

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22951

研究課題名(和文)細胞表面工学による抗腫瘍免疫応答の制御と腫瘍浸潤T細胞の革新的増殖法の開発

研究課題名(英文) Regulation of anti-tumor immune response by cell-surface engineering and development of innovative proliferation method of tumor infiltrating T cells

研究代表者

寺村 裕治 (Teramura, Yuji)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：10365421

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)：がん患者の腫瘍組織中の腫瘍浸潤T細胞を、in vitroで増殖させた後、再び患者へ輸注する治療法は、強力ながん免疫治療である。しかし、悪性黒色腫では効率良く培養に成功するが、固形がんにおいては難しく、さらに腫瘍内における免疫抑制性の環境のため培養・増殖が非常に困難であることが分かっている。本研究では、ポリエチレングリコール脂質を利用した細胞表面工学技術を免疫制御技術へ応用し、がん細胞表面を加工して、がん細胞-T細胞間相互作用における免疫抑制シグナルを制御する。ここでは、CD80を腫瘍細胞へ導入して、腫瘍特異的T細胞を効率的に増殖させることを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、PD-1/PD-L1経路を阻害する免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用され、大きな成果を上げている。抗PD-1抗体/抗PD-L1抗体の経験から、免疫抑制の解除には、このPD-1/PD-L1経路の阻害だけでは不十分であり、CD80/CD86からT細胞上のCD28分子へのシグナル伝達が必要であることが明らかになった。本研究が成功すれば、これまで困難であった固形癌への免疫療法の開発に繋がり、多くのがん患者を救うことが可能になるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：There is a promising cancer immunotherapy in which tumor-infiltrating T cells in the tumor tissue of cancer patients are proliferated in vitro and then infused again into the patient. However, although it is possible to culture tumor-infiltrating T cells efficiently in malignant melanoma, it is difficult to culture them in solid cancer, and it is known that it is very difficult to cultivate and proliferate due to the immunosuppressive environment in the tumor. In this study, we apply cell surface engineering technique using polyethylene glycol-conjugated lipids to immunoregulatory technology to modulate the surface of cancer cells and control immunosuppressive signals in cancer cell-T cell interactions. Here, the purpose was to introduce CD80 into tumor cells to efficiently proliferate tumor-specific T cells.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：細胞表面工学 免疫療法 CD8陽性T細胞 PEG脂質

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

T細胞の増殖には、3つのシグナルが必要である。一つ目は、TCRにより標的細胞上に発現するMHCクラスI分子に提示されたがん抗原を介した刺激（シグナル1）と、CD80あるいはCD86などによるT細胞上のCD28への共刺激（シグナル2）、また、IL-2、7、15などのサイトカイン刺激（シグナル3）である。従来のTILの培養では、患者から摘出した腫瘍組織を酵素処理して細胞を解離させ、IL-2の存在下で2〜3週間培養すると、TILを増殖させることはできる。しかしながら、増殖したTILは、腫瘍に対する反応性を持たない非特異的なリンパ球であることが多い。また、抗PD-1/PD-L1抗体を培養中に加えることで、免疫チェックポイントのシグナルを阻害し、TILの増殖は可能であるものの、非特異的なリンパ球であることが多い。これは、MHCクラスI分子を発現するがん細胞は、CD80/CD86を発現しておらず、シグナル2を欠くため、腫瘍特異的T細胞の増殖が妨げられることが原因である。

シグナル2を欠如すると、抗原認識したT細胞は、サイトカインの産生やパーフォリン・グランザイムなどの細胞傷害顆粒を放出してエフェクター細胞機能を発揮することは可能であるが、その後、増殖することができずアナジーと呼ばれる無反応状態やアポトーシスに陥る。また、抗原認識を経験したT細胞は、PD-1等の免疫チェックポイント分子を発現し、自らの反応にブレーキをかける。腫瘍内には、がん細胞や免疫抑制性細胞がPD-L1分子を発現しており、PD-1/PD-L1経路によりT細胞の機能と増殖が抑制される。近年、このPD-1/PD-L1経路を阻害する免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用され、大きな成果を上げている。抗PD-1抗体/抗PD-L1抗体の経験から、免疫抑制の解除には、このPD-1/PD-L1経路の阻害だけでは不十分であり、CD80/CD86からT細胞上のCD28分子へのシグナル2が必要であることが明らかになった（Science 2017:355,1428-1433）。

