

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19696

研究課題名（和文）iPS細胞技術を用いた新規腫瘍浸潤T細胞のTCR塩基配列決定

研究課題名（英文）TCR sequencing of tumor infiltrating T cells using iPS cell technology

研究代表者

直江 吉則（Naoe, Yoshinori）

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50392048

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：マウス腫瘍に浸潤している腫瘍特異的な細胞障害性T細胞を回収し、山中因子を導入することにより、抗CD3刺激無しで増殖する細胞集団を得ることが出来た。これら細胞はTCRからの刺激無しで増殖することからiPS細胞と判断した。また、得られた増殖細胞からDNAを抽出し、TCRbの遺伝子再構成を確認したところ、調べた全ての増殖細胞においてTCRb鎖遺伝子は再構成していた。以上のことから、抗CD3刺激無しで増殖する細胞はT細胞由来であることが示唆された。また、ヒト末梢細胞障害性T細胞を用いてiPS細胞の樹立を試みたが、樹立効率が低かったため、今後、培養条件の検討を行い、樹立効率向上を試みる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腫瘍に浸潤したT細胞にin vitroで山中因子を導入しiPS細胞の樹立に成功した。このことから、iPS細胞化したT細胞は無限増殖能を獲得することにより、個々のT細胞のクローニングが容易となり、腫瘍に浸潤した個々のT細胞のTCRを同定することが可能となった。この技術を利用することにより、新規がん抗原ならびにがん抗原を認識するTCRの探索研究が進むと考えられる。

研究成果の概要（英文）：By collecting tumor-specific cytotoxic T cells infiltrating the mouse tumor and introducing Yamanaka factor, it was possible to obtain a cell population that proliferates without anti-CD3 antibody stimulation. These cells were judged as iPS cells because they proliferated without TCR stimulation. In addition, we confirmed a gene rearrangement of the TCRb in all the proliferating cells examined. From the above, it was suggested that cells proliferating without anti-CD3 stimulation are derived from T cells. In addition, we tried to establish iPS cells using human peripheral cytotoxic T cells, but the establishment efficiency was low. In the future, we will investigate culture conditions and try to improve the establishment efficiency.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞障害性T細胞 iPS細胞 癌免疫

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

1. 研究開始当初の背景

進行がんに対して手術、放射線治療ならびに化学療法を組み合わせた集学的治療が行われる。しかし、多発腫瘍、中枢神経腫瘍または多臓器転移した腫瘍では、手術による腫瘍摘出は困難である。それら腫瘍に対して、放射線治療ならびに化学療法が主な治療となるが、これら治療の繰り返しにより腫瘍は放射線治療抵抗性ならびに抗癌剤抵抗性を誘導し、治療が困難になる。さらに、これら集学的治療は患者への侵襲性が高く、高齢者や合併症・併発症を有する患者において中断・中止されることが少なくない。腫瘍組織中には腫瘍浸潤リンパ球としてT細胞が腫瘍内部に存在する。そのT細胞を腫瘍から取り出し体外で培養・増幅し、患者に再移植するT細胞療法(養子免疫療法)は患者への侵襲性が低く、放射線治療または化学療法とは異なる細胞障害機序でがん細胞に作用し、摘出不能な腫瘍に対しても対象となることから、第4のがん治療法として期待された。一方、体外でT細胞を培養・増殖することにより、疲弊分子PD-1、を発現する。PD-1とそのリガンドとの結合によりT細胞は機能を消失し、がん細胞に対する細胞障害能力が著しく低下する。これらのことから、従来のT細胞療法において期待された臨床効果が得られていない。しかし、近年、進行性悪性黒色腫患者において抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体(免疫チェックポイント分子阻害抗体)による抗体療法により劇的な腫瘍縮小効果があると報告されたことから、再びT細胞療法が期待されている。

2. 研究の目的

腫瘍に浸潤した細胞障害性T細胞がどのようながん抗原を認識するT細胞レセプター(TCR)を有するか、腫瘍に浸潤した細胞障害性T細胞を取り出し、*in vitro*において細胞障害性T細胞に山中因子を導入しiPS細胞化し、TCRの配列決定、同定ならびに探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス腫瘍浸潤細胞障害性T細胞のiPS細胞化

