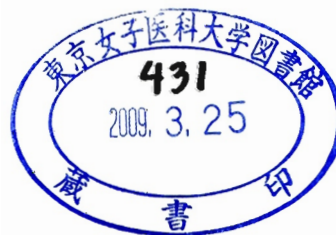


クローン技術を用いたES細胞からの樹状 細胞の誘導と細胞医療への応用

(課題番号：16591278)

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C))研究成果報告書



平成20年 3 月

研究代表者 竹下 信啓
東京女子医科大学医学部



＜ は し が き ＞

強力な抗原提示細胞である樹状細胞を用いた免疫細胞療法は悪性疾患に対する新しい治療法として期待されているが、末梢血中に存在する樹状細胞前区細胞の数は極めて少なく、また体外での培養にて分裂増殖させることが困難であるため、樹状細胞の利用には白血球成分採取装置を用いて大量の血液を処理しなくてはならない。また、腫瘍抗原に対する獲得免疫を誘導するためには抗原提示細胞上に患者本人と同一の HLA 発現が必要であるため、非自己由来の樹状細胞の利用は困難となっている。しかし、癌患者ではしばしば全身状態が不良なため患者本人からの十分な樹状細胞採取が困難である場合も多く、樹状細胞を用いた免疫細胞療法の施行に大きな課題を残している。今回、この問題を解決するために、多分化能を有する ES 細胞を用いて樹状細胞への分化誘導を試み、さらに細胞融合や核移植クローン技術を利用して個々の HLA に適合した ES 細胞由来樹状細胞 (ES-DC) の作製を試み、新しい免疫細胞治療への応用開発を目指す研究を実施した。

研究組織

研究代表者 竹下 信啓（東京女子医科大学医学部助教）

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成16年度	1,400,000	0	1,400,000
平成17年度	1,000,000	0	1,000,000
平成18年度	1,000,000	0	1,000,000
総 計	3,400,000	0	3,400,000

「研究発表」

(ア) 学会誌等

- (1) 有賀淳、小寺由人、竹下信啓、奥山隆二、清水公一、山本雅一。肝内胆管がんに対する樹状細胞がんワクチン療法。 *Biotherapy*, 2007, 21(5), 307-314.
- (2) 太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、藤崎宏之、小貫建一郎、山本雅一。胆嚢癌の伸展度に応じた治療の選択。 *消化器*, 2007, 45(3), 330-337.
- (3) 新井田達雄、吉川達也、太田岳洋、梶山英樹、谷澤武久、樋口亮太、竹下信啓、鬼澤俊輔、濱野美枝、山本雅一。進行胆嚢癌に対して膵頭十二指腸切除(PD)は意味があるか。 *外科*, 2007, 69(11), 1307-1312.
- (4) 太田岳洋、新井田達雄、谷澤武久、梶山英樹、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、山本雅一。胆嚢癌リンパ節転移陽性生存例の臨床像—術前診断で術式選択が可能か— *胆と膵*, 2006, 27(9), 655-659.
- (5) 清水公一、竹下信啓、小寺由人、山本雅一、高崎健、有賀淳。皮内反応は腫瘍抗原に対する特異的免疫反応と臨床効果の指標になるか。 *Bitotherapy*, 2006, 20(2), 190-196.
- (6) 松下典正、小林泰信、田中宜之、中尾真修、清水公一、竹下信啓、谷川啓司、有賀淳。腫瘍細胞の多様性に対応した複合癌免疫細胞療法の新規開発。 *癌と化学療法*, 2004, 31(11), 1655-1658.

(イ) 口頭発表

(A) 国際学会

- (1) R. Higuchi, T. Ohta, M. Hamano, N. Takeshita, T. Tanizawa, T. Araida, M. Yamamoto. Postoperative complications and countermeasures after biliary surgery. 17th Joint Congress of Asia & Pacific Federations & 53rd Annual Congress of the Japan, Kyoto, 2007, 6.
- (2) R. Higuchi, T. Ohta, M. Hamano, N. Takeshita, T. Tanizawa, T. Araida, M. Yamamoto. Clinicopathological analysis of cystic duct carcinoma. 17th Joint Congress of Asia & Pacific Federations & 53rd Annual Congress of the Japan, Kyoto, 2007, 6.
- (3) R. Higuchi, T. Ohta, M. Hamano, N. Takeshita, T. Tanizawa, T. Araida, M. Yamamoto. Surgery for T2 gallbladder cancer. First Biennial Congress of the

Asian-pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association, Fukuoka, 2007, 3.

- (4) R. Higuchi, T. Araida, T. Ohta, M. Hamano, N. Takeshita, Y. Kotera, M. Yamamoto, T. Yoshikawa, K. Takasaki. Significance of bile duct resection to prevent lymph node metastasis and local recurrence of advanced gallbladder cancer. 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association and the 10th Annual Meeting of the Association of Upper Gastrointestinal Surgeons of Great Britain & Ireland, Scotland, 2006, 9.
- (5) T. Tanizawa, S. Katagiri, T. Araida, T. Ohta, M. Hamano, N. Takeshita, R. Higuchi, Y. Kotera, M. Yamamoto, K. Takasaki. Assessment of arterial infiltration by cancer of the bile tract using ultrasonography with pulse Doppler method. 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association and the 10th Annual Meeting of the Association of Upper Gastrointestinal Surgeons of Great Britain & Ireland, Scotland, 2006, 9.
- (6) N. Takeshita, K. Shimizu, Y. Kotera, N. Koike, A. Aruga, M. Yamamoto, K. Takasaki. A phase II clinical trial of immunotherapy with tumor lysate-pulsed DC vaccine as an adjuvant therapy for prevention of a postsurgical relapse of advanced hepatocellular carcinoma with progressive factors. AACR 97th Annual Meeting, Washington. 2006, 4.
- (7) R. Higuchi, M. Yamamoto, T. Araida, T. Ohta, S. Katagiri, M. Hamano, N. Takeshita, S. Ariizumi, Y. Kotera, K. Imai, K. Takasaki. A resected case of intrahepatic cholangiocarcinoma with pancreaticobiliary maljunction. 13th International Postgraduate Course for the International Association of Surgeons and Gastroenterologists, Greece, 2005, 12.
- (8) R. Higuchi, T. Ohta, N. Takeshita, M. Hamano, K. Imai, T. Araida, M. Yamamoto, K. Takasaki. Hepatectomy for obstructive jaundice after insufficient biliary drainage. The 51th Annual Congress of the Japan Section, Sapporo, 2005, 5.
- (9) K. Shimizu, N. Takeshita, Y. Kotera, T. Ohtsubo, S. Katagiri, K. Yoshitoshi, M. Yamamoto, A. Aruga, K. Takasaki. Combination therapy of tumor Lysate-pulsed dendritic cells and adoptive transfer of anti-CD3 activated T cells to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: A Phase II study. XXX IV World Congress of the International College of Surgeons, Ecuador, 2004, 10.
- (10) K. Shimizu, K. Tanigawa, N. Takeshita, A. Aruga, James J. Mule, K. Takasaki. A phase I trial of combination therapy of tumor Lysate-pulsed dendritic cells and adoptive transfer of anti-CD3 activated T cells in patients with advanced gastrointestinal cancers. ASCO 40th Annual Meeting., 2004, 6.

- (11) M. Hamano, T. Ohta, M. Yamamoto, T. Araida, Y. Kotera, N. Takeshita, K. Takasaki. Cholecystostomy for acute cholecystitis is effective for patient with severe complications. 6th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Washington, DC, 2004, 6.
- (12) N. Takeshita, A. Aruga, Y. Kotera, N. Matsushita, K. Shimizu, K. Takasaki. Can the combination immunotherapy of vaccine of tumor Lysate-pulsed dendritic cells and adoptive transfer of cytokine activated T cells protect the postsurgical tumor relapse of hepatocellular carcinoma? AACR 95th Annual Meeting, 2004, 3.
- (13) K. Shimizu, K. Tanigawa, N. Takeshita, A. Aruga, James J. Mule, K. Takasaki. A phase I trial of combination therapy of tumor Lysate-pulsed dendritic cells and adoptive transfer of anti-CD3 activated T cells in patients with advanced gastrointestinal cancers. TVACT meeting X, Florida, 2004, 3.
- (14) N. Matsushita, Y. Kobayashi, Y. Tanaka, M. Nakao, N. Takeshita, Y. Kotera, K. Shimizu, K. Takasaki, K. Tanigawa. Combined cell therapy by using dendritic cells, T cells and NK cells for cancer specific plus non-specific immunotherapy. TVACT meeting X, Florida, 2004, 3.

