口投与を1クールとして，1カプセル/日投与群（n＝1），2カプセル/日投与群（n＝3），4カプセル/日投与群（n＝3）で，第1，2，4，8週の合計4クール実施した。その結果，1カプセル/日ないし2カプセル/日投与群は試験終了後に円錐切除となったが，4カプセル/日投与群はCIN3病変が完全消失し，増悪は現在まで認められない（**表2**）。

免疫学的解析では，子宮頸部リンパ球中にHPV16E7特異的なIFN-γ産生細胞，granzyme B産生細胞がそれぞれ誘導された。病理学的には投与前の病変にはリンパ球浸潤がなかったが，投与後に間質から病変内にかけて著明なリンパ球浸潤が認められた。

以上の検討結果から，子宮頸部上皮（子宮頸部リンパ球）には，腸管由来の上皮内リンパ球がホーミングしていることが認められた。また，GLBL101cの経口投与により，子宮頸部にE7-CMIが誘導され，その誘導能は末梢血よりも子宮頸部優位であった。4カプセル/日群は全例CIN3が消失した。臨床的有効性と子宮頸部のE7-CMI誘導には相関がみられた。

川名氏は「GLBL101cは子宮頸がん前がん病変に対する初の治療薬になりうると期待される。つまり，内服治療により子宮膣部円錐切除術を回避できるようになる」とまとめた。

表2―臨床効果のまとめ

CIN1: mild dysplasia
=HPV感染像（CPE像）
CIN2: moderate dysplasia
CIN3: severe dysplasia～CIS
=前がん状態

		投与前			投与終了後		
番号	cap/日	細胞診	組織診	TLA*	細胞診	組織診	TLA*
1-01	1	CIN3	CIN3	82%	CIN3	CIN2	57%
2-01	2	CIN3	CIN3	21%	CIN3	CIN3	21%
2-02	2	CIN3	CIN3	21%	CIN3	CIN3	16%
2-03	2	CIN3	CIN3	29%	CIN3	CIN3	2%
3-01	4	CIN2	CIN3	24%	CIN2	CIN2	0%
3-02	4	CIN3	CIN3	21%	CIN3	CIN2	0%
3-03	4	CIN3	CIN3	40%	CIN1	CIN2	0%

*TLA: Total CIN3 lesion area in colposcopy

（提供:川名 敬氏）

再発・難治性B細胞性リンパ腫に対するrituximab併用γδT細胞療法の安全性と有効性の検討

阿部 有 氏（日本赤十字社医療センター血液内科）

γδT細胞とrituximab併用は高い細胞傷害活性を認める

悪性リンパ腫の治療成績は，ヒトB細胞表面抗原CD20を標的とするモノクローナル抗体rituximabの登場により大きく向上している。

Rituximabは抗体依存性細胞傷害活性（ADCC），補体依存性細胞傷害活性（CDC），あるいは直接的にアポトーシスをもたらす作用を有すると報告されている。一方，自然免疫系のγδT細胞はMHCクラス1分子に拘束されないので，比較的早い段階から免疫に関与すること，またFcレセプターを発現しておりADCC効果を示すことが知られている。

阿部氏らは，悪性リンパ腫に対してrituximabとγδT細胞を併用することで,ADCCによる高い治療効果が得られるのではないかと考えた。そこで今回，CD20陽性B細胞性リンパ腫（再発・難治例）に対するrituximabとγδT細胞療法の併用療法による安全性と有効性について評価・検討した。また，免疫学的反応性についても探索・検討した。

研究デザインは単群オープン探索的臨床研究で，研究薬には活性化γδT細胞（γδT-LAK）を用いた。投与細胞数は1×10^8細胞以上の調整できた全細胞数とした。投与回数は2週間隔で合計6回とし，治療効果を考慮して最大6回までの追加投与を可能とした。rituximabは375mg/㎡を2週間隔で合計6回投与した。投与方法は，γδT-LAKとrituximabをそれぞれ1週間毎に交互に投与した（**図7**）。

