

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15007

研究課題名(和文) ヒトPD-1発現T細胞保有マウスの作製と抗PD-1抗体薬の効判定システム構築

研究課題名(英文) Preparation of human PD-1-expressing T cell-bearing mouse and construction of evaluation system of anti-PD-1 antibody drug

研究代表者

黒川 宏美 (Kurokawa, Hiromi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30791496

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)：担がんマウスから分取した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)と、腫瘍細胞を共培養し、抗PD-1抗体薬を添加することで抗PD-1抗体薬の薬効がin vitroで判定可能か検討した。担がんマウスから分取したLewis肺癌(LLC)細胞中のTILはPD-L1強発現LLC細胞またはLLC細胞と共培養し、そこに抗PD-1抗体薬を添加することで、TILによるLLCへの細胞傷害効果を検討した。抗PD-1抗体薬添加後の細胞傷害性は両細胞間で差は見られなかった。分取したTILに含まれるT細胞の割合を解析したところ、CD4陽性は0.88%、CD8陽性は42.5%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗PD-1抗体薬はある一定の患者に対して高い有効性を示す一方、非常に高価であること、一部重篤な副作用が生じることが問題視されている。さらに近年その適応範囲が拡大しつつある中、患者選択が非常に重要であることが言われている。この問題を解決するためのシステムをin vitroで構築することが本研究の目的である。抗PD-1抗体薬の薬剤有効性を検証する既存のシステムは存在せず、かつin vitroで評価できれば患者に対する侵襲性は低い点から社会的意義は高いと判断する。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated that whether the efficacy of anti-PD-1 antibody drug can be determined in vitro by coculturing tumor cells with tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) isolated from tumor-bearing mice. TIL in Lewis lung carcinoma (LLC) cells collected from tumor-bearing mice is co-cultured with PD-L1 overexpressing LLC cells or LLC cells, then anti-PD-1 antibody drug is added. The cytotoxicity of anti-PD-1 antibody was no difference between PD-L1 LLC and LLC. Analysis of the proportion of T cells contained in the sorted TIL revealed 0.88% for CD4 positive and 42.5% for CD8 positive.

研究分野：細胞生物学

キーワード：抗PD-1抗体薬 LLC細胞 共培養 薬効判定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体薬は 2014 年に薬事承認された免疫チェックポイント阻害剤で、生体の免疫システムを制御する新たな機序の抗がん剤治療法として注目されている。生体内に存在する免疫細胞のうち、T 細胞が腫瘍細胞を攻撃することが知られている。T 細胞表面には PD-1 が発現しており、がん細胞や抗原提示細胞に発現している PD-L1 と結合すると T 細胞の活性が抑制され、これによりがん細胞は T 細胞からの傷害を免れる (Okazaki T et al. Nat Immunol, 14 2013)。抗 PD-1 抗体は T 細胞上の PD-1 に結合し、PD-1 と PD-L1 との結合をブロックする。これにより T 細胞の抑制シグナル伝達が阻害され、T 細胞は活性化を維持し抗腫瘍効果を復帰することができる。したがって、薬自身が DNA 損傷を引き起こすといった従来の抗がん剤とは異なり、抗 PD-1 抗体薬はがん細胞や抗原提示細胞に発現している PD-L1 に結合することで T 細胞を活性化するという新しい機序に基づく薬である。従来の抗がん剤治療に比べ高い奏効率を有しているが (Borghaei H et al. N Engl J Med, 373 2015)、極めて高価であり 2014 年の薬価で換算すると患者一人当たりの年間使用額は約 3800 万円とされていた。その後薬価の改定により 2018 年 11 月現在では約 1,090 万円となっているものの、依然として高額な医療費は国民の負担に直結する。また、服用により死亡した例も報告されており、抗 PD-1 抗体を使用する患者を適切に判断する基準が求められている。日本赤十字社医療センター等が検討を開始したが、現時点では国内外においてこの基準は存在せず、問題解消が望まれている。

2. 研究の目的

研究代表者は患者由来の腫瘍細胞と T 細胞の共培養系に抗 PD-1 抗体薬を添加し、傷害される、されない細胞の性質を比較することで、抗 PD-1 抗体薬の効果を判定できるシステムが構築できれば、上記問題を解決できると考えた。このシステムが有効に機能するか評価するため、本申請ではマウスを使った in vitro の検討を行うことを目的とした。

