

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24年4月18日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791274

研究課題名（和文）抗原受容体改変 T 細胞による治療抵抗性消化器癌に対する新規細胞輸注療法

研究課題名（英文）Development of novel adoptive cell therapy using antigen receptor engineering T cells for chemo/radiotherapy-resistant esophageal cancer

研究代表者

今井 奈緒子（IMAI NAKO）

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30550975

研究成果の概要（和文）：T 細胞受容体(TCR)遺伝子導入リンパ球輸注療法の臨床試験検体の解析と腫瘍特異的 T 細胞輸注療法の動物モデルにおける基礎的検討を行った。臨床試験登録患者の末梢血の経時的な解析においては、輸注細胞は末梢血単核球の約 1%を占め、最長 10 ヶ月間検出可能であった。TCR トランスジェニックマウスを用いた研究では、CD4 陽性 T 細胞の存在やインテグリン刺激の付加により、CD8 陽性 T 細胞のマルチファンクション性が向上し、抗腫瘍効果を増大することを示した。また、TCR 遺伝子導入リンパ球輸注療法のマウスモデルをほぼ確立した。

研究成果の概要（英文）：We performed analysis of samples from the clinical trail patients administrated TCR (T cell receptor)-gene transduced lymphocytes and researched on adoptive cell therapy of tumor-specific lymphocytes using mouse model. In the clinical trail patients, TCR-transduced lymphocytes were detected in their peripheral blood as approximately 1% of PBMC. The infused cells have been in vivo persisted in all patients as long as 10 months. In the adoptive cell therapy model of TCR transgenic mouse, presence of CD4⁺ T cells or integrin signals is elevated CD8⁺ T cell multifunctionality, and enhanced anti-tumor effect. Furthermore, we have almost established mouse model of the adoptive transfer of TCR-gene transduced lymphocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：腫瘍免疫学、消化器内科学

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：がん免疫療法、T 細胞輸注療法、抗原受容体改変 T 細胞、マルチファンクション性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は期待される腫瘍特異的 T 細胞療法を多くの患者に適用可能とすることを目指して、

治療抵抗性食道癌を対象に腫瘍抗原特異的な T 細胞受容体(TCR)遺伝子導入リンパ球輸注の臨床試験を厚生労働省の承認を得て本

邦で初めて開始した。また、本臨床試験の実施に先立ち TCR トランスジェニックマウスを用いた特異的 T 細胞輸注療法の動物モデルを確立し、有効ながん治療には輸注細胞がマルチファンクション性（多種サイトカインの産生等多彩な機能を持つこと）を示すことが重要であることを見出し報告してきた。さらにレトロウイルスを用いた TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた輸注療法の動物モデルの作製に着手していた。

TCR 改変 T 細胞輸注療法を実用可能なものとするためには、開始した臨床試験の登録患者から得られた検体の解析と動物モデルによる基礎的検討が必要であった。

2. 研究の目的

- 1) T 細胞輸注療法の臨床試験検体を用いて輸注細胞の *in vivo* における生存性と局在、機能を解析する。
- 2) トランスジェニックマウスを用いた T 細胞輸注療法の動物モデルにおいて、より効果的に行うための条件を模索する。
- 3) レトロウイルスを用いた TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法の動物モデルの確立を試みる。

3. 研究の方法

- 1) T 細胞輸注療法の臨床試験検体を用いた研究：遺伝子改変 T 細胞を輸注した症例において経時的に採血を行い、輸注細胞の *in vivo* における動態をウイルス DNA に対する PCR 法、およびフローサイトメトリーによるテトラマー解析により検討する。テトラマー解析については、必要に応じて *in vitro* にて抗原ペプチドで刺激する。輸注細胞が *ex vivo* で検出できる症例については、輸注細胞のマルチファンクション性解析を行う。
- 2) 腫瘍抗原特異的 T 細胞輸注療法の動物モデル (TCR トランスジェニックマウス) を用いた研究：ヘルパー T 細胞等がマルチファンクション性に与える影響およびそのメカニズムについて検討する。また、放射線照射や免疫抑制剤投与による前処置が輸注療法に及ぼす効果について検討する。
- 3) レトロウイルスを用いた TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた輸注療法の動物モデルの確立：これまで行ってきた抗原特異的 T 細胞輸注療法の動物モデルでは、輸注 T 細胞として TCR トランスジェニックマウス由来 T 細胞を用いていたが、臨床では自己リンパ球にレトロウイルスベクターを用いて TCR

