今後の癌の細胞治療

—特に DC を用いて—

若杉 尋¹⁾, 田野崎隆二²⁾, 高上 洋一²⁾

1) 国立がんセンター研究所薬効試験部

2) 国立がんセンター中央病院薬物療法部

Cell Therapy in the Future : Dendritic cell therapy

Hiro Wakasugi¹⁾, Ryuji Tanosaki²⁾,
Yoichi Takaue²⁾

1) Pharmacology Division, National Cancer Center
Research Institute

2) Medical Oncology Division, National Cancer Center
Hospital

Key words | cell therapy, dendritic cell, prostate cancer, GMP

はじめに

これまで悪性腫瘍に対して細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte ; CTL) を主体とした多くの免疫療法が試みられてきたが、必ずしも一つの治療法として確立するに至っていない。一方、樹状細胞 (dendritic cell ; DC) は生体内で最も強力な抗原提示細胞 (professional antigen presenting cell ; APC) で、組織適合抗原 (major histocompatibility antigen ; MHC) のクラス I 分子拘束性に naïve CD8 陽性細胞を、クラス II 分子拘束性に naïve CD4 陽性細胞をそれぞれ活性化することができ、同時に B 細胞を刺激して特異的抗体産生をうながし、また、NK 細胞や NKT 細胞を含めた幅広い免疫ネットワークを動かすことのできる細胞である。腫瘍特異抗原が次々と同定され、多くのサイトカインの発見と血液成分分離装置の進歩と普及により、体外で樹状細胞を大量かつ容易に作る事が可能になったことにより、DC によるワクチン療法が注目されている。

DC の特徴

DC は naïve T 細胞を生体内で刺激 (primary

response) することができる唯一の強力な APC で、成熟した DC 細胞は多数の突起や陥入を有する「樹状」の細胞膜を呈しているが、末梢血 DC (blood DC) はリンパ球や単球と判別しがたい。これらはほとんどあらゆる臓器に存在し、いくつかの亜分画に分けられるが、異なる lineage 由来のさまざまな分化段階の細胞があり、いまだに明確な細胞マーカーがないために同定が難しく、その定義は混乱を究めている。DC 療法として抗腫瘍免疫の担い手として注目されているのは、いわゆる myeloid lineage-derived DC であり、本稿での DC はこの myeloid DC を意味する。

DC は骨髄の造血幹細胞からでき、末梢血に至る。ヒト末梢血中の DC (およびその前駆細胞) は末梢血単核球のたかだか 0.1% しかない。未熟な blood DC は皮膚をはじめとするあらゆる全身臓器にたどりつき、互いに細胞相互で関係を維持しながら、外来抗原に対する哨兵の役割をする。ここで多くの物質を細胞内に取り込む。組織傷害などの“danger signal”にともなう各種サイトカイン、ケモカインなどの分泌により DC は組織への流入を早め、その後に入力リンパ管に入り、所属リンパ節に移動する。リンパ節組織の T リンパ球領域で抗原

特異的 T リンパ球と相互に認識しあい、免疫反応の cascade を進めると同時に DC はアポトーシスをきたす。

DC の表面形質に関しては、CD83, CMRF44, CMRF56 の 3 つが DC 検索に極めて有用な最近見出された抗原分子であるが、これらは主に成熟・活性化 DC を認識する。末血の fresh DC に対する特異的なマーカーはなく、lineage⁻/DR⁺ cell として認識される¹⁾。これらの細胞は、さらに、CD11c 陽性の DC1 と CD123(IL-3R) 陽性の DC2 の少なくとも 2 画分に分けられ、Th1&2 や NK&NKT 細胞などと巧妙な免疫バランスを維持するのに重要であると考えられてきた²⁾。Hart らは独自に開発した単クローン性抗体を用いてさまざまな場合の DC の動態を解析している³⁾。

DC 療法

がん患者では腫瘍に対する免疫能がさまざまな形で抑制されていることが指摘されている。腫瘍から産生される IL10, VEGF (vascular endothelial cell growth factor) などにより、DC の動員や活性化・成熟化が阻害されている⁴⁾。そこで、DC あるいは DC precursor を体外に取り出して特異的抗原物質をパルスし、処理された抗原ペプチド断片を膜表面の MHC Class I 分子と結合した形で提示させてから再び体内に戻すことにより、抗腫瘍免疫能を賦活化させることが期待できる。これが DC 療法である。既にいくつかの DC 療法が世界各地で開始されているが、以下に述べるように多くの課題がある。

