

DA  
5485  
2009  
149

Regular Dose of Gemcitabine Induces an Increase in  
CD14<sup>+</sup> Monocytes and CD11c<sup>+</sup> Dendritic Cells  
in Patients with Advanced Pancreatic Cancer

(通常量のゲムシタビン投与は進行膵がん患者の  
CD14+単球と CD11c+樹状細胞を増加させる)

2 0 0 9

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

添田 敦子

寄贈  
添田敦子氏

## 【要約】

**目的：** 化学療法と免疫療法はしばしば相反するものと考えられている。しかし近年、抗がん剤の抗腫瘍効果は免疫反応と関連することが示されている。この研究において、ゲムシタビンと腫瘍ワクチンとの併用療法を前提とし、ゲムシタビンの免疫に及ぼす影響の評価および免疫学的効果判定の検討を検討した。

**方法：** 転移もしくは局所進展した進行膵がんの患者に対して、複数の免疫学的パラメータを用い 2 か月間の免疫モニタリングを行った。18 例のゲムシタビンによる治療予定の患者と 10 例のゲムシタビン治療中の患者を登録、ゲムシタビン 1000mg/m<sup>2</sup> 週 1 回 3 週連続投与 1 週休薬を 1 コースとした治療を 2 コース行った。免疫モニタリングは白血球分画、リンパ球サブタイプ、NK 細胞、CD14+単球、樹状細胞、HLA ペプチド複合体(ペンタマー)による CMV と WT1 特異的 CTL、サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-4) 産生、TCR (T 細胞受容体) レパートリーの変動で評価した。

**結果：** ゲムシタビン投与により CD14+単球と CD11c+樹状細胞は絶対数と割合の増加がみられた。また、CD123+樹状細胞も割合の増加がみられた。そのほかの免疫パラメータは一過性の変動はあるものの、明らかな増加あるいは減少の傾向はなかった。

**結論：** CD14+単球と CD11c+樹状細胞の増加は、膵がんを対象としたゲムシタビンを併用した免疫療法を支持するものと考えられる。

## 目次

はじめに.....	3
患者および方法.....	5
患者、治療スケジュール、採血.....	5
フローサイトメトリーを用いた細胞サブタイプ解析(表面マーカー).....	6
HLA 検査.....	7
ペンタマー(MHC-ペプチド複合体).....	7
ペプチドと CMV lysate.....	7
細胞内サイトカイン.....	8
T 細胞受容体レパートリー.....	8
統計解析.....	8
結果.....	9
患者.....	9
白血球分画、好中球、リンパ球、単球.....	9
表面マーカー.....	10
ペンタマー.....	14
細胞内サイトカインと T 細胞受容体レパートリー解析.....	14
考察.....	17
Funding.....	19
Conflict of Interest.....	19
文献.....	19

## はじめに

膵がんは悪性度が高く、日本ではがん死の 5 位を占めている<sup>1</sup>。ゲムシタビンは 10 年前より切除不能膵がんの標準治療となっているが、奏功率は 15%未満、生存期間中央値は 6 カ月程度と治療効果は十分ではない<sup>2</sup>。ゲムシタビンと他の抗がん剤併用の臨床試験がなされているが、ゲムシタビン単剤の成績を明らかに上回る治療法は認められなかった<sup>2-6</sup>。2005 年にゲムシタビン/エルロチニブ併用療法がゲムシタビン単剤より改善認められたが、生存期間が 5.91 カ月から 6.24 カ月にわずかな改善が認められたのみであった<sup>7</sup>。

ゲムシタビンは DNA 合成阻害する核酸アナログであるが、Grade 3-4 の好中球減少が 26%に起こる他は比較的耐容性が高い治療とされている<sup>2</sup>。Plate らはゲムシタビン投与による免疫細胞への影響を報告しているが、免疫モニタリングはゲムシタビン導入の 1 コース目 21 日間のみで長期的影響は不明であった<sup>8</sup>。

本研究では、ゲムシタビン初回導入の患者の 2 か月の免疫細胞・機能を調べ、さらに長期間の影響を評価するために 3 カ月以上治療した治療中の患者も免疫モニタリングを行った。また、ゲムシタビンと WT1 ペプチドワクチンの免疫療法を組み合わせた臨床試験を前提としており計画しており、免疫学的効果判定の検討を合わせて行った。この臨床試験はがんワクチンの奏功率が約 2.6%と低いため<sup>9</sup>、ゲムシタビン標準治療に併用することを前提としている。

がんワクチンの免疫学的効果についてであるが、効果判定に標準化されたものはない。現在、厚生省に認可されているワクチンはすべて感染症の予防ワクチンであり、がんワクチンはない<sup>10</sup>(表 1)。

表 1

不活化ワクチン	ウイルス	日本脳炎、インフルエンザ、狂犬病、B 型肝炎、A 型肝炎、ヒトパピローマウイルス
	細菌	DPT、肺炎球菌、ヘモフィリス b 型
生ワクチン	ウイルス	ポリオ、麻しん、風しん、おたふくかぜ、水痘
	細菌	BCG
トキソイド	毒素	ジフテリア、破傷風、DT

これら感染症予防ワクチンは多くは液性免疫を利用したものであり、免疫反応のモニタリングはセロコンバージョンや抗体価測定で行い、効果判定はコントロール群と比較し発症率を 50%以上減らすかをみる<sup>11</sup>。

一方のペプチドワクチンに代表されるがんワクチンは、MHC class I 分子に提示される 9 個のアミノ酸のみからなり、単独で免疫原性は弱く、アジュバント(免疫賦活剤)を必要とする。免疫モニタリングは実験的な手法はいくつもあるが、臨床に使用する



標準化された方法はなく、また効果判定も確立したものはない。また、求められるモニタリング法の要件として 1) 臨床的有用性を示す信頼できる指標 2) 腫瘍特異的免疫効果を示す信頼できる指標 3) 感度・特異度・再現性に優れている 4) 短時間で多くの検体を検査できる 5) 検体処理の自動化が可能 6) 短時間・低コスト が必要と考えられるが、現在のところこれらを満たすものではなく、また信頼できる指標としてコンセンサスを得られているものはない<sup>12</sup>。

しかし、腫瘍ワクチンはすでに多くの臨床試験がなされており、さまざまな免疫モニタリング法が採用されている。In vivo の方法として、DTH (delayed type hypersensitivity)がある。臨床では結核菌に対するツベルクリン反応として行われているが、ペプチドワクチンの効果判定としては、溶解しているペプチド量の規定などはなく、手法は標準化されていない。また反応は必ずしも抗原特異的ではないともいわれている。In vivo の方法も標準化されたものではなく、問題が多い。がん抗原に対する細胞性免疫の多くは反応性に乏しくノイズと区別するため、in vitroでの抗原刺激が必要な場合が多い。検出方法は新しいものではなく、1) リンパ球を抗原刺激し増殖をみる 2) リンパ球を抗原刺激し殺細胞効果をみる 3) マルチマー(MHC-ペプチド複合体)による抗原特異的 T 細胞の検出 4) T 細胞レセプターレパトア 5) ELISA 6) ELISPOT 7) サイトカインフローサイトメトリーがある。これら免疫学的効果判定は方法・解析が異なるため、研究室毎に結果が異なっている<sup>12</sup>。近年、標準化が試みられており、図 1-2 は CVC(Cancer Vaccine Consortium)の報告である<sup>13-14</sup>。

