

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430161

研究課題名(和文) 制御性T細胞の除去によるがん免疫応答の増強

研究課題名(英文) Augmentation of tumor immune response by depletion of regulatory T cells

研究代表者

中山 睿一 (NAKAYAMA, EIICHI)

川崎医療福祉大学・医療福祉学部・教授

研究者番号：60180428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以下のことを明らかにした。1. Tregの亜集団である、休止Treg、活性化Treg、nonTregのCCR4発現および末梢血と腫瘍局所における分布の違いを明らかにした。2. 免疫染色により、がん局所におけるCCR4陽性Tregの存在、さらに、そのリガンドがCCL22/MDCであることを明らかにした。3. 遊走能を有するCD25陽性CD4⁺T細胞は、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を有する抗CCR4(KM2760)抗体により除去できることを明らかにした。4. 固形がん患者に対してヒト化抗CCR4(KW-0761)抗体を投与することにより、Tregが除去されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Augmentation of tumor immune response by depletion of regulatory T cells (Tregs) was pursued by the following studies. 1. On three Treg subpopulations, resting Tregs, activated Tregs and nonTregs, difference of the expression of CCR4 chemokine receptor on their surface and of their distribution in PBMC and TIL was demonstrated. 2. The presence of CCR4-expressing Tregs and CCL22/MDC in the local tumor site was shown by immunohistochemistry. 3. CD25⁺CD4⁺Tregs with migratory activity were shown to be eliminated by CCR4 (KM2760) mAb with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). 4. Efficient depletion of Tregs by injection of humanized anti-CCR4 (KW-0761) mAb in solid cancer patients was demonstrated.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がん免疫 腫瘍内浸潤リンパ球 制御性T細胞 ケモカイン受容体CCR4 ケモカインCCL22/MDC 抗体依存性細胞障害性(ADCC) ヒト化抗CCR4単クローン抗体 制御性T細胞除去

1. 研究開始当初の背景

(1) がんに対する免疫反応を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) の存在が明らかになったが、CD25 あるいは FoxP3 陽性 Treg がさらに亜集団に分けられるのか、また、末梢血中と腫瘍局所でそれらの分布が異なるのか否かは不明であった。

(2) Treg にケモカイン受容体 CCR4 の発現が予想されたが、実際に、腫瘍局所に CCR4 発現 Treg が浸潤しているのか、また、浸潤しているならそのケモカインは CCL17/TARC であるのか、あるいは CCL22/MDC であるのかは不明であった。

(3) Treg の CCR4 発現は不確実であったので、抗 CCR4 抗体によって Treg を除去できる可能性があるか否かも不明であった。

(4) 固形がん患者で KW-0761 (Mogamulizumab) を用いて Treg 除去を試みるには、十分な根拠はなかった。

2. 研究の目的

(1) 制御性 T 細胞 (Treg) の亜集団として、休止 (resting) Treg、活性化 (activated) Treg、non Treg をフローサイトメトリーで同定する。また、それぞれの細胞集団について、ケモカイン受容体 CCR4 の発現を明らかにする。さらに、末梢血と腫瘍局所における分布を解析する。

(2) 免疫染色により、がん局所における CCR4 陽性 Treg の存在、さらにそのリガンドが何かを明らかにする。

(3) 抗 CCR4 モノクローナル抗体で、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) を有する KM2760 と有しない 1G1 の Treg に対する遊走阻止能を明らかにする

(4) 固形がん患者に対して、ヒト化抗 CCR4 単クローン抗体 KW-0761 を投与して Treg 除去効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 肺がん 20 症例について、それぞれの症例から末梢血サンプルと外科手術材料を得て、制御性 T 細胞 (Treg) の解析を行った。Treg の解析は、Foxp3 low CD45RA+ (Fr. I) Foxp3 high CD45RA- (Fr. II) および Foxp3 low CD45RA- (Fr. III) について解析した。Fr. I は、休止 (resting) Treg、Fr. II は、活性化 (activated) Treg、そして Fr. III は、

non Treg である (図 1)。

(2) 肺癌組織マイクロアレイ (TMA) を用いて、肺癌組織内に CCR4 陽性細胞、さらにそのリガンドである CCL17/TARC あるいは CCL22/MDC が検出されるか否かを、免疫組織染色により検討した。

