

平成30年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10055

研究課題名(和文)リンパ球運動能亢進の機序解析と免疫療法効果予測バイオマーカーとしての意義の検証

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of augmentation of random migration in lymphocytes and verification of the significance as a biomarker predicting therapeutic effect of immunotherapy

研究代表者

森崎 隆 (Morisaki, Takashi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90291517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：活性化リンパ球の運動能亢進に関与する分子Xをマイクロアレイによる網羅的解析で見出した。リンパ球は活性化すると、分子X発現が亢進する。活性化リンパ球において、この発現が亢進している分子Xを抑制すると、リンパ球の運動能、増殖能および細胞傷害活性(in vitroおよびin vivo)がさらに有意に亢進した。この結果は、分子Xが、免疫治療効果予測のバイオマーカーになるのみならず、治療効果改善のための標的分子となり得ることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We detected molecule X as a factor that contributes to the random migration in activated lymphocytes by microarray analysis. Expression of molecule X is increased through the activation process. Inhibition of molecule X in activated lymphocytes increased random migration, proliferation and cytotoxicity (in vitro and in vivo). These results suggest that molecule X may act as a biomarker predicting therapeutic effect of immunotherapy and target molecule improving therapeutic effect of immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：活性化リンパ球 リンパ球運動能 免疫療法 バイオマーカー 治療効果予測 細胞傷害活性 リンパ球増殖能 癌浸潤リンパ球

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療や抗癌剤においては、標的分子の発現強度や遺伝子多型の解析というバイオマーカーが存在し、治療効果予測や有害事象予測が投与前に判断され、患者は無為な出費や体力消耗を防ぐことが可能になった。しかし、免疫細胞療法においては、大きな有害事象への危惧は少ないものの、残念ながら未だ有効な治療効果予測のバイオマーカーが存在せず、「治療してみないと効果が分からない」状況である。しかも現在、癌に対する免疫細胞療法は研究型医療あるいは保険外医療として実施されており、治療費用は非常に高価である。従って、対費用効果を考えても、治療効果予測のバイオマーカーが存在すれば経済的にも極めて有用であり、免疫細胞療法における治療効果予測のバイオマーカーの探索は喫緊の課題である。

これまでの我々の研究を通じて、活性化後リンパ球の形態や運動能(ランダムマイグレーション)が活性化前リンパ球と比較し、大きく変化していることが分かった。さらに、活性化後リンパ球の運動能(ランダムマイグレーション)亢進によりリンパ球の癌組織への浸潤が亢進し、また癌細胞との接触回数が増加することにより、運動能と細胞障害活性が正の相関を示す可能性を我々は見出した。

2. 研究の目的

「リンパ球活性化における運動能(ランダムマイグレーション)亢進の機序を解析し、リンパ球の運動能が免疫細胞療法の治療効果を予測する新規バイオマーカーとなり得るかを検討する」ことを本研究の主目的とする。

3. 研究の方法

(1) リンパ球活性化による運動能亢進に関する候補遺伝子(分子)の探索：
リンパ球活性化により変動する遺伝子、蛋白を活性化前リンパ球と活性化後リンパ球を用いてDNAアレイ、蛋白チップを基本として網羅的に解析し、リンパ球の運動能を正に制御する制御関連候補遺伝子(分子)の選別を行う

(2) 選別した候補遺伝子(分子)によるリンパ球機能変化の解析：
候補遺伝子(分子)の遺伝子阻害、候補遺伝子の導入(シグナル阻害剤、低分子RNA干渉、遺伝子導入)を基本として、活性化後リンパ球の運動能をタイムラプスイメージング解析法、Boyden chamber法による測定法で解析し、運動能を制御する候補遺伝子(分子)の絞り込みを行う。