1. 臨床試験に用いる樹状細胞の製造に関して

1) 用いる樹状細胞の種類

一般に、治療に用いる大量の DC は、末梢血から血液成分分離装置を用いてアフエーシスにより採取した単核球分画から得られる。比重遠心液を用いて DC を濃縮して得る方法、フラスコに付着した単核球分画を GM-CSF, IL-4, TNF- α などの存在下に培養して得る方法、化学療法や顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) などのサイトカインを用いて末梢血に動員した CD34陽性細胞をアフエーシスで採取し、これにサイトカインを加えて DC を増幅する方法などがある。DC を *ex vivo* で増幅させるための培養条件の研究、あるいは *in vivo* で大量に動員・増幅させるための研究なども進んでいる。このようなサイトカインとしては、FLT-3 ligand などが重要である^{5,6)}。

2) 腫瘍抗原と樹状細胞上への発現の方法

DC に腫瘍特異抗原ペプチドを発現させるための方法も多く報告されている。特定の HLA class I 分子を有する患者に対して MART-1, gp100, MAGE, SART, bcr-abl など既知の 9-mer ほどのペプチドを DC にパルスする方法が多く用いられる。抗原として、未知の腫瘍関連抗原が機能する可能性を期待して、HLA を特定せずに腫瘍特異抗原を蛋白として DC に取り込ませる方法や、腫瘍細胞の融解液 (tumor lysate) を用いる方法も行われる。一方、抗原を発現させる方法としてはパルスする以外に、遺伝子導入の手法を用いる方法、細胞融合を行う方法⁷⁾などもある。造血幹細胞のレベルでの腫瘍化である慢性骨髄性白血病 (CML) の患者では、その DC も腫瘍由来であることが疾患特異的な bcr-abl 遺伝子の異常の存在から知られている。これ自体がすでに腫瘍特異抗原を costimulator molecule とともに細胞膜表面に提示していて、自己の MLR を誘導する⁸⁾。また、腫瘍抗原をパルスした DC からは exosome とよばれる粒子が分泌され、この胞体の中には MHC Class I と II 分子と結合した腫瘍特異抗原と costimulator molecule がともに含まれていて、DC 同様に特異的な T 細胞の一次反応を惹起できる。これを用いることにより、将来的には細胞を用いずに通常の薬物療法と同様に扱うことのできる「DC 療法」が期待される⁹⁾。

3) 細胞製造に関する規定に関して

DC 療法では、ヒトの細胞を材料に、抗原物質や培養液および細胞分離・培養キットを使用して治療に用いる細胞を製造する。この医薬品としての細胞は、数量、活性や機能、形態、細菌・真菌の混入の有無などに関して、ある特定の条件を満たす必要がある。個人差の大きいがん患者の細胞を用いて、ある規格に沿った製品を製造することは決して容易なことではない。医薬品製造に準じた GMP (Good Manufacturing Practice) 基準にそって、全工程が規定され、実際の操作が製品ロット番号を含めてすべて記録される必要がある。同時に、別の担当者によって、製品の無菌性、細胞の性状などが監査される必要がある (Quality Control)。これは、熟練した技術者により専門の細胞処理施設で行われることが理想である。規格のそろっていない細胞製品を用いたのでは臨床試験の評価は不可能であり、安全性が不確かなものでは倫理的にも問題である。

2. 臨床試験の評価系に関して

特異的細胞免疫療法を評価する目的で通常の化学療法などの GCP (Good Clinical Practice) 基準にのっとった臨床第1～3相試験を施行しようとする、いくつか適さない点がある¹⁰⁾。以下の点を踏まえて新たな臨床評価系を確立する必要がある。

1) 第1相試験

第1相試験の目的は、DC数と抗原量を変えて設定して、安全性と免疫学的有効性を確認するとともに至適投与量とスケジュールを決定することにある。しかし、これまでの報告では副作用がほとんどなく安全であり、最大耐容量 (MTD) を評価する前に特異的 T 細胞の反応などから細胞性免疫反応が plateau に達していることが示唆される。実際には、製造し得る細胞数に限りがあるため、重篤な副作用が出現するまで輸注細胞数を増加できていない。この点が従来の抗癌剤治療と異なる。