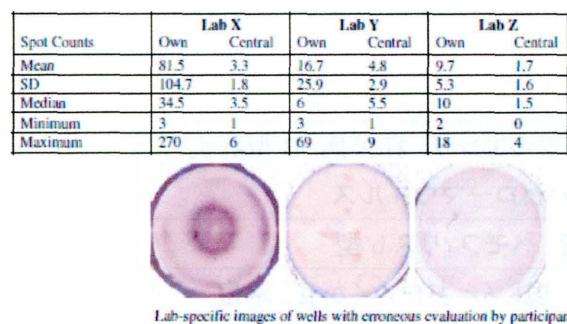


図 1 CVC による ELISPOT のパネル。同じ検体、同じ刺激によっても方法・解析により結果は異なる。

図 2 CVC による multimer のパネル。同じ検体でも解析の方法により結果が異なる。

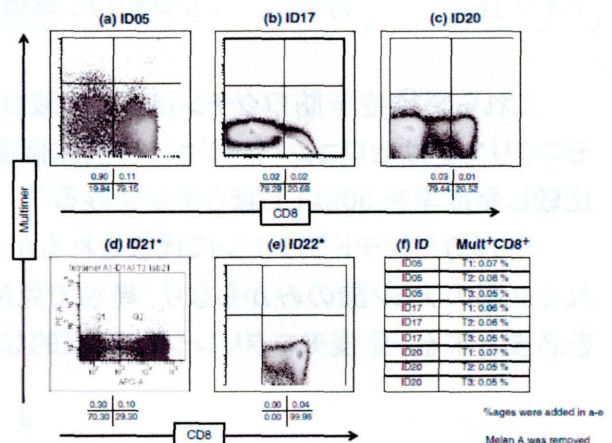


図1はELSPOTであるが、同じ検体を用いても研究室(Lab X-Z)で結果に差が認められた。これは細胞性免疫を測定する場合ノイズが大きく、反応を増強させるための抗原刺激が、この方法が研究室間で異なるためである<sup>13</sup>。また図2はマルチマーであるが、この標準化パネルでは抗原刺激は行っていないが、解析方法によって研究室間(ID 05、17、20、21、22)で異なる値となっている<sup>14</sup>。

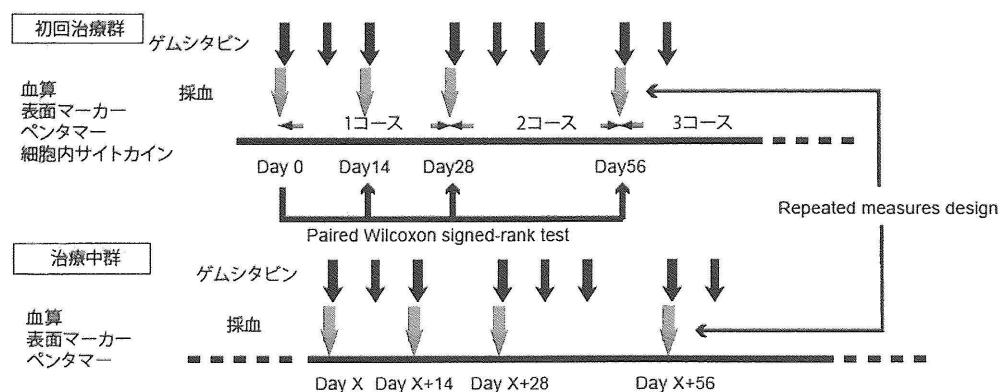
このように、免疫学的モニタリングは手技の標準化がなされていないため、ゲムシタビンを併用したがんワクチンの臨床試験を行う前に、自施設でゲムシタビン単剤での免疫モニタリングを評価する必要、および免疫学的効果判定の検討を行う必要があった。

## 患者および方法

### 患者、治療スケジュール、採血

2006年8月から2007年9月がんセンター中央病院においてゲムシタビン導入予定あるいはすでに治療中の患者に対して、書面での同意を得た後、末梢血を採血した。全症例とも組織もしくは細胞診で adenocarcinoma を確認されており、また手術や術中照射を除く他の化学療法や放射線療法は受けていない患者を選択した。患者はゲムシタビン 1000mg/m<sup>2</sup>を週1回、3週連続投与、1週休薬の4週のサイクルを1コースとし、病状の悪化がないかぎり、繰り返し行った(図3)。治療前に採血し好中球が 1000/mm<sup>3</sup> 未満となった場合、その週の治療は中止とした。吐き気止めのステロイド(デキサメサゾン 8mg)の静脈投与以外は、ステロイド投与されている患者はいなかった。10mg のヘパリン採血と7ml の EDTA 採血を Day 0、Day 14、次コース前、次々コース前に行った。ヘパリン血は処理を行った後フローサイトメトリーで解析し、EDTA 血は Buffer EL(BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA)で溶血し、Buffer RLT(BD)で溶解、RNA lysateとして-80°Cで凍結し、T細胞受容体レパートリー解析まで保存した。

図 3 治療・採血スケジュールと統計手法 ゲムシタビンは黒い矢印、採血は灰色の矢印で示す。初回治療群と治療中群の 2 群は、ゲムシタビンの長期にわたる影響を推測するために設定した。



### フローサイトメトリーを用いた細胞サブタイプ解析（表面マーカー）

使用した蛍光モノクローナル抗体は表 2 の通りである。末梢血は抗体と混合、30 分室温・暗所で反応させ、PharmLyse (BD)で溶血後、Cell Wash (BD)で洗浄、CellFix (BD)で固定した。その後フローサイトメトリー (FACSCalibur [Becton Dickinson, CA, USA])にかけた。解析は CellQuest で行い、絶対数の算定は以下の計算式を使用した。

リンパ球分画と NK 細胞 (cells/ $\mu$ l)

$$\text{WBC 数}^{\text{CD}} \times \% \text{リンパ球分画}^{\text{CD}} \times \% \text{リンパ球サブタイプ}^{\text{FM}}$$

CD14+単球 (cells/ $\mu$ l)

$$\text{WBC 数}^{\text{CD}} \times \% \text{単球分画}^{\text{CD}} \times \% \text{単球分画中 CD14+細胞}^{\text{FM}}$$

樹状細胞 (cells/ $\mu$ l)

$$\text{WBC 数}^{\text{CD}} \times \% \text{Lin1-HLA-DR+CD123+} \text{ もしくは } \text{Lin1-HLA-DR+CD11c}^{\text{FM}}$$

(<sup>CD</sup> は臨床データを用い、<sup>FM</sup> はフローサイトメトリーのデータを用いた)

表 2 抗体のパネル

	FITC	PE	PerCP	解析	サブタイプ名
#1	IgG1*	IgG1*	IgG1*	IgG1 <sup>-</sup> IgG1 <sup>+</sup> IgG1 <sup>+</sup>	陰性コントロール
#2	CD4-FITC/CD8-PE†		CD3*	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> T細胞 CD8 <sup>+</sup> T細胞
#3	CD16*	CD56*	CD3*	CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	NK細胞
#4	Vα24*	CD161*	CD3*	Vα24 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	NKT細胞
#5	CD14*	CD20*		CD14 <sup>+</sup> CD20 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup>	CD14 <sup>+</sup> 単球 B細胞
#6	CD45RA†	CD45RO†	CD4*	CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	Naïve CD4 <sup>+</sup> リンパ球 Memory CD8 <sup>+</sup> リンパ球
#7	CD3*	CD69*	CD4*	CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD69 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T細胞
#8	CD3*	CD69*	CD8*	CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD69 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T細胞
#9	CD3*	CD25*	CD4*	CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T細胞
#10	GITR‡	CD25*	CD4*	GITR <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	
#11	Lin-1*	CD123*	anti-HLA-DR*	Lin-1 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	CD123 <sup>+</sup> 樹状細胞
#12	Lin-1*	CD11c*	anti-HLA-DR*	Lin-1 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> 樹状細胞

\*: BD Biosciences, San Diego, CA

†: BECKMAN COULTER, Fullerton, CA

‡: R&amp;D Systems, Minneapolis, MN

## HLA 検査

抗原特異的 T 細胞を HLA-ペプチド複合体(ペンタマー)や細胞内サイトカインを用いて調べる前に、HLA タイピングを行った。サンプルは HLA-A02-FITC と HLA-A24-PE (BD)で染色し、フローサイトメトリーで解析した。HLA-A02 もしくは-A24 の患者のみマルチマーの検査を行った。

## ペンタマー (MHC-ペプチド複合体)

PROIMMUNE (Oxford, UK) より HLA-A0201 と CMV ペプチド(NLVPMVATV)・WT1 ペプチド(RMFPNAPYL)、HLA-A2402 と WT1 ペプチド(RMFPNAPYL)の HLA-ペプチド複合体(ペンタマー)を購入した。HLA-A02 の患者は CMV と WT1 を、HLA-A24 の患者は WT1 特異的 T 細胞を調べた。CD3-FITC、CCR7-PE、CD3-PerCP、APC-ペンタマーを全血に加え、15 分室温暗所で反応させた。溶血操作は 2 回行い、洗浄後、固定しフローサイトメトリーにかけた。ペンタマー陽性細胞が多い場合、CD45RA-FITC、CD57-FITC (BD)、CD45RO-PE、CD27-PE (BD)、CD8-PerCP とペンタマー-APC で染色、サブタイプ解析を行った。