(3) 末梢血単核球 (PBMC) から CD25 陽性の CD4 T 細胞をソートし、未処理のまま、あるいは、KM2760 で処理した後に、EZ-TAXScan 装置の一方のチャンバーに入れ、他方のチャンバーには、CCL22/MDC サイトカインを入れて、サイトカイン側への遊走を検討した。ソートした細胞の CCR4 発現は、FACS により確認した。遊走の陽性および陰性対照としては、ADCC 活性のない抗 CCR4 モノクローナル抗体である 1G1 と抗 CD4 抗体を用いてソートした CCR4 陽性および陰性の CD4 T 細胞を使用した。

(4) KW-0761 (Mogamulizumab) は、ヒト化抗 CCR4 単クローン抗体で、Fc 部分の脱フコシル化により抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) を高めた抗体である。Treg 除去による抗がん免疫能の増強を期待して、固形がん患者に対して KW-0761 を投与する医師主導治験を実施した。

4. 研究成果

(1) 肺がん患者末梢血リンパ球および摘出肺がん組織内浸潤リンパ球 (TIL) に含まれるこれらの Treg 集団について解析し、次のことが明らかになった。TIL では、末梢血リンパ球に比べて、活性化 Treg および non Treg の頻度が高いが、休止 Treg の頻度は低いまま差はなかった。この結果は、活性化 Treg および non Treg が末梢血中から腫瘍組織内へ集積していることを示唆している。さらに、腫瘍組織内で、休止 Treg の頻度上昇を認めなかったことは、休止 Treg から活性化 Treg へ変化していることを示唆するものと考えられる (図 1)。

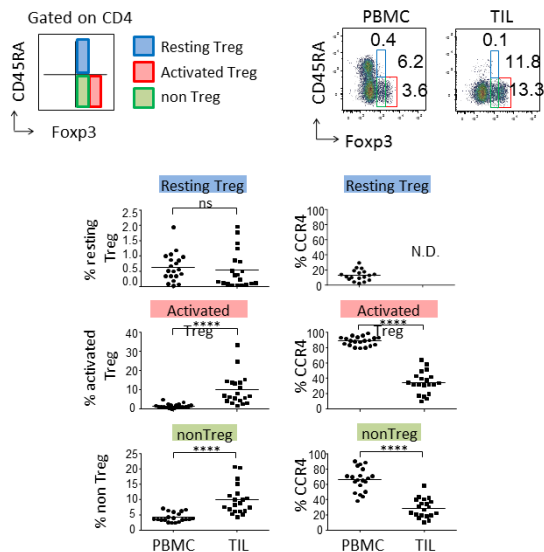


図1 肺がん患者末梢血、TILにおけるTreg分画のCCR4発現。肺癌組織内では、活性化Tregが集積している。CCR4分子は末梢血活性化Tregに高発現する一方、TILでは遊走により発現が低下している。

さらに、それぞれの細胞集団について、ケモカイン受容体CCR4の発現を検討した(図1)。その結果、TILの活性化TregおよびnonTregで、末梢血リンパ球に比べて、CCR4の発現低下を認めた。この結果は、CCR4が関与する遊走によって、活性化TregおよびnonTregの腫瘍局所への遊走が起きていることを示唆している。肺がんにおいてケモカインによる活性化Tregの集積が明らかになったが、肺がんの免疫治療戦略を構築する上で重要な示唆を与える知見と考えられる

(2) 肺癌組織マイクロアレイ(TMA)を用いた免疫組織染色による解析の結果、CCR4陽性肺癌組織浸潤リンパ球は、384サンプル中78個(20.3%)に認められ、一方、CCR4陽性の腫瘍細胞が認められたサンプルは一個のみ(0.3%)であった。さらに、CCL17/TARC陽性浸潤単核球は、5個のサンプル(1.3%)に認められ、また、CCL17/TARC陽性腫瘍細胞が認められたサンプルは2個(0.5%)のみであった。CCL22/MDC陽性浸潤単核球は117個(30.5%)のサンプルに認められ、CCL22/MDC陽性腫瘍細胞を認めたサンプルはなかった。さらに、CCR4陽性のリンパ球はほとんどがCD4陽性で、その内一部はFoxP3陽性であった。CCL22/MDC陽性細胞は、CD163陽性のM2マクロファージであった。CCR4発現は、CCL22/MDC発現と相