細胞療法に対する反応をいかにして評価するかに関しても簡単ではない。生体内で起こった反応は HLA 拘束性であったり、軽微なために、通常の方法ではその量が至適であったか否かを評価しがたいことが多い。このため、抗原特異的 CTL precursor frequency assay などの surrogate marker により評価するのが実際的である。しかし、これでは至適投与経路や至適投与スケジュールの決定は実際には極めて困難である。たとえば静脈注射をすると肺にトラップされてしまい適切な部位へのデリバリーが悪い可能性が指摘されている。DC はリンパ節の T 細胞領域で抗原を特異的な T 細胞に提示するのでリンパ節への注入も行われる。皮下投与も行われるがどの方法がよいかに関しても検討するのが困難である。また、輸注後の細胞動態の検討も重要ではあるが、実際には評価困難である。

2) 第2相試験

第2相試験の目的は、第1相試験で明らかになった至適投与法に基いて、異なる対象患者群を治療して適応となる腫瘍の種類や患者の状態を明らかにすることにある。臨床効果が得られる場合が少ないので dose-response 関係を評価することは困難である。HLA 拘束性に治療反応性が出現する可能性もあるので、至適対象群の同定は十分慎重に行う必要がある。また、primary endpoint は、腫瘍の縮小ではなく、progression-free interval などが適している可能性がある。

3) 第3相試験

第3相試験では既存の治療法と比較して、本当に有効性があるかを randomized study などで行うことが目的になる。HLA 拘束性などがあることから、比較は必ずしも容易ではない。

世界における樹状細胞療法の現状

1996年にスタンフォード大学の Engelman ら¹¹⁾は、B 細胞リンパ腫の患者に対して、個々の腫瘍に発現されている免疫グロブリンのイデオタイプ蛋白をパルスした blood DC を経静脈的に輸注した。この療法の安全性が示されるとともに、4例中2例 (CR1例, PR1例) に治療効果が認められ注目を浴びた。この後、Nestle ら¹²⁾は16例の melanoma 患者を対象に、腫瘍関連抗原である MART-1, gp100, MAGE-1&-3 あるいは腫瘍融解液でパルスした monocyte-derived DC を KLH (Keyhole limpet hemocyanin) とともに単径リンパ節に直接定期的に輸注したところ5例に転移巣の明らかな縮小を認めた (CR2, PR3)。North West 病院の Murphy ら¹³⁾は、ホルモン療法抵抗性の前立腺癌患者51例に対し、腫瘍関連抗原である PSMA (prostate-specific membrane antigen) 由来のペプチドをパルスした monocyte-derived DC を輸注し、数例の有効例を報告している。これらの結果をもとに、世界中で多くの医療機関で DC 療法が実施され、その安全性はほぼ確立されつつある。けれども、いずれの研究もまだ小規模であり、有効性についての結論は出ていない。

国立がんセンターにおける 前立腺癌に対する第1相臨床試験

国立がんセンターにおいても、まもなく blood DC を用いた臨床試験が開始される。対象は、ホルモン療法抵抗性の進行期前立腺癌で、前立腺および前立腺癌に特異的に発現している腫瘍関連抗原である前立腺酸性ホスファターゼ (Prostatic Acid Phosphatase; PAP) に関連した蛋白質を抗原として用い¹⁴⁾、安全性と feasibility を評価することを primary endpoint とした第1相臨床試験である (図1)。輸注する DC 数を3段階に分けて増加させる dose escalation study の形式をとる。DC を製造するには米国 Dendreon 社が開発したキットを用いる。これは世界で唯一米国 FDA により認可された DC 製造システムで、無血清でサイトカインを用いず、アフエレーシス後約48時間で投与される (図

投 与 ス ケ ジ ュ ー ル

図1 国立がんセンターで開始される前立腺癌を対象としたDC療法におけるDC細胞の投与スケジュール。規定量のDC製剤を2週間隔で3回投与する。「APC8015」はDC製剤名。

図2 国立がんセンターで開始される前立腺癌を対象としたDC療法におけるDC細胞調整の模式図。第1日目に末梢血から単核球分画を血液成分分離装置で採取。DC前駆細胞を比重遠心液で分離し、PAP抗原を添加し、無血清かつ無サイトカイン状態で培養。40時間後に洗浄して患者さんに経静脈的に輸注する。

表 APC8015調整時の試験

検 査 項 目	Day -2	Day 0	追加試験
	白血球分画の採取	APC8015の release test	
有核細胞数	○	○	
細胞生存率(%)	○	○	
肉眼テスト(無菌性)	○	○	
無菌性			○
真菌			○
マイコプラズマ			○
エンドトキシン		○	
グラム染色		○	
表現型*	○	○	

* : CD3, CD19, CD56, CD1a, CD54, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD14, CD66b

●参考データ : allo-MLR を最初の 6 例で追加試験として測定.