## ペプチドと CMV lysate

WT1 抗原識別部を高性能の液相クロマトグラフィーで 80%以上の精度のペプチドと

したものを使用した(Qiagen, Hilden, Germany)。HLA-A0201 結合 WT1 ペプチドのアミノ酸配列は RMFPNAPYL (AA 126-134)で HLA-A2402 結合 WT1 ペプチドは CMTWNQMNL (AA 235-243)であった。CMV AD169 のウイルス溶解液は Advanced Biotechnologies (Alberta, Canada)のものを使用した。

### 細胞内サイトカイン

細胞内サイトカインはゲムシタビンの初回投与例(初回治療群)の患者のみ調べた。ヘパリン全血に 1ml に最終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  となる CMV lysate を加え、共刺激として最終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  の CD28 と CD49d (BD)を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 6 時間刺激した。HLA-A02 もしくは HLA-A24 の患者には最終濃度  $1\text{ng/ml}$  の WT1 ペプチド刺激も行った。 $10 \mu\text{g/ml}$  のブレフェルディン A (Sigma, St Luis, MO, USA)を刺激開始後 2 時間後に加えた。陽性コントロールは最終濃度  $5 \mu\text{l/ml}$  のブドウ球菌外毒素 B (staphylococcal enterotoxin B)、陰性コントロールは PBS (-)を使用した。サンプルは 6 時間刺激後、Lysing solution (BD)で溶血、Permeabilizing Solution (BD)で膜透過性処理を施され、CD69-FITC、IL-4-PE、IFN- $\gamma$ -PE、CD8-PerCP、CD4-PerCP と CD3-APC (BD)と反応後、洗浄・固定しブローサイトメトリーにかけた。CD3+CD4+もしくは CD3+CD8+細胞の IFN- $\gamma$  と IL-4 陽性細胞をサイトカイン分泌 T 細胞と判断した。CD69 は活性化マーカーとして使用した。

### T 細胞受容体レパートリー

5 症例を解析した。EDTA 採血から RNA を抽出した。RNA 抽出には Qiagen の QIAamp RNA Blood Mini Kit が使用された。RT-PCR と PCR には TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (タカラバイオ、滋賀県)を使用した。PCR の条件は  $50^\circ\text{C}$  30 分・ $94^\circ\text{C}$  2 分を 1 サイクル、 $94^\circ\text{C}$  30 秒・ $57^\circ\text{C}$  30 秒・ $72^\circ\text{C}$  30 秒を 30 サイクル、最後に  $72^\circ\text{C}$  1 分で加熱、 $4^\circ\text{C}$  で終了した (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, CA, USA)。26 種類の TCR-V $\beta$  配列を順方向プライマー、6-FAM と結合した C $\beta$  配列を逆方向プライマーとして使用した。V $\beta$  プライマーは Invitrogen (CA, USA)、C $\beta$  プライマーは Applied Biosystems で合成した<sup>15-16</sup>。 $1 \mu\text{l}$  の PCR 産物は  $13.6 \mu\text{l}$  のホルマミドと  $0.4 \mu\text{l}$  のサイズスタンダード (Genescan-500 ROX, ABI)に加え、 $94^\circ\text{C}$  5 分で denature し、3100-Avant Genetic Analyzer (ABI)で電気泳動した。サイズ分布は GeneScan 7.7 (ABI)で解析した。

### 統計解析

非進行生存期間はゲムシタビン開始した日から進行と診断された日までとし、データは Kaplan-Meier で測定した。ログランク検定は 2 群間での比較で用いた。初回治療は治療前と治療後の免疫状態を paired Wilcoxon signed rank test で比較し、初回治



療と治療中の患者の比較を repeated measures design で行った(図 3)。データは Windows の JMP 6.0 を使用した。

## 結果

### 患者

23 例の患者がこの研究に参加した(表 3)。18 例は初回治療の患者(初回治療群)で、10 例は 3-20 コース目治療中の患者(治療中群)である。初回治療群のうち、3 症例は早期進行、肺炎、もしくは支持療法希望でゲムシタビンによる治療を中止されている。5 人の初回治療群、3 人の治療中群で気分不快、感冒による発熱、急性肺炎、ステント閉塞などで、治療スケジュールが変更された。発熱、肺炎、ステント閉塞時のデータは解析から除外した。

表 3 患者

No	グループ (コース)	年齢	性別	KPS	進展度(転移部位)	コメント
1	Naive	50	M	90	Locally Advanced	発熱で1コース目3回目のゲムシタビン中止。
2	Naive	57	M	90	Locally Advanced	
3	Treated (3)	74	F	100	Locally Advanced	患者の私用で3コース目が予定変更あり。
4	Treated (4)	76	M	90	Locally Advanced	2コース目が急性肺炎で予定変更あり。
5	Treated (20)	70	F	90	Metastasis (HEP)	
6	Treated (9)	56	M	100	Locally Advanced	発熱で2コース目の2回目のゲムシタビン中止。
7	Naive	62	F	90	Metastasis (HEP, SPL)	
8	Naive	81	M	90	Locally Advanced	
9	Treated (3)	68	F	90	Locally Advanced	
10	Treated (5)	70	M	100	Locally Advanced	
11	Naive	74	F	100	Metastasis (PUL)	吐き気により3コース目の予定変更あり。
12	Treated (12)	72	M	100	Metastasis (PER)	
13	Treated (9)	54	F	100	Metastasis (HEP)	
14	Naive	70	M	100	Metastasis (PUL, PLE)	病状が進行し2コース目でゲムシタビン中止となった。
15	Naive	57	F	80	Metastasis (PLE, OSS)	肺炎で1コース目でゲムシタビン中止となった。
16	Treated (3)	64	M	90	Locally Advanced	
17	Treated (5)	78	F	90	Metastasis (PER)	
18	Naive	56	F	90	Locally Advanced	
19	Naive	48	M	90	Locally Advanced	
20	Naive	80	M	100	Locally Advanced	
21	Naive	59	F	80	Metastasis (HEP)	病状が進行し2コース目でゲムシタビン中止となった。
22	Naive	65	F	90	Locally Advanced	高熱により2コース目2回目のゲムシタビン投与が中止となった。
23	Naive	52	M	90	Locally Advanced	好中球減少により1コース目の予定変更あり。
24	Naive	78	F	90	Locally Advanced	
25	Naive	65	F	100	Metastasis (HEP)	
26	Naive	80	F	100	Metastasis (LN)	
27	Naive	82	F	100	Metastasis (PER, LN)	
28	Naive	71	F	90	Metastasis (PUL)	2コース目の2回目投与が患者私用により中止

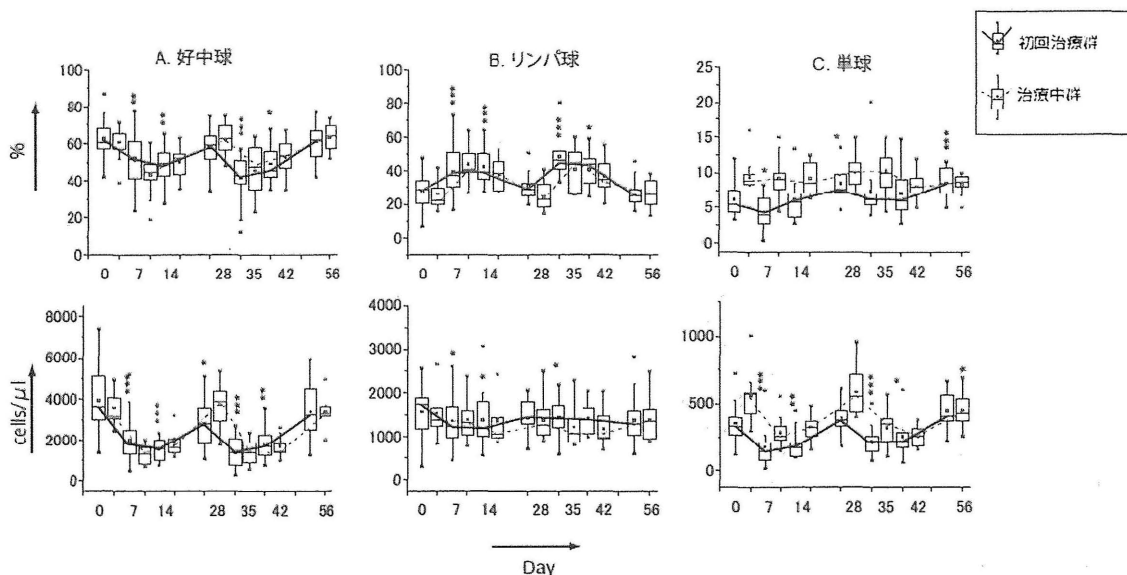
HEP: 肝, SPL: 脾, PUL: 肺, PER: 腹膜, PLE: 胸膜, OSS: 骨, LN: リンパ節

