

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390314

研究課題名（和文）放射線治療と免疫細胞治療の併用による
革新的ながんの集学的治療の開発研究課題名（英文）Novel combined modality therapy with radiotherapy and immunotherapy
for the treatment of cancer

研究代表者

垣見 和宏(KAKIMI KAZUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80273358

研究成果の概要：

Radiation Immunology & Immunotherapy の確立を目指して、放射線治療と免疫細胞治療に関する基礎的検討と臨床研究を実施した。担癌マウスモデルを用いて、電子線照射が腫瘍と生体の免疫系に与える効果を検討した。腫瘍を取り巻く微小環境内では、Gr-1+CD11b+の myeloid-derived suppressor cells (MDSC) と呼ばれる骨髄系の細胞が蓄積し、ケモカインによって制御されていることを明らかにした。

ex vivo で大量培養した T 細胞を、骨転移に対する放射線治療後に投与する臨床研究を実施した。前立腺癌に対する抗アンドロゲン治療を受けている患者では、T 細胞の培養が困難であったが、治療群では病勢コントロールが得られた症例を認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2008 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療学、免疫、免疫細胞治療、T細胞、がん、がん治療

1. 研究開始当初の背景

癌が急増して、10 年後には日本人の死因の半分が癌となる。とくに高齢者の癌患者に対して、非侵襲的な癌治療の体系を確立する必要がある。手術と並んで癌の根治的な局所治療である放射線治療の役割が大きくなっており、化学治療との併用である化学放射線治療の有効性が確立されている。し

かし、難治性の癌や多発転移に対しては限界があり、局所制御能の向上と、全身転移に対する負担の少ない治療法が望まれる。時空制御能に優れた放射線治療をさらに進化させるとともに、免疫応答を介して生体に与える効果を増幅し、全身的な治療効果が期待できる治療法の開発を目的とする。最先端の時空制御能を持つ放射線照射シス

テムに、システミックな効果とメモリー機能を持った免疫細胞治療を併用することにより、免疫応答を介して生体に与える効果を増幅し、照射部位局所だけに限局されるのではなく全身的で継続的な治療効果が期待できる革新的ながんの治療法の開発が期待される。本研究は、このような新しい治療法を開発するための科学的な根拠を、分子レベル、細胞レベル、個体レベルで確立することを目的とし、放射線治療と免疫細胞治療を併用した、癌治療の新分野を開くことを目的に本研究を実施した。

2. 研究の目的

- A. 放射線治療と免疫細胞治療の併用のための基礎的検討 ~ Radiation Immunology の確立 ~
- B. 放射線治療と免疫細胞治療の併用のための臨床研究 ~ Radiation Immunotherapy の確立 ~

3. 研究の方法

- A. 放射線治療と免疫細胞治療の併用のための基礎的検討

(1) 担癌マウスモデルを用いて、腫瘍に電子線照射を施し、電子線照射が生体の免疫系に与える効果を細胞レベル、分子レベルで検討した。まず C57BL/6 マウスの皮下に B16 メラノーマ細胞(5x10⁵)を接種し、腫瘍塊を形成させ担癌マウスを作成する。2週間後、腫瘍径が 1cm まで増殖した腫瘍局所に、エネルギー6MeV の電子線を 6Gy 単回照射する。電子線照射後 6,12,24 時間 2,3,5,7,10,14 日後に、腫瘍、所属リンパ節、脾臓を摘出し、各コンパートメントにおける効果を分子生物学および細胞生物学的手法を用いて詳細に解析した。



遺伝子発現の解析：mRNA を抽出し RT-PCR 法により遺伝子発現の変化を解析する。特に免疫制御にかかわるサイトカイン・ケモカイン遺伝子、接着因子、共刺激分子や MHC class I 分子などの抗原提示や抗原認識にかかわる分子の遺伝子発現パネルの経時的な変化を重点的に検討した。さらに免疫制御に深く関連していることが注目されているIDO や arginase など生体のエネルギー代謝にかかわる分子の発現を検討し、腫瘍を取り巻く免疫抑制生体の微小環境の分子レベルでの解析と、放射線照射が生体に及ぼす影響を詳細に検討した。

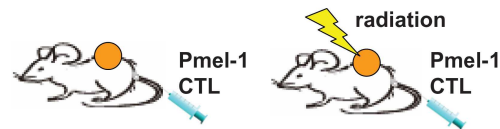
フローサイトメーター (FACS) を用いた細胞生物学的検討：各コンパートメントからリンパ球を分離し、CD4,CD8 陽性 T

