

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08615

研究課題名(和文)免疫トレランスを回避する複合的がん免疫細胞治療法の開発

研究課題名(英文)Development of comprehensive cancer immune cell therapies to overcome immune tolerance

研究代表者

目片 英治 (Mekata, Eiji)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：80314152

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)：LAP吸着カラムのTGF- β 産生免疫抑制性細胞除去作用、OX40補助刺激のCTL機能増強作用と制御性T細胞の機能抑制作用、mB7-DC-FcのT細胞補助刺激作用、PD-1 blockerの免疫チェックポイント阻害作用等を利用し、免疫寛容に打ち勝つ癌抗原特異的CTL細胞治療法の樹立研究を行った。

免疫抑制細胞除去環境でのCTL誘導は有効で、LAP-T細胞を癌抗原刺激とOX40補助刺激下に癌抗原特異的CTLを誘導すると、癌抗原特異的免疫寛容下でも移入CTLは抗腫瘍免疫作用を維持し腫瘍拒絶できた。また、B7-DC補助刺激やPD-1阻害下でのCTL誘導は免疫寛容下のCTL機能維持に有効だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドワクチン療法や細胞傷害性Tリンパ球(CTL)移入療法などがヒト癌免疫治療に臨床応用されてきたが、満足いく臨床成果は得られていない。生体では癌抗原(自己抗原)に対する免疫寛容(トレランス)が働いたために、癌抗原特異的CTLを細胞移入しても、生体のトレランス機能に負け、CTLは抗腫瘍作用を失う。したがって、本研究で開発した免疫トレランスを打ち破る方法は、ヒト癌免疫治療を成功へと導く鍵となるであろう。本研究で明らかとなった有効な免疫作用を複合させたCTL誘導により、さらに強力なCTL細胞療法の開発が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We conducted this research to establish a cancer antigen-specific CTL therapy that can overcome immune tolerance using the removal of TGF- β -producing immunosuppressive cells by LAP adsorption column, the function of CTL enhancing and regulatory T cell function inhibiting effects by OX40 costimulation, T cell costimulatory function by mB7-DC-Fc, or, the immune checkpoint inhibitory effect by PD-1 blocker.

CTL induction in an immunosuppressive cell-removed environment was effective. When LAP-T cells were induced with cancer antigen-specific CTL under cancer antigen stimulation and OX40-assisted stimulation, the transferred CTL maintained antitumor immune activity even under cancer antigen-specific immune tolerance and rejected the tumor. In addition, CTL induction by B7-DC costimulation or PD-1 inhibition was effective in maintaining CTL function under immune tolerance.

研究分野：消化器外科

キーワード：免疫寛容 抗腫瘍免疫 複合的免疫療法 OX40 LAP PD-1 PD-L2

1. 研究開始当初の背景

ペプチドワクチン療法や細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 移入療法などがヒト癌免疫治療に臨床応用されてきたが、満足のいく臨床成果は得られていない。生体では癌抗原 (自己抗原) に対する免疫寛容 (トレランス) が働くために、癌抗原特異的 CTL を細胞移入しても、生体のトレランス機能に負け、CTL は抗腫瘍作用を失う。したがって、免疫トレランスを打ち破る方法の開発が、ヒト癌免疫治療を成功へと導く鍵となる。

CTL 細胞療法の場合、免疫トレランスを打破して抗腫瘍効果を増強するには以下が重要な事だと考える。

- 1) 癌抗原に高い特異性をもつ CTL を樹立する事。
- 2) 細胞移入する CTL 機能を高めると同時に、移入された担癌生体内でも増殖できる能力を保持させる事。
- 3) 担癌生体の免疫トレランスを調節している抑制性細胞 (制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC)) の機能を抑制する事。
- 4) 活性化 CTL の働きにブレーキをかける免疫チェックポイント分子 (PD-1 や CTLA-4) を阻害する事。