### 白血球分画、好中球、リンパ球、単球

白血球分画の好中球、リンパ球、単球について解析した(図 4)。実線は初回治療

群、点線は治療中群を示している。初回治療群の単球の割合と絶対数は、治療中の患者に比較し低いが、2 か月の治療により治療中の患者と同様のレベルになる。またリンパ球はコース途中で一過性に下がるが、Grade 3-4 のリンパ球減少は 5.6%のみであった。また day 7、day 14 の間で白血球、好中球、リンパ球、単球の変わりはなく、コース中の低下は day 7 以降安定すると考えられた。

図 4 白血球分画の割合と絶対数 リンパ球の変動は少なく、単球は治療により増加する傾向がある。\*、\*\*、\*\*\*は初回治療群の治療前との比較(paired Wilcoxon signed rank test)でそれぞれ  $P<0.050$ 、 $P<0.010$ 、 $P<0.001$ を示す。初回治療群と治療中群の比較(repeated measures design)は好中球: (%)  $P=0.851$ 、(絶対数)  $P=0.444$  リンパ球: (%)  $P=0.645$ 、(絶対数)  $P=0.753$ 、単球: (%)  $P=0.006$ 、(絶対数)  $P=0.001$



## 表面マーカー

CD69+CD4+T 細胞 ( $P=0.002$ )、CD69+CD8+T 細胞 ( $P=0.012$ )で CD14+ 単球 ( $P=0.021$ ) (図 6 I, J, F)と CD123+、CD11c+の樹状細胞 2 種類 ( $P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、図 6M, N)は治療中の患者が初回治療群より絶対数は多かった。しかし NK 細胞の割合は治療中の患者で有意に低下がみられた ( $P=0.008$ ) (図 5C)。ただし、NK 細胞の絶対数は有意な低下はみられなかった ( $P=0.072$ ) (図 6C)。初回治療群で治療前と割合を比較すると、CD4+ T 細胞(図 5A)と Naïve CD4+リンパ球(図 5G)は day 14 に増加が認められた ( $P=0.008$ 、 $P<0.001$ )が、その他は有意な変化を認めなかった。CD123+樹状細胞の割合(図 5M)は 2 コース目の最初より、また CD11c+樹状細胞(図 5N)は 1 コース目の day 14 から増加みられた ( $P=0.003$ 、 $P<0.001$ )。しかし、多くのリンパ球サブタイプの絶対数は、治療による血球減少により低下がみられた。NK 細胞、CD69+CD4+T 細胞、CD69+CD8+T 細胞(図 6C, I, J)は day14 で低下みられた

( $P=0.018$ 、 $P=0.048$ 、 $P=0.015$ )。また CD8+T 細胞 ( $P=0.010$ 、 $P=0.030$ ) (図 6B)、memory CD4+リンパ球 ( $P=0.020$ 、 $P=0.010$ ) (図 6H) は回復に 2 カ月かかった。B 細胞 ( $P=0.022$ 、 $P=0.011$ 、 $P=0.005$ ) と NKT 細胞 ( $P=0.035$ 、 $P=0.042$ 、 $P=0.013$ ) (図 6E、D) は 2 カ月のモニタリング期間では回復しなかった。CD123+樹状細胞は 2 コース前に増加みられたが ( $P=0.017$ )、3 コース前には有意差は見られなかった (図 6M)。CD11c+樹状細胞は 2 カ月間増加がみられ ( $P=0.011$ 、 $P=0.021$ 、図 6N)、また CD14+単球は day14 には低下がみられたが、3 コース目前には増加がみられている ( $P=0.033$ 、図 6F)。



図 5 ゲムシタピン治療中における免疫細胞の割合の変動 CD4+T 細胞(A)と Naïve CD4+リンパ球(G)は day 14 で増加する。2 種類の樹状細胞(M、N)は増加傾向にある。リンパ球サブタイプの割合は絶対数より安定している。\*、\*\*、\*\*\*は初回治療群の治療前との比較 (paired Wilcoxon signed rank test) でそれぞれ  $P<0.050$ 、 $P<0.010$ 、 $P<0.001$ を示す。初回治療群と治療中群の比較 (repeated measures design) は A:  $P=0.674$ , B:  $P=0.636$ , C:  $P=0.008$ , D:  $P=0.338$ , E:  $P=0.134$ , F:  $P=0.003$ , G:  $P=0.216$ , H:  $P=0.244$ , I:  $P=0.002$ , J:  $P=0.448$ , K:  $P=0.299$ , L:  $P=0.405$ , M:  $P=0.001$ , N:  $P=0.005$