マウス皮下にマウス膵臓癌細胞Pan02を移植した。腫瘍のサイズが300mm³に達した時点で腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍をはさみで細切し、Mitsunaka社のmiltenyiPD社tumor dissociation kitを用いて単細胞懸濁液を得た。抗CD8ビーズを加えカラムを通すことにより、腫瘍浸潤細胞障害性T細胞を分離した。細胞障害性T細胞を抗CD3/CD28抗体で刺激し、山中因子(c-MYC, OCT3/4, SOX2, KLF4)をレトロウイルスを用いて細胞障害性T細胞に感染・導入した。

(2) TCRβ鎖の遺伝子再構成の確認

細胞からDNAを抽出しF-VB gcaactcattgtaaacgaaaca, R-JB-1 atgggaagggacgactctgt、またはR-JB-2 tgaagttgagagctgtctcctactatを用いてPCRを行った。PCR産物をTA cloningし、塩基配列を決定し、遺伝子再構成を確認した。

(3) ヒト末梢細胞障害性T細胞のiPS細胞化

ボランティアから末梢血を採取した。BD社のVacutainer CPTを用いて単核球を集め、抗CD8ビーズを加えカラムを通すことによって、細胞障害性T細胞を分離した。山中因子が一つのベクターに搭載されているHuman Cell Generation All-in-One Vector (Takara Bio)を用い、細胞障害性T細胞に遺伝子を導入し、iPS細胞の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス腫瘍浸潤細胞障害性 T 細胞から iPS 細胞の樹立

マウス腫瘍に浸潤している腫瘍特異的な細胞障害性 T 細胞を回収し、レトロウイルスを用いて山中因子を導入し、iPS 細胞の樹立を試みた。T 細胞は TCR からの刺激無しでは増殖できないが、山中因子を導入することにより抗 CD3 刺激無しで増殖する細胞集団を得ることが出来た。TCR からの刺激無しで増殖することから iPS 細胞と判断した。また、得られた増殖細胞から DNA を抽出し、TCRβ鎖の遺伝子再構成を確認したところ、調べた全ての増殖細胞において TCRβ鎖遺伝子は再構成していた。以上のことから、抗 CD3 刺激無しで増殖する細胞は T 細胞由来であることが示唆された。

(2) ヒト末梢細胞障害性 T 細胞の iPS 細胞化

ヒト末梢細胞障害性 T 細胞にレトロウイルスを用いて山中因子を導入し、iPS 細胞の樹立を試みた。抗 CD3 刺激無しで増殖する細胞を得ることが出来たが、得られた細胞数は少なく、増殖細胞の樹立効率はかなり低かった。今後、遺伝子導入の効率、T 細胞ならびに増殖細胞の培養条件等詳細な条件検討を行い、iPS 細胞の樹立効率を向上させる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Ibrahim Ragab Eissa, Itzel Bustos-Villalobos, Toru Ichinose, Shigeru Matsumura, Yoshinori Naoe, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Nobuaki Mukoyama, Zhiwen Wu, Maki Tanaka, Hitoki Hasegawa, Seiji Sumigama, Branko Aleksic, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya. The current status and future prospects of oncolytic viruses clinical trials against melanoma glioma pancreatic and breast cancers. *Cancers (Basel)*, 査読有、2018, 10: E356

Yoshiki Hirooka, Hideki Kasuya, Takuya Ishikawa, Hiroki Kawashima, Eizaburo Ohno, Itzel Bustos-Villalobos, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Nobuto Koyama, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hidemi Goto, A Phase I clinical trial of EUS-guided intratumoral injection of the oncolytic virus, HF10 for unresectable locally advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 査読有、2018, 18: 596

Yoshihiro Hotta, Hideki Kasuya, Itzel Bustos-Villalobos, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera. Curative effect of HF10 on liver and peritoneal metastasis mediated by host antitumor immunity. *Oncolytic Virotherapy*, 査読有、2017, 6: 31-38

Ibrahim Ragab Eissa, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos-Villalobos, Toru Ichinose, Maki Tanaka, Zhiwen Wu, Nobuaki Mukoyama, Taishi Morimoto, Noriyuki Miyajima, Hasegawa Hitoki, Seiji Sumigama, Branko Aleksic, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya. Genomic signature of the natural oncolytic herpes simplex virus HF10 and its therapeutic role in preclinical and clinical trials. *Front. Oncol.*, 査読有、2017, 7: 149

〔学会発表〕(計 20 件)

Shigeru Matsumura, Daishi Morimoto, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya. STING is dispensable for low susceptibility to C-REV (HF10) in pancreatic cancer cell lines、4th ONCOLYTIC VIROTHERAPY Summit、2018/12/4～6、ボストン(アメリカ)