本システムは、腫瘍細胞 A で作製した担がんマウスから腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating Lymphocyte: TIL) を単離し、TIL と腫瘍細胞 A 由来細胞の共培養系に抗 PD-L1 抗体を添加する。添加後の死細胞の割合から、抗 PD-L1 抗体薬の有効性を判断するというものである (図 1)。本システムが機能すれば、患者から生検等で得られたサンプルを基に有効性を評価できるため患者に対する侵襲性は低い。さらに本システムは特殊な培養方法や試薬を必要としないため、安価で簡便に検査できる利点を有する。

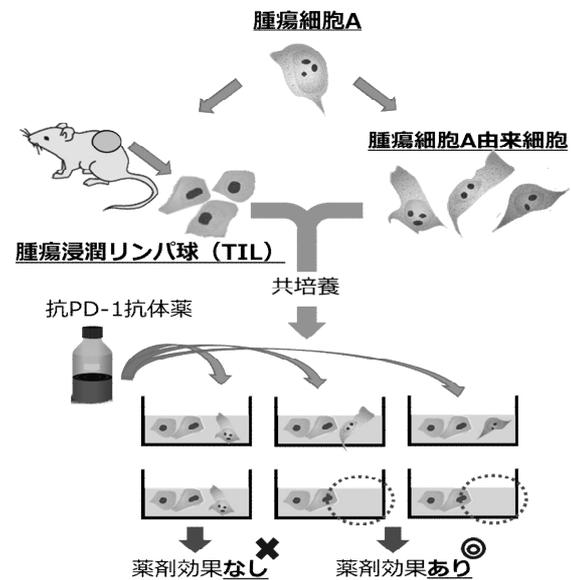


図 1 本申請の目的

3. 研究の方法

(1) 腫瘍浸潤リンパ球の単離: 抗 PD-1 抗体薬の薬剤効果を in vitro で評価すべく、担がんマウスから TIL を単離した。

比重遠心法: LLC 細胞を移植することで作製した担がんマウスから腫瘍を切り出し、鉗を用いて組織を粥状にした。その後 Accumax を加え、攪拌しながらインキュベートした。組織はセルストレーナーでろ過し、遠心処理した。その後 40%と 80%の Parcoll を添加し、所定時間遠心分離した。遠心後、40%と 80%Parcoll の間の TIL を回収した。

セルソーター: LLC 細胞を移植することで作製した担がんマウスから腫瘍を切り出し、鉗を用いて組織を粥状にした。その後 Accumax を加え、攪拌しながらインキュベートした。組織はセルストレーナーでろ過し、遠心処理した。細胞は FITC-CD45 でラベルし、フローサイトメーターを用いて CD45 陽性細胞を分取した。

(2) LLC 細胞と TIL の共培養系を用いた薬剤判定システムの評価: (1) で単離した TIL と LLC 細胞を共培養し、これに抗 PD-1 抗体薬を添加することで薬剤判定システムが機能するか評価した。対象腫瘍細胞は PD-L1 を強発現させた PD-L1/LLC または LLC 細胞を使用した。PD-L1/LLC または LLC 細胞を播種した 96well plate に、(1) で得た TIL を添加し 24-72 時間培養した。その後共培養系に抗 PD-1 抗体薬を添加し、所定時間培養した。培養後、死細胞染色色素 SYTOX を用いて抗 PD-1 抗体薬の薬剤有効性を評価した。

(3) TIL 中の CD4/CD8 の評価: TIL に含まれる CD4, CD8 陽性細胞の割合を、フローサイトメーターで評価した。担がんマウスから分離した腫瘍細胞はチューブに入れ、遠心処理した。上

清除去後、3%FBS 含有 PBS で懸濁し、APC-CD4, PE-CD8, FITC-CD45 をそれぞれ添加し反応させた。氷上で静置した後遠心処理し、上清を 3%FBS 含有 PBS に置換した後フローサイトメーターで評価した。

4. 研究成果

(1) 比重遠心法から TIL の分離を試みたが、目的とする位置にリンパ球のバンドを得ることができなかった。酵素処理の時間、酵素の種類、腫瘍細胞の種類を変化させた検討も試みたが、TIL を得ることはできなかった。

血球成分のマーカーとして知られる CD45 は TIL のマーカーであることが知られていることから、担がんマウスの腫瘍組織から CD45 陽性細胞を分取することで TIL 分取を試みた。回収した腫瘍細胞のうち、CD45 陽性細胞は 8.28%であった(図 2)。これらの細胞を回収し、 9.3×10^5 cells の TIL を得た。

