

消化器癌に対する新たな免疫療法をめざしたヒト樹状細胞/
癌細胞融合ワクチンの作製に関する基礎的研究
——融合細胞作製の融合効率, 融合細胞の機能的,
形態的特徴を中心に——

榎本 康之¹ 本間 定^{1,2} 幡場 良明³
原 栄一⁴ 銭谷 幹男¹ 大野 典也²

¹ 東京慈恵会医科大学消化器・肝臓内科

² 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所悪性腫瘍治療研究部

³ 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子細胞生物学研究部

⁴ 埼玉県立がんセンター研究室

(受付 平成 15 年 11 月 6 日)

STUDIES ON GENERATION OF FUSION CELL-VACCINE OF
HUMAN DENDRITIC CELL AND CANCER CELL
FOR NOVEL IMMUNOTHERAPY OF
GASTROINTESTINAL MALIGNANCIES

Yasuyuki ENOMOTO¹, Sadamu HOMMA^{1,2}, Yoshiyuki HATABA³,
Eiichi HARA⁴, Mikio ZENIYA¹, and Tsuneya OHNO²

¹ *Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal medicine,
The Jikei University School of Medicine*

² *Division of Molecular Cell Biology, Institute of DNA Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

³ *Division of Oncology, Institute of DNA Medicine, The Jikei University School of Medicine*

⁴ *Division of Cell Therapy, Saitama Cancer Center*

Vaccination with fusion cells (FCs) of dendritic cells (DCs) and cancer cells induces antitumor immunity in animal models and has been tested without severe adverse effects in human patients. Here, we describe the fusion efficacy of autologous human DCs and cancer cells for generating FCs by treatment with polyethylene glycol (PEG) and the functional and morphologic characteristics of FCs. DCs stained with green fluorescent dye (PKH-2GL) and cancer cells stained with a red fluorescent dye (PKH-26) were admixed and treated with PEG. After overnight incubation, the frequency of FCs, which exhibited both green and red fluorescences, among PEG-treated cells was determined. FCs were present in both the adherent and nonadherent cell fractions at frequencies of approximately 30%. However, with cells from a case of colon cancer FCs comprised 70% of adherent cells and 3% of nonadherent cells. FCs of DCs and colon cancer cells in the adherent cell fraction expressed the DC markers HLA-DR and CD86. Naive peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a patient with colon cancer co-cultured with FCs for 7 days secreted substantial amounts of interferon- γ when incubated with autologous cancer cells, whereas untreated PBMCs did not. Scanning

electron microscopy showed a DC that had apparently infiltrated a gastric cancer cell after PEG-treatment, generating a cell with unique cell processes. DCs and hepatocellular carcinoma cells were attached firmly, suggesting that the attached faces of both cells had likely fused. Some colon cancer cells had thick and uneven microvilli after treatment with PEG and attracted T lymphocytes. These findings demonstrate that FCs of DCs and cancer cells are successfully generated by treatment with PEG.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004; 119: 99-115)

Key words: dendritic cell, cancer vaccine, cell fusion, polyethylene glycol, immunotherapy

I. 緒 言

特異的 T 細胞受容体に認識される癌抗原の遺伝子が次々にクローニングされ、同時にこれらの分子の抗原性ペプチドの構造も明らかとなり¹⁾、癌細胞に対する免疫系の反応が分子レベルで解明されつつある。T 細胞の標的となる癌抗原は核蛋白、細胞質蛋白、膜蛋白のいずれにも存在し、T 細胞受容体に認識される癌抗原ペプチドは、これらの蛋白がプロテアソームなどでプロセッシングをうけ、粗面小胞体を経由して主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, 以下 MHC) class I 分子上に提示される¹⁾。この抗原性ペプチドを認識して反応する T 細胞はおもに CD8 を発現する T リンパ球であり、特異的受容体で MHC class I 分子上のペプチドを認識した CD8⁺T 細胞は、細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocytes, 以下 CTL) として Perforin-Granzyme, Fas-Fas L などの反応を介して癌細胞にアポトーシスを誘導する²⁾。CTL の標的抗原を発現している癌の担癌個体に、人為的に抗原特異的な免疫反応を誘導すれば、治療効果を示す抗腫瘍免疫が誘導される可能性が考えられる。抗原性ペプチドが大量かつ容易に合成できることより、このようなペプチドをワクチンとして使用する抗原特異的癌免疫療法が試みられている³⁾⁴⁾。

一方、癌細胞が元来このような免疫系に認識される抗原を発現していても、実際の進行癌症例では、その自然経過において癌に対する強力な免疫学的抑制が機能することは極めて稀であり、多くの場合、癌は容易に進展を続ける。その要因のひとつは、癌細胞が T 細胞に対して抗原提示と感作成立を行うために必須な分子である共刺激分子 (costimulatory molecule) を発現していないことで、その結果 T 細胞は癌抗原に対して末梢性免疫

寛容の状態にあると考えられている⁵⁾。

T 細胞に抗原特異的な活性化を成立させるためには、生体内の専門的抗原提示細胞 (professional antigen presenting cell) が抗原を取り込み、MHC 分子上にその抗原性ペプチドを結合させて、T 細胞に提示する必要がある。樹状細胞 (dendritic cell, 以下 DC) は生体内の強力な専門的抗原提示細胞であり、未感作 T 細胞に抗原特異的活性化を付与する primary immune response を担う免疫細胞である⁶⁾⁷⁾。DC は感染症に対する生体防御の上で非常に重要な細胞であるが、同時に癌抗原を T 細胞に提示する能力を有していることも示されている⁸⁾。このことより、DC を用いて T 細胞に癌抗原に対する抗原特異的活性化を誘導し、担癌患者の体内に癌の進展や転移を抑制する抗腫瘍免疫を誘導することを目的とした細胞免疫療法が注目されるようになった⁹⁾¹⁰⁾。DC はサイトカインを用いた大量培養が可能となったことより、臨床使用への道が開けつつあり¹¹⁾¹²⁾、癌に対する細胞免疫療法という新たな治療体系の確立の可能性をもたらした。

癌抗原の抗原性ペプチドを DC に取り込ませたり¹³⁾、または、抗原遺伝子を DC に導入すると¹⁴⁾、これらの DC により T 細胞は活性化され、抗原特異的な抗腫瘍免疫が誘導されることが示された。しかし、遺伝子異常が積み重なって発症、進展するヒト癌においては、癌抗原は経過中構造を変化させたり、消失したりする可能性が考えられる。そこで、単一の癌抗原に対する CTL の反応に限定せず、いくつかの抗原エピトープに対する複数の CTL クローンが活性化されるほうが、高い抗腫瘍効果が得られることが期待される。また、個々の癌症例は既知の癌抗原以外に、細胞の癌化に伴う遺伝子変異により発現される固有の癌抗原 (individually unique antigen)¹⁵⁾¹⁶⁾ や、現時点では未同

定の癌抗原を発現している可能性があり、未知、既知の癌抗原を含んだ癌細胞全体の抗原性を治療に用いる方が高い治療効果が得られる可能性がある。

近年、DCと癌細胞の融合細胞による特異的癌免疫の誘導が報告された¹⁷⁾。この方法はプロテアソームのような細胞内小器官を利用して癌抗原ペプチドをMHC class I結合性の内因性抗原として提示すると同時に、DCの発現する共刺激分子とともに癌抗原を細胞障害性Tリンパ球およびヘルパーTリンパ球に提示する利点を有している¹⁸⁾¹⁹⁾。融合細胞作製の目的は、癌細胞にDCの持つ抗原提示機能を付与し、癌細胞自身を抗原提示細胞化させることにあるといえる。DCの特性を保持した融合細胞は、融合相手の細胞である癌細胞の発現する癌抗原をTリンパ球に提示し、癌抗原を認識するTリンパ球を活性化、増殖させ、Tリンパ球を中心とした抗腫瘍免疫を誘導すると考えられる。