申請者らのこれまでの免疫トレランスを克服する免疫治療研究の結果、腫瘍抗原 (HER2/neu) に対する免疫トレランスが成立したマウスモデルにおいて、T 細胞の補助刺激因子 OX40 を介するシグナルを作用させると、CTL がトレランスに打ち勝って誘導され、強い抗腫瘍効果を発揮することを示した (*J Immunol*, 2006)。また、OX40 シグナルは CD8⁺ T 細胞 (CTL) にも直接作用し、CTL を直接的に機能増強することを見いだした (*J Immunol*, 2006)。さらに、免疫トレランスの維持に重要な働きを持つ制御性 T 細胞 (Treg) に OX40 シグナルが入ると、Foxp3 の発現が減弱し、Treg がその抑制機能を失い、CTL の抗腫瘍効果が増強することを初めて示すことができた (*Int J Cancer*; 2009)。また、担癌マウスが CTL 細胞移入を受ける前に、担癌マウスに OX40 刺激を加えておくと、担癌マウスの Treg 機能が抑制され、移入した CTL の機能が長期維持でき、腫瘍拒絶できることも示した (*Mol Med Rep*, 2009)。さらに、この OX40 補助刺激下に *in vitro* で樹立した腫瘍抗原 (HER2/neu) 特異的 CTL は、担癌マウスへの細胞移入により、OX40 非刺激 CTL では認めることのない、担癌生体内での分裂増殖能を持ち、抗腫瘍活性を長期間維持し、腫瘍拒絶できることがわかった (*Int J Cancer*; 2017 投稿中)。即ち、OX40 補助刺激により CTL は担癌生体内のトレランスに打ち勝つ可能性が示された。

一方、B7-family で T 細胞の補助刺激因子である B7-DC (PD-L2) は、T 細胞の活性化に働くが、活性化した T 細胞に誘導される免疫チェックポイント分子 Program Death-1 (PD-1) に結合し、活性化 T 細胞をアポトーシスへと導く。申請者らは B7-DC と Fc 分子との癒合タンパク (B7-DC-Fc) を作成し、PD-1 blocker との併用で抗腫瘍効果が増強する事を示した (*J Immunotherapy*, 2014)。さらにこの B7-DC における PD-1 との結合部位を変異させ、T 細胞刺激作用のみ有する mutant 型 B7-DC と Fc 分子との癒合タンパク (mB7-DC-Fc) も作成し、腫瘍抗原特異的 CTL 機能を増強することを示した (*J Immunotherapy*, 2014)。

研究連携者らのグループは、免疫抑制性細胞が分泌する TGF- β と結合する LAP タンパクに着目し、LAP 陽性細胞吸着カラムを開発した。このカラムにより、TGF- β を分泌する Treg や MDSC などの免疫抑制性細胞を選択的に吸着除去できることがわかった。

そこで、「これら特徴的な免疫作動物質を組み合わせ、免疫トレランスに打ち勝つ細胞免疫治療が樹立できるのではないかと考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

(2)-1 本研究の目的

これまでの研究結果等を踏まえ、LAP 吸着カラムによる TGF- β 産生免疫抑制性細胞の除去作用、OX40 のもつ CTL 機能増強作用と制御性 T 細胞の機能抑制作用、mB7-DC-Fc のもつ T 細胞への補助刺激作用、PD-1 blocker による免疫チェックポイント分子機能阻害作用など、ユニークな免疫作用物質を利用し、免疫トレランスに打ち勝つ、癌抗原特異的 CTL 細胞治療法の樹立を研究目的とした。

3. 研究の方法

癌抗原特異的 CTL の樹立と移入された担癌生体内での機能維持

非免疫寛容マウスモデル

HER2/neu に対する非免疫寛容マウス FVB/N を用いた。

FVB マウスに HER2 発現 NT2 腫瘍細胞を皮下接種し、HER2 ワクチン (3T3/neu-GM) を皮下接種後、7 日目に脾臓を摘出し、脾細胞からナイロンウールカラムにて T 細胞を分離した。

次に、分離した T 細胞から LAP 吸着カラムを用いて、免疫抑制性細胞 (Treg など) を吸着除去した T 細胞を得た。

この免疫抑制細胞除去 T 細胞に対して、癌抗原 (HER2) に対する MHC-Class I の immunodominant ペプチド (RNEU) を抗原提示細胞 (T2-D^q) に pulse して CD8⁺ T 細胞を抗原刺激し、7 日間培養して HER2 特異的 CTL を誘導した。

抗原刺激培養の際に、T 細胞エフェクター機能増強のため 1) 抗 OX40 抗体 2) mutant-B7-DC-Fc 癒合タンパク、免疫チェックポイント阻害剤である 3) 抗 PD-1 抗体を混入させ、それぞれ 7 日間共培養して、HER2 特異的 CTL の誘導効果を、抗原刺激のみで誘導した CTL と比較して検証した。

さらに、誘導したそれぞれの CTL を、HER2 発現 NT2 腫瘍細胞を乳腺皮下接種したレシピエント担癌 (非免疫寛容) マウスに細胞移入して、抗腫瘍免疫効果を観察した。

また、移入前の CTL (CD8⁺ T 細胞) を CFSE で標識し、1) 2) 3) の各種免疫作用物質介入の有無により、移入後の担癌レシピエント内での CD8⁺ T 細胞分裂回数を比較した。