そこで、我々は細胞表面工学技術を活用して、T細胞のCD28分子を刺激してシグナル2を入力するために、がん細胞表面にCD80タンパクあるいは抗CD28刺激抗体を結合させるアイデアに至った。MHCクラスI分子からのシグナル1に加えて、シグナル2を刺激可能ながん細胞は、あたかも抗原提示細胞としてT細胞を刺激活性化させて増殖を誘導することが期待できる。培地中にサイトカインを加え（シグナル3）、抗PD-1/PD-L1抗体を加えることで、腫瘍特異的なT細胞活性化の条件を最適し、腫瘍特異的T細胞の増殖を目指す。また、ジッパー状分子を用いてT細胞とがん細胞同士の接着誘導をすることで、細胞間相互作用が増加し、さらなる効率化も期待できる。

## 2. 研究の目的

がん患者の腫瘍組織の中に存在している腫瘍浸潤T細胞(Tumor Infiltrating Lymphocyte: TIL)を、in vitroで活性化・増殖させた後、再び患者へ輸注するTIL療法は、非常に強力ながん免疫治療である。しかしながら、悪性黒色腫では効率良くTILの培養に成功するが、固形がんにおいては腫瘍組織内のTILの数が少なく、さらに腫瘍内における免疫抑制性の環境のためTILの培養・増殖が非常に困難であることが分かっている。本研究では、ポリエチレングリコール(PEG)脂質を利用した細胞表面工学技術を免疫制御技術へ応用し、がん細胞表面を加工して、がん細胞-T細胞間相互作用における免疫抑制シグナルを制御する。特に、がん細胞が持つMHCクラスI分子に提示されているがん抗原を特異的に認識するTILを選択的に増殖させるために、細胞表面工学技術を活用してがん細胞を抗原提示細胞へと改変することで、固形がんのTILを増殖させることを目指す。腫瘍内における免疫抑制性の環境下で疲弊したTILは増殖能が低下しており、十分な抗腫瘍効果がなく、治療効果が低いことが知られている。そこで、我々は、ここで

提案する増殖方法により TIL を増殖させ、TIL 療法として展開し、最終的には、その腫瘍特異的 T 細胞受容体 (TCR) の遺伝子をクローニングして、得られた遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込み、新たに患者の末梢血リンパ球に遺伝子導入することで、患者の腫瘍特異的 T リンパ球を作製して治療に用いる (TCR-T 細胞治療) ことを目指している。このような TCR-T 細胞治療では、より若いリンパ球に遺伝子導入することにより、増殖能に優れた抗腫瘍活性の高い治療用 T 細胞を作製でき、優れた治療効果が期待できる。