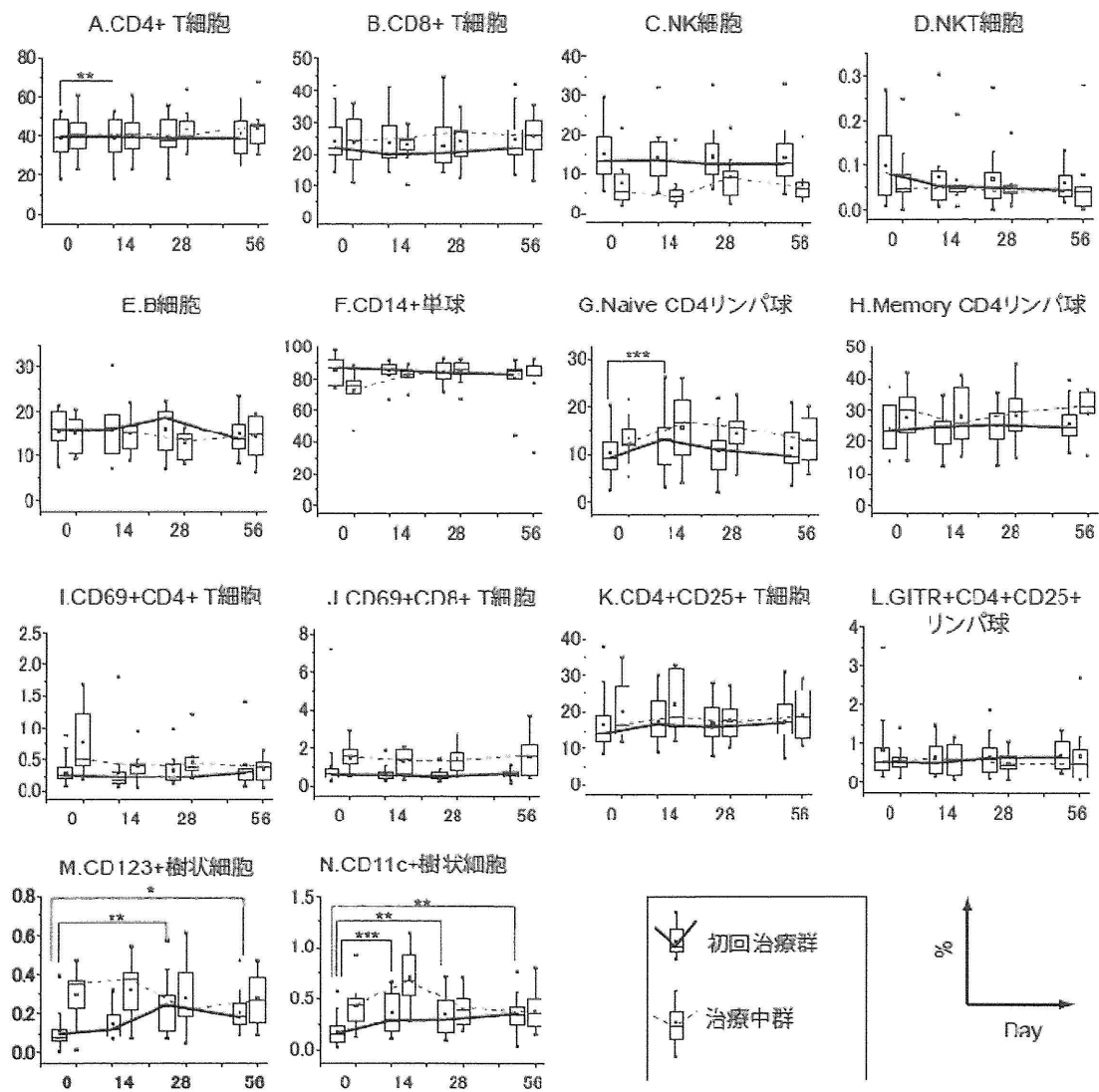
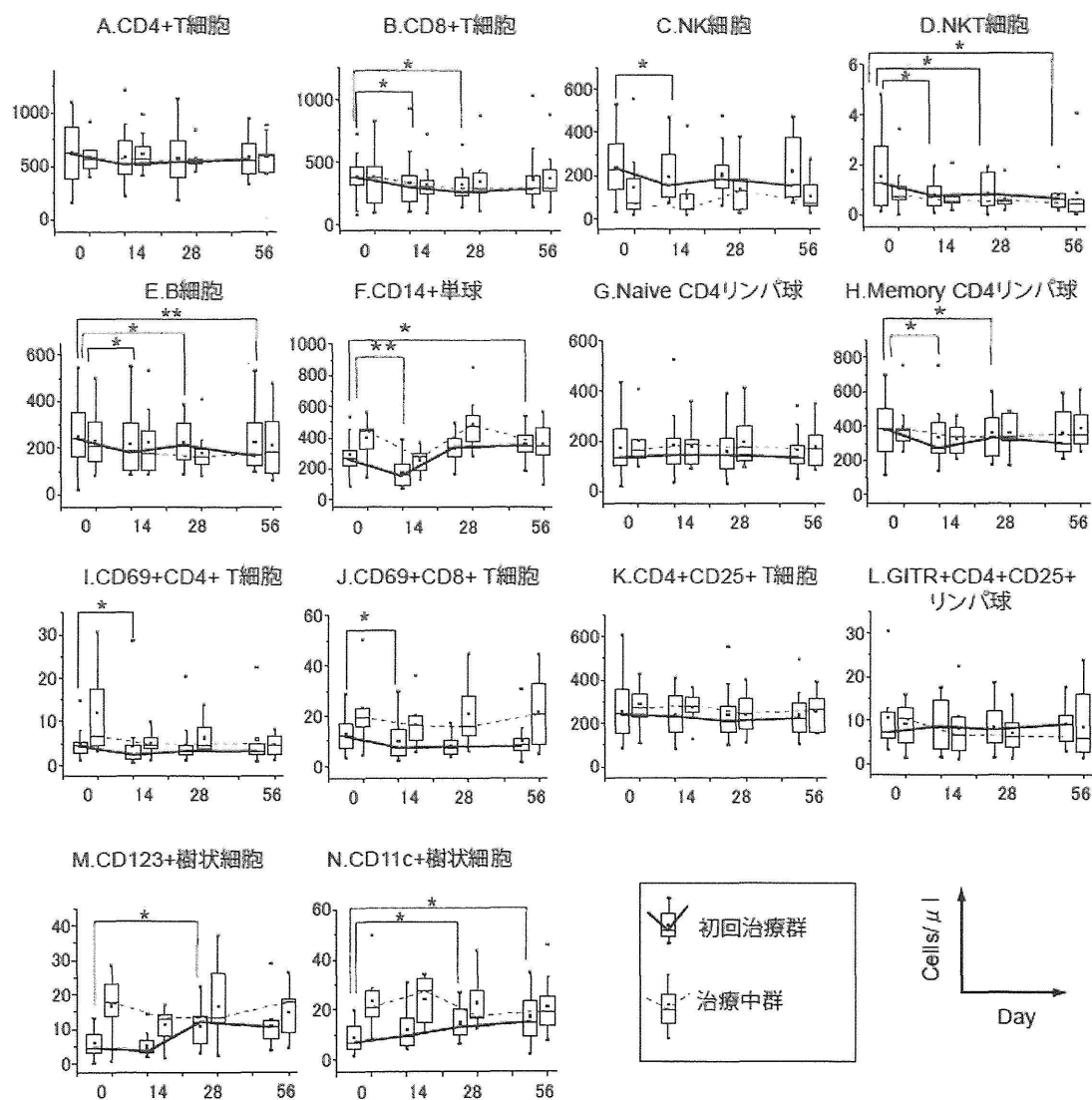


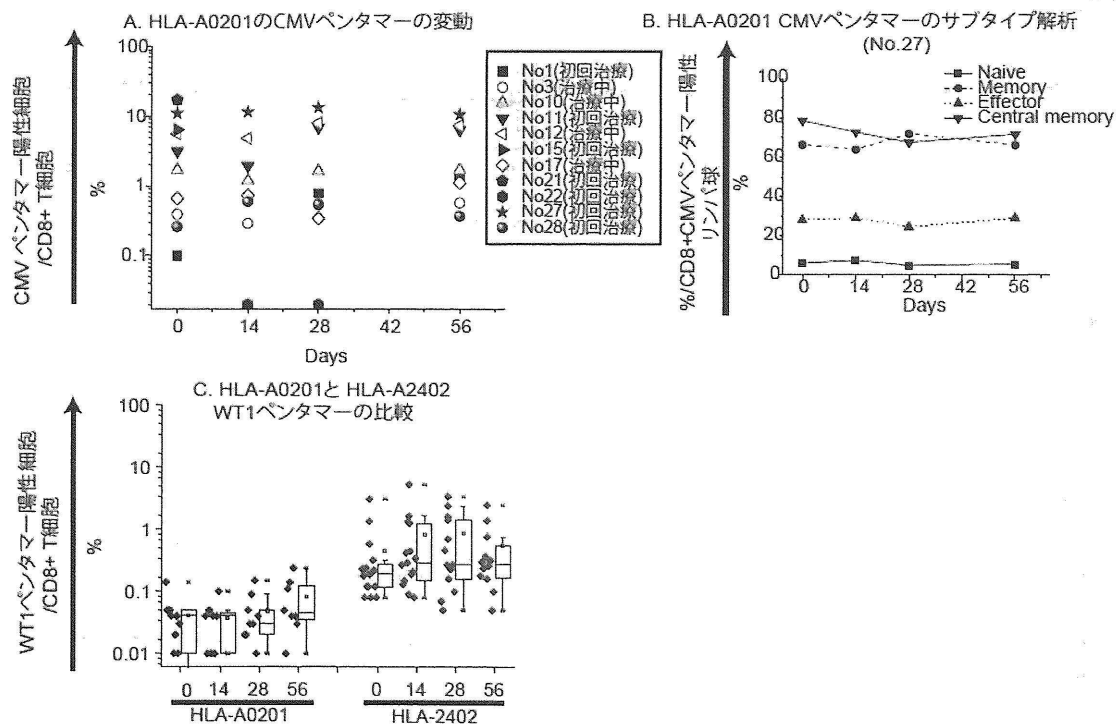
図 6 ゲムシタピン治療中における免疫細胞の絶対数の変動 CD69+CD4+T 細胞(I)、CD69+CD8+T 細胞(J)、CD14+単球(F)、2 種類の樹状細胞(M, N)は治療中群で増加みられた。CD14+単球(F)、2 種類の樹状細胞(M, N)は初回治療群において、治療前と比較しゲムシタピン投与により、徐々に増加がみられた。\*、\*\*、\*\*\*は初回治療群の治療前との比較 (paired Wilcoxon signed rank test) でそれぞれ  $P<0.050$ 、 $P<0.010$ 、 $P<0.001$ を示す。初回治療群と治療中群の比較 (repeated measures design) は A:  $P=0.572$ , B:  $P=0.791$ , C:  $P=0.072$ , D:  $P=0.166$ , E:  $P=0.099$ , F:  $P=0.021$ , G:  $P=0.663$ , H:  $P=0.838$ , I:  $P=0.002$ , J:  $P=0.012$ , K:  $P=0.551$ , L:  $P=0.433$ , M:  $P<0.001$ , N:  $P<0.001$