CTL の抗原特異性と機能評価は、担癌生体内移入後の CD8 陽性 T 細胞の CTL を、HER2 抗原刺激に対する CD8 陽性 T 細胞内 IFN- γ 染色 (ICS) で、経時的に観察した。

免疫寛容マウスモデル

誘導された HER2 特異的 CTL が、HER2 特異的免疫トレランスを打ち破って、担癌生体内で抗腫瘍免疫機能を発揮できるかを確かめた。

HER2/neu transgenic mouse : FVB/N マウスに rat-HER2/neu が遺伝子導入された、HER2 特異的な免疫トレランスマウス (neu-N) を用いた。

FVB マウスに HER2 発現 NT2 腫瘍細胞を皮下接種し、HER2 ワクチン (3T3/neu-GM) を皮下接種後、7 日目に脾臓を摘出し、脾細胞からナイロンウールカラムにて T 細胞を分離した。

次に、分離した T 細胞から LAP 吸着カラムを用いて、免疫抑制性細胞 (Treg など) を吸着除去した T 細胞を得た。

RNEU による HER2 抗原刺激と、上記免疫作用物質で誘導した HER2 特異的 CTL が、HER2 に対する免疫トレランス状態の担癌生体内で、HER2 特異的抗腫瘍免疫効果を示すことを、腫瘍増殖曲線と HER2 抗原刺激に対する CD8 陽性 T 細胞内 IFN- γ 染色 (ICS) で調べて比較した。

4. 研究成果

癌抗原特異的 CTL の樹立と移入された担癌生体内での機能維持

(1) 非免疫寛容マウスモデル (FVB/N)

HER2 発現 NT2 腫瘍細胞と HER2 ワクチン (3T3/neu-GM) を皮下接種された FVB マウスの脾細胞からナイロンウールカラムにて T 細胞を分離した。分離した T 細胞から LAP 吸着カラムを用いて免疫抑制性細胞 (Treg など) を吸着除去した T 細胞 (LAP-T) と、LAP 吸着カラムを使用しない T 細胞 (control-T) を用いた。

これらの T 細胞に対して、HER2 に対する MHC-Class I immunodominant ペプチド (RNEU) を抗原提示細胞 (T2-D^q) に pulse して CD8⁺ T 細胞を抗原刺激し、7 日間培養して HER2 特異的 CTL を誘導し、ICS にて HER2 特異的 CTL 数を比較した。

その結果、免疫抑制性細胞が除去された LAP-T は control-T に比べ、有意に多くの HER2 特異的 CTL が誘導できることがわかった。

次に、LAP-T を RNEU 癌抗原ペプチド刺激下で培養する際に、T 細胞エフェクター機能増強のため免疫作動薬と 7 日間混合培養した。

RNEU ペプチド刺激のみ

RNEU ペプチド刺激 + OX40 補助刺激

RNEU ペプチド刺激 + B7-DC (PD-L2) 補助刺激

RNEU ペプチド刺激 + PD-1 免疫チェックポイント阻害

ICS にて HER2 特異的 CTL (IFN- γ 陽性 CD8 陽性細胞) 数を比較した。

その結果、 \bullet のどの群でも HER2 特異的 CTL は培養前よりも培養後に有意に増加した。

\bullet 、 \bullet の群間で HER2 特異的 CTL の増加率に有意な差はなかった。 \bullet 、 \bullet 、 \bullet は よりも有意に多くの HER2 特異的 CTL が誘導されていた。

さらに、誘導した①~④それぞれの CTL を、HER2 発現 NT2 腫瘍細胞を乳腺皮下接種したレシピエント担癌 (非免疫寛容) マウスに細胞移入して、腫瘍増殖曲線により抗腫瘍効果を観察した。

その結果、 \bullet が最も高い抗腫瘍効果を示した。次に \bullet 、 \bullet 群が抗腫瘍効果を示した。の CTL 細胞移入では、CTL の細胞移入していない対照群と大差なく、抗腫瘍効果は乏しかった。

細胞移入前の CTL (CD8⁺T 細胞) を CFSE で標識し、 - の各種免疫作用物質介入の有無により、細胞移入後の担癌レシピエント内での CD8⁺T 細胞分裂回数を比較した。

その結果、 の CTL は細胞移入後の担癌レシピエント内でも細胞分裂していた。

、 の CTL の移入後の細胞分裂は僅かに観察された。

の CTL の移入後の細胞分裂は観察されなかった。

(2) 免疫寛容マウスモデル

誘導された HER2 特異的 CTL が、HER2 特異的免疫トレランスを打ち破って、担癌生体内で抗腫瘍免疫機能を発揮できるかを確かめるために、次の実験を行った。