(B) 国内学会・研究会

- (1) 小寺由人、竹下信啓、奥山隆二、山本雅一、有賀淳。肝内胆管癌に対する樹状細胞がんワクチン療法の現状と多施設共同研究の課題。第20回日本バイオセラピー学会学術集会総会、札幌、2007. 10.
- (2) 竹下信啓、太田岳洋、濱野美枝、新井田達雄、吉川達也、山本雅一。胆嚢癌における肝切除、胆管温存、膵切除の是非。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (3) 藤崎宏之、太田岳洋、小貫建一郎、梶山英樹、谷澤武久、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、山本雅一。二度の再切除術を施行し長期生存を得た粘液産生胆管癌の一例。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (4) 谷澤武久、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、梶山英樹、藤崎宏之、小貫建一郎、唐澤英偉、山本雅一。造影USで興味深い画像を呈した陶器様胆嚢合併の胆嚢癌の一例。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (5) 濱野美枝、太田岳洋、竹下信啓、藤崎宏之、小貫建一郎、山本雅一。胆道癌再切除症例の検討。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (6) 樋口亮太、太田岳洋、古川徹、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、梶山英樹、谷澤

- 武久、小貫建一郎、手塚徹、矢川陽介、安田秀樹、山本雅一。胆管癌切除症例における胆管断端陽性症例の予後について。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (7) 小貫建一郎、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、谷澤武久、藤崎宏之、山本雅一。胆嚢癌との鑑別に苦慮した慢性胆のう炎の1例。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (8) 樋口亮太、太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、梶山英樹、谷澤武久、藤崎宏之、手塚徹、矢川陽介、安田秀樹、山本雅一。肝門部胆管癌切除例におけるリンパ節転移個数と予後について。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (9) 新井田達雄、太田岳洋、吉川達也、樋口亮太、梶山英樹、谷澤武久、竹下信啓、鬼澤俊輔、山本雅一。胆嚢癌に対する肝切除、胆管切除、膵切除の是非。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (10) 太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、鬼澤俊輔、樋口亮太、谷澤武久、藤崎宏之、山本雅一。肝門部胆管癌に対する治療方針と成績。第43回日本胆道学会学術集会、東京、2007, 9.
- (11) 高山敬子、清水京子、大橋美穂、鈴木大輔、竹下信啓、濱野美枝、太田岳洋、藤田泉、杉木孝章、羽鳥隆、白鳥敬子、古川徹。胆管の腺筋腫症様病変と胆管癌を合併した先天性胆道拡張症の1例。第47回日本消化器画像診断研究会、久留米、2007, 9.
- (12) 竹下信啓、小寺由人、小池伸定、奥山隆二、有賀淳、山本雅一。肝細胞癌における術後再発予防を目的とした自家腫瘍抽出抗原提示樹状細胞を用いた免疫療法。第62回日本消化器外科学会定期学術集会、東京、2007, 7.
- (13) 太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、藤崎宏之、小貫建一郎。胆嚢癌、胆管癌に対する血管合併切除の成績と意義に関する検討。第62回日本消化器外科学会定期学術集会、東京、2007, 7.
- (14) 新井田達雄、太田岳洋、吉川達也、樋口亮太、濱野美枝、竹下信啓、鬼澤俊輔、梶山英樹、山本雅一。進行胆嚢癌に対する拡大手術の適応と限界。第62回日本消化器外科学会定期学術集会、東京、2007, 7.
- (15) 樋口亮太、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、谷澤武久、新井田達雄、山本雅一。胆道癌肝切除例の術後合併症とその対策。第62回日本消化器外科学会定期学術集会、東京、2007, 7.
- (16) 小貫建一郎、有泉俊一、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、小池伸定、樋口亮太、谷澤武久、山本雅一、中野雅行。肝内グリソン鞘内に転移巣を伴う腫瘍形成型肝内胆管癌の一例。第43回日本肝癌研究会、東京、2007, 6.
- (17) 小寺由人、竹下信啓、奥山隆二、有賀淳、山本雅一。樹状細胞がんワクチンに対

- する皮膚反応と臨床効果。 第 16 回日本癌病態治療研究会、東京、2007, 6.
- (18) 樋口亮太、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、谷澤武久、新井田達雄、山本雅一。胆道癌肝切除例における術後感染症の危険因子。 第 32 回日本外科系連合学会学術集会、東京、2007, 6.
- (19) 樋口亮太、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、谷澤武久、新井田達雄、山本雅一。中部胆管癌切除症例の治療成績と予後因子。 第 32 回日本外科系連合学会学術集会、東京、2007, 6.
- (20) 藤崎宏之、太田岳洋、小貫建一郎、谷澤武久、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、新井田達雄。右肝円索を伴った肝門部胆管癌の一例。 第 19 回日本肝胆膵外科学会学術集会、横浜、2007, 6.
- (21) 樋口亮太、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、谷澤武久、新井田達雄、山本雅一。胆嚢管癌の臨床病理学的検討。 第 19 回日本肝胆膵外科学会学術集会、横浜、2007, 6.
- (22) 濱野美枝、太田岳洋、竹下信啓、小池伸定、樋口亮太、谷澤武久、藤崎宏之、小貫建一郎、新井田達雄。粘液産生胆管癌の一切除例。 第 19 回日本肝胆膵外科学会学術集会、横浜、2007, 6.
- (23) 小貫建一郎、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、谷澤武久、藤崎宏之、新井田達雄。完全型膵管非融合を合併した先天性胆道拡張型、膵胆管合流異常症の 1 例。 第 19 回日本肝胆膵外科学会学術集会、横浜、2007, 6.
- (24) 太田岳洋、小貫建一郎、藤崎宏之、谷澤武久、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、新井田達雄。肝門部胆管癌の治療方針と手術成績。 第 19 回日本肝胆膵外科学会学術集会、横浜、2007, 6.
- (25) 谷澤武久、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、梶山英樹、藤崎宏之、小貫建一郎、吉川達也、山本雅一。腹腔鏡下及び開腹下胆嚢摘出術後の良性胆道狭窄症例の検討。 第 19 回日本肝胆膵外科学会学術集会、横浜、2007, 6.
- (26) 樋口亮太、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、小寺由人、梶山英樹、谷澤武久、山本雅一。Binf 陽性胆嚢癌に対する手術適応。 第 108 回日本外科学会定期学術集会、大阪、2007, 4.
- (27) 太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、谷澤武久、梶山英樹、山本雅一。肝門部胆管癌切除後の複数の胆管枝再建の工夫。 第 68 回日本臨床外科学会総会、広島、2006, 11.
- (28) 濱野美枝、新井田達雄、太田岳洋、竹下信啓、樋口亮太、梶山英樹、谷澤武久、佐藤拓也、門前正憲。幽門輪温存幽門側胃切除術後 3 ヶ月後に発症した柿胃石によるイレウスの一例。 第 68 回日本臨床外科学会総会、広島、2006, 11.
- (29) 谷澤武久、太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、梶山英樹、山本雅一。黄疸で発症した胆管内腫瘍栓を伴う肝細胞癌の一切除例。 第 68 回日

- 本臨床外科学会総会、広島、2006, 11.
- (30) 山本雅一、内田数海、竹下信啓、林和彦、高崎健、山本雅一。肝内胆管癌多発肝転移に対しタキソールが著効した1例。第68回日本臨床外科学会総会、広島、2006, 11.
- (31) 樋口亮太、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、小寺由人、梶山英樹、谷澤武久、山本雅一、吉川達也、高崎健。進行胆嚢癌手術における合併症予防対策と治療。第68回日本臨床外科学会総会、広島、2006, 11.
- (32) 新井田達雄、太田岳洋、吉川達也、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、谷澤武久、梶山英樹、山本雅一。Ss以深胆嚢癌の至適術式。第68回日本臨床外科学会総会、広島、2006, 11.
- (33) 竹下信啓、嵐陽子、新井田達雄、中村努、小寺由人、樋口亮太、梶山英樹、工藤健司、金子由香、山口大輔、高崎健、山本雅一。膵十二指腸動脈瘤破裂により後腹膜血腫を形成し十二指腸狭窄を来した一例。第68回日本臨床外科学会総会、広島、2006, 11.
- (34) 有賀淳、竹下信啓、小寺由人、小池伸定、奥山隆二、清水公一、山本雅一。私の提案する多施設共同研究—樹状細胞がんワクチン療法—。第19回日本バイオセラピー学会学術集会総会、山口、2006, 11.
- (35) 竹下信啓、太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、樋口亮太、谷澤武久、吉川達也、山本雅一。胆管拡張型膵・胆管合流異常における遠隔成績からみた治療法の選択。第29回日本膵管胆道合流異常研究会、徳島、2006, 10.
- (36) 樋口亮太、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、小寺由人、梶山英樹、谷澤武久、山本雅一、吉川達也、高崎健。Ss胆嚢癌に対する手術術式。第42回日本胆道学会学術集会、仙台、2006, 9.
- (37) 濱野美枝、新井田達雄、太田岳洋、竹下信啓、小寺由人、樋口亮太、梶山英樹、谷澤武久、山本雅一、吉川達也、高崎健。十二指腸乳頭腫瘍に対する治療の工夫。第42回日本胆道学会学術集会、仙台、2006, 9.
- (38) 太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、谷澤武久、梶山英樹、山本雅一。肝門部・上部胆管癌に対するアプローチ。第42回日本胆道学会学術集会、仙台、2006, 9.
- (39) 谷澤武久、太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、梶山英樹、山本雅一。十二指腸乳頭部癌術後、肝転移及びリンパ節再発に対し2回の外科手術により長期生存を得た1例。第42回日本胆道学会学術集会、仙台、2006, 9.
- (40) 清水公一、片桐聡、吉利賢治、竹下信啓、小寺由人、有泉俊一、大坪毅人、有賀淳、山本雅一、高崎健。進行肝細胞癌に対して、外科切除後の補助免疫細胞療法は再発抑制効果があるか？第42回日本肝癌研究会、東京、2006, 7.
- (41) 竹下信啓、太田岳洋、濱野美枝、樋口亮太、新井田達雄、山本雅一、吉川達也、高