## ペンタマー

CMV 特異的 T 細胞の割合は、7 例の初回治療、4 名の治療中の患者について調べた(図 7A)。CMV 陽性細胞の割合は、初回治療と治療中の患者で明らかな変化は見られず、初回治療の治療前と比較しても明らかな変化はなかった。サブタイプ解析は No.27 の患者に行った。Naïve (CD8+CD27+CD45RA+)、memory (CD8+CD45RA-)、effector (CD8+CD27-CD45RO+)、central memory (CD8+CD57-CD45RO+) (図 7B) の割合の変化をみたが、著明な変動は見られなかった。このことよりゲムシタビンは CMV 特異的 T 細胞に影響を及ぼさないものと考えられた。WT1 特異的 T 細胞は HLA-A02 の 5 例、HLA-A24 の 10 例、HLA-A02/24 の 6 例に対して行った。WT1 ペンタマー陽性細胞は HLA-A24 の方が HLA-A02 より多いが、HLA-A2402 の WT1 ペンタマー陽性細胞は、クラスターを形成せず、非特異的結合と考えられた(図 7C)。

図 7 ゲムシタビンの CMV と WT1 ペンタマー結合 CD8+T 細胞に対する影響 抗原特異的 T 細胞(A)とそのサブタイプにはっきりとした影響はなかった。HLA-A2402 の WT1 ペンタマー結合細胞は HLA-A0201 と比較し多かったが、非特異的結合と考えられた(C)。



## 細胞内サイトカインと T 細胞受容体レパートリー解析

IL-4 と IFN- $\gamma$  産生 CD8+もしくは CD4+T 細胞の数と割合について解析した(図 8, 9)。ブドウ球菌外毒素 B(staphylococcal enterotoxin B: SEB)刺激時の IFN- $\gamma$  産生

CD8+T 細胞 1 コース目の day14 における低下 ( $P=0.049$ ) のみ認められた (図 9)。WT1 ペプチド刺激によるサイトカイン産生は陰性コントロールの PBS(-) 刺激と同程度で、 $R=0.668$  から  $0.887$  の強い相関関係を認めた。このことは、実際の WT1 ペプチド刺激をみるためには、陰性コントロールで補正しなければいけないと考えられた。図 10 は補正したサイトカイン産生細胞の割合である。WT1 ペプチド刺激によるサイトカイン産生は  $<0.3\%$  であり、WT1 ペプチドによるサイトカイン産生はほとんどないと考えられた。CMV lysate もしくは SEB 刺激による IL-4 産生において、治療前と比較し有意差みられているが、変化は小さいため、ほとんど影響はないと考えられた。

T 細胞受容体レパートリーの解析は初回治療の 5 例について行っており、明らかな変動は見られず、T 細胞受容体に影響しないと考えられた。

図 8 ゲムシタビン治療中における、T 細胞サブタイプのサイトカイン産生細胞の割合 ゲムシタビン治療による有意な変動はなかった。

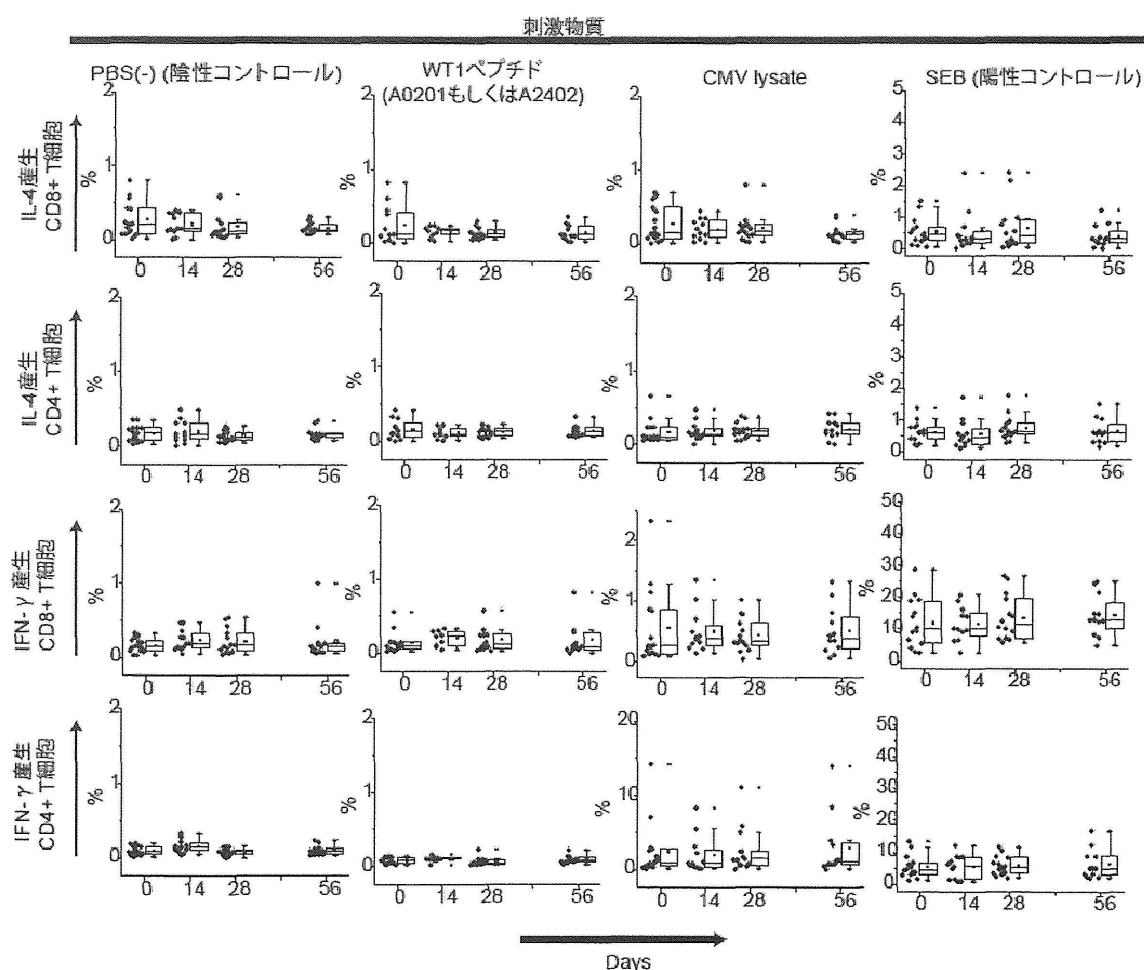


図 9 ゲムシタピン治療中における、T 細胞サブタイプのサイトカイン産生細胞の絶対数 SEB 刺激による IFN- $\gamma$  産生 CD8+T 細胞以外、有意な変動はなかった。

