

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 6月 5日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800043

研究課題名（和文） BTLAを標的とした癌免疫療法の開発

研究課題名（英文） Development of cancer Immunotherapy targeting BTLA

研究代表者

玉田 耕治 (TAMADA KOJI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00615841

研究成果の概要（和文）：本研究は免疫共シグナル分子の機能制御による効果的な新規がん免疫療法の開発を目的としている。我々は抑制性共シグナルを阻害し、同時に刺激性の共シグナルを伝達するコンパウンドとして、BTLA分子の細胞外領域と免疫グロブリンの定常部を融合した蛋白を作製した。この蛋白はT細胞の活性化を増強したが、マウスを用いたモデルでは有効ながん治療効果は示さなかった。現在我々は、この蛋白の機能を増強するための構造改変をおこなっており、今後はその蛋白の抗腫瘍効果を検討する予定である。

研究成果の概要（英文）：This project aims at optimized regulation of immune co-signal functions so as to induce potent anti-tumor immunotherapy. For this purpose, we have generated a fusion protein consisting extracellular domain of BTLA and immunoglobulin Fc region, which could deliver stimulatory co-signal while attenuating inhibitory co-signal simultaneously. Whereas this protein induced T cell activation, its injection led to no apparent anti-tumor effect in animal models. We plan to re-construct this protein in order to increase its immune activity and re-examine anti-tumor effects in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍免疫学

キーワード：免疫チェックポイント機構、免疫共シグナル分子、腫瘍反応性 T リンパ球

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫システムはその恒常性を維持するために、過度の免疫反応を抑制するメカニズムを有しており、このような免疫制御システムは免疫チェックポイント機構と呼ばれる。免疫チェックポイント機構は主に抑制性の共シグナル分子によって機能しており、その機能亢進ががんに対する免疫療法における障害になっている。従って、効果的ながん免疫応答の誘導には抑制性共シグナル分子の機能を阻害する必要がある。さらに刺激性の共シグナルの機能を促進することも重要とされている。

(2) 抑制性の共シグナル分子である BTLA (B and T lymphocyte attenuator) の機能を抑制すると同時に、BTLA のリガンドであり刺激性の共シグナル分子である HVEM (herpesvirus entry mediator) の機能を促進することができれば、強力な抗腫瘍効果を誘導できると期待される。

2. 研究の目的

(1) BTLA による抑制性共シグナルを阻害し、同時に HVEM からの刺激性共シグナルを促進する薬剤として、BTLA の細胞外領域とイムノグロブリン定常部 (Fc 領域) を融合した蛋白 (BTLA-Fc 蛋白) を作製する。

(2) BTLA-Fc 蛋白の投与により、T リンパ球の強力な活性化が誘導され、がんに対する免疫療法のが増強することを培養モデルおよびマウス腫瘍モデルにて実証する。

3. 研究の方法

(1) BTLA-Fc 蛋白の精製：BTLA-Fc 蛋白の機能を検討するために、高純度の BTLA-Fc 蛋白を大量に産生するための培養・精製システムを確立する。

(2) BTLA-Fc 蛋白の機能解析-1：BTLA-Fc 蛋白の機能を解析するため、*in vitro* の実験系にて以下の検討をおこなう。

①BTLA-Fc 蛋白が HVEM に結合すること、また HVEM と BTLA の結合を拮抗阻害することを ELISA およびフローサイトメーターにて検討

する。

②BTLA-Fc 蛋白が T リンパ球に対して刺激性の共シグナルを伝達することを検討するために、BTLA-Fc 蛋白もしくはコントロール蛋白を固相化した培養プレートにて、抗 CD3 抗体存在下で T リンパ球を培養する。T リンパ球の活性化を増殖反応およびサイトカイン産生量にて評価する。