(3) 選別した候補遺伝子(分子)によるリンパ球の細胞障害活性の検討：
候補遺伝子(分子)の阻害により、活性化後のリンパ球の運動能を抑制した系、および候

補遺伝子(分子)の導入により、リンパ球の運動能を亢進した系を用い、培養細胞に対する細胞障害活性をタイムラプスイメージング解析法により解析する。

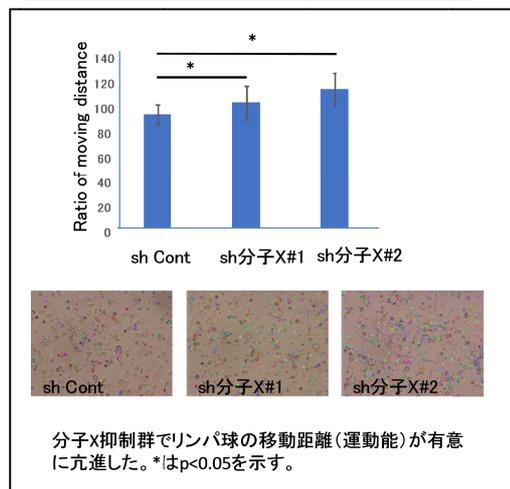
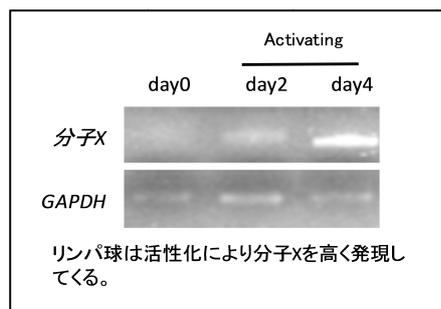
(4) 免疫不全マウスを用いたリンパ球運動能の治療効果に及ぼす影響の検証：

免疫不全マウス移植系を用いて、前年度に選別した候補遺伝子(分子)の阻害または候補遺伝子(分子)導入(シグナル阻害剤、低分子RNA干渉、遺伝子導入)により運動能を抑制または亢進させた活性化リンパ球による治療効果(増殖抑制、造腫瘍能抑制、浸潤抑制、転移抑制、生存期間)を検証する。

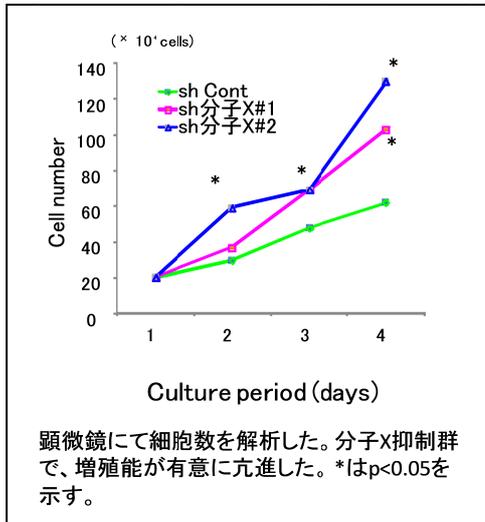
4. 研究成果

(1) 抗CD3抗体およびIL-2を用いて活性化したリンパ球と活性化前リンパ球を用いて、DNAマイクロアレイ解析を行い、運動能に関与する遺伝子をピックアップした。特に変動の大きい遺伝子の中で、癌の悪性形質誘導にも関与することが最近報告されてきた分子Xを取り上げた(論文作成中、特許申請準備中)。

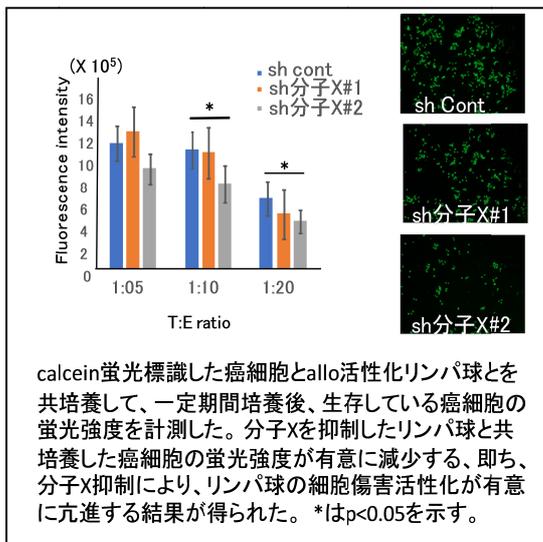
(2) リンパ球は活性化すると、分子X発現が亢進することが分かった。そこで、分子Xの発現抑制シークエンスを同定し、分子X shRNA プラスミド#1、#2を作成した。リンパ球に導入するために、このプラスミドをレンチウイルスに組み込んだ。まず、運動能につき解析した。活性化リンパ球の分子X発現を抑制すると、運動能(ランダムマイグレーション)が有意に亢進することが分かった(論文作成中)。