対象はCD20陽性B細胞リンパ腫と診断され，同意取得時の年齢が20歳以上で，適格性確認時にCD20陽性B細胞リンパ腫に対する治療終了後から4週間以上経っており，全身状態（PS）が0～1の患者である。また，適格性確認時の検査において，骨髄機能，肝機能，腎機能の検査値を満たす者とした。除外基準は重篤なアレルギー既往やコントロール困難な感染症がある，ステロイド剤の継続的な全身投与を受けているなどである。

現在，4例（男性1例，女性3例）が本試験に参加しており，3例は予定したγδT細胞療法を完遂した。1例はγδT-LAK細胞投与3回目以降,γδT細胞の培養増殖が得られず，治療を中止した。

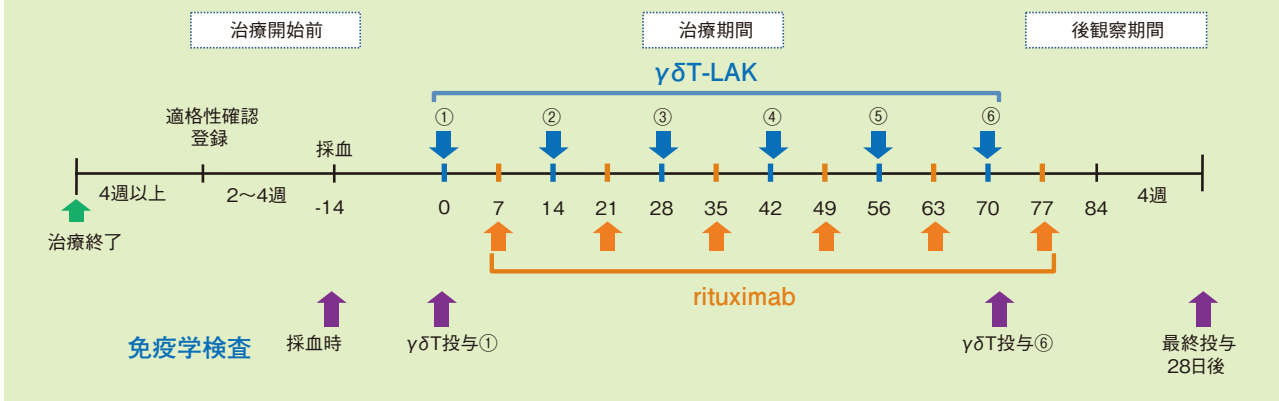
投与したγδT-LAKを解析した結果，抗腫瘍効果を有するeffector memoryタイプが全例で高値を示した。細胞傷害活性はγδT-LAK単独,rituximab単独と比べ，両者の併用で高い傷害活性が認められた。

末梢血中のγδT細胞数は，投与前と比べ投与後に増加しており、さらに6回目投与終了から1カ月後も高値を維持していた。

安全性評価では重篤な有害事象を認めず，安全に実施が可能であった。rituximab投与直後に軽度のアレルギー反応が認められたが，γδT細胞投与後には有害事象は出現しなかった。

以上の結果から阿部氏は「本治療法には重大な有害事象を認めず，安全性が確認された。しかし，症例数が少ないため,現時点では本治療法の有効性を評価することはできない。今後は症例数を増やし,検討していく考えである。免疫学的には抗腫瘍効果につながる変化も認められている。短期的な効果のみならず,長期的に病勢を抑制する効果にも期待したい」と結んだ。

図7　研究スケジュール



（提供:阿部 有氏）

消化器癌における腫瘍内浸潤メモリーT細胞の臨床的意義

庄 雅之 氏（奈良県立医科大学消化器・総合外科）

腫瘍内浸潤メモリーT細胞の高発現群の予後は有意に良好

庄氏らは,消化器がんにおける腫瘍内浸潤メモリー T細胞の臨床的意義と，新規がん免疫療法の可能性について検討した。

方法は膵がん，胃がん，食道がん，大腸がん肝転移の切除症例から検体を選び，メモリー T細胞の表面抗原であるCD45ROを免疫染色し，腫瘍内に浸潤したCD45RO陽性細胞数をカウントした。そして中央値を基準としてCD45RO高発現群と低発現群の2群に分けた。