関していた。これらの結果は、肺癌組織内では、CCL17/TARCに比べてCCL22/MDCが優位に発現し、その結果として、Tregの集積が起きていることを示唆している。

(3) 遊走試験において、KM2760未処理のPBMCからソートしたCD25陽性CD4T細胞は活発に遊走したが、KM2760で処理したPBMCからソートしたCD25陽性CD4T細胞では遊走能が減弱した。さらに、KM2760がCD4T細胞のCCL22/MDCサイトカインへの遊走をADCCのエフェクター細胞であるNK細胞が存在しない状態でも直接阻止する効果を有するか否かをトランスウェルプレートを用いて検討した。その結果、KM2760は、CD4T細胞および静止あるいは活性化抑制性T細胞(Treg)の遊走阻止能は示さないことが明らかになった。

(4) 固形がん患者にKW-0761を投与して、まず、末梢血単核球(PBMC)中のリンパ球の減少を検討した。この結果、CD4T細胞とCD16⁺CD56⁺NK細胞は減少した。一方、CD8T細胞とCD19B細胞については、減少は認めなかった(図2)。CD25⁺FoxP3⁺CD4T細胞については、減少が最も顕著であった。FoxP3⁺CD4T細胞のうち、活性化Tregの減少が顕著であった。CD4T細胞のうち、Th17およびTh2についても減少を認めた。Th1あるいはTfhについては、減少は軽度であった。これらの結果は、CCR4抗体投与により末梢血中のTregを除去できることを示している。

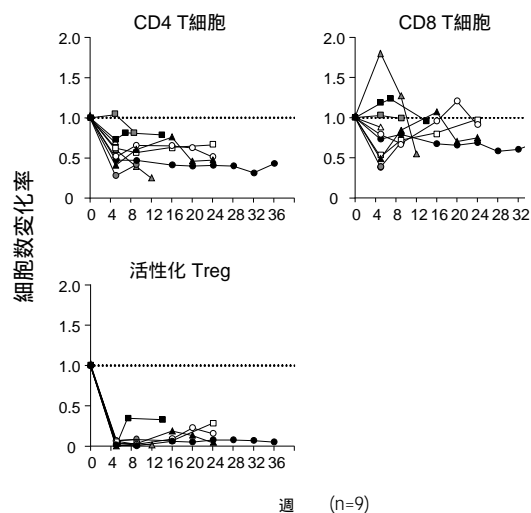


図2 KW-0761抗体投与固形がん患者PBMC中のTreg除去効果

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18件)

(1) Saito K, Nakayama E, Valmori D. Immune responses to the cancer testis antigen XAGE-1b in non small cell lung cancer caucasian patients. PLOS ONE, 11(3): e0150623, 2016. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0150623.

(2) Guidance Development Review Committee, Working Group for Clinical Studies of Cancer Immunotherapy, Working Group for Effector Cell Therapy, Working Group for CMC/Non-clinical Studies, Working Group for Cancer Vaccines and Adjuvants, Working Group for Anti-immune Checkpoint Therapy and Comprehensive Cancer Immunotherapy, and Biostatistics Subcommittee. Arato T, Daimon T, Heike Y, Ishii K, Itho K, Kageyama S, Kawakami Y, Nakayama E, Ozawa K, Sato N, Shiku H, Takeuchi M, Tani K, Tamada K, Ueda R, Yamaguchi Y, Yamanaka T, Yamaue H, Yasukawa M, Iguchi T, Kitano S, Miyahara Y, Nagata Y, Noguchi M, Terashima T, Asano T, Asonuma M, Ikeda H, Kakimi K, Takesako K, Tanaka M, Amakasu K, Yamada A, Harada N, Aoshi T, Kuroda E, Kobiyama K, Muraoka D, Yamazaki N, Kuchiba A, Tanaka S, Michimae H, Yamada T, Hanada K, Okada H, Takebe N, Hirano N, Okumura S, Sato D, Shibatsuji M and Yamaguchi T. 2015 Guidance on cancer immunotherapy development in early-phase clinical studies. Cancer Sci., 106(12): 1761-1771, 2015. 査読有
doi: 10.1111/cas.12819.