(3) BTLA-Fc 蛋白の機能解析-2：BTLA-Fc 蛋白の機能を解析するため、腫瘍を接種した *in vivo* マウスモデルにて抗腫瘍効果を評価する。P815 マストサイトーマを同系マウスである DBA/2 に接種し、BTLA-Fc 蛋白またはコントロール蛋白を投与した後に腫瘍の増殖、P815 特異的 CTL の誘導について検討する。

4. 研究成果

(1) BTLA-Fc 蛋白をコードする cDNA をヒトのコドンにて最適化し、Free-style 293 浮遊細胞にて一過性発現するシステムを確立した。これにより、1L の培養上清から約 10mg の BTLA-Fc 蛋白が作製可能であった。

(2) BTLA-Fc 蛋白は遺伝子導入により HVEM を高発現した 293T 細胞を染色し、さらに HVEM と BTLA の結合を拮抗阻害することがフローサイトメーターにより確認された (図 1)。

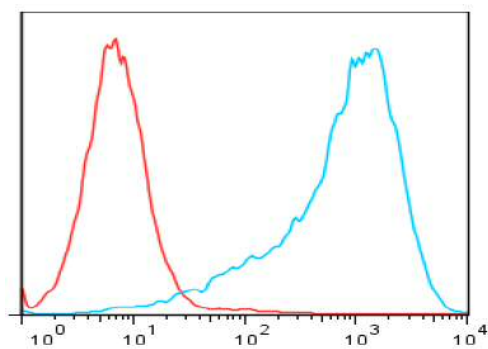


図1. BTLA-Fc蛋白はHVEMを高発現した293T細胞に結合する(青線)。

(3) 精製された BTLA-Fc 蛋白の T 細胞活性化作用について *in vitro* にて機能アッセイをおこなった。培養プレートに固相化した BTLA-Fc 蛋白はコントロール蛋白 (マウス