本研究では、遺伝子改変 T 細胞治療実現のためのファーストステップとして克服すべき腫瘍組織内のわずかな腫瘍特異的 T 細胞を効率的に増殖させることを目的とした。

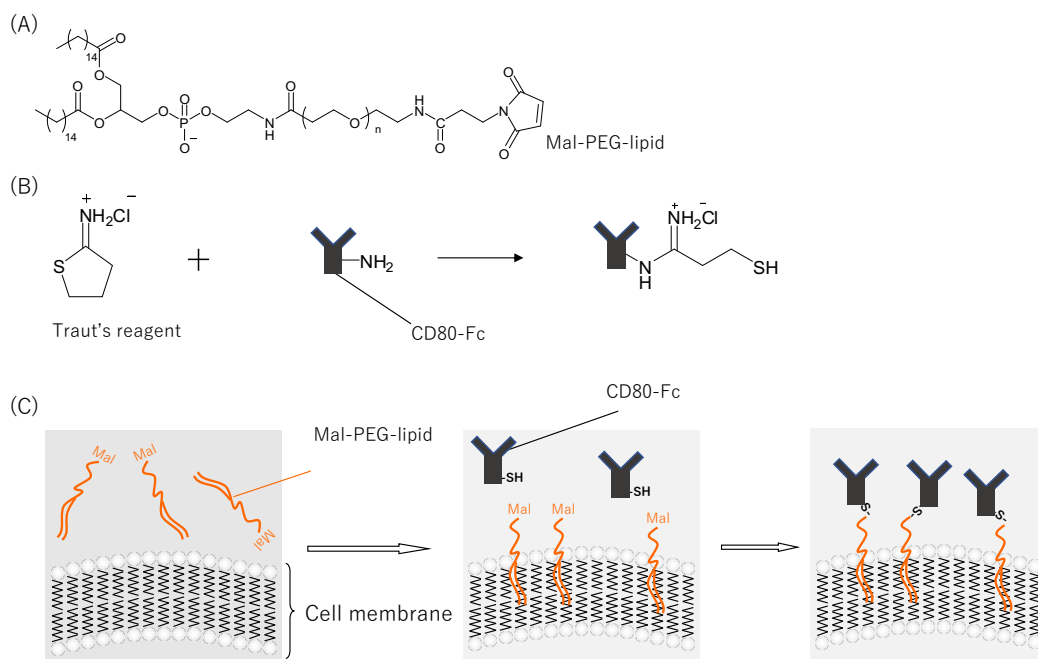
### 3. 研究の方法

マウスの腫瘍細胞株を用いたシステムの構築

マウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 の細胞株を X 線照射 (100Gy, 1hr) により、細胞増殖を止める処理を行う。その後、トリプシン処理により細胞を回収して細胞を培養液中に懸濁した ( $4.0 \times 10^6$  cells in DMEM, 10% FCS, Hgp100 ペプチド 1.0 $\mu$ g/ml、IFN- $\gamma$  10U/ml, 抗生物質)。この細胞に対してマレイミド基を末端に有する PEG 脂質を導入した後 (2mg/mL)、あらかじめ Traut 試薬によりチオール基を導入した CD80-Fc を反応させ (30min, 4 $^{\circ}$ C)、がん細胞表面への固定化を行う。その後、CD8 陽性細胞 (Pmel-1 マウス由来) との共培養を行い (Pmel-1 naïve CD8+ T 細胞 : B16F10 =  $1.0 \times 10^5$  :  $1.0 \times 10^5$  (cells/well))、細胞増殖をフローサイトメトリーにより調べた。

### 4. 研究成果

B16F10 細胞表面への CD80-Fc の固定化を検討するために、あらかじめ、トラウト試薬によりチオール基を導入した CD80-Fc を調製し細胞表面への固定化に使用した。さまざまな条件検討を行った結果、Fig. 1 に示すように、接着した B16F10 細胞表面への CD80-Fc の固定化が可能になった。接着している細胞の周囲に強い蛍光が見られており、細胞内部への取り込みはほとんど見られない。このように、マレイミド PEG 脂質を用いることで、細胞表面へ CD80-Fc の固定化が可能になった。



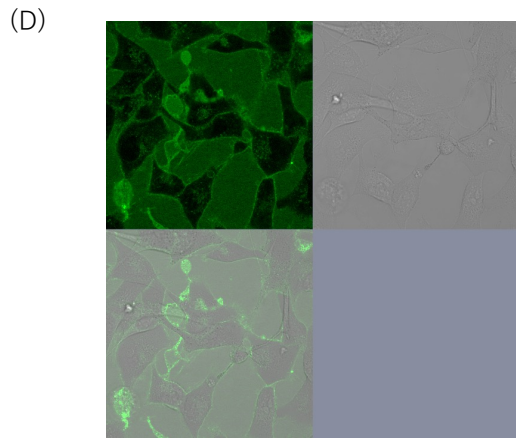


Fig. 1 B16F10 細胞表面への CD80-Fc の固定化 (A) マレイミド PEG 脂質の構造式 (B) CD80-Fc へのチオール基の導入 (C) 細胞表面への CD80-Fc 固定化方法 (D) CD80-Fc を処理した B16F10 細胞の共焦点レーザー顕微鏡写真

続いて、CD80-Fc を処理した B16F10 に対して、CD8 陽性細胞を播種し、細胞挙動の観察並びにフローサイトメトリーによる分析を行った。ここで、positive control として、B16F10 の代わりに樹状細胞 (DC) を利用した。Fig. 2 に共培養した細胞挙動を観察した写真を示した。異なる条件で CD80-Fc を処理した場合と無処理群では、大きな差異が見られなかった。

