

77. がん幹細胞を標的とする胃癌腹膜播種の免疫治療

辻谷 俊一

鳥取大学 医学部附属病院 がんセンター

Key words : がん幹細胞, 樹状細胞ワクチン療法, 難治性腹水濾過濃縮再静注法, 腹膜播種

緒 言

漿膜浸潤胃癌の再発形式の約 50%は腹膜播種であり、腹膜播種症例の 5 年生存率は 10%以下と不良である。これまで、腹膜播種の治療や予防のために、OK-432、cisplatin、etoposide、低浸透圧 cisplatin の動物実験や臨床試験で腹腔内化学療法の有用性を報告したが、治療成績は限られており、腹膜播種の根治には全く異なるアプローチが必要と考えられた。

これまでに腫瘍内で自己複製能と腫瘍を構成する種々の分化系統の癌細胞を生み出す能力を持つがん幹細胞の存在が実証された¹⁾。がん幹細胞は細胞周期の静止期を維持し、放射線療法や抗がん剤耐性の一因となっている。幹細胞は Hoechst13342 蛍光色素の排出能が高く、Side population (SP) 細胞として同定に用いられる。以前に CD44⁺胃癌の予後が不良と報告したが²⁾、胃癌細胞株の CD44⁺分画に幹細胞が存在する可能性が示され³⁾、SP 細胞は腹膜転移形成能が高く、インテグリンや CD44 の発現が高度であった⁴⁾。

CD8⁺T 細胞が認識するがん抗原が同定されて依頼、種々のがん抗原を用いたワクチン療法の開発が続いている。がん細胞の多様性に対応するには樹状細胞に多種類のがん抗原を効率よく標的し、樹状細胞の成熟化、サイトカイン産生誘導をはかる必要がある。樹状細胞ワクチン療法の有用性は、これまでの治療例の解析をもとに報告されている^{5,6)}。がん細胞は種々の免疫抑制分子を分泌し、胃癌でも TGF- β 、IL-10、VEGF、MICA などが免疫抑制に働いている。免疫抑制克服には細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導で CD4⁺および CD8⁺T 細胞へのクロスプレゼンテーションが必要で、腫瘍細胞と樹状細胞の細胞融合などの工夫が重要である⁷⁾。

今回の研究では、胃癌腹膜播種に対する有効な免疫治療を開発するために、胃癌幹細胞の免疫治療に対する特性を明らかにし、また腹水中がん細胞を利用した樹状細胞ワクチン療法の可能性について調べた。

方 法

1. ヒト培養胃癌細胞におけるがん幹細胞の免疫抑制能

CD44⁺細胞ががん幹細胞として報告されているヒト培養胃癌細胞 MKN45、MKN74 を用いて、FACS にて CD44⁺細胞と CD44⁻細胞の分画に分け、TGF- β 、IL-10、VEGF、MICA などの免疫抑制因子の発現を FACS にて解析し、CD44⁺がん幹細胞の免疫抑制能を CD44⁻細胞と比較して明らかにした。

2. がん腹膜播種症例腹水中のがん細胞に対する免疫治療

がん性腹水中のがん細胞を腹水濾過濃縮再静注法 (CART) によって濾過フィルター内に回収し、FACS にてがん細胞を分離した。十分ながん細胞数を回収するために、腹水を 1 回に全量除去することが可能な KM-CART を用いてがん細胞を回収した。がん細胞の lysate をパルスした樹状細胞による高度進行腹膜播種症例に対し、臨床例での治療開発を試みた。

結 果

1. ヒト培養胃癌細胞におけるがん幹細胞の免疫抑制能

胃癌細胞株 MKN45、MKN74 を用いて FACS にてがん幹細胞と報告されている CD44⁺細胞と CD44⁻細胞の分画に分け、細胞内サイトカインの発現を調べた。がん幹細胞では TGF- β の発現が亢進し、IL-10、VEGF の発現も高かった。しかし、CD44⁺細胞で誘導した健常人由来の CTL は CD44⁻細胞で誘導した CTL と同様の CTL 感受性を示した。

