

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07274

研究課題名（和文）第4世代ビスホスホン酸による  $\gamma$ 型T細胞の新規活性化機序を応用した癌免疫療法開発研究課題名（英文）Development of Cancer Immunotherapy Utilizing Novel Activation Mechanism of  $\gamma$ -delta T Cells by 4th Generation Bisphosphonates

研究代表者

小林 博人 (KOBAYASHI, Hirohito)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80318047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：難治性癌性腹水の症状緩和に腹水濾過濃縮再静注法が行われる。腹水濾過の際に除去される細胞成分中の  $\gamma$ 型T細胞を培養して、癌免疫細胞療法に供する細胞製剤の開発を行なった。従来の2-メチル、3-ブテニル、1-ピロリン酸を用いて培養する方法と比較して、癌細胞を減らし、テトラキスピバロイルオキシメチル2-（チアゾール-2-イルアミノ）エチルデン-1,1-ビスホスホネートを用いて培養することで最大77倍に増やすことが可能であった。また、培養した  $\gamma$ 型T細胞は、自己腹水中においても細胞障害活性を維持しており、培養したガンマ・デルタ型T細胞を腹腔内投与した場合も、有用な治療方法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌性腹膜炎による難治性腹水は、患者のQOLを著しく低下させる。症状緩和に腹水濾過濃縮再静注法が用いられるが、効果は一時的であり複数回の腹腔穿刺が必要である。本研究は本来破棄される細胞成分を用いて癌免疫細胞療法に用いる細胞製剤の開発にある。抗腫瘍活性を有する腹水由来のガンマ・デルタ型T細胞製剤を患者腹腔内へ投与することで難治性腹水の新たな治療戦略となる。また、原料採取に際し新たな患者負担は生じることはなく、持続可能な免疫療法となる。

研究成果の概要（英文）：The treatment of refractory ascites due to carcinomatous peritonitis can be alleviated through the use of CART. During the filtration of ascitic fluid in this procedure,  $\gamma$ -delta ( ) T cells are among the cellular components removed. Research has developed a cell therapy product for cancer immunotherapy by culturing these T cells. When comparing the traditional method using 2M3B-1PP for culturing these cells, the new method employs Tetrakis-pivaloyloxymethyl-2-(thiazole-2-ylamino)ethylidene-1,1-bisphosphonate. This new approach has shown to reduce the contamination of cancer cells and can increase the T cell yield by up to 77 times. Moreover, the cultured T cells maintained their cytotoxic activity even within autologous ascites. The study suggests that intraperitoneal administration of these cultured T cells could be a beneficial therapeutic approach.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：癌性腹膜炎 ガンマデルタ型T細胞 活性化法 腎細胞がん 卵巣がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

根治が望めない進行癌では、Quality of Life(QOL)の維持を目的とした治療が主体となる。申請者は末梢血中のガンマ・デルタ型 T 細胞を用いたがん免疫療法を開発し、QOL の維持とがん制御を目的とした臨床研究を実施している。癌性腹膜炎は、癌細胞の腹腔内播種に伴う大量の腹水貯留を呈する病態で、QOL が著しく低下する。近年、QOL 改善を目的とし、腹水を濾過濃縮して体内に戻す「腹水濾過濃縮再静注療法(CART)」が行われるようになった。腹水中の細胞は、癌細胞や T 細胞等の細胞成分を含み、腹水濾過カラムで分離され廃棄される。腹水中の T 細胞を用いた癌免疫療法の臨床研究はほとんど行われていない。

### 2. 研究の目的

腹水濾過カラムより回収した腹水中細胞から、癌性腹膜炎の治療に供するガンマ・デルタ型 T 細胞を培養する方法を開発し、癌性腹膜炎を有する進行癌患者の QOL の向上に貢献することを目的とする。

### 3. 研究の方法

腹水中のガンマ・デルタ型 T 細胞を効率よく培養する方法の開発として、二つのアプローチを行った。ガンマ・デルタ型 T 細胞の活性化には、抗原提示細胞として単球系細胞が必要である。そこで単球系細胞の機能強化により腹水中ガンマ・デルタ型 T 細胞の培養効率が上昇するかの検討を行った。腹水中のがん細胞を減らすことでガンマ・デルタ型 T 細胞との接触を増やし、培養効率が改善するか。PD-1/PD-L1 経路を遮断することで培養効率が改善するか。足場としてベータリン酸三カルシウム (TCP) を添加することで培養効率が改善するか。血小板由来細胞培養添加物により培養効率が改善するか。もう一つのアプローチは、ガンマ・デルタ型 T 細胞の活性化剤の検討である。2M3B-1PP (2-メチル, 3-ブテニル, 1-ピロリン酸) (E)-4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルニリン酸(HMB-PP)及びテトラキスピパロイルオキシメチル 2-(チアゾール-2-イルアミノ)エチルデン-1,1-ビスホスホネート(PTA)の3種類を用いて検討した。また、将来的に臨床研究に供する場合を想定し、培養ガンマ・デルタ T 細胞が自己の癌性腹水中でも細胞障害活性を維持できているのかを CD107a 放出アッセイで検討した。