検討の結果，膵がんにおいては，術後生存率は高発現群が低発現群と比べ有意に良好であった。次に，腫瘍内浸潤メモリー T細胞と腫瘍局所の免疫活性との関連を検討したところ，腫瘍局所のIFN-γの発現は高発現群で有意に高値を示した。また，術後肝転移再発なしの群は，ありの群と比べて腫瘍内浸潤メモリー T細胞数が有意に多かった。

胃がんにおいては，術後生存率は早期がんでは両群間に有意差は認められなかったが，進行がんでは高発現群で有意に生存率が良好であった。腫瘍局所のIFN-γの発現は高発現群で有意に高値を示した。また，術後再発は腹膜再発なしの群が，ありの群と比べて有意にメモリー T細胞数が多かった。

食道がんにおいては,術後生存率は高発現群が有意に良好であった。stage別生存率はいずれのstageにおいても高発現群で高い傾向にあり，特にstageⅡBでは高発現群が有意に良好であった。遠隔リンパ節再発，肺転移再発はいずれも再発なしの群で有意にメモリー T細胞数が多かった。予後因子多変量解析を行った結果，従来のT因子，N因子とともにCD45ROが独立予後因子として認められた（**表3**）。

大腸がん肝転移においては，術後生存率は高発現群で有意に良好であった。

以上の結果から，膵がん，進行胃がん，食道がん，大腸がん肝転移症例において，腫瘍内浸潤CD45RO陽性メモリー T細胞高発現群の予後は,有意に良好であった。腫瘍内CD45RO陽性メモリー T細胞と腫瘍局所の免疫活性との間に相関がみられた。腫瘍内メモリー T細胞の多寡は術後再発と有意な関連が認められた。

T細胞不活化経路阻害により新規がん免疫治療戦略に期待

次に，T細胞の不活化経路であるPD-1，CTLA-4をターゲットとし，メモリー T細胞を誘導することができないか検討した。

がん転移モデルマウスに抗PD-1抗体を投与したところ,肝転移が有意に抑制された。このPD-1阻害における肝転移抑制は，CD8T細胞依存性であること認められた。また，PD-1/CTLA-4を同時阻害した結果，強い肝転移抑制効果が確認された。

臨床により近い皮下腫瘍モデルおいてPD-1/CTLA-4同時阻害による抗腫瘍効果を検討したところ，ほとんどのマウスで腫瘍の退縮が認められ，多くは完全退縮に至った。T細胞腫瘍内浸潤促進効果を免疫染色により検討した結果，おもにCD8T細胞の腫瘍内浸潤が認められた。また，局所免疫活性の誘導をIFN-γ，granzyme B，perforinで検討したところ，いずれも強い免疫活性の上昇が認められた。

さらに，PD-1/CTLA-4同時阻害による抗腫瘍長期効果は抗原特異的であることを明らかにした。また，皮下腫瘍モデルに抗PD-1/抗CTL-4抗体を術前に1回投与し，3日後に腫瘍を切除，30日後に腫瘍株を再接種して腫瘍の生着率を検討した結果，強い抗腫瘍効果が認められた。

以上の結果から，PD-1およびCTLA-4同時阻害は相乗的に肝転移を抑制した。また，T細胞の腫瘍内浸潤を促進し,局所免疫活性が上昇した。T細胞不活化経路阻害により，長期に持続する腫瘍抗原特異的抗腫瘍効果が得られた。術前投与は再発を抑制する可能性が示唆された。

庄氏は「ヒト消化管がんにおいてメモリー T細胞を中心とした獲得免疫機構が重要な臨床的意義を有し，不活化経路制御による新規がん免疫治療戦略の可能性が示唆された」と結んだ。