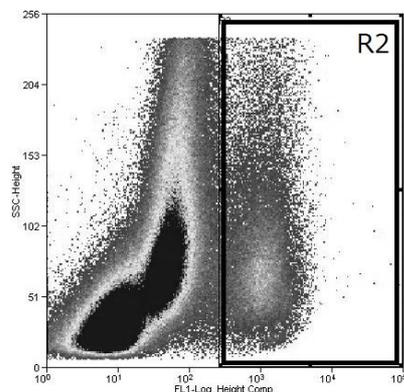


図 2 腫瘍細胞の解析結果。R2 ゲート内が CD45 陽性細胞である。

(2) TIL と共培養系での PD-L1/LLC および LLC 細胞の細胞傷害性を比較した。どちらの細胞でも SYTOX の蛍光を確認することができず、TIL と抗 PD-1 抗体薬併用による細胞傷害効果は PD-L1/LLC および LLC 細胞で同等であった。腫瘍細胞に占める TIL の割合を 2 倍にしたが変化は見られなかった。さらに抗 PD-L1 抗体薬の濃度や曝露時間、共培養の培養時間についても検討したが、TIL と共培養した腫瘍細胞における死細胞の割合に変化は見られなかった。

(3) (2) の結果から、PD-L1/LLC と LLC 細胞における抗 PD-1 抗体薬の薬剤有効性判定が困難であることが示された。TIL に含まれる CD8 陽性 T 細胞や CD4 陽性 T 細胞ががん細胞の傷害に影響することから、TIL に含まれる CD4/CD8 陽性細胞の割合を評価した。担がんマウスの腫瘍組織から得られた細胞には 18.16%の TIL が含まれていた。このうち CD4 陽性細胞は 0.88%、CD8 陽性細胞は 42.5%であった。これらの細胞が腫瘍組織から得られた細胞に占める割合は、CD4 陽性細胞が 0.11%、CD8 陽性細胞が 5.27%であった(図 3)。

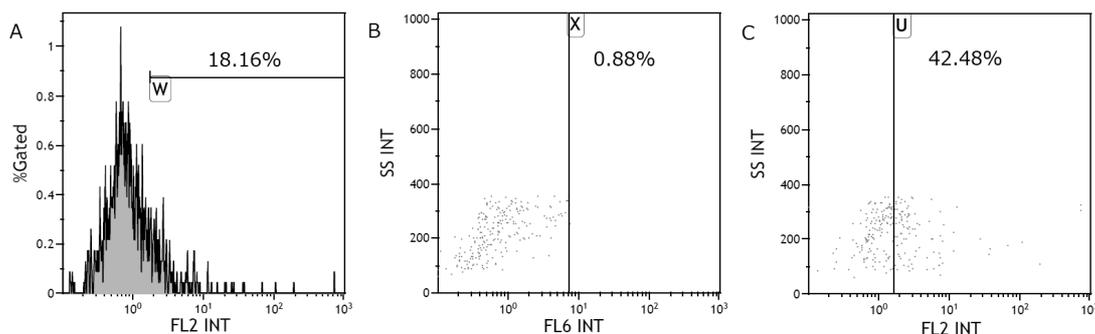


図 3 腫瘍細胞中の TIL, CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の割合

本研究では抗 PD-1 抗体薬の薬剤感受性を *in vitro* で評価するシステムの構築を目指した。LLC 細胞で作製した担がんマウスから回収した TIL と LLC 細胞を共培養し、そこに抗 PD-1 抗体薬を添加し細胞傷害効果を検討したが、PD-L1 を強発現させた LLC 細胞とワイルドタイプの LLC 細胞の死細胞割合に差は見られなかった。2 種類の細胞間での差を得るためには、共培養時の細胞数、共培養時間や添加する抗 PD-1 抗体薬について検討すべき必要があると考える。さらに使用した TIL に含まれる T 細胞の割合が少ないことも考えられることから、TIL を濃縮して CD4+T 細胞や CD8+T 細胞の割合を増加させる必要があるとも考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- (査読有) Kurokawa H, Ito H, Terasaki M, Matsui H. Hyperthermia enhances photodynamic therapy by regulation of HCP1 and ABCG2 expressions via high level ROS generation, *Sci Rep* **9**,1638, 2019
- (査読有) Yasuda G, Ito H, Kurokawa H, Terasaki M, Suzuki H, Mizokami Y, and Matsui H. The preventive effect of Qing Dai on bisphosphonate-induced gastric cellular injuries. *J Clin Biochem*

