

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591487

研究課題名（和文） 腫瘍抗原特異的 CD4+T 細胞の効率的な誘導と生体内維持による癌免疫療法の確立

研究課題名（英文） Efficient induction and maintenance *in vivo* of tumor antigen specific CD4+ T cells in cancer immunotherapy

研究代表者

山下 公大（YAMASHITA KIMIHIRO）

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：80535427

研究成果の概要（和文）：本研究は、抗原特異的 CD4+T 細胞移入による免疫細胞療法を確立し、臨床応用を目指すものである。腫瘍浸潤エフェクター細胞の重要性は以前より指摘されており、大半は CD8+T 細胞および NK 細胞が占めている。特に、CD8+T 細胞は抗原特異性、細胞傷害性および記憶維持の観点から、腫瘍免疫療法の中心的役割を果たしている。種々の癌では、腫瘍特異抗原の同定がなされ、腫瘍抗原特異的ペプチドワクチンによる細胞傷害性 CD8+T 細胞の誘導が試みられている。しかしながら、抗原特異的 CD8+T 細胞の単純な誘導および移入では十分な効果は得られていないのが現状である。一方、動物モデルでは CD8+記憶 T 細胞の維持には CD4+T 細胞の存在（CD40-CD40L interaction など）が必須であることが、既に明らかとなっている。抗原特異的 CD4+T 細胞を誘導移入し、体内で高濃度に維持を行うことにより、効果的な腫瘍抗原特異的 CD8+T を維持し、強力な抗腫瘍効果を得ることが予想される。この動物モデルを確立し、有効性の高い免疫療法を開発する、実際の臨床応用を視野に入れた研究である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is the establishment of antigen specific CD4+T cell immunotherapy for clinical application. It has been ever pointed out that CD8+ T cells and natural killer cells are occupied tumor infiltrative effector cells. In particular, CD8+T cells play a central role in antigen-specificity, cytotoxicity, and memory formation of cancer immunotherapy.

They have identified tumor-specific antigen in various cancers. Therefore, they tried to induce tumor antigen specific cytotoxic CD8 + T cells by using of tumor peptide vaccines. However, they can't get antigen specific CD8+T cells at present sufficiently for easy induction of cell. Meanwhile, in animal models, it has become already evident that the generation of CD8 + memory T cells needs the interaction with CD4+ T cells, such as CD40-CD40L.

The induction *in vivo* of antigen specific CD4+T cells and maintenance at high concentration in the body would be able to generate and keep tumor antigen specific CD8 + T cells. It is expected this immunological response would get a powerful anti-tumor effect.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計     | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、抗原特異的 CD4+T 細胞移入による免疫細胞療法を確立し、臨床応用を目

指すものである。腫瘍浸潤エフェクター細胞の重要性は以前より指摘されており、大半は CD8+T 細胞およびNK 細胞が占めている。特に、CD8+T 細胞は抗原特異性、細胞傷害性および記憶維持の観点から、腫瘍免疫療法の中心的役割を果たしている。種々の癌では、腫瘍特異抗原の同定がなされ、腫瘍抗原特異的ペプチドワクチンによる細胞傷害性 CD8+T 細胞の誘導が試みられている。しかしながら、抗原特異的 CD8+T 細胞の単純な誘導および移入では十分な効果は得られていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

動物モデルでは CD8+記憶 T 細胞の維持には CD4+T 細胞の存在 (CD40-CD40L interaction など) が必須であることが、既に明らかとなっている。抗原特異的 CD4+T 細胞を誘導移入し、体内で高濃度に維持を行うことにより、効果的な腫瘍抗原特異的 CD8+T を維持し、強力な抗腫瘍効果を得ることが予想される。この動物モデルを確立し、有効性の高い免疫療法を開発する、実際の臨床応用を視野に入れた研究である。

## 3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞/アロ樹状細胞融合ワクチンを用いた腫瘍抗原特異的な CD4+T 細胞の効果的な誘導とその機能解析。

腫瘍細胞/アロ樹状細胞融合ワクチンを用いた腫瘍抗原特異的な CD4+T 細胞の誘導が十分ではなく、 $\alpha$ -Galactylceramide ( $\alpha$ -Gal) を用いたアロ樹状細胞を用いることとし、腫瘍抗原を導入する前に、前実験として、これを用いた活性化での B16-F10 melanoma 肺転移の治療モデルで抗腫瘍効果の評価を行った。同種樹状細胞 ( $\alpha$ -Gal 付加樹状細胞によ

る活性化 ; DCG) と比較して、抗腫瘍効果に対する評価は良好で、アロ樹状細胞による活性化は、同種樹状細胞によるものと比較して、同等以上の効果が期待できることが示された (図 1)。