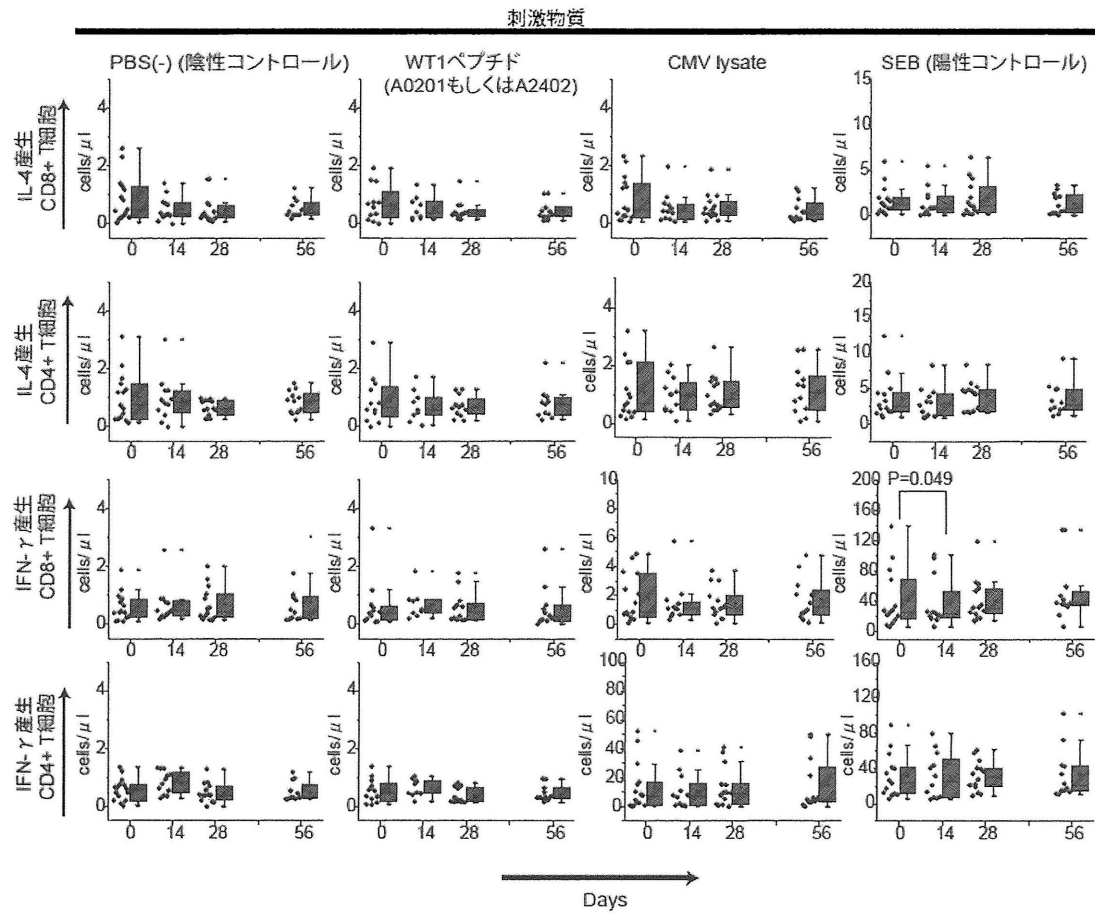
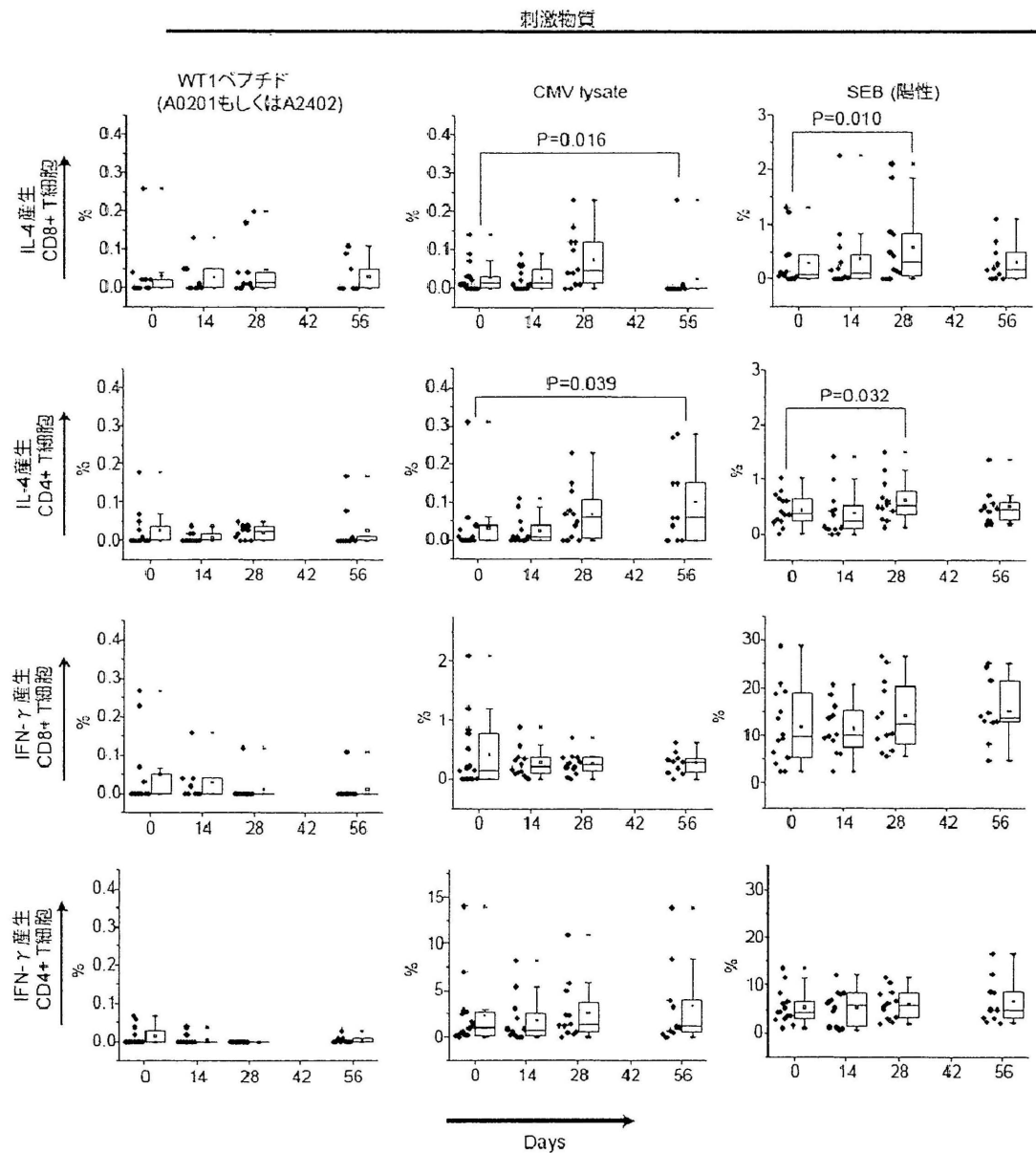


図 10 陰性コントロールで補正したそれぞれの T 細胞サブタイプ中のサイトカイン産生細胞の割合 WT1 ペプチド刺激ではサイトカイン産生細胞は 0.3%未満で、WT1 ペプチド刺激ではサイトカインを産生しないと考えられる。CMV lysate、SEB 刺激で IL-4 産生細胞割合に有意な変動があるが、その差はわずかである。



## 考察

免疫学の進歩により抗腫瘍免疫のメカニズムまたは腫瘍特異抗原が同定され、近年の腫瘍ワクチンの臨床試験に貢献している。すでに子宮頸がんの予防ワクチン (GARDASIL®、CERVARIX®) がいくつかの国で承認されているが、がんの治療ワクチンの臨床試験の効果は限られたものである<sup>9</sup>。このため、治療ワクチンの効果を上げるため、いくつかの試みがなされている。ひとつには微小残存がんの患者にワクチンを投与すること<sup>17</sup>、もうひとつは化学療法や放射線療法と併用して相乗効果を期待す

るものである<sup>18-19</sup>。抗がん剤は免疫抑制をもたらす、いくつかの薬剤は免疫抑制剤として自己免疫疾患の治療や移植後 GVHD 予防に使用されている。一方、いくつかの抗がん剤は抗腫瘍免疫を賦活する作用があることが明らかになってきた。サイクロフォスファミドは腫瘍の免疫寛容の原因となるとされる CD4+CD25+の制御性 T 細胞を低下させる<sup>20</sup>、オキサリプラチンとドキシソルビンンは腫瘍細胞を障害し、Toll 様受容体-4 と結合する HMGB1 タンパクを放出し、樹状細胞を活性化させる<sup>21</sup>。シスプラチンやドキシソルビン、マイトマイシン C、フルオロウラシル、カンプトセシンは Fas や TRAIL 依存性経路でアポトーシスを誘導する<sup>22-23</sup>。