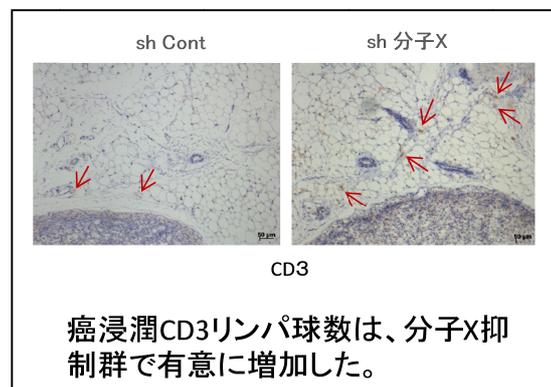
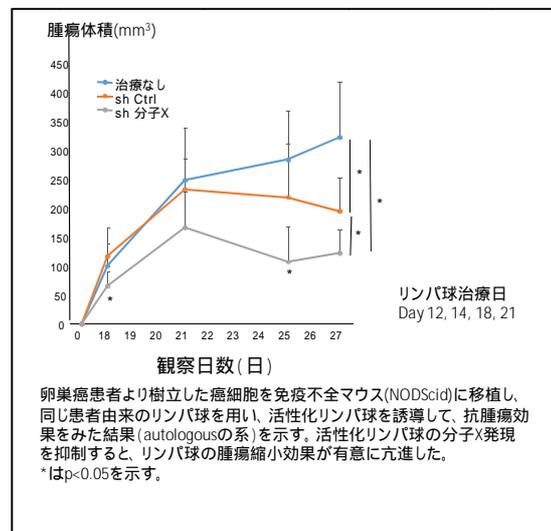
(3) 次に、増殖能について検討した。活性化リンパ球の分子 X 発現を抑制すると、リンパ球の増殖能が有意に亢進した (論文作成中)



(4) 次に、細胞傷害活性について検討した。活性化リンパ球の分子 X 発現を抑制すると、リンパ球の細胞傷害活性が有意に亢進した (論文作成中)



(5) 免疫不全マウスに腫瘍を皮下移植する系を用いて、腫瘍形成後、autologousの活性化リンパ球を投与して、腫瘍抑制効果を検証した。活性化リンパ球の分子 X 発現を抑制すると、癌局所に浸潤するリンパ球数が増加し、またリンパ球の腫瘍縮小効果が有意に亢進した (論文作成中)



以上より、同定した分子 X は、運動能 (ランダムマイグレーション) を指標とする治療効果バイオマーカーになり得るのみならず、治療効果を改善する標的分子となり得ることが分かり、現在論文作成中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Kawamoto M, Onishi H, Koya N, Konomi H, Mitsugi K, Tanaka R, Motoshita J, Morisaki T, Nakamura M. Stage IV gastric cancer successfully treated multidisciplinary therapy including immunotherapy: a case report. Surg Case Rep 査読有, 3(1), 2017, 112.
DOI: 10.1186/s40792-017-0380-5

大西 秀哉、荻野 利達、森崎 隆、片野 光男. 患者さんを見据えた全人的癌治療 低酸素環境とHedgehog Signal 癌と化学療法. 査読有, 44, 2017, 977-980.

Onishi H, Fujimura A, Oyama Y, Yamasaki A, Imaizumi A, Kawamoto

M, Katano M, Umabayashi M, Morisaki T. Hedgehog signaling regulates PDL-1 expression in cancer cells to induce antitumor activity by activated lymphocytes. *Cell Immunol* 査読有, 310, 2016, 199-204.
DOI: 10.1016/j.cellimm

〔著書〕(計 1 件)

Onishi H, Morisaki T, Katano M. Regulatory T cell: Immunotherapy of Cancer: An Innovative Treatment Comes of Age. Springer Japan, Tokyo, 査読有, pp309-322, 2016.