Nutr **64**, 45-51, 2019

3. (査読有) Terasaki M, Ito H, Kurokawa H, Tamura M, Okabe S, Matsui H, Hyodo I. Acetic acid is an oxidative stressor in gastric cancer cells. J Clin Biochem Nutr **63**. 36-41, 2018
4. (査読有) Kurokawa H, Ito H, Matsui H. Monascus purpureus induced apoptosis on gastric cancer cell by scavenging mitochondrial reactive oxygen species. J Clin Biochem Nutr **61**. 189-195, 2017
5. (査読有) Ito H, Kurokawa H, Hirayama A, P Indo H, J Majima H, Matsui H. Cancer cell-specific mitochondrial reactive oxygen species promote non-heme iron uptake and enhance the proliferation of gastric epithelial cancer cell. J Clin Biochem Nutr **61**. 183-188, 2017

〔学会発表〕(計41件)
(国際学会)

1. (ポスター・査読有) ○Kurokawa H, Ito H and Matsui H. Cancer specific ROS generation by hyperthermia enhance the photodynamic therapy by regulation of HCP1 and ABCG2 expressions. ASCB2018 (Sandiego), Dec 2018
2. (ポスター・査読有) ○Ito H, Kurokawa H, Hirayama A, Indo PH, Majima JH, and Matsui H. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the expression of non-heme iron transporter and promote iron incorporation in gastric cancer cells. ASCB2018 (Sandiego), Dec 2018
3. (ポスター・査読有) ○Ito H, Kurokawa H, Hirayama A, Indo PH, Majima JH, and Matsui H. Reactive oxygen species derived from mitochondria increase non-heme iron incorporation in gastric cancer cells by regulating the expression of transporters. SFRBM2018 (Cicago), Nov 2018
4. (口頭・査読有) ○Matsui H and Kurokawa H. Reactive Oxygen Species Accelerate Cancer Cellular Invasion. ACSIN14 & ICSPM26 (Miyagi), Oct 2018
5. (ポスター・査読有) ○Kurokawa H and Matsui H. Hyperthermia regulates transporter expression via ROS production and enhance the chemotherapy, ACSIN14 & ICSPM26 (Miyagi), Oct 2018
6. (口頭・査読有) ○Kurokawa H, Ito H, Terasaki M and Matsui H. Mitochondrial reactive oxygen species increase by cisplatin enhances PDT effect via transporter regulation. 10th International Symposium on CellTissue Injury and CytoprotectionOrganoprotection (Kyoto), Jun 2018
7. (ポスター・査読有) ○Kurokawa H, Ito H, Terasaki M and Matsui H. Hyperthermia enhance the chemotherapy of PDT effect via regulation of transporter expression. SFRRI2018 (Lisbon), Jun 2018
8. (ポスター・査読有) Kurokawa H and Matsui H. ROS INCREASE CHEMO-REAGENT CONCENTRATIONS BY THE DOWN-REGULATION OF BCRP, MDR1 AND MDR2 DURING BOTH HYPERTHERMIA AND CHEMOTHERAPY. DDW2018 (Washington DC), May 2018
9. (口頭・査読有) ○Matsui H and Kurokawa H, Mitochondrial Reactive Oxygen Species Accelerated Cancer Specific Porphyrin Accumulation to Enhance Photodynamic Therapeutic Effect in Gastric Epithelial Cells. 233rd The Electrochemical Society meeting (Seattle), May. 2018
10. (ポスター・査読有) Kurokawa H and ○Matsui H. Hyperthermia upregulates SLC22A16 expression and downregulates ABCG2 expression via ROS production and enhances the

cytotoxicity of doxorubicin. American Association for Cancer Research Annual meeting 2018 (Chicago), Apr. 2018

11. (ポスター・査読有) ○Matsui H and Kurokawa H. Hyperthermia-derived ROS accelerates chemo-reagents concentrations by the regulation of transporters. International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (Tokyo), Apr. 2018
12. (ポスター・査読有) ○Matsui H, Kurokawa H, Ito H. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Accelerated Cancer Specific Porphyrin Accumulation to Enhance Photodynamic Therapeutic Effect in Gastric Epithelial Cells. Cancer pharmacology research (New York city), Dec. 2017
13. (ポスター・査読有) ○Terasaki A, Kurokawa H, Ito H, Matsui H, Ichioka E, Tsushima Y, Manaoka-Iguchi A, Bando H, Hara H. Hyperthermia regulates transporter expression via ROS production and enhances the cytotoxicity of doxorubicin. The San Antonio Breast Cancer Symposium 2017 (San Antonio), Dec. 2017
14. (ポスター・査読有) ○Kurokawa H, Ito H, Matsui H. Hyperthermia upregulates SLC22A16 expression and downregulates ABCG2 expression via ROS production and enhances the cytotoxicity of doxorubicin, The American Society for Cell Biology| European Molecular Biology Organization 2017 meeting (Philadelphia), Dec. 2017
15. (ポスター・査読有) Kurokawa H, Ito H, ○Matsui H. ROS increase chemo-reagent concentration by the down regulation of BCRP during both hyperthermia and chemotherapy. The Society for Redox Biology and Medicine's 24th Annual Meeting (Baltimore), Nov. 2017
16. (ポスター・査読有) ○Kurokawa H, Ito H, Matsui H. Nitric oxide regulates the expression of heme carrier protein-1 via hypoxia inducible factor-1 α stabilization, 16th International Photodynamic Association World Congress (Coimbra), Jun. 2017