細胞、CD4CD25 陽性抑制性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などのエフェクター細胞、CD11c 陽性 DC や CD11b 陽性細胞などの抗原提示細胞 (APC) さらにストローマ細胞の細胞表面マーカーを染色し、活性化や成熟分化の状態を詳細に解析した。

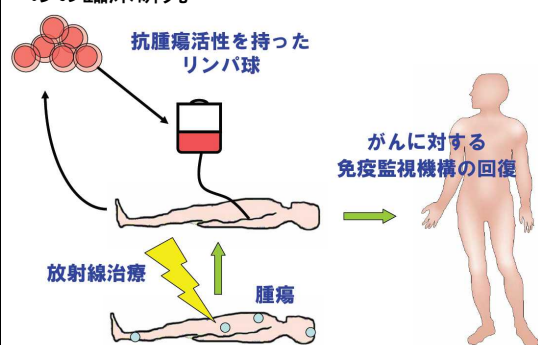
(2) CTL モデル-電子線照射後のマウスに

腫瘍特異的な CTL を静脈内投与し、腫瘍特異的な CTL の生体内でのダイナミックな動態を経時的に観察し、電子線照射が与える影響と抗腫瘍効果の関係を検討した。B16 細胞に発現する gp100 抗原を特異的に認識する CTL 由来の T 細胞受容体 (TCR) を持った TCR transgenic mice (Pmel-1 マウス) のリンパ球は、B16 細胞を認識して傷害することが可能な CTL である。そこで腫瘍細胞接種後 7 日目に 5x10⁶ 個の Pmel-1 のリンパ球を、エフェクター細胞としてマウスの尾静脈から投与し B16 メラノーマに対する抗腫瘍免疫応答を検討した。in vitro での細胞傷害活性を持った Pmel-1 細胞も、in vivo においては、B16 腫瘍が誘導する抑制性の環境下においては腫瘍を拒絶することができず、anergy や ignorance と呼ばれる不応答状態に陥ることが知られている。腫瘍に対して電子線照射を加えることで、免疫応答の抑制を克服し抗腫瘍効果を誘導できるかどうかを検討し、放射線治療と免疫細胞治療の併用モデルを作成した。

このような解析によって、生体と腫瘍に対する放射線治療の影響を、分子レベルから細胞レベル、個体レベルへと再構築し、その成果に基づいて、より効果的な免疫療法との併用を確立した。



- B. 放射線治療と免疫細胞治療の併用のための臨床研究



(1) T細胞は、T細胞受容体や NKG2D 受容体を介してストレスを受けた細胞や腫瘍細胞を認識することが分子レベルで明らかになったこと、骨粗鬆症や高Ca血症治療薬であるアミノビスホスホネ

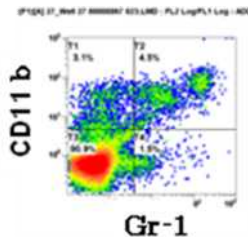
ートとIL-2を用いて T細胞を培養増殖させることが可能になったこと、アミノビスホスホネートにより増殖した T細胞が抗腫瘍活性を持つこと、などから、がんに対する免疫細胞治療への応用が期待されている。東京大学医学部附属病院22世紀医療センター免疫細胞治療学講座において、治療抵抗性の固形癌患者で、放射線治療の適応となる骨転移症例に対して放射線治療と活性化自己 T細胞治療の併用治療の臨床研究を実施した。東京大学医学部倫理委員会の承認を得た後(整理番号1511)UMIN-CTRに登録を行ない(UMIN試験ID:UMIN000000628)、T細胞を用いた免疫細胞治療の臨床試験を実施した。

放射線療法は3Gy/回、全10回。被験者から成分採血により単核球を採取し、ゾメタを用いて T細胞を増殖・活性化させ、1投与あたり 1×10^9 細胞(目標値)を静脈内投与(点滴注射)し(全8回)治療効果を検討した。

