

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20181

研究課題名(和文) 唾液腺癌に対するCAR発現T細胞とNKT細胞の併用による養子免疫療法

研究課題名(英文) Adoptive Immunotherapy using the Lymphocytes transduced with Chimeric Antigen Receptor against Salivary Gland Tumor

研究代表者

國井 直樹 (KUNII, Naoki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00456047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺癌におけるメソテリン(MSLN)分子の発現を調べるとともに、MSLN特異的キメラ抗原受容体(MSLN-CAR)導入T細胞を用いた養子免疫療法の有効性を検討した。

16名の患者検体ならびに唾液腺癌細胞株A-253とその他4種の細胞株を用いてMSLNの発現を解析したところ、A-253ならびにほとんどの手術検体において様々な発現強度のMSLNが確認された。さらにMSLN-CAR T細胞はメソテリン刺激後に用量依存的に活性化が上昇しMSLN発現腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を示した。よって唾液腺癌に対するMSLN-CAR T細胞による養子免疫療法は有効な治療戦略になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Salivary gland cancers (SGCs) are not sensitive to conventional radiotherapy or chemotherapy regimens. Therefore, the development of a new treatment strategy is of critical importance for improving the prognosis. We examined the expression of mesothelin (MSLN) molecules in SGCs and the efficacy of adoptive cell therapy based on MSLN-specific chimeric antigen receptor (CAR) transduced T cells.

The expression of MSLN molecule was studied in SGC samples obtained from 16 patients as well as an SGC cell line (A-253) and four other cell lines. MSLN was detected in the A-253 cells and most of the surgical specimens to various degrees. Following stimulation with MSLN, MSLN-specific CAR-expressing CD8 T cells were dose-dependently activated. Furthermore, the cytotoxicity of CAR T cells against MSLN-expressing cancer cells was demonstrated.

Therefore, the use of adoptive transfer with MSLN-specific CAR-expressing CD8 T cells against SGCs would be an effective therapy.

研究分野：免疫学

キーワード：がん免疫 キメラ抗原受容体 唾液腺がん 免疫療法 標的分子 メソテリン

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで国内外において種々の抗原特異的がん免疫療法に関する研究が行われてきた。特に国内では、臨床研究としてがん抗原ペプチド療法や樹状細胞療法などのワクチン療法が広く行われてきたが、未だ治療法として確立していない。その原因として、がん患者の生体内では免疫抑制細胞の増加が報告されており、ワクチン療法を行っても抗原特異的T細胞を十分誘導出来ない点などが挙げられる。一方、生体外で抗原特異的T細胞を誘導した上で患者に投与する養子免疫療法についても、細胞純度や経済的な問題が存在する。そこで、がん特異抗原を認識するT細胞受容体 (TCR) をリンパ球に遺伝子導入する技術が開発され、TCR 導入リンパ球を用いた臨床研究が本邦でも開始された。この技術では単一の TCR を発現するリンパ球を大量かつ安価に調製することが可能である。しかしながら、TCR の抗原認識は標的細胞の MHC に依存しており MHC の異なる患者には用いることが出来ず、また多くのがん腫において MHC 発現が低下していることから、この治療法の効果も限定的である ( )。これらの問題を解決するため、キメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor, CAR) が開発された。CAR は抗体の抗原認識部位を一本鎖に繋ぎ、その下流に膜貫通部位と細胞内シグナル伝達ドメインを配した構造をしており (図1) CARを遺伝子導入されたT細胞は、特異的抗原を発現する癌細胞に対し抗腫瘍活性を示す。CAR は抗体由来であるため、MHC に拘束されず、また親和性も TCR に比べて非常に高い。現在、CAR 導入リンパ球を用いた第 1~2 相臨床研究が主に米国で行われており、いくつかの有望な報告もなされている ( )。

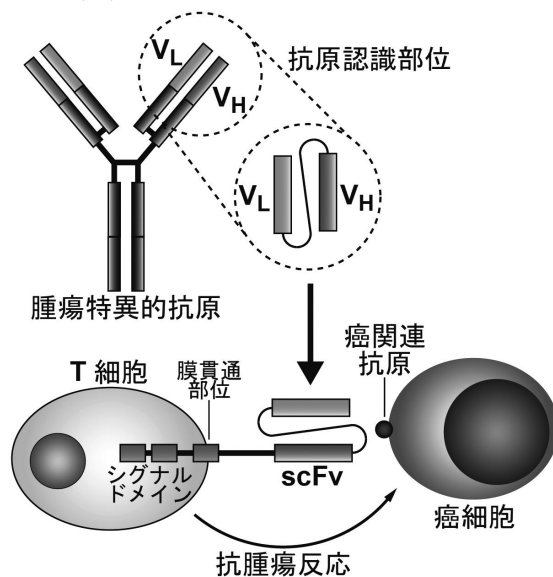


図1 キメラ抗原受容体 (CAR) の構造

(2) Mesothelin (MSLN) は約 40 kDa の蛋白で、中皮腫や卵巣・膵臓の腺癌など多くの固

形癌で過剰な発現が認められている。しかしながら唾液腺癌における MSLN の発現に関する報告は未だにない。共同研究者であるペンシルバニア大学の Prof. June CH.らはマウス由来抗ヒト MSLN 抗体クローンである SS1 から CAR を作成し、MSLN 発現腫瘍に対する抗腫瘍活性を証明した ( , )。現在、中皮腫・卵巣癌・膵癌を対象とした第 相臨床研究がペンシルバニア大で進行中である。