ゲムシタビンはいくつかの免疫賦活効果が知られている。腫瘍のアポトーシスを誘導し、抗原提示を増強する効果<sup>24-25</sup> や骨髓由来抑制細胞を除去する効果などある<sup>26</sup>。Nowak らはマウスモデルにおいて、ゲムシタビンによる治療は B 細胞の減少やインフルエンザ抗体の低下を報告しているが<sup>27</sup>、ゲムシタビンと免疫療法である CD40L の併用療法は固形がんに対して相乗効果をもつことも報告している<sup>28</sup>。Bauer らはゲムシタビンと樹状細胞ワクチンの併用療法で Panc-2 の膵がん細胞株において高い効果を示した<sup>29</sup>。また Correale らは、大腸がんに対して、GM-CSF と IL-2 投与後ゲムシタビン併用 FOLFOX4 において、腫瘍抗原表出の増加と制御性 T 細胞の低下を報告している<sup>30</sup>。しかし、ゲムシタビンの免疫系の影響に対する定まった見解はない。膵がんの患者の免疫モニタリングを Plate らが行っているが、ゲムシタビンは免疫抑制的でなく、CD3+CD45RO+メモリー T 細胞を減らすことにより、免疫増強効果が期待できるとしている<sup>8</sup>。しかし、この研究は 1 コース目の 21 日のみモニタリングしており、ゲムシタビンの治療スケジュールも異なっていた。Bang らはゲムシタビンとシスプラチンの併用療法において、CD11c+の樹状細胞の増加を報告している<sup>31</sup>。

この研究においては、膵がん患者のゲムシタビン投与後 2 か月以上の免疫モニタリングを行い、T 細胞サブタイプや NK 細胞の低下は一過性で、CD14+単球や 2 種類の樹状細胞の増加傾向が認められた。ゲムシタビンの標準療法は抗原提示細胞を増やすと考えられた。膵がん患者においては末梢血中の樹状細胞は低下しており<sup>32</sup>、樹状細胞の分化は腫瘍細胞により抑制されるとされている<sup>33-34</sup>。ゲムシタビン投与による抗原提示細胞の増加は自然免疫、獲得免疫を刺激し、腫瘍細胞の障害に関連する可能性がある。これらのゲムシタビンの抗原提示細胞への効果は、腫瘍ワクチンとの併用において相乗効果をもたらす可能性がある。

以前、我々のグループでがん患者に対する同種幹細胞移植後の WT1 特異的 T 細胞と GVHD・抗腫瘍効果の関連について報告した<sup>35</sup>。WT1 タンパクは白血病<sup>36</sup>をはじめ、乳がんやさまざまな固形がんの細胞株でみられており<sup>37</sup>、WT1 ペプチドワクチンの臨床試験は既にいくつかの研究室で行われている<sup>38-39</sup>。膵がんは 75%のケースで WT1 タンパクを発現しているといわれている<sup>40</sup>。これらの結果は膵がんに対するゲムシタビンと WT1 ペプチドワクチン併用療法を支持するものと考えられる。

免疫学的効果判定であるが、WT1 ペプチドワクチンの効果判定において限界があることが考えられた。WT1 特異的ペンタマーにおいて、HLA-A0201 は非特異的結合が少なく、WT1 特異的 T 細胞の解析に适当と考えられたが、HLA-A2402 は非特異的結合が多く解析に困難が伴うと考えられた。

また、この研究において初回治療と治療中の 2 群を解析したが、非進行生存期間がこの 2 群において明らかに異なっており(6 カ月 vs. 20.6 カ月)、実際には背景の異なる集団と考えられた。

これらの問題点はあるが、今回の膵がん患者における免疫細胞の研究から、膵がんに対するゲムシタビンと WT1 ペプチドワクチン併用療法の臨床試験の実施は可能と考えられる。

## Funding

厚生労働省がん研究助成金ならびに厚生労働科学研究費を用いた。

## Conflict of Interest

なし

## 文献

1. Abridged life table for Japan 2006: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2006.
2. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15(6):2403-13.
3. Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB, 3rd. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol* 2002;20(15):3270-5.
4. Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, Andre T, et al. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol* 2005;23(15):3509-16.
5. Oettle H, Richards D, Ramanathan RK, van Laethem JL, Peeters M, Fuchs M, et al. A phase III trial of pemetrexed plus gemcitabine versus gemcitabine in patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2005;16(10):1639-45.
6. Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo



- in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(8):1430–8.
7. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007;25(15):1960–6.
  8. Plate JM, Plate AE, Shott S, Bograd S, Harris JE. Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54(9):915–25.
  9. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10(9):909–15.
  10. ワクチンの基礎. 東京: 社団法人 細菌製剤協会, 2001.
  11. Clements JD. Trial Design for Vaccine. In: Bloom BR, editor. *The Vaccine Book*. San Diego: Elsevier Science, 2003:95–117.
  12. Mosca PJ. Immune Monitoring. In: Khleif S, editor. *Tumor Immunology and Cancer Vaccine*. New York: Springer Science+Business Media, 2005:369–85.
  13. Janetzki S, Panageas KS, Ben-Porat L, Boyer J, Britten CM, Clay TM, et al. Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother* 2008;57(3):303–15.
  14. Britten CM, Janetzki S, Ben-Porat L, Clay TM, Kalos M, Maecker H, et al. Harmonization guidelines for HLA-peptide multimer assays derived from results of a large scale international proficiency panel of the Cancer Vaccine Consortium. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58(10):1701–13.
  15. Choi YW, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J. Interaction of Staphylococcus aureus toxin “superantigens” with human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(22):8941–5.
  16. Labrecque N, McGrath H, Subramanyam M, Huber BT, Sekaly RP. Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigen: V beta restriction and conserved evolutionary features. *J Exp Med* 1993;177(6):1735–43.
  17. Hoos A, Parmiani G, Hege K, Sznol M, Loibner H, Eggermont A, et al. A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. *J Immunother (1997)* 2007;30(1):1–15.
  18. Menard C, Martin F, Apetoh L, Bouyer F, Ghiringhelli F. Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2008.
  19. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer

chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008;8(1):59–73.

20. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(5):641–8.

21. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13(9):1050–9.

22. Lacour S, Hammann A, Wotawa A, Corcos L, Solary E, Dimanche-Boitrel MT. Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Res* 2001;61(4):1645–51.

23. Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(11):783–9.

24. Correale P, Cusi MG, Del Vecchio MT, Aquino A, Prete SP, Tsang KY, et al. Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity in vitro. *J Immunol* 2005;175(2):820–8.

25. Zisman A, Ng CP, Pantuck AJ, Bonavida B, Belldegrun AS. Actinomycin D and gemcitabine synergistically sensitize androgen-independent prostate cancer cells to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis. *J Immunother (1997)* 2001;24(6):459–71.

26. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 2005;11(18):6713–21.

27. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res* 2002;62(8):2353–8.

28. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res* 2003;63(15):4490–6.

29. Bauer CA, Bauernfeind F, Sterzik A, Orban M, Schnurr M, Lehr HA, et al. Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model. *Gut* 2007.

30. Correale P, Cusi MG, Tsang KY, Del Vecchio MT, Marsili S, Placa ML, et al.

Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23(35):8950-8.

31. Bang S, Kim HS, Choo YS, Park SW, Chung JB, Song SY. Differences in immune cells engaged in cell-mediated immunity after chemotherapy for far advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 2006;32(1):29-36.

32. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1755-66.

33. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2(10):1096-103.

34. Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1998;160(3):1224-32.

35. Morita Y, Heike Y, Kawakami M, Miura O, Nakatsuka S, Ebisawa M, et al. Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Cancer* 2006;119(6):1360-7.

36. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994;84(9):3071-9.

37. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 1999;90(2):194-204.

38. Morita S, Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, Maruno M, Izumoto S, et al. A phase I/II trial of a WT1 (Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: safety assessment based on the phase I data. *Jpn J Clin Oncol* 2006;36(4):231-6.

39. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(38):13885-90.

40. Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, Nakatsuka S, Yokota A, Tatsumi N, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2004;95(7):583-7.

## 参 考 論 文

参考論文については学術雑誌掲載論文から構成されていますが、著作権者(出版社、学会等)の許諾を得ていないため、筑波大学では電子化・公開しておりません。

論文は電子ジャーナルとして出版社から公開されています。契約している場合は全文を読むことができます。詳しくは下記のリンク先をご覧ください。

<http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyp112>