Hideki Kasuya, Yoshiki Hirooka, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Toru Ichinose, Ibrahim Ragab Eissa, Wu Zhiwen, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Hidemi Goto, Maki Tanaka. Clinical trial using HF10 with Gemcitabine and Erlotinib for 9 patients of Unresectable pancreatic cancer、第56回日本癌治療学会学術集会、2018/10/18~20、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Yoshinori Naoe, Nobuaki Mukoyama, Ibrahim Ragab Eissa, Toru Ichinose, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Zhiwen Wu, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Yasushi Fujimoto, Michihiko Sone, Yasuhiro Koder, Hideki Kasuya. The synergistic effect of the combination therapy of PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus Canerpaturev(C-REV)、第56回日本癌治療学会学術集会、2018/10/18~20、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Hideki Kasuya, Yoshiki Hirooka, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Toru Ichinose, Ibrahim Ragab Eissa, Zhiwen Wu, Nobuaki Mukoyama, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Hidemi Goto, Maki Tanaka、Final total Data of Clinical trial using HF10 with Gemcitabine and Erlotinib against Unresectable Pancreatic Cancer、第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2018/7/26~28、虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区)

Nobuaki Mukoyama, Ibrahim Ragab Eissa, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Zhiwen Wu, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Yasushi Fujimoto, Michihiko Sone, Yasuhiro Koder, Hideki Kasuya. The synergistic effect of the combination therapy of PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus HF10、第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2018/7/26~28、虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区)

Noriyuki Miyajima, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Toru Ichinose, Ibrahim Ragab Eissa, Zhiwen Wu, Nobuaki Mukoyama, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Hideki Kasuya. Involvement of cGAS and STING in sensitivity to oncolytic virus HF10 in breast cancer cell lines、第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2018/7/26~28、虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区)

Daishi Morimoto, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Toru Ichinose, Ibrahim Ragab Eissa, Itzel Bustos-Villalobos, Noriyuki Miyajima, Nobuaki Mukoyama, Zhiwen Wu, Maki Tanaka, Yasuhiro Koder, Hideki Kasuya. Does the expression level of STING correlate with susceptibility to oncolytic virus HF10 in human pancreatic cell lines?、第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2018/7/26~28、虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区)

Hideki Kasuya. Overview of the Immunotherapy Combinations with HF10 from Clinical Trial and Basic Research、Armed Oncolytic Immunotherapies Summit、2018/6/26~28、フランクフルト(ドイツ)

Hideki Kasuya, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Toru Ichinose, Ibrahim Ragab Eissa, Zhiwe Wu, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka. Combination therapy of oncolytic HSV HF10 and immunecheckpoint inhibitor、International Oncolytic Virus Conference、2018/4/9~11、オックスフォード(イギリス)
森本 大士, 直江 吉則, 向山 宜明, 宮嶋 則行, Ibrahim Ragab Eissa, 一ノ瀬 亨, Itzel Bustos-Villalobos, 山田 豪, 田中 舞紀, 藤本 保志, 小寺 泰弘, 粕谷 英樹.

腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスHF10と免疫チェックポイント阻害剤の併用、第51回制癌剤適応研究会、2018/3/23、下呂温泉水明館（岐阜県下呂市）

森本 大士, 直江 吉則, 向山 宜明, 一ノ瀬 亨, Itzel Bustos Villalobos, 神田 光郎, 丹羽 由紀子, 岩田 直樹, 林 真路, 小林 大介, 田中 千恵, 中山 吾郎, 山田 豪, 杉本 博行, 小池 聖彦, 藤原 道隆, 田中 舞紀, 藤本 保志, 粕谷 英樹, 小寺 泰弘. Combination therapy of PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus HF10、第28回日本消化器癌発生学会総会、2017/11/17~18、メルパルク熊本（熊本県熊本市）

吳 智聞, 一ノ瀬 亨, 駱 晨虹, 直江 吉則, Itzel Bustos-Villalobos, 山田 豪, 杉本 博行, 宮嶋 則行, 森本 大士, 向山 宣昭, 西川 洋子, 小出 悠介, 小寺 泰弘, 田中 舞紀, 粕谷 英樹. Combination therapy against human colorectal cancer with the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab and oncolytic herpes simplex virus HF10、第55回日本癌治療学会学術集会、2017/10/20~22、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