### 4. 研究成果

本研究の研究実施計画書は、研究者の所属する東京女子医科大学倫理委員会にて承認されている(3784-R4)。

#### (混入がん細胞数減少による効果)

東京女子医科大学付属病院及び東京女子医科大学東医療センターの化学療法・緩和医療科、産婦人科にて難治性腹水の治療で CART を行った患者 8 人より同意を得て検体を採取した。腹水をナイロンウールカラムに充填し、37 度 5%炭酸ガス培養器内に 30 分静置し、カラムより細胞を回収した。混入がん細胞は約 20%程度に減少し、単核球は約 3 倍に濃縮された。これらの細胞を用いて培養するとがん細胞を減らす前と比較して、約 10 倍のガンマ・デルタ型 T 細胞を得ることが可能となった。

#### (PD-1/PD-L1 経路の遮断による効果)

ガンマ・デルタ型 T 細胞は活性化後早期から 7 日程度 PD-1 が発現されるため、培養開始から 7 日間抗 PD-1 抗体を培養系に添加した。予想に反して抗 PD-1 抗体添加群と非添加群で有意な改善は認められなかった。

#### (TCP による効果)

TCP は骨補填材料であるが、ガンマ・デルタ型 T 細胞の活性化に必要な単球系細胞の足場となり、また、小粒子が取り込まれると抗原提示能が増強される。不均一に細分化した TCP を 30~100 µg/dL の割合で培養系に入れると、混入がん細胞を減少させなくても約 2 倍のガンマ・デルタ型 T 細胞を得ることが可能となった。

#### (自己腹水による抗腫瘍活性への影響の検討)

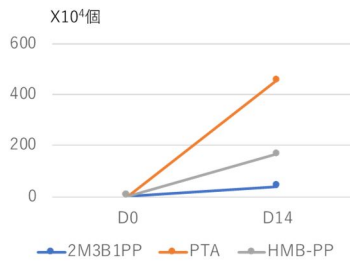
標的細胞として卵巣癌細胞株の SKOV を用い、腹水の存在下で CD107a を指標とした脱顆粒が見られるかをフローサイトメーターで解析した。腹水は CART 後の約 10 倍に濃縮された腹水を用いて、腹腔内に投与された場合と同条件となるようにした。濃縮腹水の有無で比較した場合、脱顆粒ガンマデルタ型 T 細胞の割合は、一部割合が減少した症例もあったが、ほぼ変化は無いことがわかった。

#### (血小板由来添加物による効果)

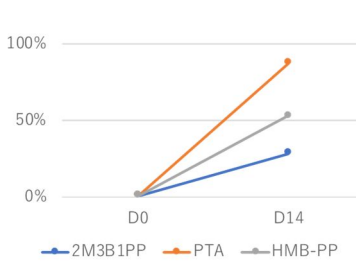
血小板由来添加物は様々なサイトカインや増殖因子を含有しており、樹状細胞において抗原提示能の増強効果が認められている。ガンマ・デルタ型 T 細胞の培養効率改善効果を検討した。5%AB 血清、5%血小板由来添加物、5%AB 血清+5%血小板由来添加物で比較した。腹水細胞、末梢血単核球共に得られたガンマ・デルタ型 T 細胞数及び T 細胞中の割合は 5%AB 血清>5%血小板由来添加物>5%AB 血清+5%血小板由来添加物の培養系であり、効果を認めなかった。

(ガンマ・デルタ型 T 細胞の活性化剤の検討)

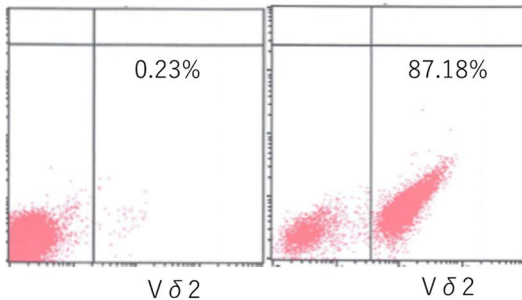
ガンマ・デルタ型 T 細胞数



ガンマ・デルタ型 T 細胞割合



腹水を PTA で活性化



腹水細胞と末梢血単核球に、ガンマ・デルタ型 T 細胞の活性化剤として 2M3B-1PP、HMB-PP、PTA を加え、インターロイキン 2 (100U/mL) の存在下で 14 日培養し、得られたガンマ・デルタ型 T 細胞数と T 細胞に占めるガンマ・デルタ型 T 細胞の割合を検討した。腹水細胞でも末梢血単核球に於いても PTA がガンマ・デルタ T 細胞の培養に最も効率的であることが分かった。腹水中の単核球に占めるガンマ・デルタ型 T 細胞の割合は 0.2~1.0% と少なく、がん免疫細胞療法の臨床試験に供するのに十分は数の腹水由来ガンマ・デルタ型 T 細胞を得ることは困難である。今回様々なアプローチで腹水由来ガンマ・デルタ型 T 細胞の培養効率を改善することを検討した。現時点で

は活性化剤とし PTA を用いることが最も有効である。通常 CART に用いる腹水は、3~4L 程度であり、腹水濾過カラムからは  $1.5 \times 10^8$  個程度の単核球が採取できる。この腹水由来単核球に占めるガンマ・デルタ T 細胞は 1%程度であり、症例によっては  $1.5 \times 10^9$  個程度のガンマ・デルタ T 細胞を得ることが可能と思われる。自己腹水の存在下でも腹水由来ガンマ・デルタ T 細胞は抗腫瘍活性を維持することがわかり、腹腔内への投与による効果を検討する場合には、症例によっては可能と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小林博人、張奇、阿部結貴、田畑務、菅野仁	4. 巻 39
2. 論文標題 癌性腹水から効率良くガンマ・デルタ型T細胞を誘導する方法の基礎的検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 東京女子医科大学総合研究所紀要	6. 最初と最後の頁 76,77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------