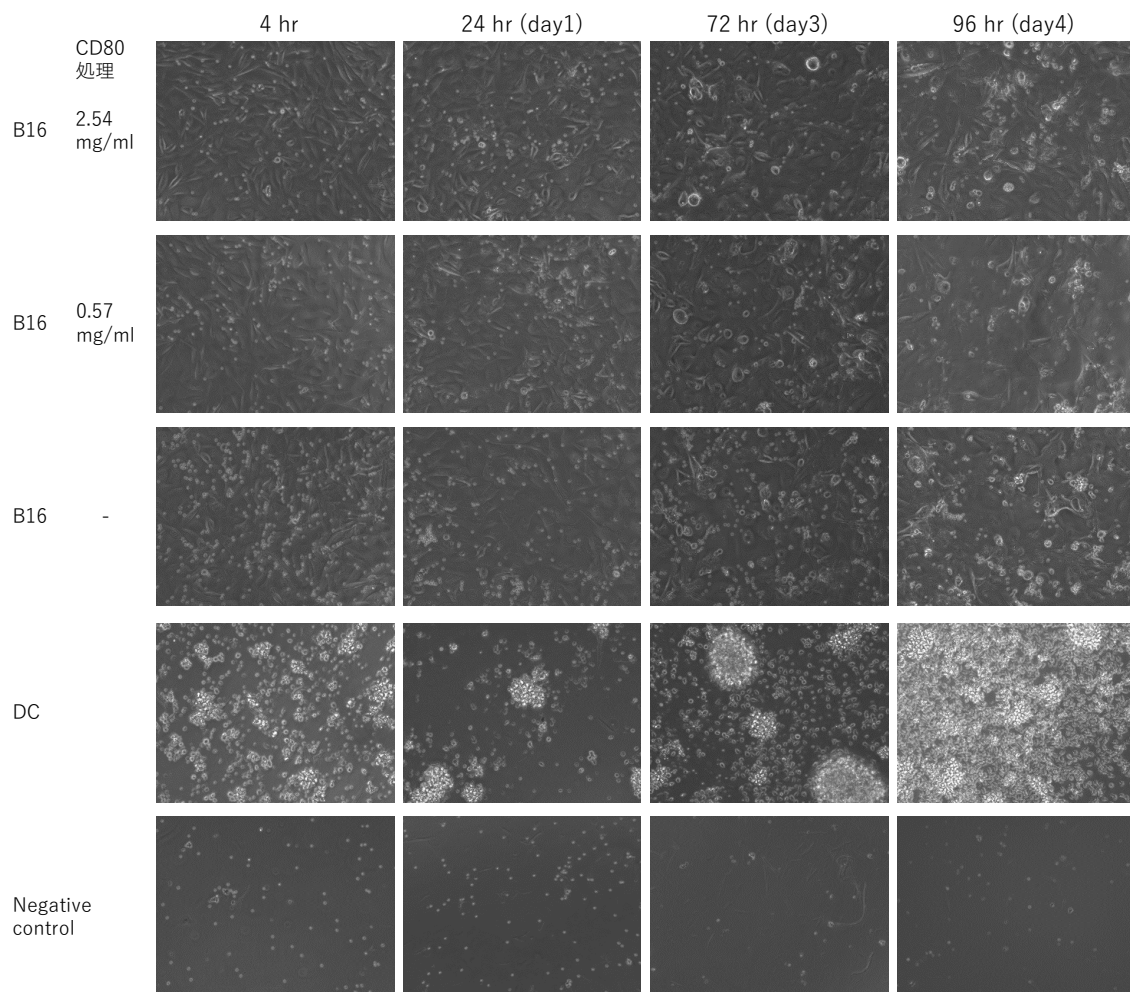


Fig. 2 CD80-Fc 固定化 B16F10 細胞と CD8 陽性細胞との細胞間相互作用の観察

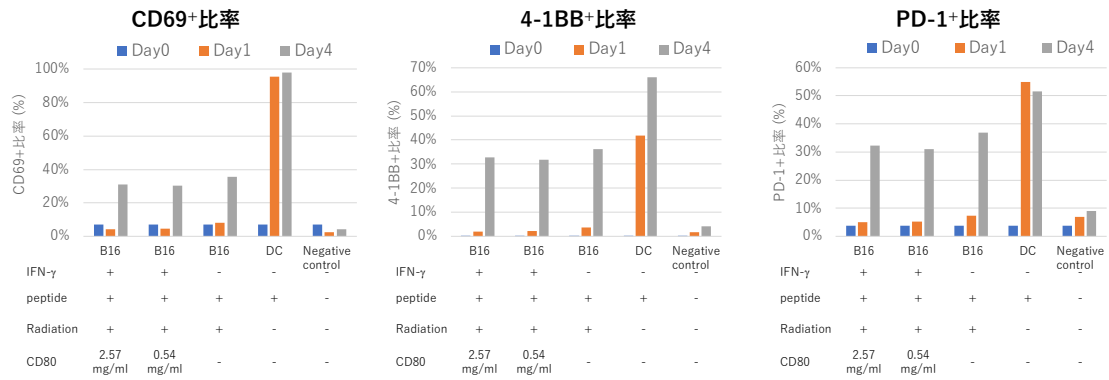


Fig. 3 CD8 陽性 T 細胞中の CD69<sup>+</sup>比率、4-1BB<sup>+</sup>比率、PD-1<sup>+</sup>比率の変化

フローサイトメトリーにより、CD8 陽性細胞中の CD69<sup>+</sup>比率、4-1BB<sup>+</sup>比率、PD-1 比率を定量したところ、CD80-Fc 処理群と CD80-Fc 未処理群でのこれらの比率の変化に大きさ差異が見られなかった (Fig. 3)。ただ、ポジティブコントロールとして使用している DC では、これらのマーカー比率の増加が見られており、共培養系として機能していることは確認できている。