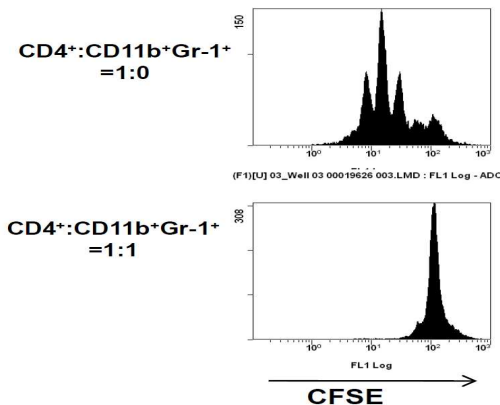
4. 研究成果

A. 放射線治療と免疫細胞治療の併用のための基礎的検討

(1) 腫瘍を取り巻く微小環境内では、Gr-1⁺CD11b⁺の myeloid-derived suppressor cells (MDSC) と呼ばれる骨髄系の細胞が蓄積し、そのダイナミックな免疫抑制作用がケモカインによって制御されていることを明らかにした。放射線照射後には右図のごとくMDSCが増加していることが認められたことから、MDSCによる抑制を除去することで、さらに放射線治療の抗腫瘍効果の増強を得ることが可能ではないかと期待している。本研究を発展させ、免疫応答の制御により放射線治療を進化させることを目指したい。



(2) MDSCによるT細胞の抑制

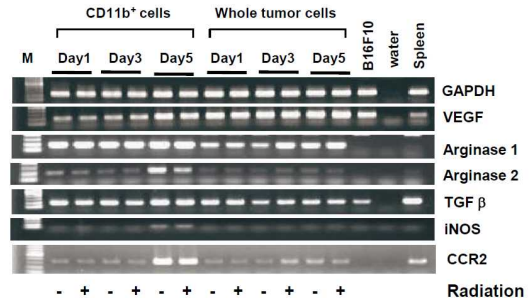


腫瘍内に浸潤しているリンパ球からCD11b-MACS ビーズを用いてCD11b⁺Gr-1⁺細胞を分離し、脾細胞と1:1で混合培養して、その抑制活性を検討した。あらかじめ1.2uMのCFSEでラベルしたCD4⁺細胞を抗CD3抗体と抗CD28抗体で固相化したウェルで刺激してその分裂をCFSE強度で評価したところ、腫瘍由来のCD11b⁺Gr-1⁺細胞の存在下では、CFSEのシフトは認められずCD4⁺細胞の増殖が抑制されていたことから、MDSCであることが証明された。

放射線照射後には、MDSCが増加していることから、放射線治療の効果をより高めるためには、MDSCの制御を含めた併用治療を検討することが必要であると考えられた。

(3) 腫瘍局所での各種の免疫抑制性の活性をもつ遺伝子発現を検討し、放射線治療が免疫系に及ぼす影響を検討した。

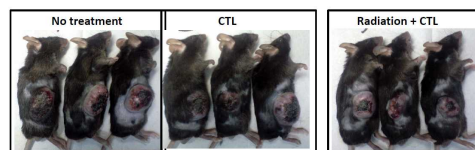
Arg1, Arg2, iNOS, CCR2については、継代培養しているB16F10細胞株においてその発現を認めないことから腫瘍組織に浸潤した免疫系細胞が発現していると考えられた。放射線照射後5日目に強い遺伝子発現が認められたが、放射線無治療群でも同程度の遺伝子発現が認められることから、放射線治療によるものよりも腫瘍の増大による遺伝子発現の変化であると思われる。



(4) B16メラノーマ皮下接種モデルに対して、抗原特異的なCTLを尾静脈から投与する免疫細胞治療モデルにおける放射線照射を検討した。CTL単独では明らかな抗腫瘍効果を得ることは困難であったが、放射線照射後にCTLを投与することにより腫瘍の増殖抑制効果が確認された。

所属リンパ節と腫瘍内の浸潤リンパ球を解析し、CTLの頻度を解析したところ、放射線照射によって腫瘍内へのCTLの浸潤が増加したと考えられた。

Improvement of Adoptive CTL Transfer Therapy

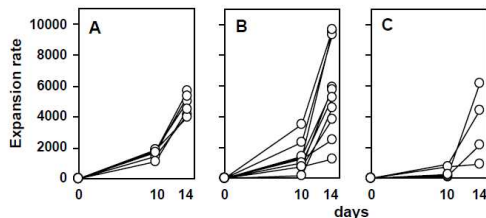


B. 放射線治療と免疫細胞治療の併用のための臨床研究

(1) 末梢血由来の単核細胞成分(PBMC)をIL-2(700U/ml)と Zoledronic acid(10 μ M)存在下で2週間培養するとγδT 細胞優位に約1000 倍まで増殖し、全 PBMC の 85 - 95%がγδT 細胞となる。γδT 細胞は、CD4⁺CD8⁻double negative であり、NK 活性化型受容体の1つである NKG2D を発現すること、この NKG2D 陽性細胞は CD56⁺と CD56⁻の分画に 1:1 の割合で分けられた。