IgG2a) に比べ、著しくマウス T 細胞の増殖反応を増強し (図 2)、多くのサイトカイン、ケモカインの産生増強を誘導した (図 3)。

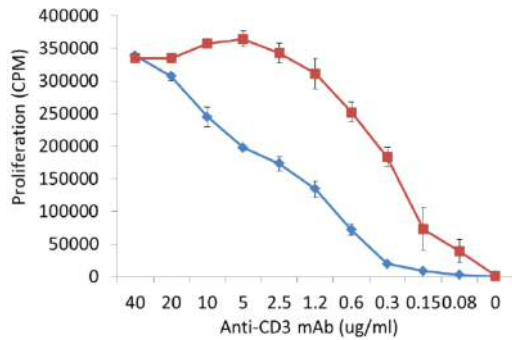


図2. In vitro培養アッセイにてBTLA-Fc蛋白 (赤線)はコントロール蛋白(青線)に比べてT細胞の増殖を促進した。

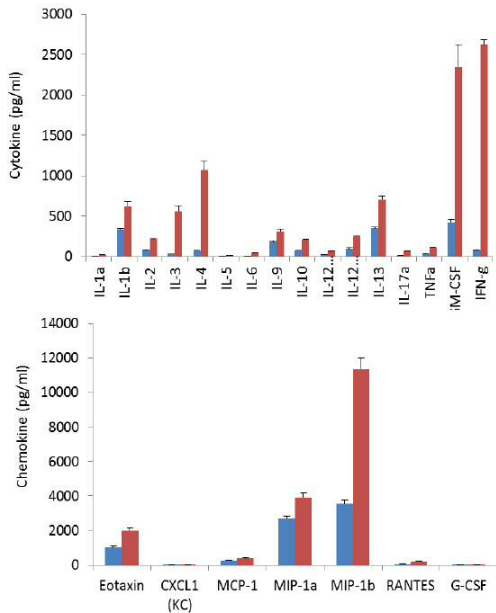


図3. In vitro培養アッセイにてBTLA-Fc蛋白 (赤)はコントロール蛋白(青)に比べて多くのサイトカイン・ケモカイン産生を増強した。

(4) 次に、精製された BTLA-Fc 蛋白を利用して、in vivo における抗腫瘍効果誘導について検討した。第一に、腫瘍反応性リンパ球の誘導活性を評価した。P815 マストサイトマを接種したマウスに 300ug の BTLA-Fc 蛋白あるいはコントロール蛋白を投与した後に腫瘍所属リンパ節細胞を採取し、ex vivo にて不活化した腫瘍細胞と共培養することで再刺激した。それらのリンパ球の P815 に対する傷害活性を ⁵¹Cr-release アッセイにて検討したところ、BTLA-Fc 投与マウスにおける腫瘍傷害活性の増強はほとんど認められなかった (図 4)。

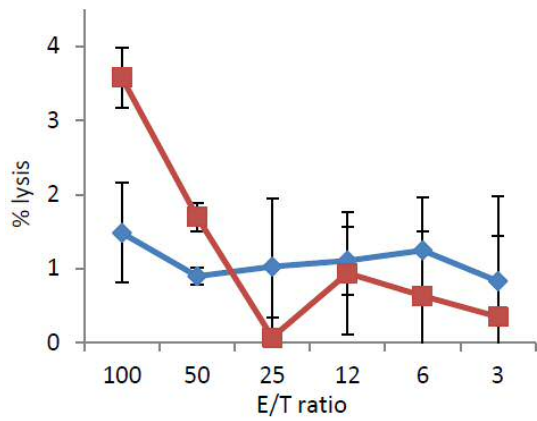


図4. BTLA-Fc蛋白(赤線)を投与したマウスにおいて誘導されたP815に対する細胞傷害活性は、コントロール蛋白(青線)を投与したマウスとほとんど変化なかった。

(5) さらに、P815 マストサイトマを接種したマウスに 300ug の BTLA-Fc 蛋白あるいはコントロール蛋白を投与し、腫瘍増殖に対する抑制効果を検討した。この実験系においては BTLA-Fc 蛋白投与による腫瘍増殖抑制効果あるいは生存期間延長効果はほとんど認められなかった (図 5)。

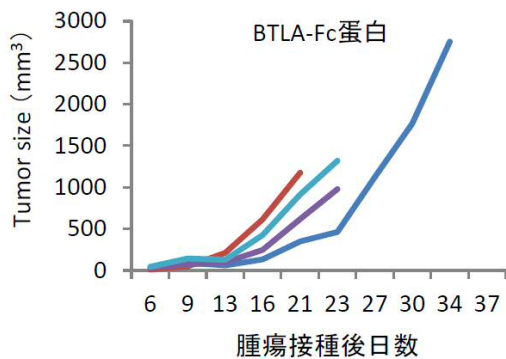
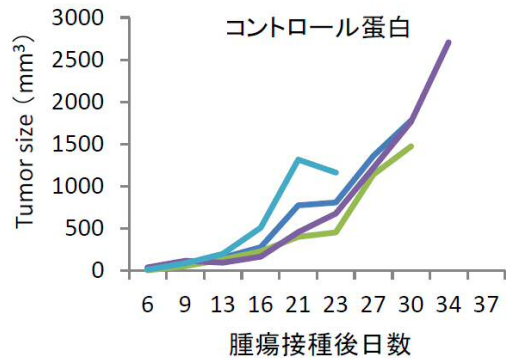


図5. BTLA-Fc蛋白を投与したマウス(下図)におけるP815増殖はコントロール蛋白を投与したマウス(上図)とほぼ変化なかった。

また別の実験系として、P815 の腫瘍抗原 P1A 蛋白に対する特異的 T リンパ球である

P1A-CTLをマウスに投与した後にP815を接種し、さらに BTLA-Fc 蛋白もしくはコントロール蛋白を投与した。この実験システムでは、P1A-CTL 細胞による抗腫瘍免疫反応がベースとして存在するため、BTLA-Fc 蛋白の免疫増強効果が観察しやすいことが期待されたが、やはり明らかな抗腫瘍効果はほとんど認められなかった (図6)。