近年、DCと癌細胞の融合細胞を用いた癌免疫療法の臨床第1相試験が脳腫瘍やメラノーマで報告され²⁰⁾²¹⁾、重篤な副作用が無く、安全に施行可能であることが示された。融合細胞を用いた免疫療法では、治療に用いる融合細胞の質が重要な要素である。われわれは、マウスDCと腫瘍細胞の融合細胞の作成と、その抗腫瘍免疫誘導能につき検討し報告してきた²²⁾²³⁾。これらの知見を基に、東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認のもと、同大附属医院において進行癌に対するDCと癌細胞の融合細胞を用いた癌免疫療法のパイロットスタディが進行中である。これらの臨床研究のために作製されたヒトDCと癌細胞の融合細胞につき、その作製効率、機能、形態につき検討したのでここに報告する。

II. 材料と方法

1. DCの採取

DCの採取は、東京慈恵会医科大学附属医院本院で施行中の進行癌に対する自己DCと癌細胞の融合細胞を用いた癌免疫療法に関する基礎研究(東京慈恵会医科大学倫理委員会承認10-32(2677))、と臨床研究(東京慈恵会医科大学倫理委員会承認10-33(2678))に関連して採取された癌

患者末梢血単核球細胞(peripheral mononuclear cells, 以下PBMC)を用い、臨床応用のためのFCの品質管理の一環としてヘルシンキ宣言の遵守のもとに施行された。PBMCからのDCの培養はSallustoら¹²⁾の方法によった。各症例より十分な説明と同意を得て、約30mlの末梢血をヘパリン採血した。Ficoll遠心分離法を用いてPBMCを採取した。DCの培養は、すべて専用のP2培養施設で行った。5%非働化自己血清添加RPMI-1640培地(Nissui Pharmaceutical Co. Tokyo, Japan)に細胞を浮遊させ、24穴培養プレートに 10^6 cells/wellで細胞を植え込み、 37°C で1時間培養後、浮遊細胞を洗浄除去し、付着細胞分画を得た。この付着細胞をrh GM-CSF(Becton Dickinson, Bedford, MA, 10 ng/ml)、rh IL-4(Becton Dickinson, 10 ng/ml)およびrh TNF- α (Becton Dickinson, 10 ng/ml)を添加した5%非働化自己血清添加RPMI-1640培地で10日間培養した後、浮遊または緩やかに付着したDCをピペット操作により採取した。30mlの患者末梢血より $1-2 \times 10^6$ のDCが採取可能であった。フローサイトメトリーによる解析では、これらのDCはCD80、CD83、CD86、HLA-DRなどのDCマーカーを発現し、MHC typeの異なるTリンパ球との混合培養(allogenic mixed leukocyte reaction)の系においてTリンパ球の増殖反応を誘導するの機能を示した(data not shown)。

2. 癌細胞の培養

治療に用いる癌細胞の培養は専用のP2培養施設で行った。癌細胞の培養は患者より十分な説明と同意を得たうえ、治療または検査用に採取した癌性腹水または癌性胸水、手術時に採取された腫瘍組織、生検により採取された癌転移リンパ節組織などの一部を用いて行った。癌細胞を採取し、FC作製につき検討した症例をTable 1に示した。癌性胸腹水はPBSで2-3倍に希釈後、1,500 rpm、10分の遠心で得られた細胞を10%FCS添加DMEM培地(Nissui Pharmaceutical Co. Tokyo, Japan)に浮遊させ、 10^6 /mlの濃度で25 cm^2 collagen coated flask(Iwaki, Tokyo, Japan)で5% CO_2 下に培養した。腫瘍組織、生検組織からの癌細胞の初代培養は、細切した腫瘍組織をPBSで洗浄後、酵素処理(0.1% コラゲナー

Table 1. Cases of malignancies in which fusion efficacy of dendritic cells and tumor cells was examined.

Case	Diagnosis
1. 37y, M	Epithelioid sarcoma
2. 32y, M	Colon cancer
3. 33y, F	Gastric cancer
4. 46y, F	Gastric cancer

ぜ, 和光純薬, 大阪, 37°C, 4 時間処理, または 1,000 U/ml デイスペーゼ, 合同酒精, 東京, 37°C, 30-60 分処理) を行い, 得られた単離癌細胞を 8%FCS 添加 TIL 培地 (Immuno-Biological Lab. Fujioka, Japan), または 10%FCS 添加 DMEM 培地に浮遊させ, 10⁶/ml の濃度で 25 cm² collagen coated flask に植え込み, 5% CO₂ 下に培養した. 増殖の良好な癌細胞は 0.05% trypsin+0.01% EDTA を用いて継代培養を行った.

3. DC と癌細胞の融合細胞の作製

DC は癌細胞と融合する前に, その培養液の細菌汚染検査とエンドトキシン汚染検査を施行した. これらの汚染の無いことを確認の上, DC と癌細胞の細胞融合を Gong ら¹⁷⁾ の方法を改変して行った²³⁾. 培養されている癌細胞を 0.05% trypsin+0.01% EDTA 処理により剥離させ, DC と癌細胞を 2:1 の比率で混合し, 1,200 回転, 5 分の遠心を行った. 遠心後上清を除き, 沈澱した細胞に 37°C に加温した 50% polyethyleneglycol (PEG1450, Sigma Chemical Co., St Luis, MO) 1 ml を加え, 正確に 1 分間インキュベートした. 37°C に加温した無血清の RPMI-1640 7 ml を 7 分間かけて加え PEG を希釈した後, 遠心により PEG を除いた. rh GM-CSF (10 ng/ml), rh IL-4 (10 ng/ml) および rh TNF- α (10 ng/ml) を添加した 5% 非働化自己血清添加 RPMI-1640 培地に PEG 処理した細胞を浮遊させ, 1 晩培養した. 浮遊状態および軽く culture plate に付着している細胞はピペット操作で回収し, 付着細胞は 0.05% trypsin+0.01% EDTA により剥離させて回収した. それぞれの細胞を 5% 非働化自己血清添加 PBS で 3 回洗浄し, 以下の実験に使用した.

4. 融合効率の検討

DC と癌細胞の融合効率は以下の方法で検討

した. DC は PKH-2GL (緑色蛍光), 癌細胞は PHK-26 (赤色蛍光)²⁴⁾ で融合前に染色した. これらの細胞を PEG 処理で融合させ, 1 晩培養後, 上記のように浮遊細胞分画と付着細胞分画を採取した. それぞれの細胞を蛍光顕微鏡 (LSM 410, KARL ZEISS, Germany) を用いて観察し, 100 の細胞について赤, 緑の両方の蛍光, または中間の橙色の蛍光を発する細胞の数を算定した. 変法として, PKH-26 で染色した癌細胞と, 無染色の DC を PEG 処置して 1 晩培養し, 浮遊細胞, 付着細胞を採取した. この細胞を FITC 標識抗 HLA-DR 抗体 (PharMingen, San Diego, CA), または FITC 標識抗 CD86 抗体 (PharMingen) で染色し, 蛍光顕微鏡下に 100 の細胞を観察して, 赤と緑の両方の蛍光, または中間の橙色の蛍光を発する細胞の比率を算定した.

5. フローサイトメトリーによる検討

DC と癌細胞の融合細胞について DC の細胞表面マーカーの発現の有無をフローサイトメトリーで検討した. FC を FITC 標識抗 HLA-DR, または FITC 標識抗 CD86 抗体で染色し, 2% paraformaldehyde で固定し, フローサイトメトリーにより解析した. フローサイトメトリー上の FC の位置を決定するために, PKH-26 で染色した癌細胞と, PKH-2GL で染色した DC を PEG 処理し, 2 色の蛍光を発する細胞の存在する領域を複数の解析によって前もって決定しておき, その領域にゲートをかけて解析を行った. 使用した装置は FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) であり, ヒストグラムなどの作成は Cell Quest software package system (Becton Dickinson, San Jose, CA) を使用して行った.