- 崎健。胆管非拡張型膵・胆管合流異常に対する治療戦略。第 61 回日本消化器外科学会定期学術集会、横浜、2006, 7.
- (42) 濱野美枝、新井田達雄、太田岳洋、竹下信啓、小寺由人、樋口亮太、山本雅一、高崎健。十二指腸乳頭腫瘍に対する縮小手術。第 61 回日本消化器外科学会定期学術集会、横浜、2006, 7.
- (43) 谷澤武久、片桐聡、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、山本雅一、高崎健。パルスドプラ法による胆道癌動脈浸潤の検討。第 61 回日本消化器外科学会定期学術集会、横浜、2006, 7.
- (44) 樋口亮太、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、小寺由人、山本雅一、吉川達也、高崎健。進行胆嚢癌に対するリンパ節郭清や脈管浸潤を郭清するための予防的な肝外胆管切除の意義。第 61 回日本消化器外科学会定期学術集会、横浜、2006, 7.
- (45) 新井田達雄、太田岳洋、吉川達也、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、山本雅一、高崎健。Ss 胆嚢癌の治療戦略。第 61 回日本消化器外科学会定期学術集会、横浜、2006, 7.
- (46) 太田岳洋、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、新井田達雄、山本雅一、高崎健。肝門部胆管癌の治療戦略。第 61 回日本消化器外科学会定期学術集会、横浜、2006, 7.
- (47) 清水公一、片桐聡、吉利賢治、竹下信啓、小寺由人、有泉俊一、大坪毅人、有賀淳、山本雅一、高崎健。進行肝細胞癌に対して、外科切除後の補助免疫細胞療法は再発抑制効果があるか？第 II 相臨床試験。第 42 回日本肝癌研究会、東京、2006, 7.
- (48) 樋口亮太、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、谷澤武久、山本雅一、高崎健、大坪毅人。閉塞性黄疸を伴う肝切除例での残存肝機能評価法。第 23 回日本胆膵生理機能研究会、東京、2006, 6.
- (49) 谷澤武久、片桐聡、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、梶山英樹、山本雅一。パルスドプラ法を用いた胆道癌動脈浸潤の検討。第 23 回日本胆膵生理機能研究会、東京、2006, 6.
- (50) 竹下信啓、太田岳洋、濱野美枝、新井田達雄、吉川達也、山本雅一、高崎健。胆管非拡張型膵・胆管合流異常症の治療戦略。第 18 回日本肝胆膵外科関連会議、東京、2006, 5.
- (51) 樋口亮太、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、小寺由人、山本雅一、吉川達也、高崎健。胆摘後に偶然発見された胆嚢癌に対する追加切除の適応と予後。第 18 回日本肝胆膵外科関連会議、東京、2006, 5.
- (52) 太田岳洋、山本雅一、新井田達雄、濱野美枝、竹下信啓、樋口亮太、高崎健。肝門部胆管癌の局所解剖と術式選択。第 18 回日本肝胆膵外科関連会議、東京、2006,

- 5.
- (53) 濱野美枝、新井田達雄、太田岳洋、竹下信啓、小寺由人、樋口亮太、高崎健。 十二指腸乳頭部腫瘍に対する縮小手術。 第 18 回日本肝胆膵外科関連会議、東京、2006, 5.
- (54) 樋口亮太、新井田達雄、太田岳洋、濱野美枝、竹下信啓、小寺由人、今井健一郎、山本雅一、吉川達也、高崎健。 進行胆嚢癌における肝切除範囲の検討。 第 106 回日本外科学会定期学術集会、東京、2006, 3.
- (55) 有賀淳、清水公一、竹下信啓、小寺由人、小池伸定、高崎健。 臨床医療における細胞療法実施のための設備構築と GMP 導入の現状と問題点。 第 18 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、山口、2005, 12.
- (56) 清水公一、竹下信啓、小寺由人、桂川秀雄、片桐聡、吉利賢治、有泉俊一、有賀淳、山本雅一、高崎健。 肝細胞癌術後再発ハイリスク群に対して免疫細胞療法は再発抑制効果がある。 第 18 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、山口、2005, 12.
- (57) 山田有希子、太田岳洋、山本雅一、新井田達雄、竹下信啓、今井健一郎、谷澤武久、高崎健。 術前診断可能であった肝内結石症に合併した肝内胆管癌の一例。 第 799 回外科集談会、東京、2005, 12.
- (58) 新井田達雄、太田岳洋、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、高崎健。 十二指腸乳頭部癌の手術術式の再考。 第 67 回日本臨床外科学会総会、東京、2005, 11.
- (59) 太田岳洋、樋口亮太、小寺由人、竹下信啓、濱野美枝、新井田達雄、山本雅一、吉川達也、高崎健。 肝門部胆管癌の治療戦略と切除成績。 第 67 回日本臨床外科学会総会、東京、2005, 11.
- (60) 太田岳洋、樋口亮太、富岡寛行、竹下信啓、濱野美枝、新井田達雄、山本雅一、高崎健。 粘液産生胆管腫瘍の臨床病理学的検討。 第 41 回日本胆道学会学術集会、岡山、2005, 9.
- (61) 竹下信啓、太田岳洋、新井田達雄、濱野美枝、吉川達也、高崎健。 膵・胆管合流異常症における長期成績からみた治療法の選択。 第 60 回日本消化器外科学会定期学術集会、東京、2005, 7.
- (62) 清水公一、竹下信啓、桂川秀雄、片桐聡、吉利賢治、小寺由人、有泉俊一、有賀淳、山本雅一、高崎健。 肝細胞癌術後再発ハイリスク群に対して免疫細胞療法は再発抑制効果がある。 第 60 回日本消化器外科学会定期学術集会、東京、2005, 7.
- (63) 太田岳洋、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、新井田達雄、山本雅一、高崎健。 肝門部胆管癌に対する血管合併切除の意義—適応と限界—。 第 60 回日本消化器外科学会定期学術集会、東京、2005, 7.
- (64) 竹下信啓、太田岳洋、新井田達雄、吉川達也、高崎健。 胆管非拡張型膵・胆管合流異常症の治療戦略。 第 30 回日本外科系連合学会学術集会、東京、2005, 6.
- (65) 樋口亮太、山本雅一、新井田達雄、太田岳洋、竹下信啓、今井健一郎、高崎健。 膵

- 胆管合流異常を伴う肝内胆管癌の一切除例。 第 17 回日本肝胆膵外科学会、横浜、2005, 6.
- (66) 新井田達雄、太田岳洋、吉川達也、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、高崎健。 壁深達度別胆嚢癌外科治療の再考。 第 17 回日本肝胆膵外科学会、横浜、2005, 6.
- (67) 太田岳洋、樋口亮太、竹下信啓、濱野美枝、新井田達雄、山本雅一、高崎健。 十二指腸乳頭部癌切除例の検討—特に縮小手術の適応と成績に関して—。 第 17 回日本肝胆膵外科学会、横浜、2005, 6.
- (68) 清水公一、谷川啓司、竹下信啓、小寺由人、羽鳥隆、吉利賢治、山本雅一、有賀淳、高崎健。 皮内反応は腫瘍抗原に対する特異的免疫反応と臨床効果の指標となるか。 第 26 回癌免疫外科研究会、東京、2005, 5.
- (69) 竹下信啓、清水公一、小寺由人、松下典正、有賀淳、高崎健。 肝細胞癌に対する術後再発予防としての樹状細胞ワクチンによる皮内反応の意義。 第 105 回日本外科学会定期学術集会、名古屋、2005, 5.
- (70) 太田岳洋、樋口亮太、竹下信啓、新井田達雄、山本雅一、吉川達也、高崎健。 進行胆道癌に対する HPD。 第 105 回日本外科学会定期学術集会、名古屋、2005, 5.
- (71) 有賀淳、松下典正、須藤俊美、小峰啓史、中尾真修、田中宜之、竹下信啓、清水公一、小林泰信、谷川啓司。 NK 細胞を用いた癌免疫細胞療法の新展開。 第 17 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、北九州、2004, 11.
- (72) 清水公一、竹下信啓、松下典正、山本雅一、有賀淳、高崎健。 HCV 陽性進行肝細胞癌治療切除後の補助免疫細胞療法：第 2 相臨床試験。 第 17 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、北九州、2004, 11.
- (73) 有賀淳、清水公一、竹下信啓、小寺由人、松下典正、谷川啓司、高崎健。 樹状細胞ワクチンと活性化リンパ球による消化器癌術後再発・転移予防効果。 第 42 回日本癌治療学会総会、京都、2004,10.
- (74) 清水公一、竹下信啓、大坪毅人、桂川秀雄、片桐聡、吉利賢治、松下典正、有賀淳、山本雅一、高崎健。 HCV 陽性進行肝細胞癌に対する補助療法の試み。 第 42 回日本癌治療学会総会、京都、2004,10.
- (75) 清水公一、谷川啓司、藤沢俊美、竹下信啓、有賀淳、高崎健。 消化器癌に対する自己癌抽出抗原提示樹状細胞癌ワクチン療法と活性化自己リンパ球移入療法の併用療法。 第 42 回日本癌治療学会総会、京都、2004,10.
- (76) 竹下信啓、清水公一、小寺由人、松下典正、有賀淳、高崎健。 自家腫瘍抽出抗原提示樹状細胞ワクチンによる皮内反応は、肝細胞癌に対する術後再発予防の免疫学的・臨床学的評価の指標になりうるか？ 第 42 回日本癌治療学会総会、京都、2004,10.
- (77) 小寺由人、竹下信啓、羽鳥隆、松下典正、清水公一、有賀淳、高崎健。 S-1 と樹状細胞ワクチン、活性化リンパ球治療併用した免疫細胞化学療法の 2 経験例。 第