2. がん腹膜播種症例腹水中のがん細胞に対する免疫治療

腹膜播種を有するがん患者 16 例においてがん性腹水中のがん細胞を CART により濾過フィルター内に回収し、FACS によって CD45⁻EpCAM⁺がん細胞を分離した。すべての症例で 2.4×10^5 個以上のがん細胞を回収することができた。

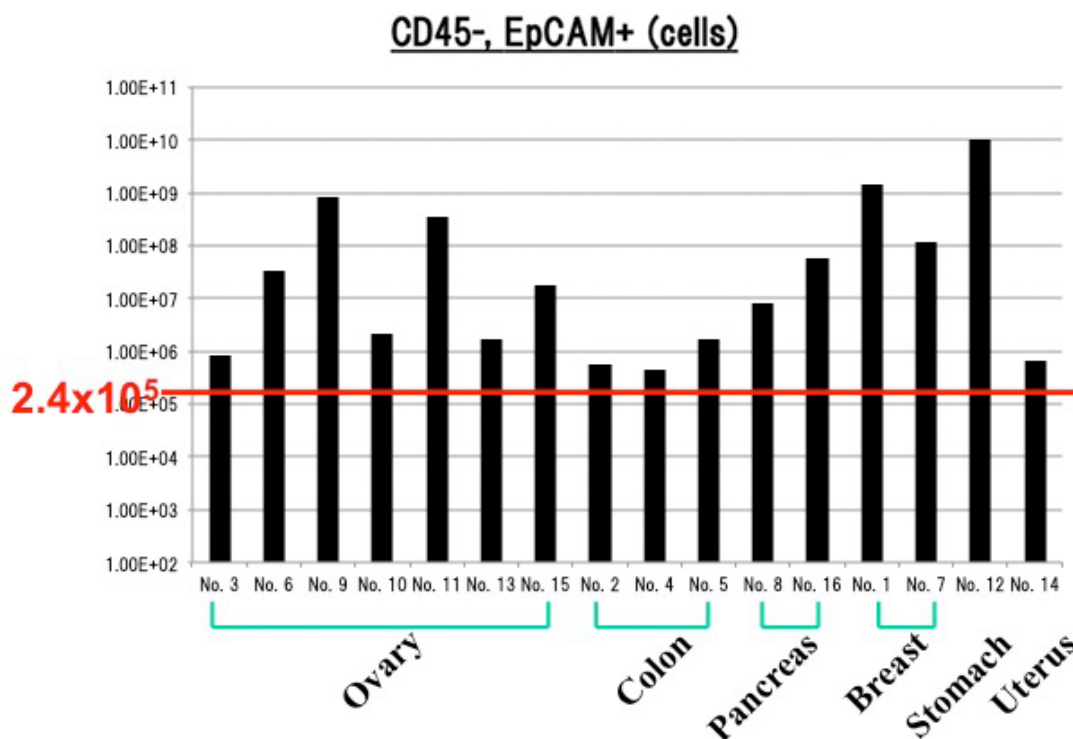


図 1. CART にて回収された腹水中がん細胞数

改良型の CART により全腹水を除去すると、すべての症例で 2.4×10^5 個以上のがん細胞を回収することができた。

考 察

これまで多くの研究が種々の腫瘍においてがん幹細胞の存在を報告し、がん幹細胞の臨床的重要性が明らかになった。がん幹細胞はがん全体の中ではきわめて頻度が低く、がん幹細胞特異的に傷害できる治療法が臨まれている。その点、抗原分子に特異的に反応する免疫療法は、がん幹細胞治療における有力な治療法となりうると考えられる。

これまでの報告と同様に、今回の研究から胃癌のがん幹細胞も TGF- β 、IL-10、VEGF の発現が亢進しており、高度な免疫回避機構を有することが示された。一方で、胃癌のがん幹細胞はそれ自身が免疫治療に抵抗性なのではなく、局所の免疫回避機構によって守られている可能性が示唆された。したがって、樹状細胞ワクチン療法のような抗原特異的免疫療法により、がん幹細胞を標的とした治療が有効性を示す可能性は高いと考えられた。