6. FC のリンパ球刺激能の検討

FC の抗原提示細胞としての T リンパ球の刺激能を以下の方法で検討した. 上述のように DC と癌細胞を混合して PEG 処理し, 1 晩培養後, 浮遊細胞分画と付着細胞分画の FC を採取した. 癌細胞の由来した患者 (免疫療法未施行) から採取した PBMC と浮遊細胞分画または付着細胞分画の FC と混合培養した. FC と PBMC の数比を 1:200 とし, RPMI-1640+10%FCS 培地に rh interleukin-2 (IL-2) 20 U/ml を加えて 7 日間培養し

た。コントロールとしてFCを加えず、IL-2添加のみで7日間培養したPBMCを用いた。培養後PBMCの数を算定し、PBMCを 5×10^5 /well、癌細胞を 10^4 /wellで24穴培養プレートに植え込み、2日間混合培養した。培養上清を採取して遠心し、培養液中に分泌されたインターフェロン- γ (以下IFN- γ)をELISA kit (Biosource, Camarillo, CA)を用いて定量した。

7. 走査電子顕微鏡 (SEM) による細胞の観察

浮遊細胞は遠心 (1,500 rpm, 10分) で回収し、1.2% グルタルアルデヒド液 (350 mOs, pH 7.4) で固定 (24時間) 後、0.1% ポリ-L-リシンをコートしたスライドガラス上に細胞を付着させ、アルコール系列で脱水、酢酸イソアミルで置換後、液

化炭酸による臨界点乾燥 (HCP-2, 日立, 東京) の後、金パラジウムのイオンスパッターコーティング (MSP-10, 真空デバイス, 茨城) を行った。

付着細胞は細胞が培養されている plastic culture plate の一部を切り出し、1.2% グルタルアルデヒド液 (350 mOs, pH 7.4) で固定 (24時間)、アルコール系列で脱水、液化炭酸による臨界点乾燥の後、金パラジウムのイオンスパッターコーティング (MSP-10) を行った。これらの浮遊・付着細胞は走査電子顕微鏡 (JSM-5800LV, 日本電子, 東京) を用いて加速電圧 10-15KV で観察した。

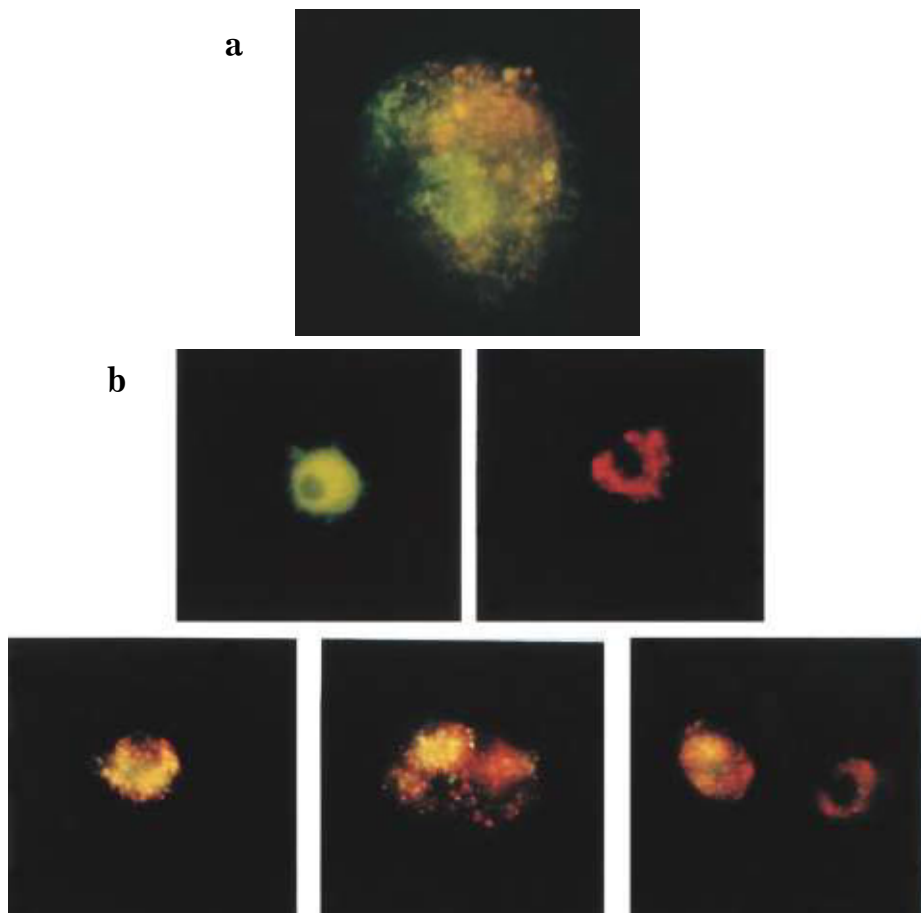


Fig. 1. Fluorescence microscopic view of fusion cells of autologous dendritic cells and cancer cells. a: Cells generated by treatment of PKH-2GL (green)-stained dendritic cells and PKH-26 (red)-stained cancer cells with polyethylene glycol (PEG) b: Upper; Left, dendritic cells stained with PKH-2GL. Upper right, cancer cells stained with PKH-26. Lower; Fusion cells generated by treatment of stained dendritic cells and cancer cells with PEG.

Table 2. Fusion efficacy of DCs and cancer cells. Dendritic cells (DCs) were stained with green fluorescent dye (PKH-2GL), and cancer cells with red one (PKH-26). Cancer cells and DCs were admixed and treated with 50% polyethylene glycol as described in the text. After overnight incubation, adherent and nonadherent cells were collected and observed under a fluorescence microscope. Per cent cells exhibiting both red and green fluorescence was determined by counting 100 cells.

Case	Fusion efficacy	
	Cell type	Per cent
1. Epithelioid sarcoma	Adherent	23
	Non-adherent	18
2. Colon cancer	Adherent	32
	Non-adherent	48
3. Gastric cancer	Adherent	23
	Non-adherent	25
4. Gastric cancer	Adherent	68
	Non-adherent	3

Table 3. Fusion efficacy of DCs and cancer cells. Human colon cancer cells were stained with red fluorescent dye (PKH-26). Autologous dendritic cells and the PKH-26-stained cancer cells were admixed and treated with 50% polyethylene glycol as described in the text. After overnight incubation, adherent and non-adherent cells were collected, admixed, and treated with FITC labeled anti-human HLA-DR or anti-human CD86. Per cent of cells exhibiting red and/or green fluorescence was determined by counting 100 cells under a fluorescence microscope. Cells with red fluorescence were identified as unfused cancer cells, those with green fluorescences as unfused DCs and those with red and green fluorescences as FCs.

FITC labeled antibody	Fluorescence		
	Red (PKH-26)	Green (FITC)	Red and Green
Anti-HLA-DR	58%	7%	35%
Anti-CD86	49%	24%	27%

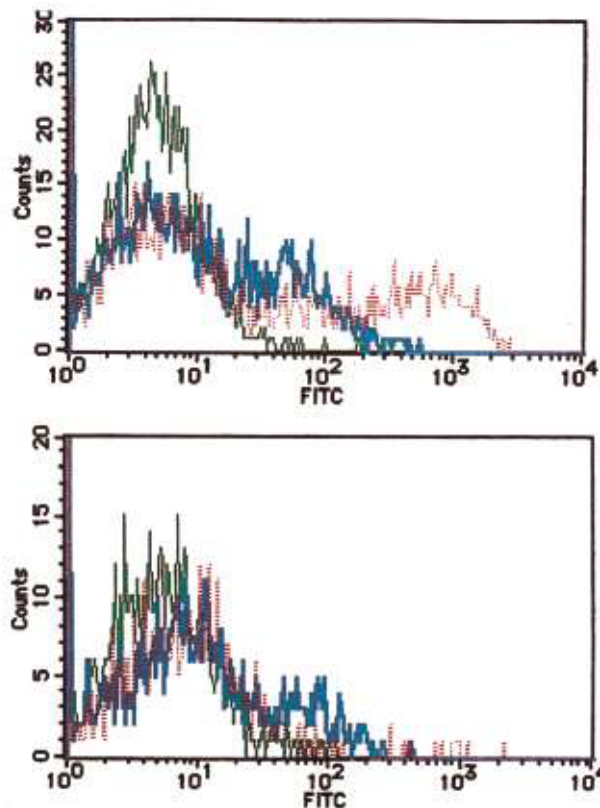


Fig. 2. Flow cytometric analysis on fusion cells of autologous dendritic cells and colon cancer cells. Colon cancer cells and autologous dendritic cells were admixed and treated with polyethylene glycol as described in the text. After overnight incubation, adherent and non-adherent cells were collected. Cells in each fractions were stained with FITC labeled anti-human HLA-DR and anti-human CD86, respectively, and analyzed by flow cytometry. Upper; adherent cells, Lower; non-adherent cells. Red; anti-HLA-DR, Blue; anti-CD86, Green; isotype control antibody