- 42 回日本癌治療学会総会、京都、2004,10.
- (78) 高崎健、太田岳洋、竹下信啓、山本雅一、新井田達雄。胆道損傷、良性胆管狭窄に対する狭窄部胆管切除、胆管胆管端々吻合術。第 66 回日本臨床外科学会総会、盛岡、2004, 10.
- (79) 武井美名、太田岳洋、金子由香、君島映、松浦裕史、加藤孝章、谷澤武久、樋口亮太、畑地健一郎、竹下信啓、片桐聡、小熊英俊、新井田達雄、高崎健。幽門輪より発生した巨大 Brunner 腺腫の一切除例。第 66 回日本臨床外科学会総会、盛岡、2004, 10.
- (80) 太田岳洋、竹下信啓、新井田達雄、山本雅一、吉川達也、高崎健。胆嚢腺扁平上皮癌切除例の臨床病理学的検討。第 66 回日本臨床外科学会総会、盛岡、2004, 10.
- (81) 太田岳洋、竹下信啓、新井田達雄、山本雅一、高崎健。先天性胆道拡張症に対する外科治療の成績と問題点。第 66 回日本臨床外科学会総会、盛岡、2004, 10.
- (82) 嵐陽子、竹下信啓、新井田達雄、中村努、小寺由人、樋口亮太、梶山英樹、工藤健司、金子由香、山口大輔、高崎健。膵十二指腸動脈瘤破裂により後腹膜血腫を形成し十二指腸狭窄を来した一例。第 794 回外科集談会、東京、2004, 9.
- (83) 新井田達雄、竹下信啓、内田数海、太田岳洋、吉川達也、高崎健。進行胆嚢癌治療における集学的治療への新たな取り組み。第 40 回日本胆道学会学術集会、筑波、2004,9.
- (84) 有賀淳、清水公一、竹下信啓、小寺由人、松下典正、谷川啓司、高崎健。消化器癌に対する樹状細胞と活性化リンパ球を併用した複合癌免疫細胞療法。第 59 回日本消化器外科学会定期学術総会、鹿児島、2004.7.
- (85) 竹下信啓、有賀淳、高崎健、A.E. Chang, L. Stoolman. 肺転移モデルにおける免疫抑制メカニズムの解析—regulatory cell の存在と特性—第 59 回日本消化器外科学会定期学術総会、鹿児島、2004.7.
- (86) 清水公一、竹下信啓、小寺由人、吉利賢治、山本雅一、有賀淳、高崎健。Phase II trial of tumor Lysate-pulsed dendritic cell vaccination in combination with adoptive transfer of anti-CD3 antibody-activated T cells in intrahepatic cholangiocarcinoma. 第 25 回癌免疫外科研究会、京都、2004, 5.
- (87) 松下典正、田中宜之、中尾真修、清水公一、有賀淳、清水公一、竹下信啓、小林泰信、谷川啓司。腫瘍細胞の多様性に対応した複合癌免疫細胞療法の新規開発。第 25 回癌免疫外科研究会、京都、2004, 5.
- (88) 竹下信啓、清水公一、小寺由人、松下典正、有賀淳、高崎健。肝細胞癌における術後再発予防を目的とした新たな治療戦略：自家腫瘍抽出抗原提示樹状細胞／活性化リンパ球の併用による免疫療法は術後再発予防に有効か？第 25 回癌免疫外科研究会、京都、2004, 5.
- (89) 君島映、太田岳洋、金子由香、加藤孝章、谷澤武久、武井美名、樋口亮太、畑地健

一郎、竹下信啓、片桐聡、新井田達雄、高崎健。 胆嚢癌肉腫の 1 例。 第 278 回日本消化器病学会関東支部例会、東京、2004, 2.

- (90) 松下典正、田中宜之、中尾真修、有賀淳、谷川啓司、小林泰信、高崎健、清水公一、竹下信啓、小寺由人。 腫瘍特異的および非特異的免疫応答を併用した複合免疫細胞療法の開発。 第 35 回消化器病センター例会、東京、2004.1.

＜研究目的＞

プロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞を用いた免疫細胞療法（樹状細胞療法）は近い将来に、免疫学の臨床応用、特に細胞療法における中心的役割を果たす可能性がもっとも強いと期待されている治療法である。その応用範囲は癌治療を始め、自己免疫疾患や移植医療における免疫寛容の誘導など多岐にわたっており、現在国内外を含めて多くの臨床試験が進行していることは周知のとおりである。我々の施設でも 2000 年より主に肝臓癌、膵臓癌、胆管癌に対して自己腫瘍抽出抗原もしくは人工癌抗原を提示させた樹状細胞がんワクチン療法の基礎及び臨床研究を進めているが、現在までの実施経験から樹状細胞を利用した免疫細胞療法には次のような問題点があると考えている。

- 1, 末梢血に含まれる樹状細胞前駆細胞の数は極めて少なく、また、体外での培養にて容易に分裂増殖しないため、臨床応用には成分採血装置を用いたアフエーシスにより毎回 2L 以上の大量の血液を処理することが必要である。
- 2, 腫瘍抗原特異的免疫応答の誘導には樹状細胞上に自己と同一の HLA 発現が必要であるため、原則的に自己の樹状細胞を採取して使用することが必要であるが、しばしば進行癌患者の場合において、全身状態が不良なために十分量の前駆細胞を採取できない場合やアフエーシスそのものが実施できない場合も多い。
- 3, 樹状細胞は体外での培養にて分裂が極めて少ない細胞であるため、レトロウイルスなどを用いて長期に安定した発現を可能とする遺伝子導入が難しく、非自己樹状細胞の遺伝子改変による利用は困難と考えられる。

これら上述の問題を解決するため、近年研究が進められている多分化能を有する ES 細胞を用いて樹状細胞を分化誘導することを試み、さらに細胞融合や核移植クローン技術を利用して HLA の問題を解決可能な治療法を開発する目的で本研究を計画した。マウス ES 細胞を用いた基礎実験を行い、その結果を基に、将来的にはヒト ES 細胞を用いた樹状細胞の分化誘導を検討することにより、患者自身の樹状細胞と同機能を有する ES 由来樹状細胞(ESDC)が容易に十分量得られることが可能となれば、現在の問題点を解決して臨床応用の普及が期待される。

<研究内容>

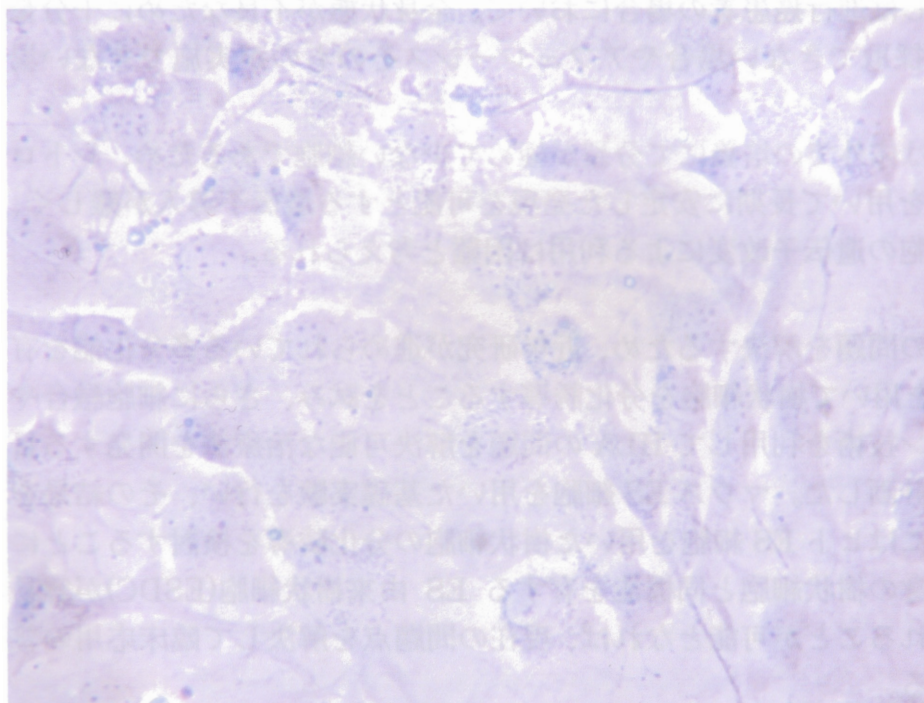
1. マウスES細胞の培養

(1) マウスfeeder細胞の培養

マウスfeeder細胞としてB6C3Fe-a/a由来OP9を理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。また、STO細胞を信州大学医学部佐々木克典教授より御供与頂いた。凍結feeder細胞を解凍し、10%FBS含有DMEM培養液にてゼラチンコートプレートにまいて培養し、細胞が増殖した時点でTrypsin/EDTAにて細胞を剥がして継代培養した。一部を凍結保存した。