(国内学会)

17. (口頭・査読有) ○黒川宏美、松井裕史、温熱療法は乳がん細胞の抗がん剤トランスポーター発現を制御し、抗がん剤効果を増強する、第35回日本ハイパーサーミア学会(福井) 2018年8月
18. (口頭・査読有) ○黒川宏美、活性酸素は薬剤排泄トランスポーターを制御することで薬剤感受性を亢進させる、フリーラジカルサマースクール 2018(群馬) 2018年8月
19. (口頭・査読有) ○黒川宏美、俣野大介、松井裕史、AOBは活性酸素消去を介して胃粘膜障害を保護する、第18回AOB研究会(京都) 2018年6月
20. (口頭・査読有) ○黒川宏美、伊藤紘、松井裕史、エリスロポエチンの事前投与は抗がん剤効果を増強する、第36回サイトプロテクション研究会(京都) 2018年5月
21. (口頭・査読有) ○黒川宏美、伊藤紘、松井裕史、温熱療法は活性酸素産生量を増加させることでトランスポーターの発現制御を介してドキソルビシンの抗がん効果を増強する、第71回日本酸化ストレス学会(京都) 2018年5月
22. (口頭・査読有) ○黒川宏美、松井裕史、エリスロポエチンによる抗がん剤耐性解消に関する研究、第26回筑紫会(茨城) 2018年3月
23. (口頭・査読有) ○黒川宏美、松井裕史、エリスロポエチン前投与がもたらす抗がん剤増強効果に関する研究、つくば医工連携フォーラム 2018(茨城) 2018年1月
24. (シンポジウム・査読有) ○黒川宏美、伊藤紘、寺崎正彦、松井裕史、癌特異的ボル

フィリン集積現象と活性酸素、第38回日本レーザー医学会学術大会(神奈川) 2017年11月

25. (口頭・査読有) ○黒川宏美、伊藤紘、松井裕史、シスプラチンの事前投与は腫瘍細胞特異的なALA-PDT効果を増強する、第38回日本レーザー医学会学術大会(神奈川) 2017年11月
26. (シンポジウム・査読無) ○黒川宏美、寺崎正彦、伊藤紘、松井裕史、酢および紅麹色素のがん細胞特異的傷害効果: Cancer cellular cytotoxicity of both acetic acid and monascus purpureus、第16回日本臨床中薬学会学術大会(埼玉) 2017年9月
27. (口頭・査読有) ○黒川宏美、伊藤紘、松井裕史、温熱療法は薬剤排泄トランスポーターの発現を制御することで抗がん剤効果を増強させる、第34回日本ハイパーサーミア学会(京都) 2017年9月
28. (ポスター・査読有) ○黒川宏美、三輪佳宏、松井裕史、Tunneling nanotubeを介したがん-正常細胞間競合の解明、日本酸化ストレス学会サマースクール 2017(千葉) 2017年8月
29. (シンポジウム・査読有) ○黒川宏美、伊藤紘、松井裕史、温熱療法はミトコンドリア由来活性酸素を介して細胞内ポルフィリン蓄積量を増加する、第27回日本光線力学学会学術講演会(京都) 2017年7月
30. (口頭・査読有) ○黒川宏美、伊藤紘、松井裕史、シスプラチンの事前投与は腫瘍細胞特異的にALA集積を増加させる、第70回日本酸化ストレス学会、つくば国際会議場、Jun 28-29, 2017

〔図書〕(計2件)

1. 黒川宏美、松阪諭: 血液循環がん細胞(CTC)の検出方法と臨床への応用、プレシジョン・メディシン ~ ビッグデータの構築・分析から臨床応用・課題まで ~、第2章第4節、(株)エヌ・ティー・エス、東京、2018
2. 黒川宏美、松井裕史: 電磁波や超音波を含めた光の診断技術の現状~消化がん~、疾患・病態検査・診断法の開発、38-45、技術情報協会、東京、2017

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 松井裕史

ローマ字氏名: Matsui Hirofumi

研究協力者氏名: 三輪佳宏

ローマ字氏名: Miwa Yoshihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。