Nobuaki Mukoyama, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Ibrahim Ragab Eissa, Chenhong Luo, Itzel Bustos-Villalobos, Zhiwen Wu, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Maki Tanaka, Yasushi Fujimoto, Michihiko Sone, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya. Combination therapy of PD-L1 immune checkpoint inhibitor and oncolytic herpes simplex virus HF10、第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017/7/20~22、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Chenhong Luo, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos-Villalobos, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Nobuaki Mukoyama, Yoko Nishikawa, Yusuke Koide, Toshie Kuwahara, Yasuhiro Kodera, Maki Tanaka, Hideki Kasuya. Combination therapy against human pancreatic cancer with oncolytic herpes virus HF10 and abraxane、第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017/7/20~22、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Ibrahim Ragab Eissa, Chenhong Luo, Itzel Bustos-Villalobos, Zhiwen Wu, Mukoyama N, Noriyuki Miyajima, Daishi Morimoto, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Maki Tanaka M, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya. Systemic therapeutic potential of oncolytic herpes simplex virus HF10 adsorbed on antigen-specific lymphocytes、第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017/7/20~22、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

Hideki Kasuya, Toru Ichinose, Yoshinori Naoe, Itzel Bustos-Villalobos, Ibrahim Ragab Eissa, Chenhong Luo, Zhiwen Wu, Nobuaki Mukoyama, Norihiro Miyajima, Daishi Morimoto, Yoshiki Hirooka, Hidemi Goto, Maki Tanaka. Clinical trial data using HF10, oncolytic herpes simplex virus、第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2017/7/20~22、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

Hideki Kasuya, Gewen Tan, Chenhong Luo, Toru Ichinose, Itzel Bustos-Villalobos, Yoshinori Naoe. Combination therapy of oncolytic herpes virus and anti-angiogenesis agent (bevacizumab) against human gastric cancer xenograft、EACR-AACR-SIC Special Conference 2017、2017/6/24~27、フィレンツェ（イタリア）

森本 大士, 直江 吉則, 一ノ瀬 亨, Itzel Bustos-Villalobos, 神田 光郎, 丹羽 由紀子, 岩田 直樹, 林 真路, 小林 大介, 田中 千恵, 山田 豪, 中山 吾郎, 杉本 博行, 小池 聖

彦, 藤原 道隆, 藤井 努, 田中 舞紀, 粕谷 英樹, 小寺 泰弘. ヒト膀胱癌異種移植モデルにおけるnab-Paclitaxel (nab-PTX) と腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスHF10 との併用療法、第117 回日本外科学会定期学術集会、2017/4/27、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

吳 智聞, 一ノ瀬 亨, 駱 晨虹, 直江 吉則, Itzel Bustos-Villalobos, 山田 豪, 藤井 努, 杉本 博行, 森本 大士, 向山 宣昭, 小寺 泰弘, 田中 舞紀, 粕谷 英樹. ヒト大腸がんモデルにおけるセツキシマブとの併用による腫瘍溶解性ウイルスHF10 の抗腫瘍効果、第117 回日本外科学会定期学術集会、2017/4/27、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

粕谷 英樹, 直江 吉則, Itzel Bustos-Villalobos, 一ノ瀬 亨, 森本 大士, 向山 宣昭, 吳 智聞, 藤井 努, 小寺 泰弘, 田中 舞紀. HF10 ウイルス療法におけるin situ vaccination 効果についての検討、第117 回日本外科学会定期学術集会、2017/4/27、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計2件)

粕谷英樹, 一ノ瀬 亨, 直江 吉則, 松村 繁, Itzel Bustos-Villalobos, 炭竈 誠二, 長谷川 仁紀, Branko Aleksic. 愛知県医師会、現代医学65巻2号、癌免疫治療トピックス、2017, 77-81

粕谷 英樹, 直江 吉則, 一ノ瀬 亨, 廣岡 芳樹, 後藤 秀実, 田中 舞紀. (株)メディカルドゥ、遺伝子医学MOOK 31号 がん免疫療法 - What 's now and what 's next? 第2章の4の3) 腫瘍溶解性ウイルスHF10による再発乳がん多発結節症例, 切除不能進行膀胱がん症例に対する臨床研究、2017, 136-143

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)
取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科癌免疫治療研究室

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/intlexch/cancerimmuno/www/member/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：粕谷 英樹

ローマ字氏名： KASUYA Hideki

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁): 00402636

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。