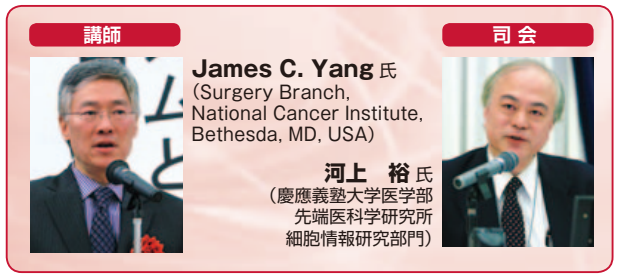
表3―食道がんにおける予後因子多変量解析

Variables	Odds Ratio	95% Confidence Interval	p
CD45RO	0.46	0.26-0.79	0.005
T	2.28	1.49-3.48	0.0001
N	2.48	1.22-5.04	0.012
M	1.68	0.84-3.34	N.S

（提供:庄 雅之氏）

特別講演　ヒトがんに対する細胞性免疫応答：臨床応用への戦略

Yang氏はヒト悪性黒色腫に対するT細胞免疫応答のエビデンスを示し，それをさまざまな進行性がんの治療に用いるための戦略について述べた。



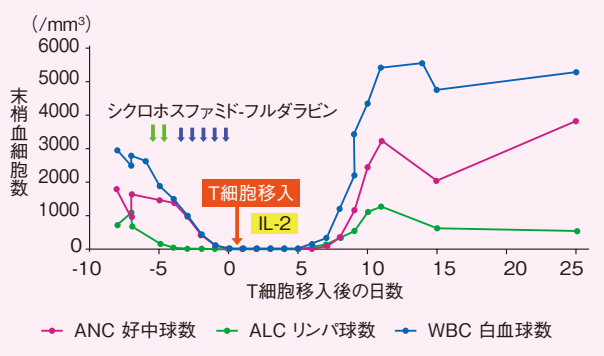
ヒト悪性黒色腫におけるT細胞応答とその抗原の実体

ヒト悪性黒色腫に対する免疫応答があることは以前から知られている。悪性黒色腫では，ときに自然退縮例が認められ，IL-2，抗CTLA4 抗体，抗PD1抗体などを用いた免疫療法により治療効果が認められる場合がある。そして，多くのヒト悪性黒色腫では，腫瘍中にがん細胞に反応する腫瘍浸潤Ｔ細胞（TIL）が認められる。3つの研究論文，すなわちBoonらによる2論文とKawakamiらによる1論文は，Ｔ細胞応答を誘導する3つの抗原，MAGE-A1，tyrosinase，MART-1の同定により，それまで疑問視されていたヒト腫瘍特異的抗原の存在を証明し,新しい分子腫瘍免疫学の始まりを象徴していた。

免疫療法の効果を限定するもの

では，このＴ細胞応答を利用する治療の問題点は何か。第一に，抗CTLA4抗体，IL-2などの免疫制御治療薬では，あらかじめ抗腫瘍免疫反応が患者体内に存在することが必要である。第二に，たとえ免疫反応が存在していたとしても，例えばIL-2の投与のみでは抗腫瘍Ｔ細胞の生体内増殖には不十分と考えられ，少数例にしか治療効果は認められない。第三に，ペプチドワクチンで腫瘍抗原に特異的なＴ細胞を誘導できる症例でも，臨床的効果を示すことはまれである。これらは，生体内の抗腫瘍Ｔ細胞は量的にも，質的にも不十分であり，養子免疫療法の重要性を示唆している。