遺伝子を導入し、輸注療法に用いる予定である。臨床と同様にレトロウイルスを用いた TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法のマウスモデル確立を試みる。

a) レトロウイルスベクターの作成

トランスジェニックマウス作製に用いた TCR α 鎖および β 鎖の遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを作成する。

b) レトロウイルスベクターの遺伝子導入

マウス T 細胞に遺伝子導入し、導入効率や導入細胞のフェノタイプ、*in vitro* での抗原特異的な細胞傷害活性を検討する。

4. 研究成果

- 1) 臨床試験検体を用いた解析について：研究期間中、4 例の患者に対して遺伝子改変 T 細胞輸注療法を施行した。ウイルスベクターの DNA に対する PCR 法による末梢血中の遺伝子導入細胞の動態を調べたところ、輸注後 1 日から 14 日でピークとなり、最長 10 ヶ月間検出可能であった。フローサイトメトリーによる解析では、*ex vivo* ではテトラマー陽性の細胞は検出できなかったが、*in vitro* にて抗原ペプチドで刺激すると、テトラマー陽性の抗原特異的 T 細胞が検出でき、これは MAGE-A4 陽性腫瘍を認識・殺傷した。また食道原発巣の病変が存在した 1 例では、輸注後 35 日目の腫瘍部の生検検体からウイルス DNA が検出され、輸注細胞の腫瘍局所への浸潤が確認された。

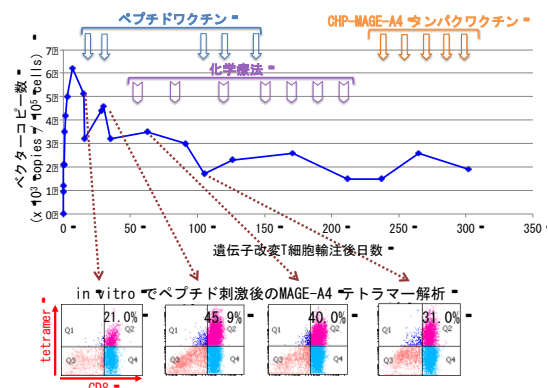


図1 輸注細胞の *in vivo* における長期維持

- 2) TCR トランスジェニックマウスを用いた動物モデルにおける検討について

a) 様々な方法で調整した TCR トランスジェニックマウス由来腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞のマルチファンクション性を評価し、輸注療法との効果について検討した。腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞は、CD4 陽性ヘルパー T 細胞とともに培養した方が、単独で培養した時と比べて高いマルチファンクション性を示

し、強い抗腫瘍効果を示した。この培養系に各種サイトカインの中和抗体を加えることにより、マルチファンクション性に関わる因子としてIL-2およびIL-21を同定した。また、腫瘍特異的CD8陽性T細胞を調整する際にインテグリン刺激を付加すると、マルチファンクション性が向上し、輸注療法の効果も増強することを示した。

さらに、マルチファンクション性T細胞はbcl-2を高発現し、活性化カスパーゼ3の発現が低い抗アポトーシス性であり、輸注後の抗腫瘍効果が高いことを見出し、輸注T細胞のマルチファンクション性は輸注T細胞の生存性や治療効果の感度の高い指標とな

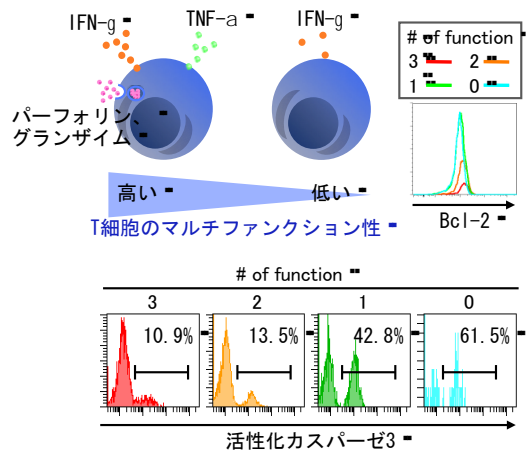


図2 マルチファンクションT細胞はBcl-2発現が高く、活性化カスパーゼ3の発現が低い。

ることを明らかにした。

b) 輸注療法における前処置の効果について検討した。放射線照射またはシクロフォスファミド投与により、輸注細胞がhomeostatic expansionをおこす環境をつくると、抗腫瘍効果が増強し、輸注細胞のマルチファンクション性が増強することを示した。