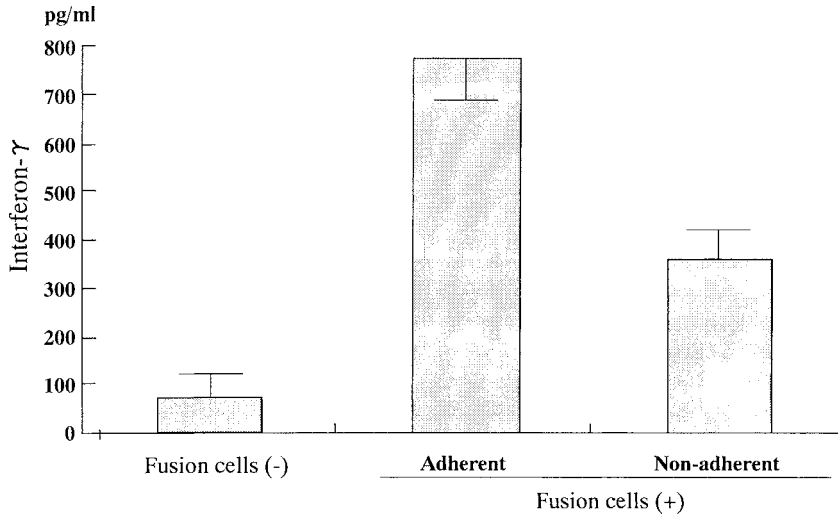


Fig. 3. Stimulation of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by fusion cells of dendritic cells and cancer cells. Naive PBMC were collected and co-cultured with adherent or non-adherent fusion cells of autologous dendritic cells and cancer cells for 7 days (Stimulator: Responder ratio 1:200). Resultant PBMC were incubated with the cancer cells for 2 days. Interferon- γ secreted by the PBMC was examined by EIA. Bars indicate standard deviation.

III. 結 果

1. PEG 処理による癌細胞と DC の融合効率の検討

消化器癌を含む各種悪性腫瘍患者より腫瘍細胞を培養し、株細胞として樹立された 5 種の腫瘍細胞株を用いた。うち 4 例では、腫瘍細胞を赤い蛍光色素である PKH-26 で染色し、DC は緑の蛍光色素 PKH-2GL で染色した後、PEG で融合処理を行った。1 晩培養後、付着細胞と浮遊細胞を別々に採取し、蛍光顕微鏡下で 100 の細胞につき発する蛍光色素の色を観察した。赤と緑の両方の蛍光、または混合して橙色の蛍光を発している細胞を FC として算定した。典型的な FC の像を Fig. 1 に示す。細胞は腫瘍細胞単独よりやや大型で、細胞全体に赤と緑、および中間の橙色の蛍光が認められる。

類上肉腫 1 例、大腸癌 1 例、胃癌 2 例で検討した結果を Table 2 に示す。症例ごとに融合効率に差が認められたが、Case 1-3 においては PEG 処理した細胞の浮遊細胞分画、付着細胞分画の両方に FC が認められ、PEG 処理細胞の約 20-30% の細胞が FC であると考えられた。しかし、Case 4 の胃癌の症例は、FC は付着細胞分画に多く存在し、PEG 処理後の付着細胞分画の約 70% の細胞が FC と判定された。45 歳、女性の大腸癌より樹

立した細胞株と自己 DC を用いて、異なる染色法により融合効率を検討した。すなわち、前もって PKH-26 で染色した腫瘍細胞と DC を PEG 処理し、1 晩培養後、DC マーカーである HLA-DR と CD86 に対する FITC 標識抗体で処理し、同様に蛍光顕微鏡下で融合効率を検討した。その結果を Table 3 に示す。両抗体の間で若干の差が見られたが、PEG 処理細胞の約 30% が FC であると考えられた。なお、Table 2 における検討では、PEG 処理細胞の浮遊細胞と付着細胞を混合して分析した。

2. FC の表面マーカーと T 細胞刺激能の検討

DC と腫瘍細胞の FC における DC の細胞表面マーカー発現について検討した。45 歳、女性の大腸癌患者より大腸癌細胞株を樹立し、自己 DC と混合して PEG 処理を行った。1 晩培養後、浮遊細胞と付着細胞を別々に採取し、FITC 標識抗 CD86 抗体、FITC 標識抗 HLA-DR 抗体で処理し、FACS 解析を行った。Fig. 2 に示すように、付着細胞分画には明らかな CD86 (青)、HLA-DR (赤) の発現が認められた。浮遊細胞分画には CD86 陽性細胞が認められたが、HLA-DR 陽性細胞の頻度は付着細胞分画に比較して著しく低かった。

DC と腫瘍細胞の FC の T 細胞刺激能について

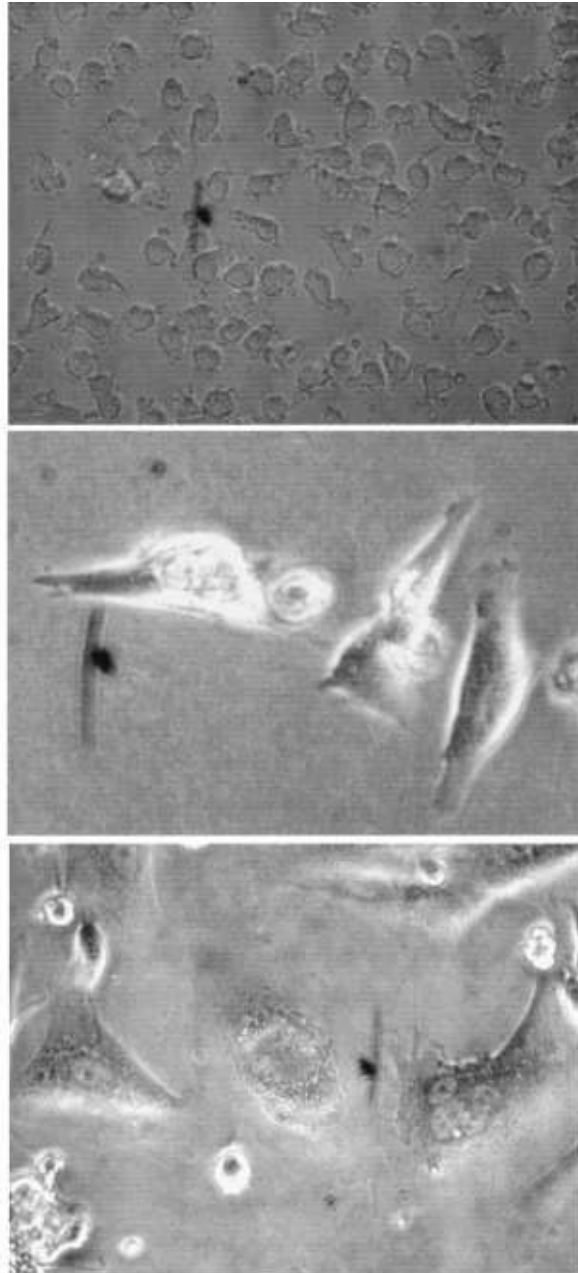


Fig. 4. Phase contrast microscopic view of dendritic cells (upper), gastric cancer cells (middle) and polyethylene glycol treated dendritic cells and gastric cancer cells (bottom). Original magnification $\times 200$.