図8―シクロホスファミド+フルダラビンによる前処置後のT細胞養子免疫療法



（提供:James C. Yang氏）

抗腫瘍T細胞投与時に患者に行われる前処置の重要性

ヒト悪性黒色腫では腫瘍浸潤リンパ球が存在する。手術で得た腫瘍にIL-2を添加したTILの培養では，2週間後には活性化したＴ細胞が増殖し腫瘍細胞を排除する。これらの抗腫瘍活性を持つTILが養子免疫療法に用いられた。この養子免疫療法の治療効果を上げるために重要な点は，培養Ｔ細胞の投与前に患者に化学療法や放射線治療を行い，内在性免疫細胞を減少させる前処置を行っておくことである。これはマウスモデルでも，臨床治験でも示されてきた。マウスモデルの解析でわかったこの前処置の作用機序は次の3つである。第一に宿主の制御性Ｔ細胞の除去により，投与したＴ細胞の活性を高める。第二に宿主によるＴ細胞の恒常的増殖機構（homeostatic expansion）を作動させ,投与したＴ細胞の増殖を助ける。また前処置直後は内在性免疫細胞はほぼ完全に除去されるので，IL-7やIL-15などのいわゆるhomeostatic cytokineは主に投与された細胞に対して働く。第三に，マウスモデルでは，腸管上皮などからの細菌の血中漏出によるtoll-like receptor（TLR）刺激,その結果である抗原提示細胞の活性化が関与することがわかっている。

前処置後にＴ細胞が投与された1症例の経過を**図8**に示す。シクロホスファミド（Cy）とフルダラビン（Flu）を投与して，白血球数がほぼなくなると同時に培養Ｔ細胞を移入し，その後約3日間，IL-2を投与した。この後，7～10日後には白血球の回復が認められる。一回のこの治療で，悪性黒色腫では劇的な治療効果が見られる場合がある。

表4―腫瘍浸潤リンパ球（TIL）養子免疫療法の悪性黒色腫に対する臨床効果

前処置	症例数	PR	CR	奏効率(%)
Cy/Flu	43	16（84,36,29,28,14,13,11,8,8,7,4,3,3,2,2,2）	5（95+,82+,79+,78+,64+）	21（49%）
Cy/Flu + 200TBI	25	8（14,9,6,6,5,4,3,3）	5（68+,64+,60+,57+,54+）	13（52%）
Cy/Flu + 1200TBI	25	8（21,13,7,6,6,5,4,3）	10（48+,45+,44+,44+,39+,38+,38+,38+,37+,19）	18（72%）

（ ）内の数字は,各症例においてPR･CRの治療効果判定後,それぞれの効果が維持できた月数を示す。+が付いている症例では治療効果が現在も継続中である。

（提供:James C. Yang氏）

マウスでは，より強力な前処置によってT細胞養子免疫療法の効果が上がったので，臨床治験でもCyとFluに加え，200cGyあるいは1200cGyの全身放射線照射（TBI）の追加が行われた。1200cGy照射例では，CD34陽性自己造血幹細胞も併用投与された。これらのTIL養子免疫療法は全部で93例に実施され，3年以上経過観察されているが，CR症例が，Cy＋Fluのみ群では5例，Cy＋Flu＋200TBI群では5例，Cy＋Flu＋1200TBI群では10症例に認められ，その後1例が再発したが,その他の症例では3年以上CRが維持されている。すなわち，約20%の症例で長期生存が認められ，これは根治治療である可能性が高い（**表4**）。