がん性腹水中の遊離がん細胞は、がん免疫療法において宿主特異的ながん抗原を得るための理想的な材料となりうる。がん細胞分画を分離し、lysate を作製し、それを樹状細胞にパルスすることによって、有効な多様ながん抗原に反

応する CTL を誘導できると考えられる。その場合、免疫治療を臨床的に行うために十分な量のがん細胞数を得ることが重要だが、従来の CART では、1 回の腹水除去が 3 L 程度であり、十分な量のがん細胞の採取は困難と考えられた。そこで、改良型の CART である KM-CART を用い⁸⁾、1 回で腹水の全量除去と腹腔内遊離癌細胞の全量回収を試みた。今回の研究で、KM-CART を用いて腹水中がん細胞を回収し、CD45-EpCAM⁺がん細胞を分離することによって、臨床的に治療応用が可能ながん細胞数が得られることを確認した。今後は、臨床試験計画に基づいて、腹水中がん細胞の lysate をパルスした樹状細胞ワクチン療法の有効性について検討していく予定である。

文 献

- 1) Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645-8. PubMed PMID: 7509044.
- 2) Saito H, Tsujitani S, Katano K, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Serum concentration of CD44 variant 6 and its relation to prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer*. 1998 Sep 15;83(6):1094-101. PubMed PMID: 9740073.
- 3) Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*. 2009 May;27(5):1006-20. doi: 10.1002/stem.30. PubMed PMID: 19415765; PubMed Central PMCID: PMC2746367.
- 4) Nishii T, Yashiro M, Shinto O, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. Cancer stem cell-like SP cells have a high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma. *Cancer Sci*. 2009 Aug;100(8):1397-402. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01211.x. Epub 2009 May 6. PubMed PMID: 19493275.
- 5) Kobayashi M, Shimodaira S, Nagai K, Ogasawara M, Takahashi H, Abe H, Tanii M, Okamoto M, Tsujitani S, Yusa S, Ishidao T, Kishimoto J, Shibamoto Y, Nagaya M, Yonemitsu Y; DC Vaccine Study Group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT).. Prognostic factors related to add-on dendritic cell vaccines on patients with inoperable pancreatic cancer receiving chemotherapy: a multicenter analysis. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 Aug;63(8):797-806. doi: 10.1007/s00262-014-1554-7. Epub 2014 Apr 29. PubMed PMID: 24777613.
- 6) Takahashi H, Shimodaira S, Ogasawara M, Ota S, Kobayashi M, Abe H, Morita Y, Nagai K, Tsujitani S, Okamoto M, Suzuki Y, Nakanishi Y, Yonemitsu Y; DC Vaccine Study Group at the Japanese Society of Immunotherapy and Cell Therapy.. Lung adenocarcinoma may be a more susceptible subtype to a dendritic cell-based cancer vaccine than other subtypes of non-small cell lung cancers: a multicenter retrospective analysis. *Cancer Immunol Immunother*. 2016 Sep;65(9):1099-111. doi: 10.1007/s00262-016-1872-z. Epub 2016 Jul 22. PubMed PMID: 27448677.
- 7) Matsumoto S, Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M. Allogeneic gastric cancer cell-dendritic cell hybrids induce tumor antigen (carcinoembryonic antigen) specific CD8(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2006 Feb; 55(2):131-9. Epub 2005 May 13. PubMed PMID: 15891883.
- 8) Japanese CART Study Group., Matsusaki K, Ohta K, Yoshizawa A, Gyoda Y. Novel cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy (KM-CART) for refractory ascites associated with cancerous peritonitis: its effect and future perspectives. *Int J Clin Oncol*. 2011 Aug;16(4):395-400. doi: 10.1007/s10147-011-0199-1. Epub 2011 Feb 24. PubMed PMID: 21347629.