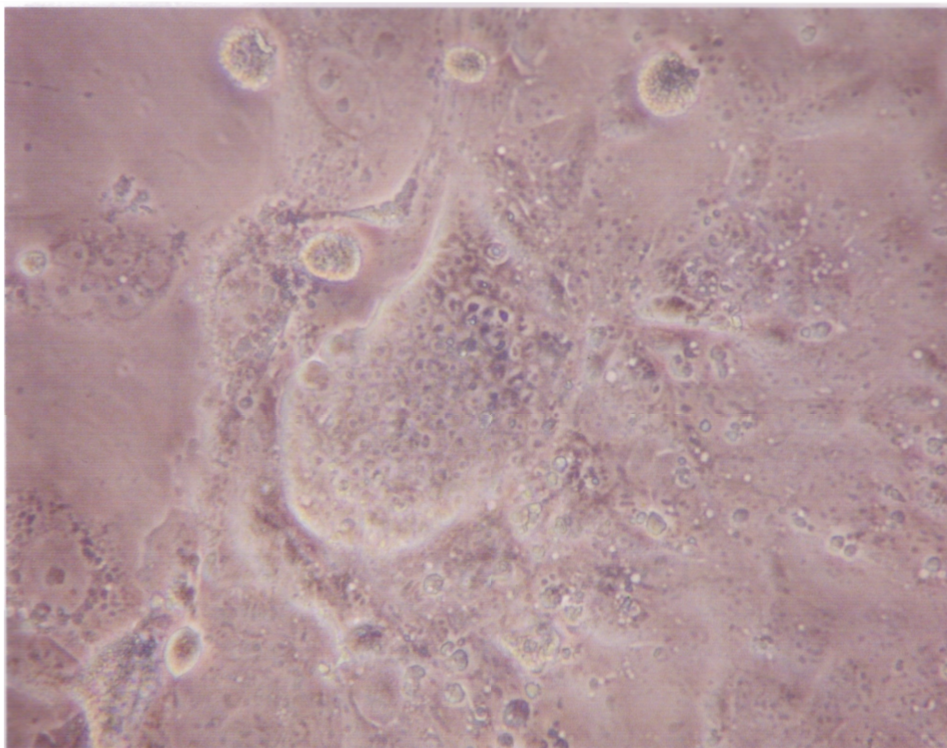
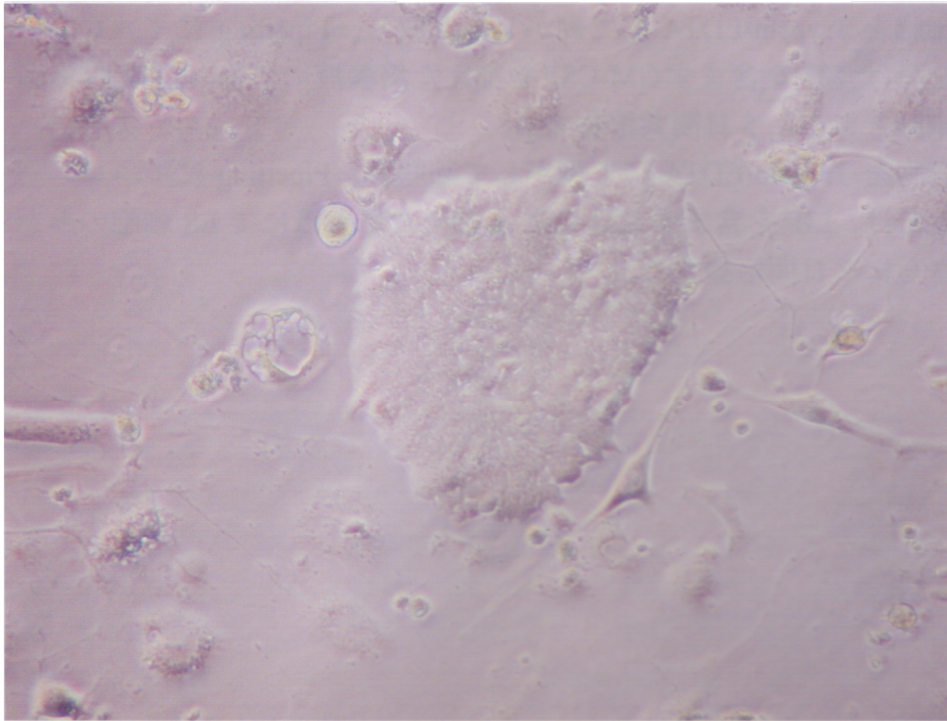
(2) マウスES細胞の培養

マウスES細胞としてC3Hマウス由来H-1を理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。また、129sv細胞及びD3細胞を信州大学医学部佐々木克典教授より御供与頂いた。feeder細胞を予めMMC処理し、解凍したES細胞と共培養した。培養液にはES細胞用complete medium(ESGRO)に10%ES細胞専用FCSとLIFを加えて使用した。数日後にES細胞のコロニー(Embryonic body)が増殖した時点で、Trypsin/EDTAにてES細胞コロニーを剥がして回収し、パイペッティングにてコロニーを分けて、さらに継代培養を行った。



STO feeder細胞

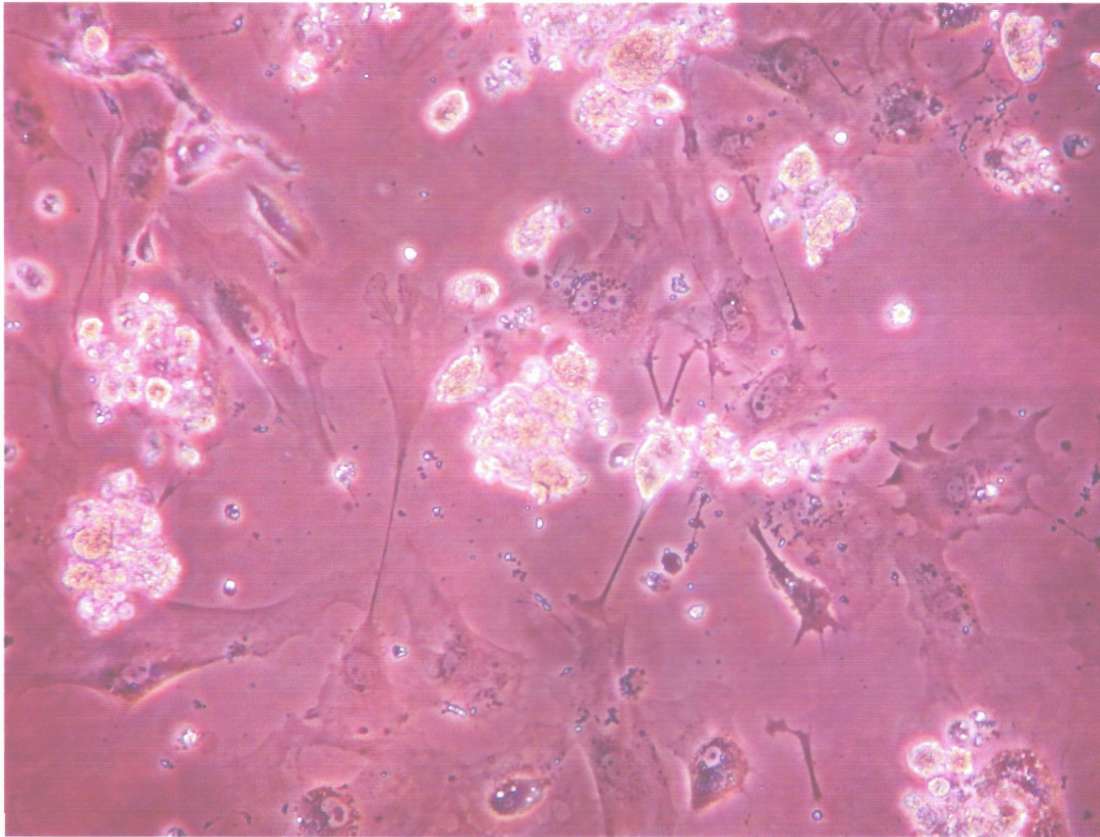
129sv ES細胞コロニー



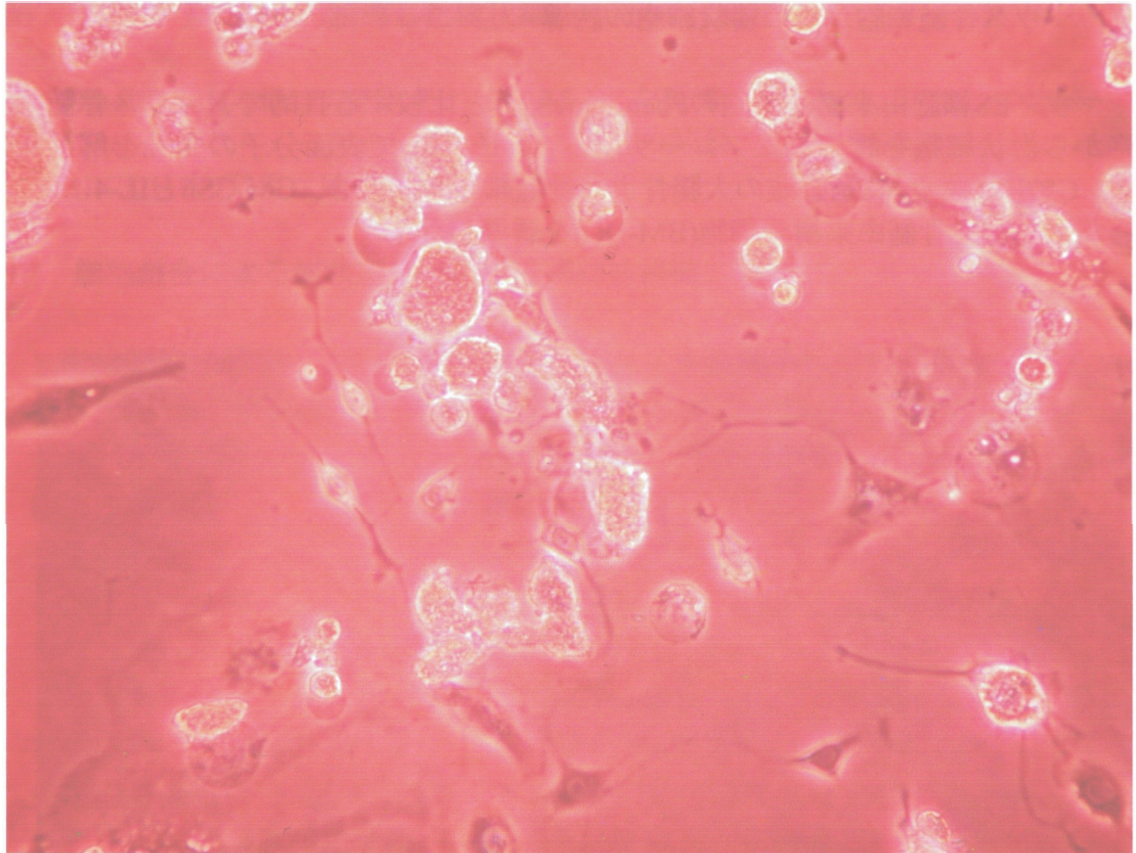
9) CCR1 (chemokine

2. マウスES細胞からの樹状細胞の誘導

- (1) マウス ES 細胞を MMC 処理 feeder 細胞と 5 日間共培養する。
- (2) 細胞を Trypsin/EDTA にて剥がして回収し、Pipetting にてコロニーを分け、LIF を含まず GM-CSF を加えた培養液にて MMC 処理 feeder 細胞とさらに 5 日間共培養する。
- (3) 細胞を Trypsin/EDTA にて剥がして回収し、Pipetting にてコロニーを分け、LIF を含まず GM-CSF を加えた培養液にて ES 細胞のみをさらに 7 日間培養する。