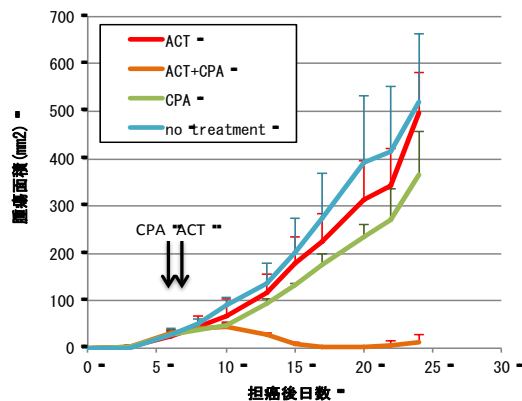


図3 シクロフォスファミド(CPA)投与により、輸注療法(ACT)の効果が増強する

3) レトロウイルスを用いたTCR遺伝子導入T細胞を用いた輸注療法の動物モデルの確立について

「方法」の項で述べたレトロウイルスベクターを作製した。このベクターを用いたマウスリンパ球へのTCR遺伝子導入に成功し、抗原特異的なIFN- γ 産生を確認した。この細胞を非担癌マウスに輸注した場合の生存性は、遺伝子導入細胞の調整方法(刺激方法・培養期間)やホストの前処置により大きく変わることを見出した。生存性がよくなった条件で、担癌マウスに輸注したところ、抗腫瘍効果が認められた。

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1件)

①Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, and Shiku H. T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/ γc^{null} mice. *Cancer Sci*. 査読有 vol.103 2012 pp.17-25

[学会発表](計7件)

①今井奈緒子、池田裕明、細井勇人、俵功、山根真妃子、王立楠、森和子、日向千咲、珠玖洋. T細胞のマルチファンクション性はその生存性と輸注療法の効果を規定する. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月28日 千葉

②細井勇人、池田裕明、日向千咲、王立楠、織戸由貴、今井奈緒子、糠谷育衛、榎竜嗣、峰野純一、竹迫一任、近藤哲、珠玖洋. インテグリンシグナルを介した教育による効果的なT細胞療法の確立. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月28日 千葉

③Imai N, Ikeda H, Tawara I, Hosoi H, Mori K, Hyuga C, Yamane M, Wang L, Shiku H. Multifunctionality determines T cell survival fate. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月5日 名古屋

④Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Hori S, Saito K, Imai N, Okamoto S, Tomura D,

Nukaya I, Junichi Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H. In vivo persistence of adoptively transferred TCR gene-modified lymphocytes in patients with advanced esophageal cancer. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋

⑤Ikeda H, Imai N, Hosoi H, Yamane M, Okamoto S, Mineno J, Takesako K, Kageyama S, Shiku H. Gene-modified T cell therapy: Harnessing lymphocytes for effective cancer treatment. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日 名古屋

⑥Ikeda H, Imai N, Hosoi H, Yamane M, Okamoto S, Mineno J, Kageyama S, Takesako K, Shiku H. Antigen receptor gene-modified lymphocytes: harnessing T cells for effective cancer treatment. 第17回日本遺伝子治療学会 2011年次学術集会 2011年7月16日 福岡

⑦池田裕明、今井奈緒子、細井勇人、山根真妃子、岡本幸子、峰野純一、竹迫一任、影山慎一、珠玖洋. 遺伝子改変 T細胞輸注療法. 第15回日本がん免疫学会総会 2011年6月30日 大阪

〔図書〕(計1件)

①今井奈緒子、池田裕明、珠玖洋 羊土社
がん生物学イラストレイテッド 第6章
んと免疫 がん抗原 2011 p.260-268

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shikuken.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 奈緒子 (IMAI NAOKO)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30550975