検討した。34歳、男性の大腸癌患者より大腸癌細胞株を樹立し、自己DCとFCを作製した。FCと7日間共培養した自己PBMCは、その後腫瘍細胞と混合培養すると明らかなIFN- γ の産生を示した(Fig. 3)。T細胞刺激能は付着細胞分画のFC

の方が、浮遊細胞分画のFCに比較して強かった。FCと混合培養されなかったPBMCを癌細胞と2日間混合培養してもIFN- γ の産生は、FCと共培養されたPBMCに比較して低かった。

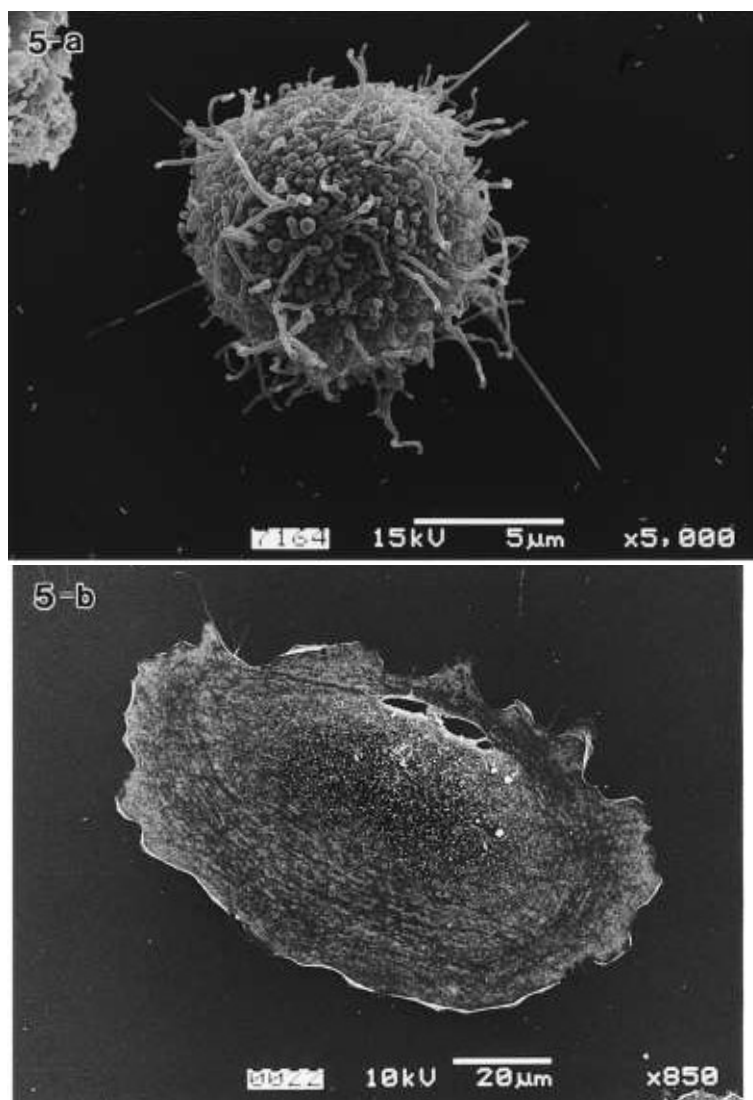


Fig. 5. Scanning electron micrograph of dendritic cell (a), gastric cancer cell (b) and polyethylene glycol treated dendritic cells and gastric cancer cell (c, d, e).

3. 走査電子顕微鏡によるFCの微細形態の観察

腫瘍細胞の細胞株が樹立された3症例について、腫瘍細胞と自己DCのPEG処理細胞を走査電子顕微鏡(SEM)で観察した。以下にその形態の特徴について示す。

1) 33歳, 男性, 胃癌

PEG処置前のDC, 胃癌細胞, DCと胃癌細胞のPEG処置8時間後の付着細胞の位相差顕微鏡像を示す(Fig. 4-a, b, c)。PEG処理後の腫瘍細胞は処理前の細胞より大型で、細胞質は顆粒状に密度が増加し、多核の細胞が散見された。SEMによ

る観察では、DCは細胞表面に特徴的な樹状突起が多数認められたが(Fig. 5-a)、腫瘍細胞の表面は細胞突起は粗であった(Fig. 5-b)。PEG処理8時間後のSEM像では、付着性の腫瘍細胞にDCが強く結合し、その境界は不鮮明で、DCが腫瘍細胞の中に侵入するように融合していくと思われる像が多数観察された(Fig. 5-c, d)。この段階ではDCと癌細胞はその表面形態の特徴から明確に区別可能であるが、DCが強く接着した癌細胞では細胞辺縁は平坦性を失い、PEG処理前には見られなかった細胞突起の進展が認められた。また、

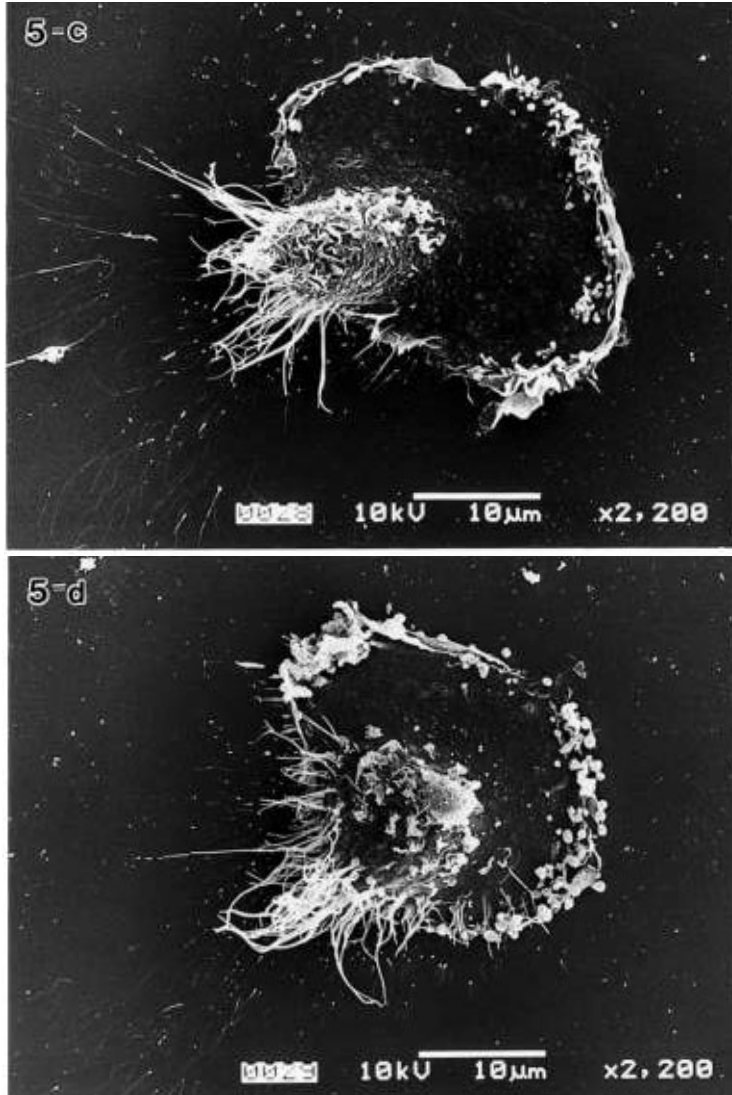


Fig. 5. Continued.

PEG 処置後は腫瘍細胞や DC とは異なり，細胞辺縁に密な線維状突起と細胞表面に顆粒状の微絨毛を有する付着細胞 (Fig. 5-e) が多数認められた。

2) 51 歳，男性，肝細胞癌

PEG 処置 8 時間後の細胞の SEM を示す。本例は PEG 処理後多くの細胞は浮遊性を示したため，pipetting により回収した細胞を SEM で観察した。Fig. 6-a は多数の突起を有する DC と肝癌細胞が付着した像であるが，固定前に充分な洗浄を行っても腫瘍細胞と DC は固く結合し，その境

界部は不鮮明であった。また，DC の表面形態を示しながら，細胞が大型となり，腫瘍細胞と境界不鮮明に結合している細胞の像も観察された (Fig. 6-b)。

3) 31 歳，女性，大腸癌

PEG 処置 8 時間後の細胞の SEM を示す。本例も PEG 処理後多くの細胞は浮遊性を示したため，浮遊細胞を回収して SEM で観察した。PEG 処理前の腫瘍細胞は，細胞表面に均一で微細な顆粒状の微絨毛の発達が認められた (Fig. 7-a)。しかし，DC と腫瘍細胞を混合して PEG 処理して