また、これが共に NK 細胞が貢献していることを直接示した (図 2)。治療対象に異なる腫瘍細胞株を用いても良好で、一部の細胞株では優位性も示した。

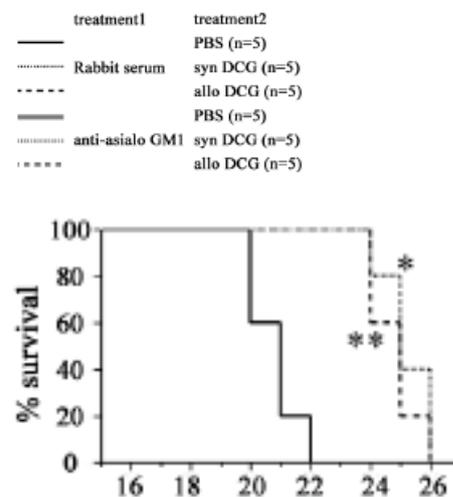


図 1 アロ樹状細胞は DCG に有効

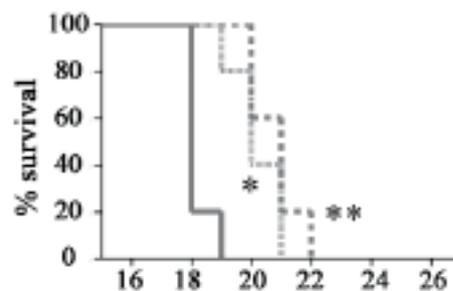


図 2 アロ樹状細胞の抗腫瘍効果は NK 細胞による

(2) 次に、CD4+T 細胞が誘導されることを確認した。本来、抗原特異的 CD8+T 細胞の誘導の際には、アロ樹状細胞を用いたペプチドワクチンでは誘導困難であるが、この腫瘍細胞/アロ樹状細胞融合癌ワクチンの作製と抗原特異的 CD4+細胞の誘導は、アロ

樹状細胞を採取し、M05 細胞 (OVA ; 卵白アルブミン導入 B16 細胞) とポリエチレングリコール (PEG) を用いて融合抗原の作製を進めた。本来は誘導困難であるはずであるが、 $\alpha$ -Galactylceramide ( $\alpha$ -Gal) を用い多アロ樹状細胞 DCG 療法ならば、これを免疫し、OVA<sub>323-339</sub> tetramer で、抗原特異的 CD4+T 細胞を検出する段階まで進めることができた。ただ、検出は少量で、比較評価することは困難であると結論した。腫瘍樹立モデルにおいては、抑制的環境の問題があるが、特に骨髄由来抑制性細胞は、肺転移モデルで抗癌剤治療により数と割合が減少し、肺転移が抑制されることで肺転移の程度に関与することが示せた。今後の問題として、OVA<sub>323-339</sub> 反応性 T 細胞受容体遺伝子導入マウス (OT-II) 由来の OT-II CD4+T 細胞を移入して免疫を行い、活性化を評価する必要がある。

#### 4. 研究成果

アロ樹状細胞を用いた NKT 細胞を誘導する DCG 療法の有効性を示した。また、抗原特異的 CD4+T 細胞の誘導を試みたが、免疫抑制性細胞の存在のために、活性化が進まないことを確認した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 掛地 吉弘、山下 公大、鈴木 知志、癌治療における漢方治療：最新のエビデンス、医学のあゆみ、査読無、243 巻 2 号、2012、191-197
- ② Iwai K, Soejima K, Kudoh S, Umezato Y, Kaneko T, Yoshimori K, Tokuda H, Yamaguchi T, Mizono A, Setoguchi Y, Kamigaki T, Fujimoto K, Goto S, Extended

survival observed in adoptive activated T lymphocyte immunotherapy for advanced lung cancer: results of a multicenter historical cohort study, Cancer Immunol Immunother, 査読有、61 巻 10 号、2012、1781-1790

- ③ Yokoyama K, Kaji H, He J, Tanaka C, Hazama R, Kamigaki T, Ku Y, Tohyama K, Tohyama Y, Rab27a negatively regulates phagocytosis by prolongation of the actin-coating stage around phagosomes, The Journal of biological chemistry, 査読有、286 巻、2011、5375-5382  
DOI:10.1074/jbc.M110.171702

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山本 将士、金光 聖哲、山下 公大、今西 達也、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、黒田 大介、掛地 吉弘、マウス 腺癌細胞を用いた制御性 T 細胞除去と樹状細胞ワクチン併用療法の抗腫瘍効果に関する検討、第 23 回日本消化器癌発生学会、2012 年 11 月 15 日～2012 年 11 月 16 日、徳島
- ② 山下 公大、山本 将士、大坪 大、長谷川 寛、音羽 泰則、瀧口 豪介、裏川 直樹、友野 絢子、金光 聖哲、今西 達也、中村 哲、角 泰雄、鈴木 知志、黒田 大介、掛地 吉弘、ヒトアロ樹状細胞を用いた CTL 誘導の試み、第 23 回日本消化器癌発生学会、2012 年 11 月 15 日～11 月 16 日、徳島
- ③ 長谷川 寛、山下 公大、大坪 大、藤井 眞一郎、安田 貴志、中村 哲、鈴木 知志、黒田 大介、転移性肺腫瘍の克服に向けた基礎的研究：NKT 細胞活性化療法による肺 NKT 細胞傷害性と CD40-CD40L 相互作用の検討、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12 日～4 月 14 日、千葉

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山下 公大 (YAMASHITA KIMIHIRO)  
神戸大学・医学部附属病院・特命助教  
研究者番号：80535427

##### (2) 研究分担者

中村 哲 (NAKAMURA TETSU)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10403247

神垣 隆 (KAMIGAKI TAKASHI)

神戸大学・医学研究科・客員教授  
研究者番号：20372641