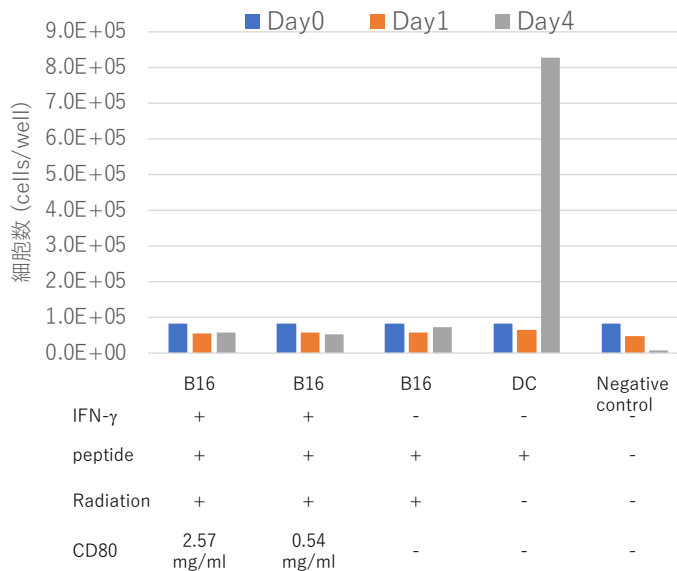


Fig. 4 CD8 陽性 T 細胞数の変化

最後に、CD8 陽性細胞の細胞数をカウントしたところ (Fig. 4)、ポジティブコントロールとして使用している DC では、細胞数の増加が見られたものの、CD80-Fc 処理群では、ほとんど細胞増殖が見られなかった。

以上のことから、細胞表面に固定化した CD80-Fc では CD8 陽性細胞との細胞間相互作用を惹起できないものと推察される。本研究では、PEG のスペーサーとして分子量 5kDa を使用しているが、他の膜タンパク質の存在により、立体障害の影響を受ける可能性は否定できない。今後、さらに検討する必要があるが、細胞表面に存在している膜タンパク質や導入したりガンドの情報を調べる手法が全くない。今後は、この分析方法も検討する必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihara Akifumi, Watanabe Sayumi, Goel Isha, Ishihara Kazuhiko, Ekdahl Kristina N., Nilsson Bo, Teramura Yuji	4. 巻 253
2. 論文標題 Promotion of cell membrane fusion by cell-cell attachment through cell surface modification with functional peptide-PEG-lipids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120113 ~ 120113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2020.120113	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 該当する
1. 著者名 Tomoyuki Azuma, Taishi Matsushita, Vivek Anand Manivel, Kristina N Ekdahl, Bo Nilsson, Yuji Teramura and Madoka Takai	4. 巻 31
2. 論文標題 Poly(2-aminoethyl methacrylate)-based polyampholyte brush surface with carboxylic groups to improve blood compatibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biomater Sci Polym Ed	6. 最初と最後の頁 679, 693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09205063.2019.1710900	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 該当する
1. 著者名 Shodai Togo, Ken Sato, Ryuzo Kawamura, Naritaka Kobayashi, Makoto Noiri, Seiichiro Nakabayashi, Yuji Teramura, and Hiroshi Y. Yoshikawa,	4. 巻 4
2. 論文標題 Quantitative Evaluation of the Impact of Artificial Cell Adhesion via DNA Hybridization on E-cadherin-Mediated Cell Adhesion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 16103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5123749	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 -
1. 著者名 Shota Toda, Kenta Asawa, Artin Fattah, Naoko Nakamura, Kristina N Ekdahl, Bo Nilsson, Yuji Teramura	4. 巻 10
2. 論文標題 Optimization of Islet Microencapsulation with Thin Polymer Membranes for Long-Term Stability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi10110755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kazuhiko Ishihara, Satoru Yanokuchi, Yuji Teramura, Kyoko Fukazawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Combination of two antithrombogenic methodologies for preventing thrombus formation on a poly(ether ether ketone) substrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Colloid Surface B	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2020.111021	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 -

1. 著者名 寺村裕治、石原一彦	4. 巻 38
2. 論文標題 細胞表面の工学的改質がもたらすバイオメディカル分野における可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオマテリアル	6. 最初と最後の頁 132, 134
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
研究分担者	垣見 和宏  (Kakimi Kazuhiro)  (80273358)	東京大学・医学部附属病院・特任教授    (12601)	

#### 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
---------	---------