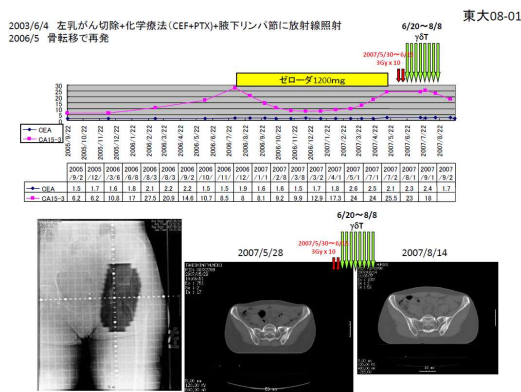
(2) がん患者のγδT 細胞も、健常者と同様に培養増殖させることに成功した。2例の乳癌の骨転移、3例の前立腺癌の骨転移症例の5例に対して、末梢血の単核球を採取した後、アミノビスホスホネートと IL-2 を用いて T 細胞を培養し、免疫細胞治療に用いた。前立腺癌症例1例では、T 細胞の培養不良のため治療できなかった。

A. 健常者 B. 肺がん患者術後再発 C. 骨転移に対す放射線治療後の患者のγδT 細胞の増殖率を示す。



骨転移症例では、培養困難例が存在した。前立腺癌に対する抗アンドロゲン治療としてリューブリンの投与を受けている患者での培養が困難であった。

(3) 1例の乳癌患者の治療経過は良好で、腫瘍マーカーの低下を認めた。強い患者の希望と倫理委員会の承認を得て、経過良好な症例に関しては、2クール目の追加治療を実施した。再発、化学療法に抵抗性の患者に対する治療でありながら、重篤な有害事象を認めず、比較的低侵襲で治療効果が確認された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Sawanobori Y, Ueha S, Kurachi M, Shimaoka T, Talmadge JE, Abe J, Shono Y, Kitabatake M, Kakimi K, Mukaida N, Matsushima K. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* 2008; 111: 5457-5466.

Kondo M, Sakuta K, Noguchi A, Ariyoshi N, Sato K, Sato S, Hosoi A, Nakajima J, Yoshida Y, Shiraishi K, Nakagawa K, Kakimi K. Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2008; 10: 842-856.

Kakimi K, Nakajima J, Wada H. Active specific immunotherapy and cell-transfer specific therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008.

Hosoi A, Takeda Y, Sakuta K, Ueha S, Kurachi M, Kimura K, Maekawa R, Kakimi K. Dendritic cell vaccine with mRNA targeted to the proteasome by polyubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 242-246.

Hosoi A, Takeda Y, Furuichi Y, Kurachi M, Kimura K, Maekawa R, Takatsu K, Kakimi K. Memory Th1 cells augment tumor-specific CTL following transcutaneous peptide immunization. *Cancer Res* 2008; 68: 3941-3949.

Kurachi M, Kakimi K, Ueha S, Matsushima K. Maintenance of memory CD8⁺ T cell diversity and proliferative potential by a primary response upon re-challenge. *Int Immunol* 2007; 19: 105-115.

垣見和宏、がん免疫 - 免疫細胞治療について -、PHYSICIANS' THERAPY MANUAL 6(1) JUL.2008

作田和子、細井亮宏、吉田幸弘、垣見和宏、ポストヒトゲノムのがん免疫細胞治療(今後の展開)、侵襲と免疫 2008、Vol.17, No.4, 149-154.