HER2 特異的な免疫トレランスマウス(neu-N)を用いた。

LAP-T に , , , または の培養条件下で HER2 特異的 CTL を誘導し、HER2 発現 NT2 腫瘍接種した neu-N HER へそれぞれの CTL を細胞移入した。

腫瘍増殖曲線で抗腫瘍効果を観察し、免疫トレランス状態の担癌生体内で HER2 特異的抗腫瘍免疫作用が維持できているかどうかを、CTL 細胞移入後の neu-N マウス脾細胞中の T 細胞を用いて、HER2 抗原刺激に対する CD8 陽性 T 細胞内 IFN- 染色(ICS)で比較した。

その結果、 の OX40 培養下で誘導された CTL は最も強い抗腫瘍効果を示し、担癌トレランス生体内でも HER2 特異的抗腫瘍免疫機能を維持していた。

一方、 , の CTL は弱い抗腫瘍効果を示し、担癌トレランス生体内でも弱いながら HER2 特異的抗腫瘍免疫機能が観察された。

しかし、 のペプチド抗原刺激のみで誘導された CTL は、担癌トレランス生体内では、抗腫瘍効果は認めず、HER2 特異的抗腫瘍免疫機能も観察されなかった。

以上の結果から、LAP 吸着カラムを用いて免疫抑制性細胞を除去した環境で CTL を誘導することは有効であり、LAP-T 細胞をがん抗原ペプチド刺激と OX40 補助刺激下にがん抗原特異的 CTL を誘導すると、その CTL はがん抗原特異的免疫トレランス下でも、抗腫瘍免疫作用を維持し、腫瘍拒絶できる能力があることがわかった。

また、B7-DC 補助刺激や PD-1 阻害を加えて CTL 誘導することもトレランス下の CTL 機能維持に有効な可能性がある。

今後は、これらの有効な免疫作用を複合させて CTL を誘導し、免疫トレランス下での抗腫瘍免疫効果がさらに強力な CTL 細胞療法の開発研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Pham Minh Ngoc, Murata Satoshi, Kitamura Naomi, Ueki Tomoyuki, Kojima Masatsugu, Miyake Toru, Takebayashi Katsushi, Kodama Hirokazu, Mekata Eiji, Tani Masaji	4. 巻 142
2. 論文標題 In vivo antitumor function of tumor antigen-specific CTLs generated in the presence of OX40 co-stimulation in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2335 ~ 2343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.31244	査読の有無 有
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masatsugu Kojima, Satoshi Murata, Miyuki Shimoji, Andreas Michael Sihombing, Naomi Kitamura, Tomoyuki Ueki, Mina Kitamura, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Aya Tokuda, Toru Miyake, Eiji Mekata, Masaji Tani
2. 発表標題 Tumor Ag-specific CTL generation from tumor-associated lymphocytes in malignant ascites of peritoneal metastases
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Murata, Katsushi Takebayashi, Tsuyoshi Yamaguchi, Sachiko Kaida, Ken Ishikawa, Hirokazu Kodama, Miyuki Shimoji, Andreas Michael Sihombing, Masatsugu Kojima, Toru Miyake, Hiroya Iida, Tomoyuki Ueki, Mina Kitamura, Aya Tokuda, Eiji Mekata, Masaji Tani
2. 発表標題 Therapeutic strategy based on the mechanism of peritoneal relapse after surgery for gastric cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyuki Shimoji, Satoshi Murata, Andreas Michael Sihombing, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Masatsugu Kojima, Tomoyuki Ueki, Naomi Kitamura, Mina Kitamura, Aya Tokuda, Toru Miyake, Eiji Mekata, Masaji Tani.
2. 発表標題 Effect of hyperthermia on the cancer stem-like cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Andreas Michael Sihombing, Satoshi Murata, Miyuki Shimoji, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Masatsugu Kojima, Tomoyuki Ueki, Naomi Kitamura, Mina Kitamura, Aya Tokuda, Toru Miyake, Eiji Mekata, Masaji Tani
2. 発表標題 CD44-enriched cancer stem-like cells as a source of peritoneal metastasis from gastric cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田 聡、Pham Minh Ngoc、北村 直美、河合 由紀、梅田 朋子、目片 英治、森 毅、富田 香、北村 美奈、田中 彰恵、清水 智治、谷 眞至
2. 発表標題 細胞移入後に担癌生体内で増殖できる腫瘍特異的CTL細胞療法
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	村田 聡 (Murata Satoshi) (90239525)	滋賀医科大学・医学部・講師 (14202)	
研究分担者	三宅 亨 (Miyake Toru) (70581924)	滋賀医科大学・医学部・講師 (14202)	
研究分担者	谷 眞至 (Tani Masaji) (60236677)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

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
---------	---------