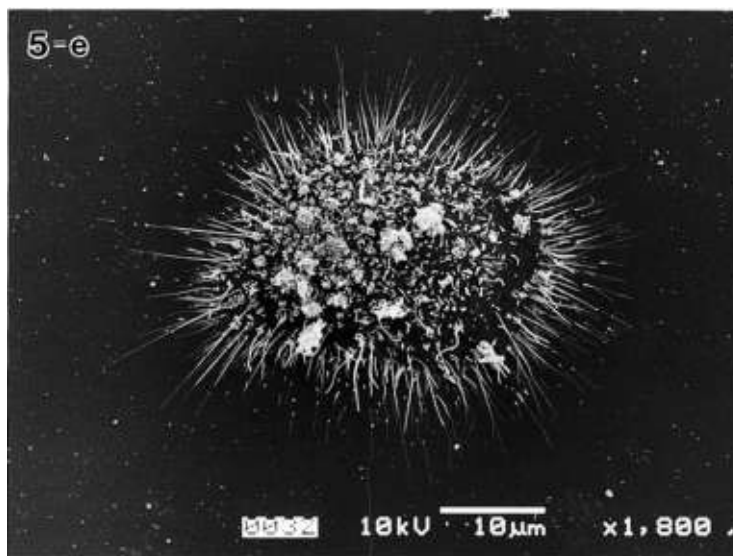


Fig. 5. Continued.

得られた細胞は腫瘍細胞とほぼ同等の大きさを示すものの、微絨毛はより太い短桿状を示した (Fig. 7-b)。また、PEG 処理後、長桿状の微絨毛を有する細胞も観察され、これらの細胞には、T リンパ球の形態的特徴を示す細胞が付着する像が観察された (Fig. 7-c)。

IV. 考 察

有効な治療法のないと考えられる進行癌症例に対して自己 DC と癌細胞の FC を癌ワクチンとして使用する癌免疫療法の臨床治験が進みつつある²⁰⁾²¹⁾。現在までの報告では、重篤な副作用は観察されず、今後有効性の向上を目指した検討が進められると考えられる。今回、われわれはこのような自己の DC と癌細胞で作製された FC につき、その融合効率、DC マーカーの発現、リンパ球刺激能、走査電子顕微鏡による超微細形態の観察など基礎的な検討を行った。この際、研究結果の解釈を確実なものとするために、癌細胞は細胞株として樹立されたもののみを使用し、かつ癌細胞の由来した患者本人から採取した DC を癌細胞の融合相手の細胞として用いて検討を行った。

近年、DC と癌細胞の FC を癌ワクチンとして使用する試みの報告が増加しつつあるか¹⁷⁾²⁰⁾⁻²³⁾²⁵⁾²⁶⁾、細胞融合の方法は多くが polyethylen glycol (PEG) 処理か、または、electropora-

tion 法を使用している。両者の細胞融合効率はほぼ同等との報告もあるが²⁵⁾、いずれの方法も若干の技術的修得と経験を必要とする。最近、vesicular stomatitis virus の細胞融合遺伝子を DC と癌細胞の融合に使用する方法が報告され²⁷⁾、FC ワクチン作製の新たな展開が示された。われわれは、マウス骨髄由来 DC と癌細胞を PEG 処理することにより FC を作成する方法について検討を重ね報告してきた²²⁾²³⁾。同方法を用いると、マウス肝癌、脳腫瘍等の系で約 30% 前後の融合効率が得られ、これらの FC が癌ワクチンとして機能しうることを示した。ヒト癌に対する FC ワクチンの臨床応用のためには、広く用いられているヒト単球由来 DC¹²⁾ とヒト癌細胞の PEG 処理による融合効率を明確にする必要がある。この際、由来の異なる DC と癌細胞を使用すると、異種免疫反応 (allogeneic immune reaction) により細胞の性質が影響を受ける可能性が考えられるため、DC と癌細胞は同一の患者から由来した細胞のみを使用して検討を行った。

融合効率の検討方法としては、DC を緑色の蛍光色素の PKH-2GL、癌細胞を赤色の蛍光色素である PKH-26 で前もって染色した後融合させ、その後蛍光顕微鏡で細胞の観察を行い、両方の色の蛍光、または中間の橙色の蛍光を発している細胞を FC として算定した。従来の融合効率に関する

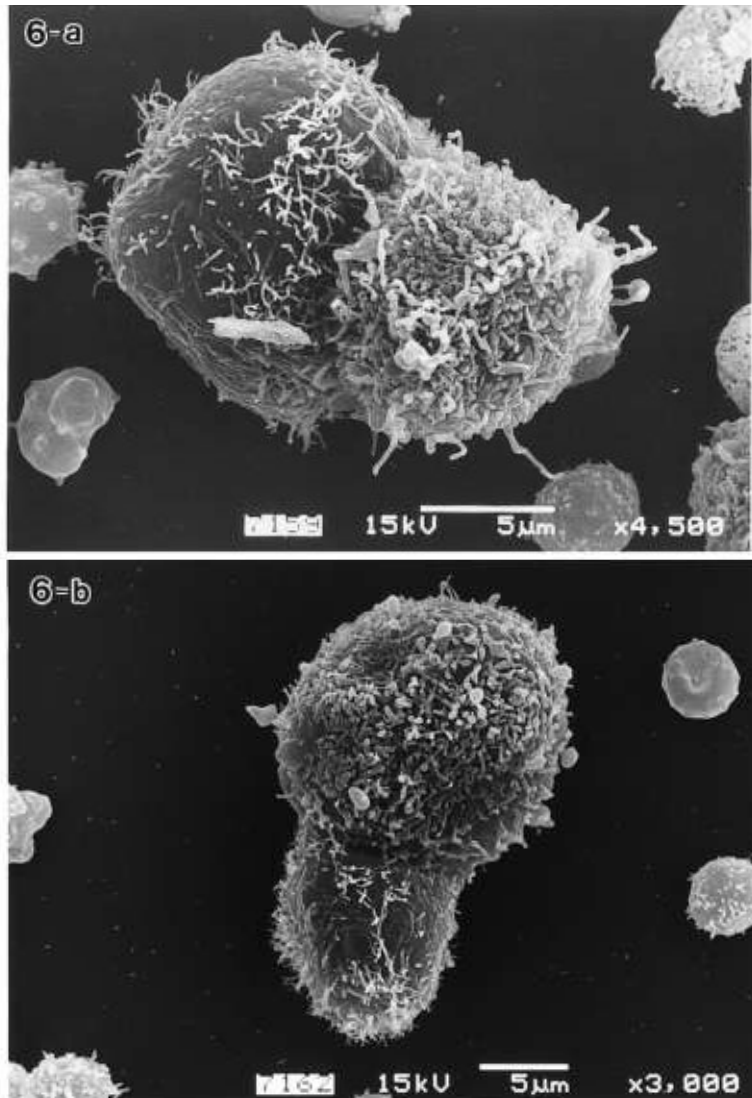


Fig. 6. Scanning electron micrograph of polyethylene glycol treated dendritic cell and hepatocellular carcinoma cell (a, b).