(3) Futami J, Nonomura H, Kido M, Niidoi N, Fujieda N, Hosoi A, Fujita K, Mandai K, Atago Y, Kinoshita R, Honjo T, Matsushita H, Uenaka A, Nakayama E, and Kakimi K. Sensitive multiplexed quantitative analysis of autoantibodies to cancer antigens with chemically S-cationized full-length and water-soluble denatured proteins. Bioconjugate Chem., 26(10): 2076-2084, 2015. 査読有

doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00328.

(4) Okita R, Wolf D, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Saisho S, Shimiz K, Yamaguchi Y, Oka M, Nakayama E, Lundqvist A, Kiessling R, Seliger B, Nakata M. Contrasting effects of the cytotoxic anticancer drug Gemcitabine and the EGFR tyrosine kinase inhibitor Gefitinib on NK cell-mediated cytotoxicity via regulation of NKG2D ligand in non-small-cell lung cancer cells. PLOS ONE, 10(10): e0139809. 2015. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0139809.

(5) Kurose K, Ohue Y, Wada H, Iida S, Ishida T, Kojima T, Doi T, Suzuki S, Isobe M, Funakoshi T, Kakimi K, Nishikawa H, Uono H, Oka M, Ueda R and Nakayama E. Phase Ia study of FoxP3⁺ CD4 Treg depletion by infusion of a humanized anti-CCR4 antibody, KW-0761, in cancer patients. Clin Cancer Res, 21(19): 4327-4336, 2015. 査読有
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0357.

(6) Miyai M, Eikawa S, Hosoi A, Iino T, Matsushita H, Isobe M, Uenaka A, Uono H, Nakajima J, Nakayama E and Kakimi K. TCR NGS for Ag-specific T cell frequency analysis. PLOS ONE, 10(8): e013686, 2015. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0136086.

(7) Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E and Uono H. Immune-mediated anti-tumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. Proc Natl Acad Sci USA, 112(6): 1809-1814, 2015. 査読有
doi: 10.1073/pnas.1417636112.

(8) Kurose K, Ohue Y, Sato E, Yamauchi A, Eikawa S, Isobe M, Nishio Y, Uenaka A, Oka M and Nakayama E. Increase in activated Treg in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Treg by ADCC using an anti-human CCR4 mAb (KM2760). Journal of Thoracic Oncology, 10(1): 74-83, 2014. 査読有
doi: 10.1097/JTO.0000000000000364.

(9) Ohue Y, Wada H, Oka M and Nakayama E.

Antibody response to cancer/testis (CT) antigens: A prognostic marker in cancer patients. *Oncol Immunology*, 3: 11, e970032; December 1, 2014. 査読有
doi: 10.4161/21624011.2014.970032

(10) Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto H, Nishio Y, Isobe M, Fukuda M, Uenaka A, Oka M and Nakayama E. Prolongation of overall survival in advanced lung adenocarcinoma patients with the XAGE1 (GAGED2a) antibody. *Clin Cancer Res*, Oct 1, 20(19): 5052-63, 2014. 査読有
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0742.

(11) Hepatitis C virus-specific T-cell response correlates with hepatitis activity and donor IL28B genotype early after liver transplantation. Tsuzaki R, Takaki A, Yagi T, Ikeda F, Koike K, Iwasaki Y, Shiraha H, Miyake Y, Sadamori H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Nobuoka D, Utsumi M, Nakayama E, Fujiwara T, Yamamoto K. *Acta Med Okayama*, 2014;68(5):291-302. 査読有
http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/68_5_291.pdf

(12) Pandey J, Namboodiri A, Ohue Y, Oka M, Nakayama E. Genetic variants of immunoglobulin and chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Exp Immunol*, 176(1): 78-83, 2014. 査読有
doi: 10.1111/cei.12247.

(13) Muraoka D, Nishikawa H, Noguchi T, Wang L, Harada N, Guillaume P, Luescher I, Uenaka A, Nakayama E, Old LJ, Kato T and Shiku H. Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8⁺ T cells. *Vaccine*, 31(17): 2110-2118, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.056.

(14) Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, Nakayama E, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K and

Kamihira M. T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*, 8(6): 891-902, 2013. 査読有
doi: 10.2217/nmm.12.142.