129sv ES-DC



H-1 ES-DC

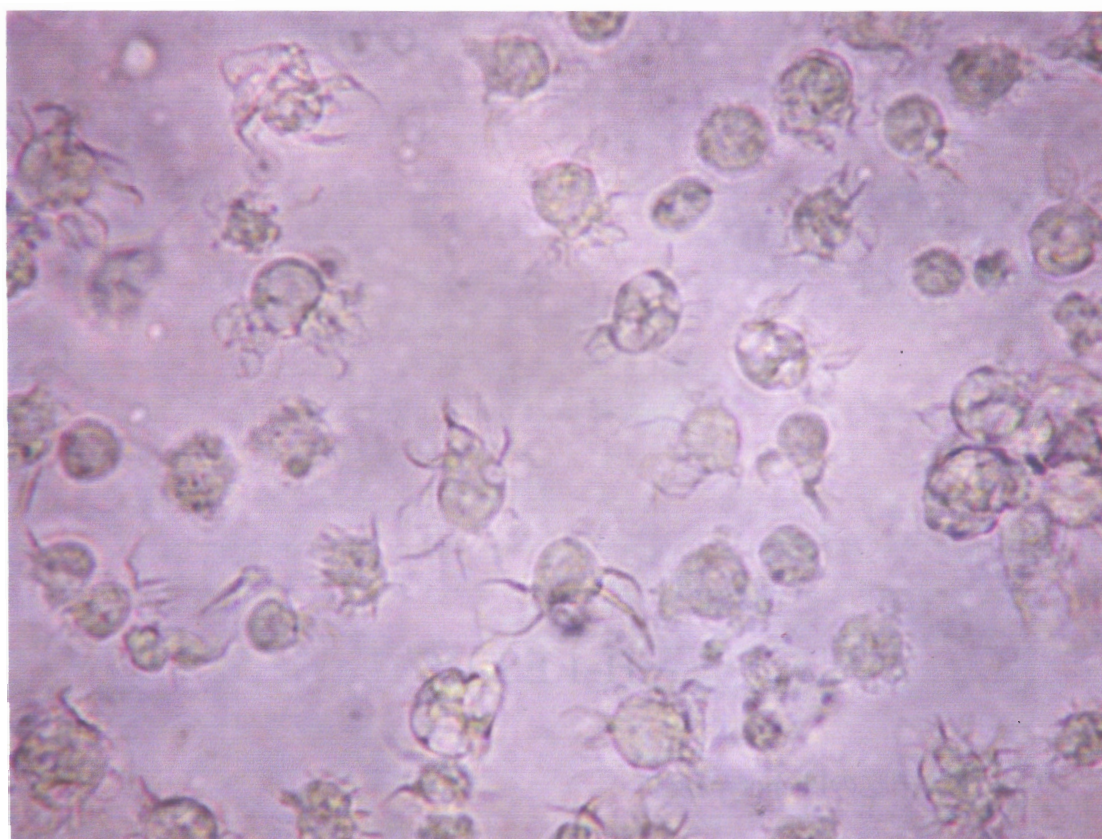
3. マウス樹状細胞のPhenotype解析

マウス樹状細胞に特徴的なPhenotypeをフローサイトメーターにて解析し、作製したES-DCが樹状細胞特徴的な分子発現を認めるかどうかを確認した。マウス樹状細胞に特徴的な表面分子として下記の分子が挙げられる。

- (1) MHC class II
- (2) ICAM-1 (adhesion molecule)
- (3) CD11c (adhesion molecule)
- (4) CD80
- (5) CD86
- (6) CD40 (signal pathway)
- (7) OX40Ligand
- (8) CD8 α
- (9) CCR7 (chemokine receptor)

4. マウス骨髄細胞からの樹状細胞の誘導

マウスES細胞由来樹状細胞のPhenotype解析と比較する目的で、マウス骨髄細胞から樹状細胞を誘導してフローサイトメーターにて表面分子の発現を解析した。C57BL6マウス8週齢雌の大腿骨より骨髄細胞を採取し、GM-CSFとIL-4にて1週間培養して骨髄由来樹状細胞(BM-DC)を誘導した。



BM-DC

5. マウス骨髄細胞から誘導した樹状細胞のPhenotype解析

マウスBM-DCのPhenotype解析では、MHC class II, ICAM-1, CD11c, CD80, CD86, CD40, OX40L, CCR7, CD8 α の発現が認められた。

6. マウスES細胞から誘導した樹状細胞のPhenotype解析

129sv細胞、H-1細胞のそれぞれよりES-DCを誘導し、CD11c, CD80, CD86の発現をフローサイトメーターにて解析した。その結果、CD80とCD86の発現を認めたが、CD11cの発現は確認されなかった。

7. 細胞融合による樹状細胞への腫瘍細胞核移植

樹状細胞に腫瘍細胞の核を移植することにより腫瘍抗原の発現を誘導することを試みた。細胞融合には不活化センダイウイルス外膜(HVJ-E)を用いた。センダイウイルスは外膜に存在するHNタンパク質がシアル酸を糖鎖の末端に持つ細胞膜上のレセプターを認識して吸着し、もう一つのエンベロープ成分であるFタンパク質を介して膜融合を引き起こす。このウイルスを完全に不活化して外膜のみとしたHVJ-Eは感染性や増殖性がなく細胞膜融合能のみを有したベジクルとして細胞融合に有用と考えられている。

ヒト末梢血単核細胞を採取し、GM-CSFとIL-4にて1週間培養して誘導した樹状細胞をPKH26を用いて赤色に染色し、ヒト胆嚢癌細胞株AGをPKH67を用いて緑色に染色した後に、HVJ-Eを用いて細胞融合を行った。細胞融合処置後、蛍光顕微鏡にて観察し、黄色に染色される融合細胞を確認した。この腫瘍細胞核移植樹状細胞をさらにGM-CSFとIL-4を添加した培養液にて継続して培養を試みたが、融合した細胞はその後の分裂増殖を認めず、やがて自然死した。これより融合細胞を培養増殖させることは困難であることが推測される。

8. マウス腫瘍細胞株とマウス骨髓由来樹状細胞の細胞融合

同様の方法を用いて、C57BL6マウス由来の腫瘍細胞株B16と同系マウス骨髓由来樹状細胞の細胞融合を試みた。B16腫瘍をPKH67で緑に染色し、BM-DCをPKH26で赤色に染色した後に、HVJ-Eを用いて細胞融合を行い、蛍光顕微鏡で黄色に染色した融合細胞を確認した。この融合細胞をGM-CSFとIL-4を添加した培養液にて継続して培養を試みたが、その後の分裂増殖は認められず、やがて自然死した。以上より、マウスのモデルにおいても細胞融合は可能であったが、融合細胞を引き続き培養することにより分裂増殖させることは困難であることが示唆された。

9. マウス腫瘍細胞株とマウスES細胞由来樹状細胞の細胞融合

同様の方法を用いて、C57BL6マウス由来の腫瘍細胞株B16と129sv ES細胞から誘導した樹状細胞(ES-DC)の細胞融合を試みた。B16腫瘍をPKH67で緑に染色し、

129sv ES-DCをPKH26で赤色に染色した後に、HVJ-Eを用いて細胞融合を行い、蛍光顕微鏡で黄色に染色した融合細胞を確認した。この融合細胞をGM-CSFとIL-4を添加した培養液にて継続して培養を試みたが、その後の分裂増殖は認められず、やがて自然死した。以上より、ES-DCを用いたモデルにおいても細胞融合は可能であったが、融合細胞を引き続き培養することにより分裂増殖させることは困難であることが示唆された。

10. マウス腫瘍細胞と骨髄由来樹状細胞の融合細胞によるin vivo Vaccination 効果

これまでの結果より、HVJ-Eを用いて腫瘍細胞と樹状細胞の融合細胞を作製することが可能であることが判明したが、融合後の細胞は分裂増殖を認めなかったことより、融合後の細胞をそのまま細胞免疫治療に利用する必要があることが必要と考えられた。まず、獲得免疫が誘導されると考えられる同系腫瘍と同系樹状細胞の融合細胞を用いてin vivo vaccination効果を検討した。腫瘍細胞と融合した樹状細胞はその後の分裂増殖を認めなかったことより、細胞融合後直ちにがんワクチンとして用いる方法が必要と考えられた。8週齢C57BL6マウス雌の骨髄を採取し、in vitroにてGM-CSFとIL-4にて誘導した樹状細胞(BM-DC)と同系腫瘍であるB16メラノーマをHVJ-Eを用いて細胞融合し、同日内にC57BL6マウスにワクチンとして皮下接種した後に、B16メラノーマを接種してin vivoでの腫瘍増殖抑制効果を検討したところ、BMDC-B16メラノーマ融合細胞接種群では非接種群と比較してB16メラノーマの増殖が有意に抑制され、BMDC-B16メラノーマ融合細胞ワクチンにおける獲得免疫の誘導が確認された。

11. マウス腫瘍細胞とES細胞由来樹状細胞の細胞融合によるin vivo Vaccination効果

129sv ES細胞をGM-CSFとIL-4にて培養して誘導したES-DCと異系腫瘍であるB16メラノーマをHVJ-Eを用いて細胞融合し、同日内にC57BL6マウスにワクチンとして皮下接種した後に、B16メラノーマを接種してin vivoでの腫瘍増殖抑制効果を検討したところ、ESDC-B16メラノーマ融合細胞接種群では非接種群と比較してB16メラノーマの増殖が抑制される傾向が認められたが有意に増殖を抑制する効果は認められなかった。これよりES細胞からの樹状細胞分化が不十分である可能性と、異系腫瘍との融合により獲得免疫が十分誘導できなかった可能性が推察され、今後の研究展開の課題と考えられた。