報告ではフローサイトメトリーによる判定法が多用されているが、今回の検討ではDCを得るために癌患者からの採血が必要であり、常時フローサイトメトリー解析に足る程の血液細胞が得られる確証が得られなかった。また、蛍光顕微鏡による観察は、フローサイトメトリーによる解析では困難とされる単なるDCと癌細胞の接着した状態 (clump) をFCと区別することが可能であった。実際、Fig. 1-a, b に示すように、融合細胞と判定された細胞の発する蛍光は、赤色と緑色の蛍光が細胞内に分布して認められ、非特異的な細胞接着

との区別を可能にしている。

融合効率の検討は、PEG 処理後1晩培養した細胞の浮遊分画と付着分画で検討した。Table 1 に示すように、Case 1-3 では浮遊、付着の両分画で細胞の約 20-30% のFCと判定された。しかし、Case 4 では付着細胞分画の70% 近くがFCで、浮遊細胞分画にはFCは少数であった。症例間におけるこの差違の理由は明確ではないが、融合に用いるそれぞれの癌細胞の異なる特性が反映されている可能性が考えられる。実際、Case4 の癌細胞が検討した他の癌細胞に比較して明らかに cul-

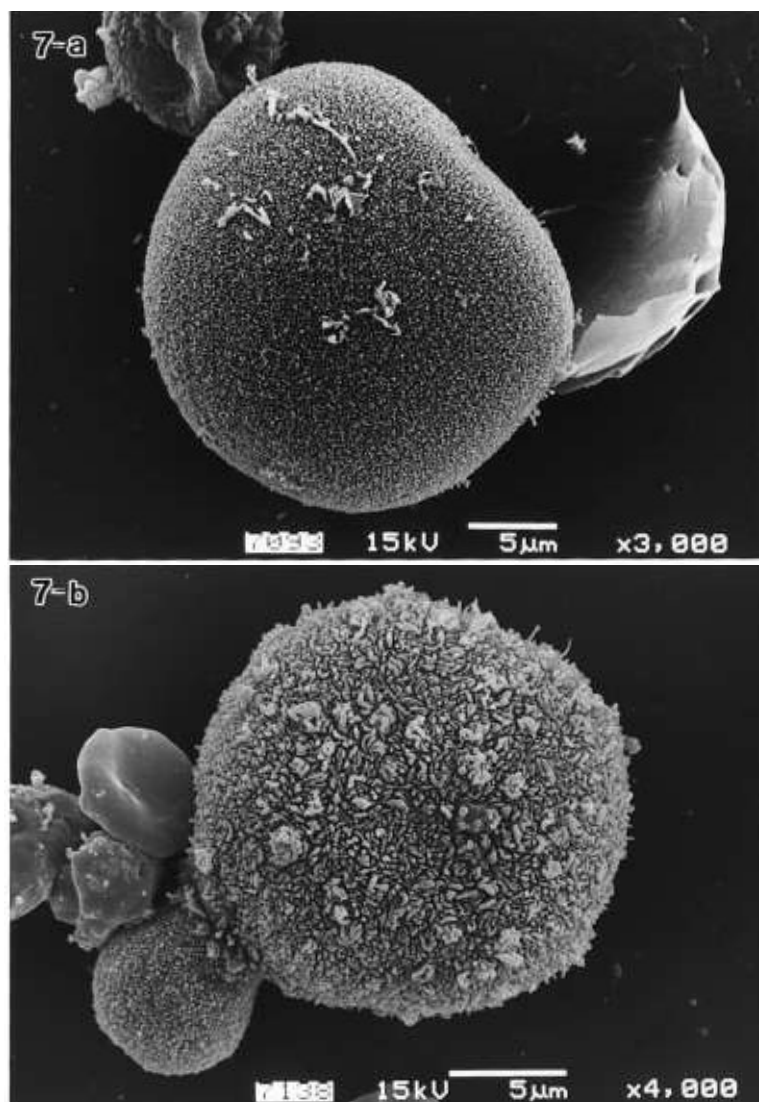


Fig. 7. Scanning electron micrograph of colon cancer cell (a) and polyethylene glycol treated dendritic cell and colon cancer cell (b, c).

ture plate への接着性が高いわけではなく、また、浮遊細胞分画に FC の多い Case 2 は接着性の弱い浮遊性の癌細胞ではなかった。いずれにしても、FC がどの分画で採取されるかは現時点では予想が困難なところがあり、FC を癌ワクチンとして使用する治療に際しては、浮遊、付着の両分画を投与することが望ましいと考えられる。また、DC が種々の特徴的な表面マーカー分子を発現することから、PKH-26 で染色した癌細胞と無染色の DC を PEG 処置して融合させ、その後、FC を FITC 標識した DC マーカーに対する抗体で染色

して観察する方法で融合効率の検討を行った。この検討は浮遊細胞と付着細胞の両分画を混合した細胞で行い、抗体は DC の代表的なマーカーである HLA-DR と CD86 に対する 2 つの抗体を使用して行った。その結果、PEG 処理細胞の約 3 割が FC と判定され、Table 1 で示した結果と類似していた。HLA-DR 抗体と CD86 抗体を使用しての融合効率の結果に若干の相違が認められたことは、DC における両分子の発現頻度が異なることに起因すると考えられる。以上より、ヒト DC とヒト癌細胞を PEG 処理することにより、マウス

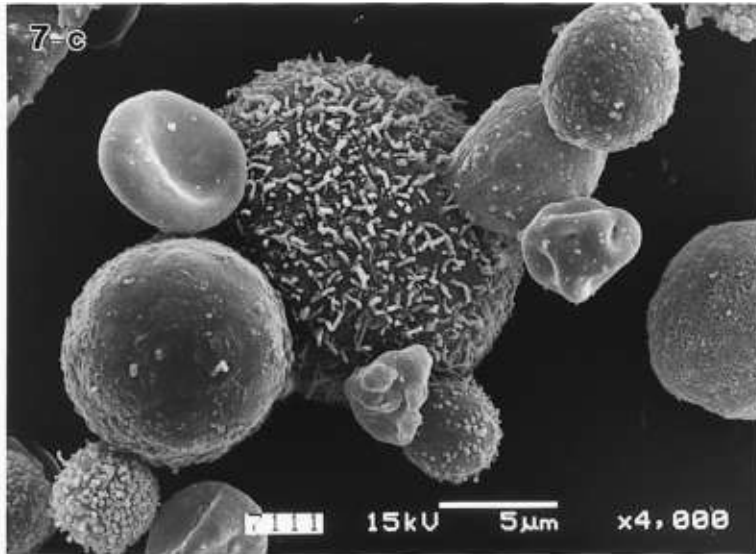


Fig. 7. Continued.

の場合と同様の融合効率でFCを得ることが可能であることが示された。しかし、進行度や全身状態の異なる種々の進行癌患者から採取されたDCの生物学的特性は多様であることが予想され、そのことがDCと癌細胞の融合効率に影響を及ぼす可能性も考えられ、今後もさらなる検討を要する。

次に作製されたFCの機能的検討を行った。FCが抗原提示細胞として機能し、T細胞に対して癌抗原に特異的な活性化を誘導させるためには、FCがDCの機能分子を発現していることが必須の条件となる。大腸癌細胞と自己DCをPEG処置し、その後、浮遊、付着の両細胞分画でDCマーカーの発現の有無をフローサイトメトリーで解析した。検索するDCマーカーとしてはCD4⁺ヘルパーT細胞への抗原提示に必須のHLA-DRと、T細胞に対する共刺激分子であるCD86を選択した。その結果、FCの付着細胞分画に明らかなHLA-DRとCD86の発現が認められた。しかし、FCの浮遊細胞分画にはCD86の軽度の発現を認めるのみであった。

次に、FCのリンパ球刺激能につき検討した。大腸癌細胞とDCをPEG処置し、免疫療法施行前の患者から採取したPBMCと7日間混合培養した。その後、このPBMCと癌細胞を2日間混合培養するとIFN- γ の産生が認められたが、7日間FCと混合培養しなかったPBMCでは、癌細胞と

混合培養してもIFN- γ の分泌は認められなかった。FCは付着細胞分画由来の細胞が、浮遊細胞分画由来のものよりも、より強いT細胞刺激能を示した。このことは、癌細胞の由来した個体は異なるものの、DCと大腸癌のFCでは付着細胞分画の細胞の方がHLA-DR、CD86の発現が良好であった (Fig. 2) ことと関連性を有する可能性が考えられる。PBMCのIFN- γ の産生は、PBMC中のT細胞がFCと混合培養されている間に癌細胞に対して反応性が誘導されたことを示唆し、FCが抗原提示細胞として機能したことを示している。しかし、本実験ではT細胞をDC単独、または腫瘍細胞単独で刺激した結果が得られておらず、腫瘍細胞自身のみでT細胞に対してどの程度の抗原提示能が示されるのか明らかでない。Gongらは同様の方法でヒトFCの*in vitro*におけるT細胞に対する刺激能を検討し、FCのT細胞に対する刺激能が腫瘍細胞単独による刺激、またはDC単独による刺激に比較して有意に高いことを示している²⁸⁾。

胃癌、肝細胞癌、大腸癌の3例の患者から樹立された癌細胞を用いて、自己DCとのFCを作製し、SEMによる観察を行い微細形態的特徴を検討した。胃癌の例では、位相差顕微鏡による観察では、比較的淡明であった癌細胞の細胞質は融合処置の後顆粒状に暗調となり、細胞はやや大型と

