

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18450

研究課題名(和文) iPS技術によるがん抗原特異的再生T細胞を用いた、大腸癌の選択的細胞移入療法

研究課題名(英文) Adoptive cell transfer of WT1-specific T cell established by iPS technology

研究代表者

高橋 亮 (TAKAHASHI, Ryo)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80571455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はがん抗原をと特異的に攻撃する特異的な細胞障害性T細胞(CTL)からiPS細胞を樹立、これを培養して再び成熟T細胞(CTL)に分化誘導することで、特異的かつ活性の高いクローンを大量に作成するがん免疫療法における新技術の確立が目的である。がん抗原WT-1に対する特異的T細胞からiPS細胞を樹立してのち再分化誘導した成熟CTLを、市販の大腸癌細胞株と共培養したところ、アポトーシスが誘導され一定の殺細胞効果が確認された。現在は手術切除標本から樹立されたCTOS細胞を使っての検討を行っているところである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate whether the cancer antigen-specific cytotoxic T cells (CTLs) established by iPS technology could eliminate colorectal cancer. Mature CTLs regenerated by specific iPS cells were established from specific T cells for cancer antigen WT-1. We found that the mature CTLs could induce apoptosis of colorectal cancer cell lines (SW480, SW620, T84). Currently, we are investigating this effect using CTOS (cancer tissue-originated spheroid) cells established from surgical resection specimens.

研究分野：消化器外科

キーワード：がん免疫療法 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

(1) がんに対する免疫療法は古くから研究が続けられてきたが、抗 PD-1 抗体製剤が登場して以降、悪性黒色腫のみならず肺癌をはじめとするさまざまながん種において効果が確認されてきたこともあり、近年になって大きく注目を集めるようになった。

(2) 免疫療法の一つとして、さまざまながんで発現亢進を認めるがん共通抗原や、正常細胞と比較して発現量の多い抗原に対し、特異的に結合・作用する細胞障害性 T 細胞(CTL)を輸注する選択的細胞移入療法(ACT)が挙げられる。この手法は正常細胞へのダメージを最低限に抑えながら腫瘍治療効果が得られる可能性がある。しかし輸注前の全身照射といった侵襲的処置を必要としたり、遺伝子改変を行った CTL のがん化リスク、また培養中の失活や自己反応性クローンの混入などが臨床応用における大きな障壁となっていた。

(3) 京都大学再生医科学研究所河本研究室では、安全性が高く、長期間にわたり活性の高い CTL を輸注できる ACT プロトコル開発を目的として、iPS 技術に着目した。がん特異的 CTL から iPS を作製すると(T-iPS)、TCR 遺伝子は再構成されたまま受け継がれるため、これを再び成熟 TCL に分化誘導することで、特異的反応性と活性を保ったクローンを大量に培養することが可能となる(再生 CTL)。河本らはこの手法を用いて、悪性黒色腫の MART-1 抗原に対する特異的 CTL を再生することに成功した (Vizcardo R et al. Cell Stem Cell, 12, 31-36, 2013)。iPS 由来がん特異的 CTL では、ほかにも複数の既知がん共通抗原に対して、細胞株を用いた in vitro 実験で抗腫瘍効果が実証されている。

(4) 一方、がんは均一な細胞集団ではなく、組織内にさまざまな特性をもった細胞が存在することが明らかとなっており、この多様性が各種治療の抗腫瘍効果を減弱させる大きな要因でもある。モノクローナルで均一な細胞集団である細胞株を対象とした従来の実験系では、このギャップが障壁となり、実際の腫瘍特性や抗腫瘍効果を良好に反映していないことも多いと考えられる。大阪成人病センター井上研究室では、CTOS (cancer tissue-originated spheroid) 法と呼ばれる初代培養法を開発した。これは極性、多様性などもとの腫瘍の性質を保持したがん細胞のみからなる集塊で、かつ樹立効率が 80%を超える画期的な手法である。Invitro 実験系や免疫不全マウス皮下での安定した継代も可能である。

(5) この CTOS を作製する際に副産物として採取されるフロースルーには腫瘍浸潤リンパ球 TIL (tumor infiltrating lymphocyte) が含まれており、これを精製して解析することでがん種に共通する免疫療法ターゲットを探索したり、個々の腫瘍における治療ターゲットをピックアップする研究が精力的に進められている。

2. 研究の目的

本研究は、がん抗原をと特異的に攻撃する特異的な細胞障害性 T 細胞(CTL)から iPS 細胞を樹立、これを培養した上で再び成熟 T 細胞(CTL)に分化誘導することで、特異的かつ活性の高いクローンを大量に作成するがん免疫療法における新技術の確立とその大腸癌治療への応用が目的である。

ACT が固形癌である大腸癌における新規治療オプションになり得るかどうかを検証する。

CTOS を用いて再生 CTL の殺細胞効果を検証するとともに、付随するゲノムシーケンスや TIL の解析などを通じて、既知のがん共通抗原のみならず、個々の腫瘍における再生 CTL のターゲットを検索して短時間低コストで ACT を導入する方法を探り、将来のテーラーメイド ACT の確立を目指す。