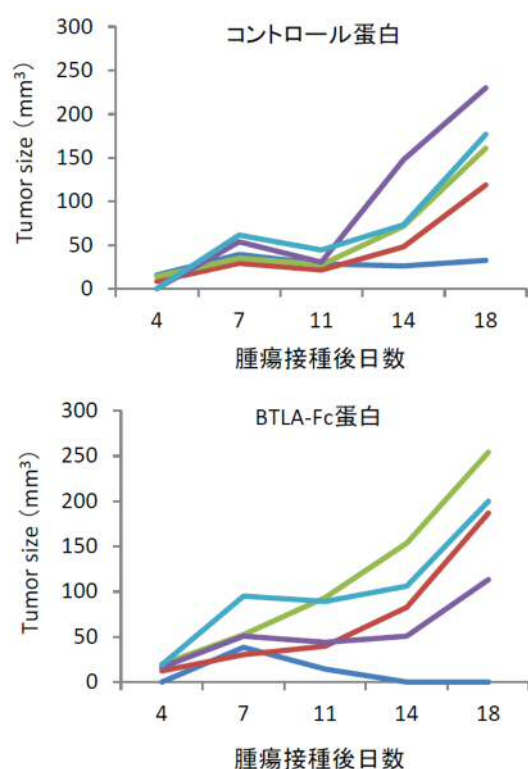


図6. P1A-CTL細胞を移入後、BTLA-Fc蛋白を投与したマウス(下図)におけるP815増殖はコントロール蛋白を投与したマウス(上図)とほぼ変化なかった。

<研究成果のまとめ>以上の結果より、BTLA-Fc 蛋白は in vitro の培養システムにおいては強力に T リンパ球の活性化を誘導するにもかかわらず、in vivo に投与された場合には腫瘍反応性 T リンパ球の活性化や腫瘍の退縮を誘導できないことが示された。これは BTLA-Fc 蛋白が生体内では可溶性の状態であるため HVEM 分子への結合親和性が弱く、十分な機能を発揮できないことが原因と推測された。そこで現在 BTLA-Fc 蛋白を改変し、より親和性を高めた新規蛋白を作製しており、今後はそれらの抗腫瘍効果を検討することにより、新しいがん免疫療法の開発が期待される。

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2件)

- ① Park, J. J., Anand, S., Zhao, Y., Matsumura, Y., Sakoda, Y., Kuramasu, A., Strome, S. E., Chen, L. and Tamada K. Expression of anti-HVEM single chain antibody on tumor cells induces tumor-specific immunity with long-term memory. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 203-214, 2012 (査読有り). DOL:10.1007/s00262-011-1101-8
- ② Tamada K., Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Davila E. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clin Cancer Res.* 18, 6436-6445, 2012 (査読有り). DOL:10.1158/1078-0432.CCR-12-1449

[学会発表] (計4件)

- ① Yukimi Sakoda, Koji Tamada, Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies, Keystone Symposia: Cancer Immunotherapy and Immunology, 2013年1月27日-2月1日、Vancouver, Canada
- ② Koji Tamada, Recent Advances in Immunology: What we have learned and what we can do. 2nd Bulgarian-Japanese symposium (招待講演)、2012年12月8日、Sofia, Bulgaria
- ③ 玉田耕治、難治性消化器癌に対する革新的免疫療法、第20回消化器関連学会習慣 (招待講演)、2012年10月10日-13日、神戸国際会議場 (神戸)
- ④ 佐古田幸美、玉田耕治、標識抗原を認識する新規キメラ抗原受容体を利用したがん免疫療法、日本がん免疫学会、2012年7月26日-28日、北海道大学 (札幌)

[図書] (計1件)

- ① 玉田耕治、先端医学社、TNFファミリー関連分子標的 (4-1BB, LIGHT, HVEM)、炎症と免疫、2013年5月号、23-29

[その他]

ホームページ

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~plasma/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 耕治 (TAMADA KOJI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00615841