〔学会発表〕(計 13 件)

山崎 章生、大西 秀哉、藤村 晶子、川元 真、森崎 隆. 抗 PD-1 抗体が著効した切除不能上顎洞癌の 1 例、2017 年 12 月 2 日、第 2 1 回 バイオ治療法研究会 学術集会、福大メディカルホール(福岡県、福岡市)

藤村 晶子、古後 龍之介、森崎 隆、中川 尚志、大西 秀哉. 抗 PD-1 抗体が著効した切除不能上顎洞癌の一例、2017 年 11 月 30 日、第 3 0 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、ホテルグランヴェール岐山(岐阜県、岐阜市)

川元 真、大西 秀哉、山崎 章生、森崎 隆、村橋 睦了、緒方 久修、中村 雅史. 活性化リンパ球の random migration 能は癌免疫療法の効果予測因子となりうる、2017 年 10 月 28 日、第 2 3 回 国際個別化医療学会学術集会、品川フロントビル会議室(東京都、品川区)

村橋 睦了、浜名 洋、岸 裕幸、山口 類、宮野 悟、緒方 久修、岡崎 利彦、宮本 将平、谷 健三郎、大西 秀哉、高松 泰、中西 洋一. びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における腫瘍浸潤 CD8+T リンパ球の解析、2017 年 9 月 30 日、第 9 回 血液疾患免疫療法学会、一橋講堂(東京都、千代田区)

大西 秀哉、山崎 章生、大山 康博、川元 真、中村 雅史. 全人的治療を考慮した膵癌に対する Hedgehog 阻害治療の開発、2017 年 7 月 21 日、第 72 回 日本消化器外科学会総会、ホテル金沢(石川県、金沢市)

川元 真、森崎 隆、大西 秀哉. 癌特異的な免疫監視機構の構築により良好な経過を得ている stage IV 胃癌の 1 例、2017 年 7 月 20 日、第 72 回 日本消化器外科学会総会、ホテル金沢(石川県、金沢市)

大西 秀哉. 患者さんを見据えた全人的膵癌治療:低酸素環境と Hedgehog signal、2017 年 5 月 26 日、第 38 回 癌免疫外科研究会、倉敷アイビースクエア(岡山県、倉敷市)

藤村 晶子、大西 秀哉、益田 宗幸、中川 尚志、森崎 隆. 免疫細胞療法と抗 PD-1 抗体で CR となった耳下腺癌多発転移の一例、2016 年 12 月 1 日、第 2 9 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、久留米シティプラザ(福岡県・久留米市)

大西 秀哉、藤村 晶子、大山 康博、川元 真、山崎 章生、今泉 晃、中村 雅史、森崎 隆. 低酸素環境下、活性化リンパ球および樹状細胞における Hedgehog シグナルの生物学的役割の解析、2016 年 12 月 1 日、第 2 9 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、久留米シティプラザ(福岡県・久留米市)

大西 秀哉、森崎 隆、山崎 章生、川元 真、中村 雅史. 活性化リンパ球における Hedgehog signal の生物学的意義の解析、2016 年 5 月 12 日、第 37 回 癌免疫外科研究会 川越プリンスホテル(埼玉県、川越市)

大西 秀哉、森崎 隆、山崎 章生、川元 真、片野 光男、中村 雅史. 活性化リンパ球のランダムマイグレーションは癌免疫療法の効果増強の指標となり得るか、2015 年 12 月 4 日、第 28 回 日本バイオセラピー学会学術集会総会、川越東武ホテル(埼玉県、川越市)

大西 秀哉、森崎 隆、山崎 章生、川元 真、永井 英司、大内田 研宙、真鍋 達也、植木 隆、宮坂 義浩、大塚 隆生、中村 雅史. 活性化リンパ球のランダムマイグレーションと細胞傷害活性は関与するか、2015 年 11 月 27 日、第 77 回 日本臨床外科学会総会、福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

大西 秀哉、森崎 隆、山崎 章生、大内田 研宙、永井 英司、片野 光男、中村 雅史. 癌免疫療法の治療効果予測バイオマーカーの探索:ランダムマイグレーション、2015 年 10 月 29 日、第 5 3 回 日本癌治療学会学術集会、国立京都国際会館(京都府、京都市)

〔その他〕

ホームページ等
九州大学大学院医学研究院 先端医療医学部門 腫瘍制御学分野
<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 隆 (MORISAKI Takashi)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：90291517

(2) 研究分担者

片野 光男 (KATANO, Mitsuo)
福岡女学院看護大学・看護学部・教授
研究者番号：10145203
(平成27年4月1日より削除)

大西 秀哉 (ONISHI, Hideya)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：30553276

久保 真 (KUBO, Makoto)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：60403961

山崎 章生 (YAMASAKI, Akio)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：80404440

今泉 晃 (IMAIZUMI Akira)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：30624051