(15) Reis BS, Jungbluth AA, Frosina D, Holz M, Ritter E, Nakayama E, Ishida T, Obata Y, Carver B, Scher H, Scardino P, Slovin S, Subudhi SK, Reuter VE, Savage C, Allison JP, Melamed JM, Jäger E, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S. Prostate cancer progression correlates with increased humoral immune response to a human endogenous retrovirus GAG protein. *Clin Cancer Res*, 19(22): 6112-6125, 2013. 査読有
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3580.

(16) Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Udono H, Seto Y, Yamada K, Nishikawa H, Pan L, Venhaus R, Oka M, Doki Y, Nakayama E. Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother*, 37(2): 84-92, 2014. 査読有
doi: 10.1097/CJI.000000000000017.

(17) Mizote Y, Uenaka A, Isobe M, Wada H, Kakimi K, Saika T, Kita S, Koide Y, Oka M, and Nakayama E. Production of NY-ESO-1 peptide/DRB1*08:03 tetramers and ex vivo detection of CD4 T-cell responses in vaccinated cancer patients. *Vaccine*, 32(8): 957-964, 2014. 査読有
doi: 10.1016/j.vaccine.2013.12.042.

(18) Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, Honda H, Yamashita T, Nohara S, Oka M, Jimbow K, and Nakayama E. TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimid-dextran (NPCMD). *J Dermatol Sci*, 73(3): 209-215,

2014. 査読有

doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.11.006.

〔学会発表〕(計50件中、7件記載)

Ohue Y, Kurose K, Oka M, Nakayama E: Discriminant function for predicting survival of lung adenocarcinoma patients developed by using immune parameters of PD-L1, Gal-9, and XAGE1 expression on tumor cells and T cell infiltration score (ポスター) The Inaugural International Cancer Immunotherapy Conference, 2015年9月16日, Sheraton New York Times Square Hotel (New York, USA)

Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto H, Nishio Y, Isobe M, Fukuda M, Uenaka A, Oka M and Nakayama E: Clinical effect of XAGE1 (GAGED2a) antigen expression and antibody response in EGFR mutated and wild-type advanced lung adenocarcinoma (ポスター) 22nd Annual International Cancer Immunotherapy Symposium, 2014年10月5日, Grand Hyatt New York Hotel (New York, USA)

Kurose K, Ohue Y, Eikawa S, Nishio Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M and Nakayama E: Increase of activated Tregs in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Tregs by ADCC using anti-human CCR4 mAb (KM2760) (ポスター) 22nd Annual International Cancer Immunotherapy Symposium, 2014年10月5日, Grand Hyatt New York Hotel (New York, USA)

Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Ohue Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E: Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb (ポスター) 104nd Annual Meeting of American Association of Cancer Research, 2013年4月6日, Washington Convention Center (Washington DC, USA)

Ohue Y, Kurose K, Eikawa S, Mizote Y, Matsumoto H, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Nakayama E, Oka M: Immune response to XAGE-1b (GAGED2a) in NSCLC patients and

its clinical relevance (ポスター) 104nd Annual Meeting of American Association of Cancer Research, 2013年4月6日, Washington Convention Center (Washington DC, USA)

Kurose K, Ohue Y, Mizote Y, Isobe M, Uenaka A, Oka M, Nakayama E: Depletion of Tregs from PBMCs by treatment with defucosylated anti-CCR4 mAb (ポスター) 21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium, 2013年9月30日, Grand Hyatt New York Hotel (New York, USA)

Ohue Y, Kurose K, Mizote Y, Matsumoto H, Isobe M, Uenaka A, Fukuda M, Oka M, Nakayama E: Prolonged overall survival in XAGE-1b(GAGED2a) antibody positive NSCLC patients (ポスター) 21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium, 2013年9月30日, Grand Hyatt New York Hotel (New York, USA)

〔図書〕(計5件中、3件記載)

(1) 鈴木 進、中山睿一、黒瀬浩史、上田龍三: 最新医学社、モガムリズムマブの新しい展開、最新医学、2016、71(1): 126-133.

(2) 中山睿一: 南山堂、がん抗原(第7章) The Frontiers in Life Sciences、がんと免疫、2015、1(1): 51-59.

(3) 黒瀬浩史、岡 三喜男、中山睿一: 最新医学社、基礎: 抗 CCR4 抗体の制御性 T 細胞への影響と臨床応用の可能性、最新医学、2015、70(3): 393-398.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 睿一 (NAKAYAMA EIICHI)

川崎医療福祉大学・医療福祉学部・教授
研究者番号: 60180428