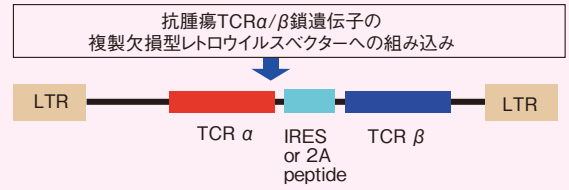
“Young TIL”を用いた養子免疫療法

Yang氏らは現在，Young TILと呼ばれるコンセプトでTIL療法の臨床試験を進めている。従来のTIL培養法は，比較的長期（2～4週間）の培養後，複数のHLAをマッチしたがん細胞株を用いて腫瘍反応性を確かめるスクリーニングを経た後に，急速T細胞培養法（rapid expansion protocol）を用いて細胞を100倍以上増やしてから養子免疫療法に使用していた。しかしそれでは手間がかかり,他施設での実施が難しい。さらに自家がん細胞株は必ずしも樹立できないため，自家腫瘍特異的に反応するT細胞はスクリーニングで評価されず治療に使用されない，といった欠点があった。予備実験では，Young TILの多くは腫瘍反応性T細胞を含むことがわかっている。現在，培養期間を短縮して，腫瘍反応性をテストせずに投与するYoung TILプロトコールの臨床試験を進めている。既に治療効果が十分に認められており，この方法によって今後は，より多くの患者を治療できるだけでなく,多くの施設で実施可能になると考えられる。

T細胞受容体遺伝子導入T細胞を用いた養子免疫療法

Young TILプロトコールは従来の養子免疫療法を変える可能性を持っている。しかしながら悪性黒色腫においてもTILが十分に増殖しない場合があり，また他のがんでは腫瘍反応性を持つTILをほとんど培養できないという問題が依然残されている。それらの問題を解決する一つの方法として，腫瘍抗原特異的なT細胞受容体（TCR）の遺伝子を末梢血T細胞に導入して，人工的に抗腫瘍T細胞を作り出す方法がある。腫瘍抗原を認識するT細胞受容体のαβ鎖遺伝子をレトロウイルスベクターで末梢血T細胞に導入する（**図9**）。悪性黒色腫MART-1抗原を認識するTCR遺伝子を導入したリンパ球を用いた養子免疫療法の臨床試験では，投与したリンパ球の血液での長期存続と抗腫瘍効果が認められた。ただし,MART-1抗原は正常色素細胞にも黒色腫細胞に比較すると少量ではあるが発現するために，色素細胞が存在する部位の障害，すなわち皮膚白斑，ブドウ膜炎，内耳障害などの副作用が認められており，がん精巣抗原などの，よりがん特異的な抗原に対するTCRの利用が重要と考えられ，実際，NY-ESO-1がん精巣抗原を認識するTCRを用いた悪性黒色腫の臨床試験では強い抗腫瘍効果が副作用なしに認められている。

図9―T細胞受容体（TCR）遺伝子導入T細胞の作製



末梢血リンパ球に、抗腫瘍TCRα/β鎖遺伝子をレトロウイルスを用いて導入して,腫瘍反応性T細胞を作製して、養子免疫療法に用いる。

（提供:James C. Yang氏）

T細胞受容体遺伝子導入T細胞の他のがんへの応用

TCR遺伝子導入T細胞を用いた養子免疫療法を,どのように悪性黒色腫以外のがんにも応用するかも問題である。Yang氏らは4つの方法を検討している。1つは,悪性黒色腫関連抗原を発現する他のがんを治療することである。2つ目は，他のがんで発現する腫瘍抗原に対するTCRを単離・同定して用いることである。3

つ目は，腫瘍抗原が不明であっても，他のがん細胞に特異的反応するT細胞が得られれば，そのTCR遺伝子を単離して用いることである。4つ目の戦略は，がんの表面抗原を認識するモノクローナル抗体の可変領域をTCR定常領域に結合したキメラ抗原受容体を構築することである。