(3) 唾液腺癌は頭頸部癌に属し、治療の第一選択は手術である。臨床病期 I ~ III 期の患者の 5 年生存率は 80% 以上であるが、 期の患者では 20% に急激に低下する。その理由として、多くの唾液腺癌は放射線療法・化学療法に抵抗性であり、切除不能例や遠隔転移例では治療法が確立していない点が挙げられる。それ故、予後の改善には新規治療戦略の確立が必要不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、唾液腺原発癌を対象として癌関連抗原 mesothelin (MSLN) 特異的 CAR を導入したリンパ球を用いた養子免疫療法の有効性を検討するため、唾液腺癌における MSLN 発現の検討ならびに唾液腺癌に対する MSLN 特異的 CAR 導入リンパ球の抗腫瘍活性の検討を行って、近い将来の臨床応用を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト唾液腺癌由来細胞株である A-253 とそれ以外の 4 種の癌細胞株における MSLN の発現を、抗 MSLN 抗体を用いてフローサイトメトリーにて解析した。

(2) ヒト唾液腺癌手術検体 16 検体を用いて MSLN 発現を抗 MSLN 抗体を用いて免疫組織化学的に検証した。

(3) MSLN 特異的 CAR をレンチウイルスを用いて、ヒト CD8 T 細胞導入し、高率に CAR を発現するエフェクター細胞集団を調製した。これらの細胞群の MSLN 特異的 CAR 発現率をフローサイトメトリーにて解析した。

(4) (3) で調製した MSLN 特異的 CAR 導入 T 細胞を用いて各細胞株に暴露後の活性化能を CD107a mobilization assay にて検討した。

(5) (4) と同様に MSLN 特異的 CAR 導入 T 細胞の各細胞株に対する細胞傷害活性をクローム放出試験にて検討した。

4. 研究成果

(1) 唾液腺癌由来細胞株 A-253 において MSLN の高発現が確認された (図 2)。

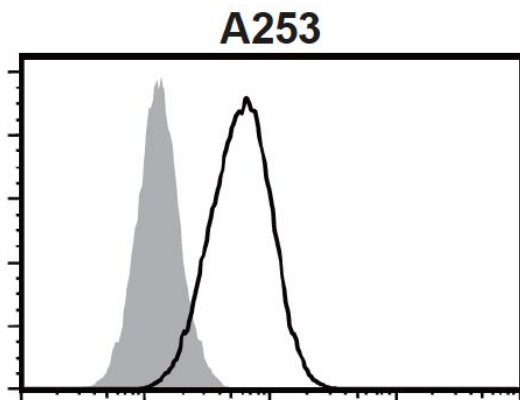


図2 唾液腺癌細胞株 A-253 における MSLN 発現 (横軸は発現強度、影は isotype matched control を示す)

(2) ほとんどの手術検体において様々な発現強度の MSLN が確認された。

(3) 高純度の MSLN 特異的 CAR 導入 T 細胞が調製された (図3)

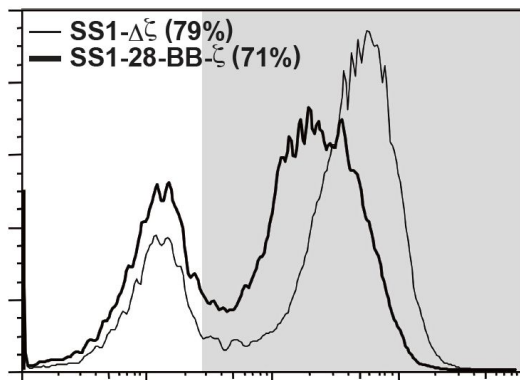


図3 ヒト CD8T 細胞に対する MSLN 特異的 CAR の導入効率 (横軸は発現強度を示す)

(4) MSLN 特異的 CAR 導入 T 細胞は、暴露した腫瘍細胞のメソテリン発現量に依存的に、T 細胞の活性化マーカーである CD107a の発現上昇が認められた。

(5) クロム放出試験にて MSLN 特異的 CAR 導入 T 細胞の MSLN 発現腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を示した。

(6) 以上の成果より、唾液腺癌に対する MSLN 特異的 CAR 導入 T 細胞による養子免疫療法は有効な治療戦略になる可能性があると考えられた。

(7) 今後は唾液腺に対する MSLN 特異的 CAR 導入 T 細胞の細胞傷害活性ならびに癌細胞による抗原刺激後の細胞増殖を有意に高めるアジュバントの開発なども並行して行い、臨床研究の開始と将来の臨床応用を目指して研究を継続して行く予定である ( )。

<引用文献>

Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol.* 2012 12: 269-81.

Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011 365: 725-33.

Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhai M, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Haines KM, Heitjan DF, Albelda SM, Carroll RG, Riley JL, Pastan I, June CH. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 106: 3360-5.

Zhao Y, Moon E, Carpenito C, Paulos CM, Liu X, Brennan AL, Chew A, Carroll RG, Scholler J, Levine BL, Albelda SM, June CH. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res.* 2010 70: 9053-61.

Kunii N, Zhao Y, Jiang S, Liu X, Scholler J, Balagopalan L, Samelson LE, Milone MC, June CH. Enhanced function of redirected human T cells expressing linker for activation of T cells that is resistant to ubiquitylation. *Hum Gene Ther.* 2013 24: 27-37.

#### 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2件)

Horinaka A, Sakurai D, Ihara F, Makita Y, Kunii N, Motohashi S, Nakayama T, Okamoto Y. Invariant NKT cells are resistant to circulating CD15(+) myeloid-derived suppressor cells in patients with head and neck cancer. *Cancer Sci.* 107 2016 207-16 査読有

Kamata T, Suzuki A, Mise N, Ihara F, Takami M, Makita Y, Horinaka A, Harada K, Kunii N, Yoshida S, Yoshino I, Nakayama T, Motohashi S. Blockade of programmed death-1/programmed death ligand pathway enhances the antitumor immunity of human invariant natural killer T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 65 2016 1477-1489 査読有

〔学会発表〕(計7件)

國井直樹, 山崎一樹, 茶園英明, 花澤豊行, 岡本美孝. 中下咽頭癌 CR 例に対する iNKT 細胞アジュバント療法の有効性に関するランダム化試験 第29回日本口腔・咽頭科学会学術講演会 2016/09/09 松江テルサ(島根県・松江市)

Naoki Kunii, Yuji Makita, Fumie Ihara, Daiju Sakurai, Shinichiro Motohashi, Toshinori Nakayama, Yoshitaka Okamoto. A Randomized Double-blind Phase II Trial Evaluating Adjuvant Therapy for Advanced Oro- and Hypo-pharyngeal Cancer using the Injection of  $\alpha$ GalCer-loaded DCs into the Nasal Submucosa. 第20回日本がん免疫学会総会 2016/07/29 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

國井直樹, 蒔田勇治, 伊原史英, 茶園英明, 櫻井大樹, 岡本美孝. 唾液腺癌症例に対する  $\alpha$ -galactosylceramide パルス樹状細胞の鼻粘膜下投与を用いた第1相臨床研究 第34回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2016/02/06 鳥羽国際ホテル(三重県・鳥羽市)

國井直樹, 蒔田勇治, 伊原史英, 内田亮介, 佐々原剛, 藤川陽, 櫻井大樹, 岡本美孝. 期中下咽頭癌治療後 CR 例に対する NKT 細胞免疫療法に関する第2相ランダム化二重盲検試験 第26回日本頭頸部外科学会学術講演会 2016/01/28 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

國井直樹, 蒔田勇治, 伊原史英, 茶園英明, 櫻井大樹, 岡本美孝. The phase I/II study about iNKT cell-mediated immunotherapy against salivary gland cancer 第60回日本唾液腺学会学術集会 2015/12/05 文京学院大学 本郷キャンパス(東京都・文京区)

Naoki Kunii, Yuji Makita, Fumie Ihara, Ryosuke Uchida, Akira Fujikawa, Daiju Sakurai, Shinichiro Motohashi, Toshinori Nakayama, Yoshitaka Okamoto. The Antigen Specific Immunotherapy Based on Chimeric Antigen Receptor Expressing T cells Targeted to Salivary Gland Tumor. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015 2015/07/09 Ito Hall, Ito International Research Center, The University of Tokyo (東京都・文京区)

國井直樹. 頭頸部がんに対する免疫細胞療法~NKT細胞関連トランスレーショナル研究と今後の展望~ 第77回耳鼻咽喉科臨床学会学術講演会 2015/06/25 オークラアクトシティ浜松・アクトシティ浜松(静岡県

県・浜松市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

國井 直樹 (KUNII, Naoki)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00456047

### (2) 研究協力者

岡本 美孝 (OKAMOTO, Yoshitaka)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 40169157

Carl H. June  
University of Pennsylvania, Professor

蒔田 勇治 (MAKITA, Yuji)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教  
研究者番号: 90706722