〔学会発表〕(計14件)

2007/6/1 第55回日本輸血・細胞治療学会総会シンポジウム、名古屋、垣見和宏、細胞治療の基盤と臨床応用、γδT 細胞を用いた免疫細胞治療の取り組み

2007/7/11-12 第11回基盤の癌免疫研究会総会、東京、細井亮宏、竹田やよい、前川隆司、木村公則、高津聖志、垣見和 TLR7 リガンドと Th エピトープペプチドを用いた経皮ペプチド免疫による腫瘍特異的 CTL の誘導

2007/7/11-12 第11回基盤的癌免疫研究会総会、東京、竹田やよい、細井亮宏、前川隆司、木村公則、垣見和宏、ユビキチン配列を付加した mRNA を導入した樹状細胞による CTL の誘導

2007/10/3-5 第66回日本癌学会学術総会、横浜、竹田やよい、細井亮宏、前川隆司、垣見和宏、ユビキチン配列を付加した mRNA を導入した樹状細胞による CTL の誘導 DC based vaccine transfected with mRNA encoding proteosomal targeted tumor associated antigen

2007/11/20-22 第37回日本免疫学会総会・学術集会、Hosoi Akihiro, Takeda Yayoi, Maekawa Ryuji, Takatsu Kiyoshi, Kakimi Kazuhiro. Efficient Expansion and Activation of Tumor specific CD8+ T cells by Transcutaneous Peptide Immunization with TLR7 ligand and Th1 Epitope Peptide

2007/11/20-22 第37回日本免疫学会総会・学術集会、Kurachi Makoto, Kakimi Kazuhiro, Ueha Satoshi, Matsushima Kouji. Maintenance of memory CD8+ T cell Diversity and Proliferation Potential by a Primary Response upon Re-Challenge.

2007/12/1 第5回難病治療開発研究会、東京、細井亮宏、垣見和宏、経皮ペプチド免疫法を用いた癌ワクチン治療の開発

2008/1/22 先端医療開発シンポジウム、東京、垣見和宏、がんに対する免疫細胞治療法の開発

2008/4/13 AACR Annual meeting San Diego, CA. USA. Kazuhiro Kakimi, Akihiro Hosoi, Yayoi Takeda, Ryuji Maekawa, Kiyoshi Takatsu. Efficient expansion and activation of tumor-specific CTLs by transcutaneous CTL and Th1 epitope peptide immunization with TLR7 ligand.

第12回基盤的癌免疫研究会総会、2008/7/2-3、大宮、近藤真、作田和子、野口敦崇、有吉直子、佐藤和聡、佐藤志保、佐藤啓介、細井亮宏、中野由貴子、木村公則、垣見和宏、ゾレドロン酸を用いて培養した V₉V₂T 細胞による免疫細胞治療

第49回日本肺癌学会総会、2008/11/14、北九州市、中島淳、垣見和宏他、シンポジウム4、生体防御と肺癌、S44 自己活性化T細胞による非小細胞性肺癌免疫療法

第67回日本癌学会学術総会、2008/10/28-30、名古屋、上羽悟史、沢登靖史、倉知慎、垣見和宏、松島綱治、ケモカインによる CD11b+Gr-1+Myeloid derived suppressor cells の担癌宿主内動態制御、

第38回日本免疫学会総会、2008/12/1-3、京都、Kurachi Makoto, Kakimi Kazuhiro, Ueha Satoshi, Suenaga Fumiko, Abe Jun, Matsushima Kouji、Primary memory CTL

preferentially accumulate in secondary lymphoid organs.

第38回日本免疫学会総会、2008/12/1-3、京都、Ueha S, Sawanobori Y, Shono Y, Abe J, Kurachi M, Shimaoka T, Kitabatake M, Kakimi K, Matsushima K. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-suppressor cells in tumor-bearing mice.

〔その他〕

アウトリーチ活動

2007/10/13 患者会支援企画、東京大学医学部附属病院 22世紀医療センター がん患者さんのための公開講座&施設見学会

(1) がんと免疫、免疫細胞治療について
(2) 先端医療開発の現状 免疫細胞治療とトランスレーショナルリサーチ 垣見和宏

2008/9/20 日本経済新聞社主催 健康と医療フォーラム 2008 スペシャルセミナー

がんと免疫~免疫細胞治療の最前線~
特別講演2 「がんと免疫~免疫細胞治療について~ 垣見和宏

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣見 和宏 (KAKIMI KAZUHIRO)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：80273358

(2) 研究分担者

倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)
東京大学・医学部・助教
研究者番号：00396722
上羽 悟 (UEHA SATOSHI)
東京大学・医学部・助教
研究者番号：00447385
白石憲四郎 (SHIRAIISHI KENSHIRO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40447404
多湖 正夫 (TAGO MASAO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50282520
(平成19年度のみ)

(3) 連携研究者

井垣 浩 (IGAKI HIROSHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90361344
木村 公則 (KIMURA KIMINORI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70397339
古市 好宏 (FURUICHI YOSHIHIRO)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：70384998