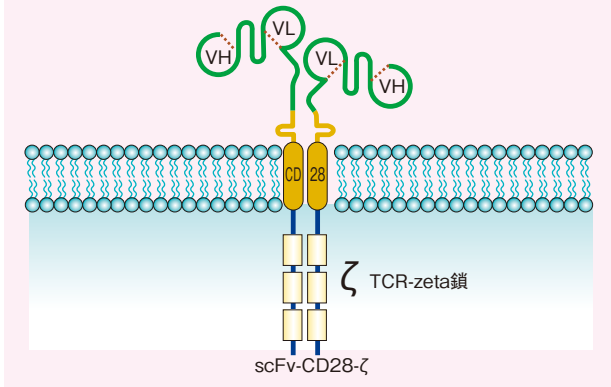
●悪性黒色腫関連抗原を発現する他のがんの治療

Yang氏らは,悪性黒色腫関連抗原としてNY-ESO-1抗原に着目した。NY-ESO-1はもともと食道がん患者に見つかったがん精巣抗原であるが，悪性黒色腫の10～20%に発現するだけでなく，他の腺がんや多くの滑膜肉腫にも発現している。そこで，HLA-A2拘束性NY-ESO-1特異的T細胞からTCR遺伝子を単離して，さらに，その親和性を高めるためにTCRα鎖のCDR3領域に変異を加えた。この改変TCR遺伝子を用いて，悪性黒色腫だけでなく,滑膜肉腫も治療された。その結果,11例の評価可能な悪性黒色腫患者の奏効率はCR2例とPR3例であり,滑膜肉腫患者6例のうち4例がPRであった。したがって，この養子免疫療法の治療効果は，悪性黒色腫に限定されるものではないことが判明した。

●他のがんに発現する腫瘍抗原に対するT細胞受容体の利用

2番目の方法として，大腸がんなどによく発現するCEAに対するTCRが,HLA遺伝子導入マウスから得た高親和性CEA特異的T細胞から単離され，それを用いて大腸がん患者が治療された。その結果,CEAを発現する少数の正常細胞を持つ正常大腸組織の破壊とそれに伴う下痢という強い副作用が認められ，臨床試験は中止された。これは正常細胞にも発現がみられる抗原に対するT細胞療法では重篤な副作用が問題になりうることと同時に，T細胞養子免疫療法が非常に強力な作用を持つことを示している。

図10―キメラ抗原受容体（CAR）



（提供:James C. Yang氏）

●キメラ抗原受容体の利用

キメラT細胞受容体（chimeric antigen receptor; CAR）は，腫瘍特異的に発現されている細胞表面抗原を認識する抗体のH鎖およびL鎖可変部をCD28の膜貫通領域と細胞内領域，そしてシグナル伝達機能を持つTCR-zeta鎖遺伝子に結合したものである（**図10**）。Yang氏らは,B細胞性悪性リンパ腫が発現する膜分子CD19に対する抗体を利用したCARを導入したT細胞を用いて，B細胞性悪性リンパ腫の治療を試み，治療効果が認められた。

TILを用いた養子免疫療法の今後の方向性

Yang氏らはTILを用いる養子免疫療法で,3つのプロジェクトを進めている。1つは，マウスで強力な効果が認められた，IL-12遺伝子導入TILを用いた臨床試験である。この治療では，IL-2の併用投与をしなくてすむ可能性がある。現在，臨床試験で少量のTILから投与している段階である。2つ目は，TIL養子免疫療法にTBIを併用する有用性を見極めるためのランダム化臨床試験である。3つ目は，併用投与するIL-2をIL-15に置き換える臨床試験である。IL-15の使用により,IL-2とは異なり，免疫抑制性の制御性T細胞を増殖させない，毒性が低い，というような利点がある可能性がある。

TCR遺伝子導入T細胞を用いた養子免疫療法の今後の方向性

TCR遺伝子導入T細胞を用いた養子免疫療法では，3つのプロジェクトを進めている。1つは，がん精巣抗原MAGE-A3のTCRを用いた臨床試験である。2つ目は，腫瘍血管に過剰発現する血管内皮増殖因子（VEGF）受容体2に対するCARを用いた臨床試験である。この方法は，マウスではさまざまながんに対する治療効果が認められている。3つ目は，悪性脳腫瘍に特異的に発現する上皮成長因子受容体変異体（EGFRvIII）を標的にするCARを用いる臨床試験である。

Yang氏は「これらの新しい養子免疫療法により,今まで困難であった進行がんに対しても，免疫療法の治療効果を示せる可能性がある」と述べた。

第9回日本免疫治療学研究会学術集会
日時：2012年2月18日（土）
会長：杉山 保幸 先生（帝京大学医学部附属溝口病院外科）
場所：東京ガーデンパレス（東京都文京区）