なって、多数の核を有する細胞が観察されるようになった。このような特徴を示す細胞は融合処置以前には認めなかったことより、融合細胞である可能性が高いと考えられる。SEMによる観察では、DCが付着性の癌細胞に侵入するように融合していく像が観察された。また、融合処置後DCや癌細胞とは異なり、細胞辺縁に密な線維状突起と細胞表面に顆粒状の微絨毛を多数有する付着細胞が観察された。位相差顕微鏡による観察で、細胞質が顆粒状に暗調化した細胞がこの細胞に一致すると考えられ、このことより、融合が終了した細胞がこのような形態的特徴を示した可能性が高い。また、肝細胞癌とDCをPEG処置すると、そのFCの多くは浮遊細胞分画に認められた。十分な細胞の洗浄後もDCと肝細胞癌細胞は強く接着し、その接着境界は不明瞭で、両細胞が融合していることが示唆された。肝細胞癌においては、胃癌とDCのFCで見られたような、完全に融合した後と考えられる細胞は観察されなかったが、今回の検討では観察時期がPEG処理8時間後の一点のみであったことを考えると、この後に本格的な細胞融合が開始される可能性も考えられる。

一方、大腸癌細胞とDCのPEG処置後の細胞では、多くの細胞が浮遊性を示した。癌細胞の表面形態は微細で均一な顆粒状の微絨毛で被われているが、融合処置後は太く、不均一な短桿状の微絨毛を有する細胞が多数観察された。胃癌で認められたようなDCと癌細胞が融合しつつあるような像は観察されなかった。長桿状の微絨毛を有する細胞には、Tリンパ球の表面形態を示す細胞が集積して付着している像が認められた。このことより、短桿状や長桿状の微絨毛を有する細胞はDCと大腸癌細胞がすでに融合を終えた後の細胞である可能性が示唆される。しかし、上記の検討はすべて微細形態的特徴からの判断に基づいている。形態からの判断をより確実にするために、FCと考えられる特徴を示す細胞について免疫電子顕微鏡を用いてDCマーカーであるHLA-DRの発現の有無を検討中である。

以上の検討により、ヒト単球由来DCと癌細胞をPEG処置することにより、マウスにおける場合と同様に、ほぼ一定の比率で両者のFCが形成されることが明らかとなった。また、FCは浮遊細胞

分画、付着細胞分画の両方に存在するため、癌患者の治療に際しては両細胞分画を採取して使用することが望ましいと考えられた。しかし、胃癌、肝細胞癌、大腸癌の各細胞で自己DCとPEGによる融合処置を施行すると、おのおの特徴的で異なる融合プロセスを示唆する微細形態が観察された。このことは、DCと癌細胞のFCを癌ワクチンとして使用する際に、DCの融合相手となる癌細胞が症例ごとに多様な細胞特性を示すことを考えれば、当然の結果とも考えられる。癌細胞の分化度、接着性、遊走性、産生するサイトカインなどにより、癌細胞とDCのFCは多彩な性状を示すことが考えられる。今後、基礎的、臨床的検討を重ねることにより、より有効な細胞融合の条件や、FCワクチンが有効性を示す癌種を決定していくことが望まれる。

V. 結 語

1. 自己DCと癌細胞を混合して50% polyethylene glycol (PEG) で処理することにより両細胞の融合細胞を作製することを試み、その融合効率を検討した。蛍光色素を用いた検討では、PEG処理された細胞の約30%前後が融合細胞であることが示された。また融合細胞はPEG処理細胞の浮遊細胞分画、付着細胞分画のいずれにも存在し、その存在比率は症例により異なった。

2. 大腸癌細胞とDCの融合細胞はDCマーカーであるHLA-DR、CD86を発現していた。また、融合細胞と7日間混合培養された末梢血単核球は、癌細胞と混合培養するとIFN- γ を産生した。以上より、融合細胞の抗原提示細胞としての機能が示された。

3. 胃癌、肝細胞癌、大腸癌の症例から癌細胞を樹立し、自己DCと融合細胞を作製して走査電子顕微鏡で観察した。胃癌ではDCが癌細胞に侵入するように接着して融合し、新たな特徴の細胞突起を有する細胞となると考えられる像、肝細胞癌では両者の細胞が融合するように強く接着する像、大腸癌では融合処置後、大腸癌のものとは異なる短桿状や長桿状の微絨毛を有する腫瘍細胞様の細胞が観察された。各々の癌細胞で特徴的なDCとの融合のプロセスを示すと考えられた。

この研究の一部は、文部科学省のハイテクリサーチセンター事業，ならびにバイオベンチャーリサーチファンド事業による研究費によった。

文 献

- 1) Rosenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today* 1997; 18: 175-82.
- 2) Khurana D, Leibson PJ. Regulation of lymphocyte-mediated killing by GTP-binding proteins. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 333-8.
- 3) Weiner DB, Kim JJ. Cancer vaccines: is the future now? *Expert Rev Vaccines* 2002; 1: 257-60.
- 4) Melief CJ, Van Der Burg SH, Toes RE, Ossendorp F, Offringa R. Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev* 2002; 188: 177-82.
- 5) Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 1993; 14: 483-6.
- 6) Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-96.
- 7) Banchereau J, Steinman M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
- 8) Shurin MR. Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 43: 158-64.
- 9) Grabbe S, Beissert S, Schwarz T, Granstein RD. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today* 1995; 16: 117-21.
- 10) Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-32.
- 11) Romani N, Grner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93.
- 12) Sallusto F, 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* 1994; 179: 1109-18.
- 13) Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996; 183: 283-7.
- 14) Butterfield LH, Jilani SM, Chakraborty NG, Bui LA, Ribas A, Dissette VB, et al. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus. *J Immunol* 1998; 161: 5607-13.
- 15) Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, et al. A mutated β -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 183: 1185-92.
- 16) Brandle D, Brasseur F, Weynants P, Boon T, Van den Eynde BJ. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 1996; 183: 2501-8.
- 17) Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 558-61.
- 18) Hart I, Colaco C. Fusion induces tumor rejection. *Nature* 1997; 388: 626-7.
- 19) Parkhurst MR, DePan C, Riley JP, Rosenberg SA, Shu S. Hybrids of dendritic cells and tumor cells generated by electrofusion simultaneously present immunodominant epitopes from multiple human tumor-associated antigens in the context of MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 2003; 15: 5317-25.
- 20) Kikuchi T, Akasaki Y, Irie M, Homma S, Abe T, Ohno T. Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 337-44.
- 21) Krause WK, Neumann C, Soruri A, Mayer S, Peters JH, Andreesen R. The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells. *J Immunother* 2002; 25: 421-8.
- 22) Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S, Abe T, Kufe

- D, Ohno T. Antitumor effect of immunizations with fusions of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model. *J Immunother* 2001 ; 24 : 106-13.
- 23) Homma S, Toda G, Gong J, Kufe D, Ohno T. Preventive antitumor activity against hepatocellular carcinoma (HCC) induced by immunization with fusions of dendritic cells and HCC cells in mice. *J Gastroenterol* 2001 ; 36 : 764-11.
- 24) Ford JW, Welling TH III, Stanley JC, Messina LM. PKH-26 and 125I-PKH-95 : characterization and efficacy as labels for in vitro and in vivo endothelial cell localization and tracking. *J Surg Res* 1996 ; 62 : 23-8.
- 25) Lindner M, Schirmmacher V. Tumour cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy : comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols. *Eur J Clin Invest* 2002 ; 32 : 207-17.
- 26) Orentas RJ, Schauer D, Bin Q, Johnson BD. Electrofusion of weakly immunogenic neuroblastoma with dendritic cells produces a tumor vaccine. *Cell Immunol* 2001 ; 213 : 4-13.
- 27) Phan V, Errington F, Cheong SC, Kottke T, Gough M, Altmann S, et al. A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccine. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1215-9.
- 28) Gong J, Avigan D, Chen D, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, et al. Activation of antitumor T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc Natl Sci Acad USA* 2000 ; 97 : 2715-8.