2). この短時間に、抗原をパルスされた樹状細胞は活性化する。用いる試薬や抗原物質もすべて FDA で臨床用として認可されたものである。GMP 管理下に空気清浄装置の完備された細胞処理施設で製造と品質管理を行い、製薬のノウハウをそのまま活かして、なるべく一定の品質で安全性の高い DC 製剤を製造することが配慮されている (表)。

今後の展望

治療に用いる細胞は個人差があり、また、病期や治療によってもさまざまな影響を受ける。その細胞を生体外で加工することによって製造した細胞製剤の品質を一律にすることは容易ではなく、GMP レベルの製造基準に準拠することが臨床試験を科学的

に評価して行くためには必要と考えられる。同時に、微生物や不純物の混入をなくし、安全な品質の製剤を製造するためにも必須である。このような細胞製造システムの管理が今後ますます重要となる。

一方、免疫反応の多くは HLA に拘束されたペプチド特異的である。現在進行中の DC 療法は、特定の HLA を有する患者を対象に 9 個のアミノ酸からなるペプチドを抗原として用いる特異的な反応を検討するものと、HLA を特定せずに腫瘍融解液や蛋白質を用いて未知の特異的な反応を期待するものの 2 つに大別される。前者は対象を絞りこんでいるために明らかな有効性が認められたならば明解な結論が得られるものの、対象患者が限られるため、臨床試験を進めるのに時間がかかる。一方、後者では多数の患者を対象に検討し得るものの、明らかな有効性が出てもその先に進みにくい可能性があり、逆に有効性が低い場合には何を検討したか、それ自体が不明瞭になる。いずれのアプローチがよいかは現在のところ明らかではないものの、出てくる結果に関してはその評価に十分留意する必要がある。

評価する方法も重要である。明らかな臨床的效果が認められる場合はよいが、微妙な生体内の特異的な免疫反応を検出するだけの場合も多い。また、臨床的に認められた効果が免疫反応により特異的に出現したものか否かを明らかにする必要がある。特異的な CTL の頻度が増加したことを測定することは必ずしも容易ではないが、従来の limiting dilution assay の他に、ELISPOT assay や Tetramer を用いる方法も報告されており、臨床試験実施のためには重要である。

文 献

- 1) Hart DNJ : Dendritic cells : Unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 90 : 3245-3287 1997
- 2) Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt, Liu YJ : Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science 283 : 1183-1186 1999
- 3) Fernley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN : Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. Blood 93 : 728-736 1999
- 4) Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP : Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nat Med 2 : 1096-1103 1996
- 5) Lynch DH, Andreasen A, Maraskovsky E, Whitmore J, Miller RE, Schuh JCL : Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. Nat Med 3 : 625-631 1997

- 6) Arrighi JF, Hauser C, Chapuis B, Zubler RH, Kindler V : Long-term culture of human CD34+ progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor Induces extensive amplification of a CD34-CD14- and CD34-CD14+ dendritic cell precursor. *Blood* 93 : 2244-2252 1999
- 7) Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D : Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 3 : 558-561 1997
- 8) Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, Popat U, Claxton DF, Kliche KO, Andreeff M, Champlin RE : Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 89 : 1133-1142 1997
- 9) Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S : Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine : dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4 : 594-600 1998
- 10) 高上洋一, 西條長宏 : Cell Therapy : 3. 細胞免疫療法のガイドライン案. 臨床腫瘍研究最前線 8 : 30-35 1998
- 11) Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engelman EG, Levy R : Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2 : 52-58 1996
- 12) Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D : Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4 : 328-332, 1998
- 13) Salgaller ML, Tjoa BA, Lodge PA, Ragde H, Kenny G, Boynton A, Murphy GP : Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer. *Crit Rev Immunol* 18 : 109-119 1998
- 14) Peshwa MV, Shi JD, Ruegg C, Laus R, van Schooten WC : Induction of prostate tumor-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocytes in vitro using antigen-presenting cells pulsed with prostatic acid phosphatase peptide. *Prostate* 36 : 129-138 1998