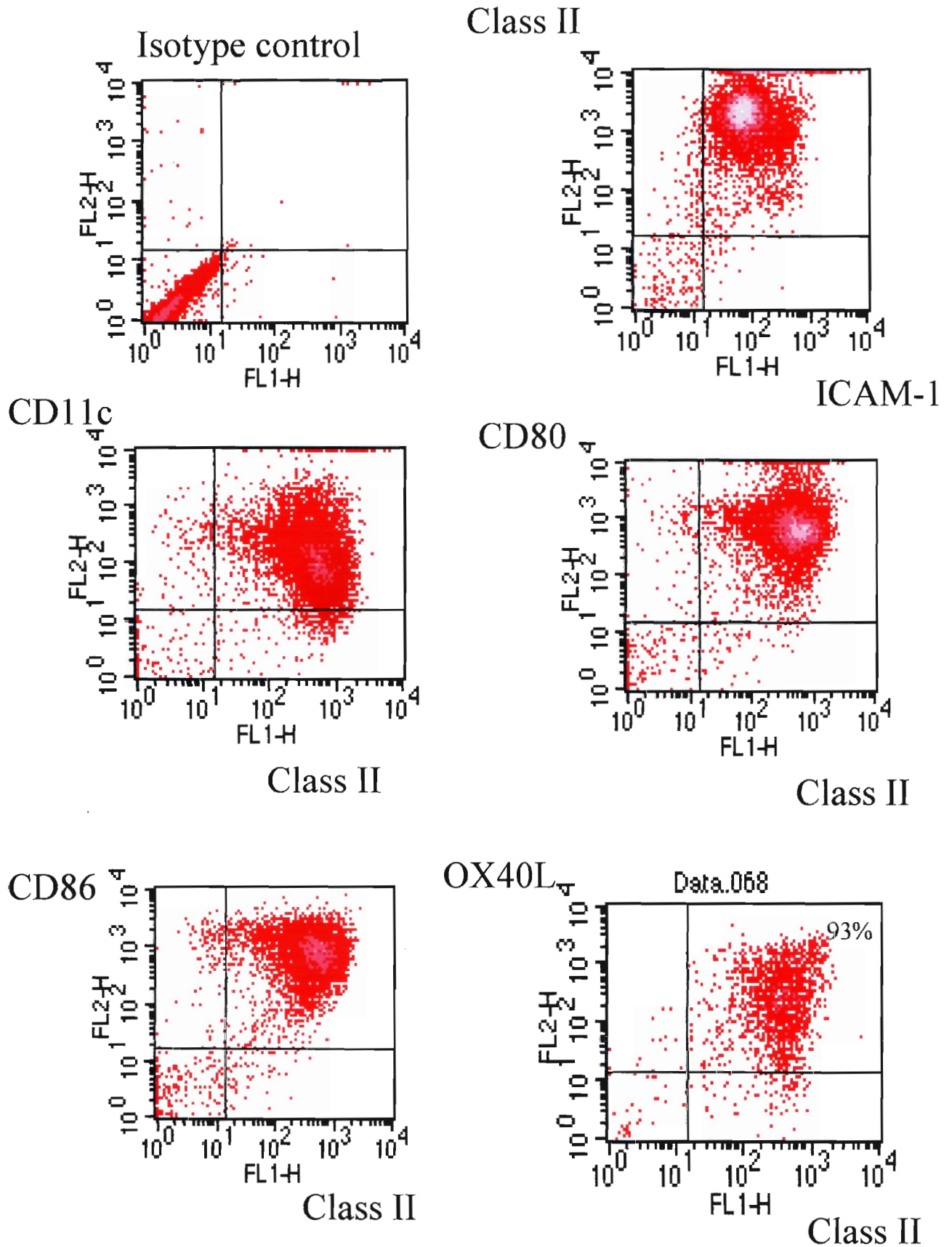
12: 今後の展望

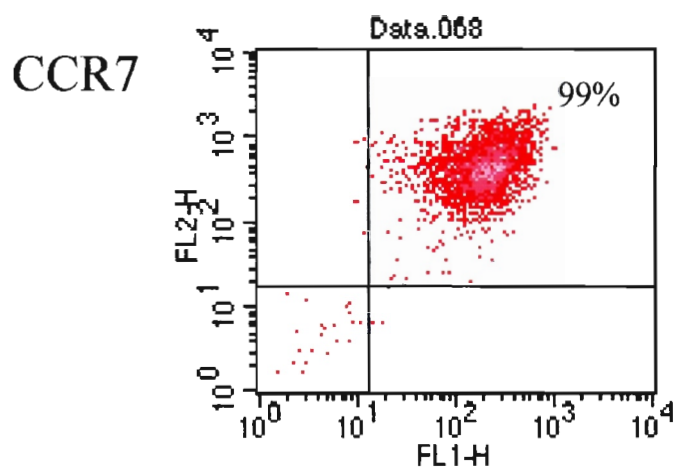
我々は消化器悪性腫瘍に対して自己樹状細胞を用いた免疫細胞療法の開発を目指した研究を進めているが、樹状細胞のソースとしてマウスES細胞からの樹

状細胞の分化誘導を今回試みてきた。本研究において、マウスES細胞からの樹状細胞の分化誘導が可能であり、新しい免疫治療として期待される結果であったが、自己MHC拘束性の免疫応答の課題は残されている。核移植としての異系細胞融合では非自己MHC系における獲得免疫の誘導が十分得られなかったことより、臨床応用に向けての方法の改良が必要とされる。

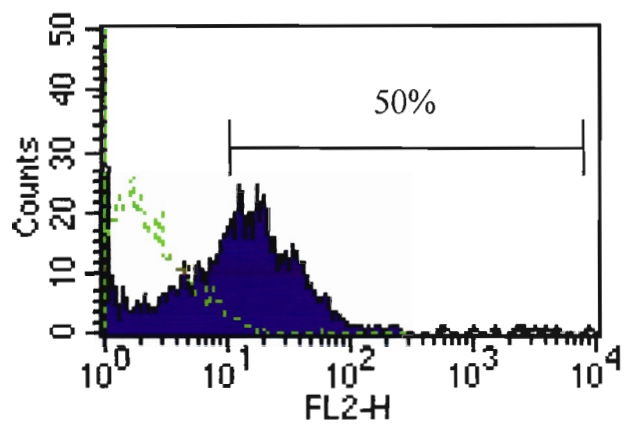
最近、自己の細胞を用いて遺伝子操作でES細胞と同様の再生能を有するiPS細胞の作製が成功したことが報告された。本方法では自己細胞を利用可能であるため、人での応用にHLA型の差異が問題とならない画期的な方法と考えられる。この成果を受けて、我々も、現在までのES細胞から樹状細胞を分化誘導して利用する方法とは別に、自己細胞由来のiPS細胞を利用する方法の研究が重要と考えられ、今後の研究展開としてiPS細胞からの樹状細胞(iPS-DC)の誘導とiPS-DCと腫瘍細胞の融合細胞を用いた免疫細胞療法について、さらなる継続した研究の展開を進めていく予定である。