3. 研究の方法

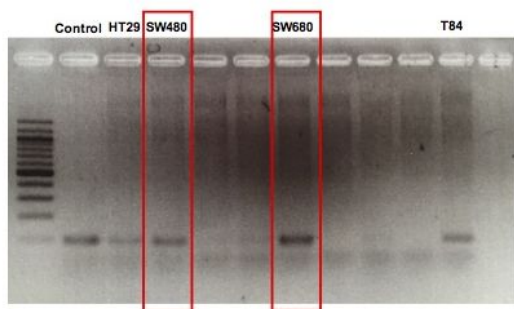
(1) 当科で倫理委員会承認 (申請番号: G-793) を得て大腸癌手術症例の切除検体から順次 CTOS を樹立し、冷凍保存または免疫

不全マウス皮下で継代した。

(2) 河本研究室ではがん共通抗原 WT-1 および MART-1 それぞれに特異的な CTL がクローニングされ、iPS 化されている。このうち WT-1 は大腸癌組織の 80%以上で隣接正常組織に比べて発現亢進しているとの報告があり、本研究における治療ターゲットに適すると考えられたため、これを分化誘導、培養した再生 CTL を実験に用いた。市販大腸癌細胞株および大腸癌由来 CTOS における WT-1 発現を定量的 PCR およびウエスタンブロットでスクリーニングしたうえで、再生 CTL と共培養を行い、annexin V をマーカーとした FACS 解析で殺細胞効果を定量した。

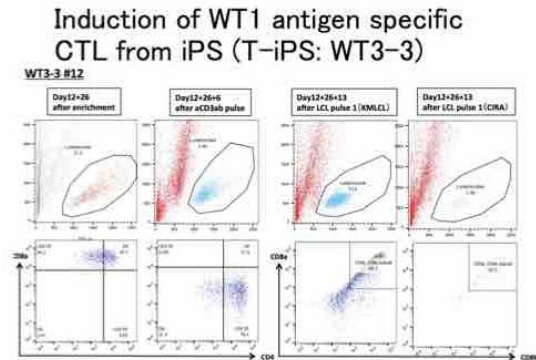
4. 研究成果

(1) 市販大腸癌細胞株を用いたスクリーニングでは 10 株中 7 株で WT-1 発現が確認され、文献に合致する結果であった。複数の大腸癌細胞株を用いてスクリーニングを行ったところ、RT-PCR 法にて WT-1 の mRNA 発現を確認し、ハプロタイプが実験系 (HLA-A2402) に合致する 3 種類の大腸癌細胞株 SW480, SW620, T84 を選択した。



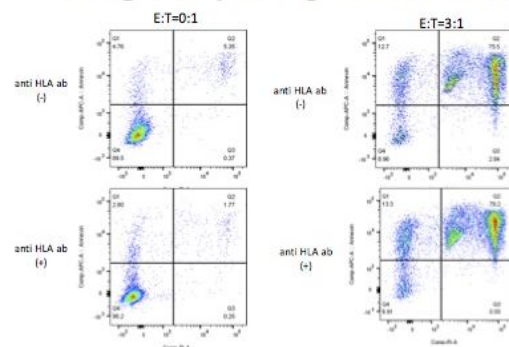
	WT1/ABL ratio
HT 29	1.64
SW480	0.4
SW680	43.6
T84	0.108

(2) WT-1 特異的 T 細胞由来 iPS は研究協力を得ている京都大学再生医科学研究所河本研究室にて樹立されており、その再分化誘導して成熟 CTL を培養することに成功した。



(3) 3 種類の大腸癌細胞株 SW480, SW620, T84 を、iPS 由来の WT-1 特異的再生 CTL と in vitro で共培養する killing assay を行ったところ、annexin V 発現 (アポトーシス) はコントロール群に比べて実験群で亢進しており、一定の殺細胞効果が確認された。

Killing assay using CRC cell lines



(4) 次に手術切除標本から樹立された CTOS 細胞を使っての評価を行った。現在までの検討では、CTOS における WT-1 発現をスクリーニングしたところ、実験に用いた 14 株のうち明らかな WT-1 発現亢進が

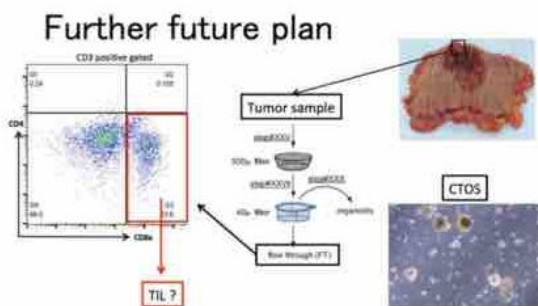
確認されたのは1株に留まり、これまでのデータとの乖離があった。

Establishment of CTOS



文献的にはがん抗原 WT-1 は大腸癌組織の 80% 以上で隣接正常組織に比べて発現亢進しているとされるが、現在までの解析結果からは CTOS 細胞における陽性率はそれより低い結果であった。

CTOS に対する CTL の殺細胞効果検証が次のステップである。ただし、FACS を用いてアポトーシスを annexin V 発現で評価する実験系の問題点として細胞集塊である CTOS を単細胞に分離する必要がある。細胞間接着が heterogeneity が失われることで殺細胞効果にバイアスがかかる可能性があり、これを排除するためにゲル包埋状態でのタイムラプスやクロムリリースアッセイなどを行うことを検討している。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) iPS 技術によるがん抗原特異的再生 T 細胞を用いた、大腸癌に対する選択的細胞移入療法

高橋亮、西川元、河本宏、坂井義治
第 79 回日本臨床外科学会 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
とくになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 亮 (TAKAHASHI, Ryo)
京都大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号： 80571455

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者