Surface Phenotypes of BM-DC

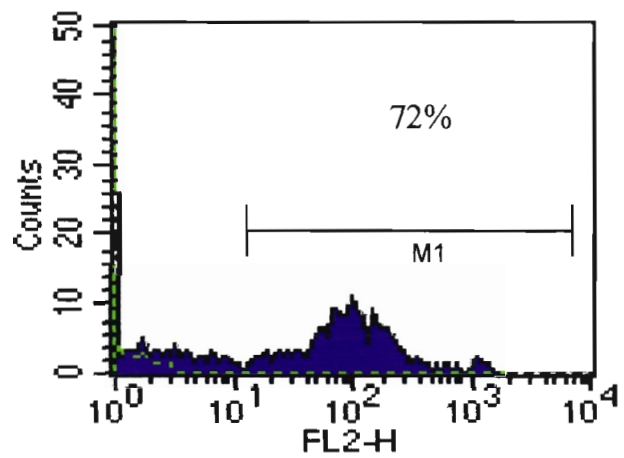




Class II



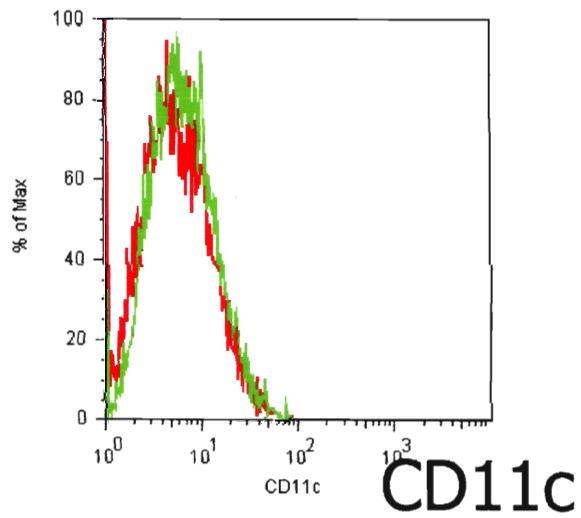
CD40



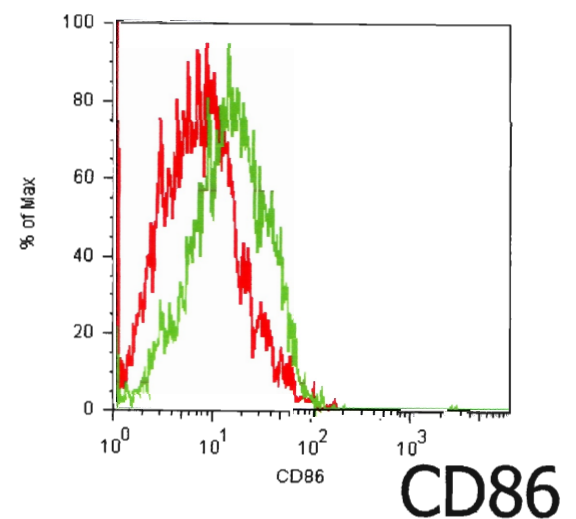
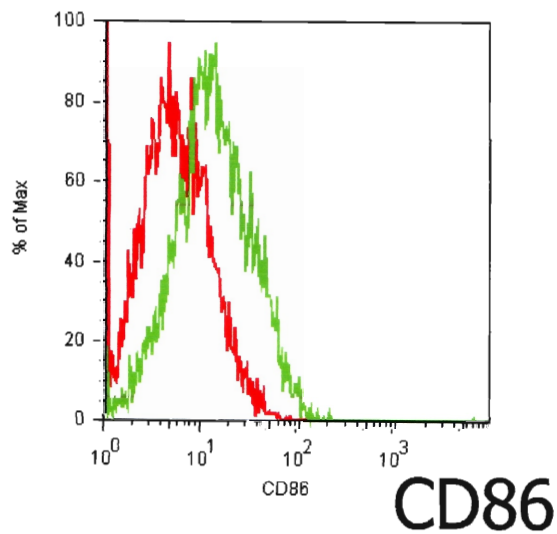
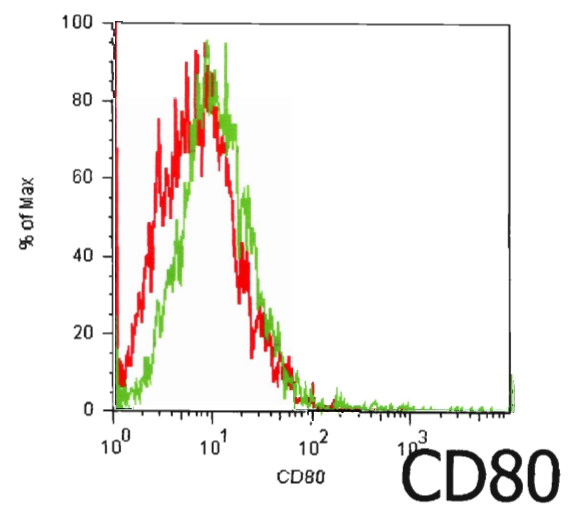
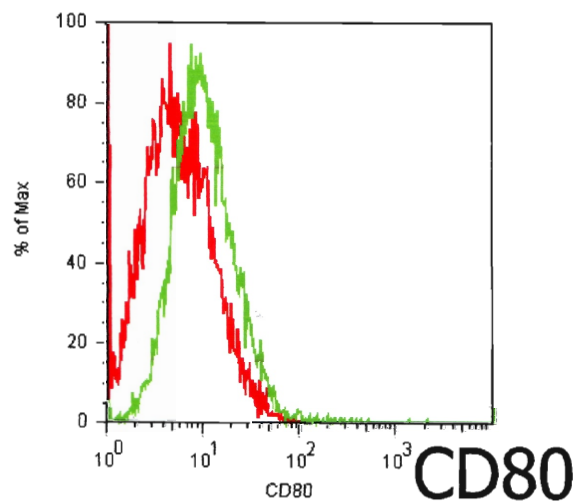
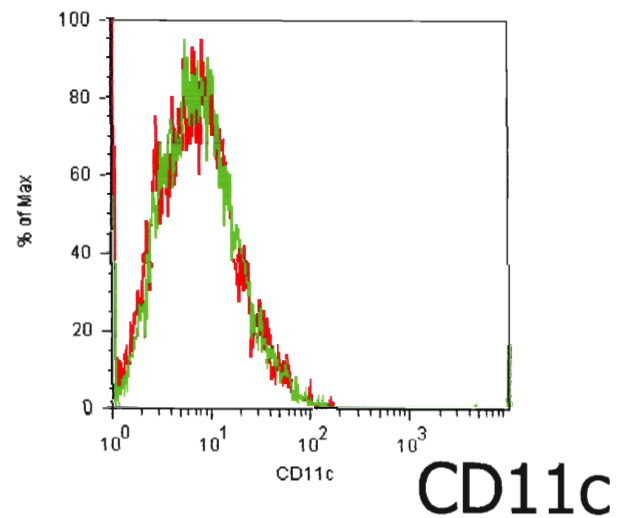
CD8 α

Surface Phenotypes of ES-DC

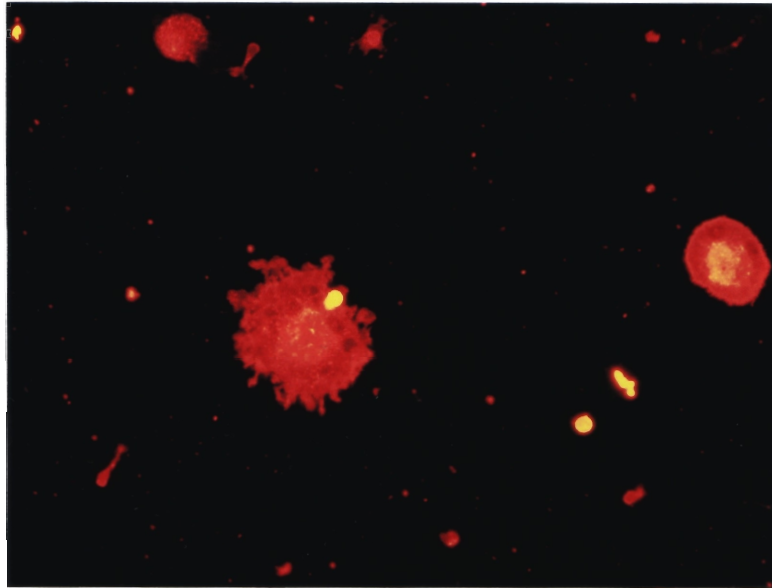
129sv



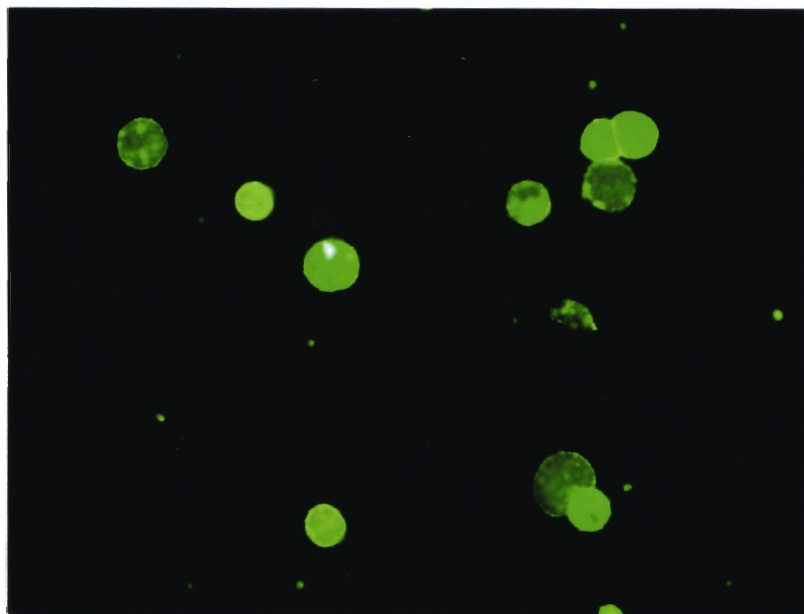
H-1



Cell Fusion by using HVJ-E

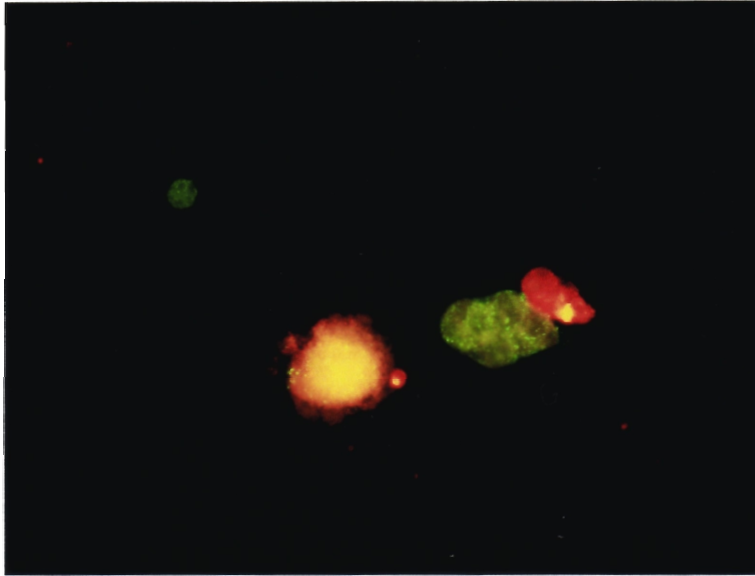


PKH26-Dendritic cell

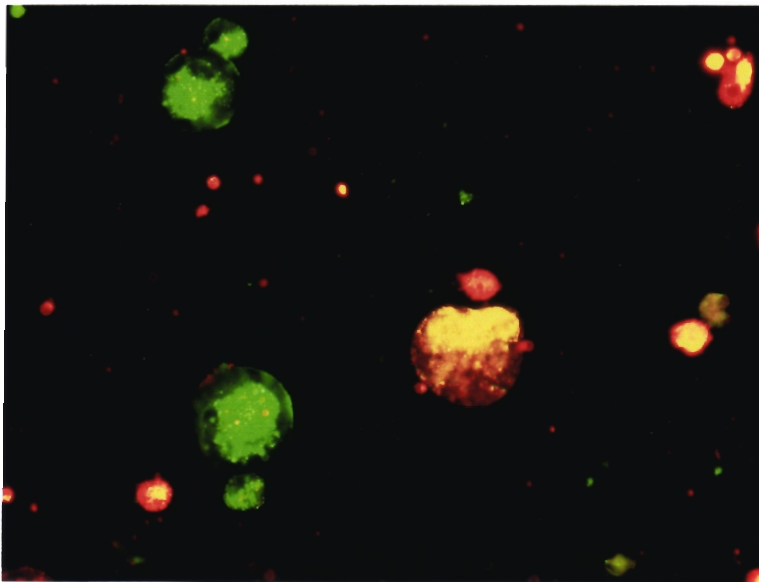


PKH67-AG

After Cell Fusion



Day 1



Day 2