

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830124

研究課題名(和文) 副刺激を調節した T細胞を用いた新たな養子免疫療法の可能性の検討

研究課題名(英文) New adoptive gammadelta T cell therapy regulated through co-stimulatory and co-inhibitory receptor

研究代表者

鈴木 透 (SUZUKI, TORU)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00441296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：4-1BB抗体、PD-L1抗体による T細胞の副刺激を調節することで T細胞の活性状態を向上させ、更に刺激活性に伴うアポトーシスを抑制することを証明できたが、細胞障害を導く IFN やパーフォリン、グランザイムの産生能力の有意な向上は認めず、ヒト膀胱癌細胞株に対する抗腫瘍効果増強についても証明することが出来なかった。その理由として、培養3日目に最も4-1BB、PD-1を発現する T細胞の割合が多かったが、10日間の培養によりその割合が減少することが考えられた。そのため培養開始初期の T細胞のみを使用すれば有用性を証明できる可能性はあると考える。

研究成果の概要(英文)：Anti-4-1BB antibody and anti-PD-L1 antibody combined with TCR stimulation significantly up-regulated CD69 expression and inhibited activation induced cell death of T cells. Although anti-4-1BB and anti-PD-L1 antibody enhanced secretion of IFN and perforin, granzyme compared with TCR stimulation alone, we didn't observed significant increase. Finally, antitumor effects of T cells against human bladder cancer cells didn't increase upon co-stimulation with both antibodies. That is the reason why the ratio of 4-1BB and PD-1 positive T cells decreased after 10 days of culture. Therefore, it is needed to use only 4-1BB and PD-1 positive T cells for new adoptive T cell therapy regulated through co-stimulatory and co-inhibitory receptor.

研究分野：免疫細胞療法

キーワード： T細胞 PD-1 4-1BB 副刺激

1. 研究開始当初の背景

近年、骨粗鬆症などに対して使用されるゾレドロン酸を用いて自然免疫を司る $\gamma\delta$ T 細胞を大量に増殖させ投与する養子免疫療法が開発され、本邦においても腎細胞癌に対する臨床試験が行われている¹。他の治療法と比較して副作用の軽減による QOL の向上が期待できるが、十分な抗腫瘍効果が認められていないのが現状である。その理由として、(1) 腫瘍細胞の持つ様々な免疫回避機構が存在すること、(2) 副作用により投与出来る細胞数に制限があることがあげられる。これまでに我々は、(1) の打開策として $\gamma\delta$ T 細胞に対する免疫回避機構のひとつである、腫瘍細胞表面における活性型受容体 NKG2D のリガンド発現低下に着目し、その発現をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸を用いて増強させ、 $\gamma\delta$ T 細胞のヒト膀胱癌細胞株に対する抗腫瘍効果を向上させることに成功した²。更に(2)の打開策として、制限された投与細胞数でも効率良く抗腫瘍効果を発揮できるシステムの開発を検討するため $\gamma\delta$ T 細胞が持つ co-receptor を介した副刺激に着目した。

$\alpha\beta$ T 細胞と同様に、 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化には T 細胞受容体 ($\gamma\delta$ TCR) / CD3 複合体による刺激 (シグナル 1) とともに co-receptor による副刺激 (シグナル 2) が必要である。co-receptor としては co-stimulatory receptor と co-inhibitory receptor が存在する。 $\alpha\beta$ T 細胞においてはいくつかの co-stimulatory receptor が報告されているが、中でも 4-1BB (CD137) に

よる副刺激の調節が最も効果的であると報告されている³。

また同様に $\alpha\beta$ T 細胞においては co-inhibitory receptor として PD-1 (programmed cell death-1) が報告され、このシグナルの遮断による効果が報告されている⁴。しかし、 $\gamma\delta$ T 細胞におけるこれらシグナル 2 の効果は未だ検討されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では co-stimulatory receptor である 4-1BB の刺激と co-inhibitory receptor である PD-1 の遮断による $\gamma\delta$ T 細胞に与える効果を検討する。まず、副刺激による $\gamma\delta$ T 細胞のエフェクター機能の変化を未治療群、単独治療群、両者の併用群に分けそれぞれ *in vitro* で検討し、更にマウス膀胱癌モデルを用いて *in vivo* でも抗腫瘍効果の向上ならびに安全性につき検討する。

3. 研究の方法

(1) $\gamma\delta$ T 細胞の 4-1BB、PD-1 の発現の検討

$\gamma\delta$ T 細胞をはじめ免疫担当細胞はその活性状態によりレセプターの発現に変化が見られることが多いと考えられるため、培養スケジュールを変更して $\gamma\delta$ T 細胞の co-receptor の発現を検討する。

まず健常人被験者から採血を行い、分離した末梢血単核球をゾレドロン酸とインターロイキン 2 の存在下に 10 日間培養した後、MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) を用いて $\gamma\delta$ T 細胞を精製する。精製した $\gamma\delta$

T細胞を TCR/CD3 刺激した後、24 時間毎に $\gamma\delta$ T 細胞表面の 4-1BB ならびに PD-1 の発現に変化があるかをフローサイトメーターを用いて検討する。この実験によりどのタイミングで副刺激を調節するのが適当かを明らかにする。

(2) 副刺激による $\gamma\delta$ T 細胞のエフェクター機能の検討

実験(1)により明らかとなった発現が最も認められるタイミングで副刺激を調節することにより、 $\gamma\delta$ T 細胞のエフェクター機能が向上するか否か、抗腫瘍効果が向上するか否かを検討する。

実験(1)同様に精製した $\gamma\delta$ T 細胞を TCR/CD3 刺激した後、4-1BB 抗体、PD-L1 抗体単独、更に両者を添加してそれぞれ共培養し、24 時間毎に $\gamma\delta$ T 細胞の CD69 の発現をフローサイトメーターを用いて測定し、 $\gamma\delta$ T 細胞の活性状態に与える影響を検討する。また、フローサイトメーターにより $\gamma\delta$ T 細胞の PI、Annexin V の発現を測定し副刺激の $\gamma\delta$ T 細胞のアポトーシスに与える影響を検討する。

同様に、 $\gamma\delta$ T 細胞を TCR/CD3 刺激した後、4-1BB 抗体、PD-L1 抗体単独、更に両者を添加してそれぞれ共培養し、インターフェロン γ 、パーフォリン、グランザイム等の細胞障害性サイトカイン産生をフローサイトメーター、ならびに ELISA を用いて検討する。期待された副刺激の効果が認められない場合はタイムスケジュールを変更し、前処置後初期での検討を再度行う。

最後に、前処置した $\gamma\delta$ T 細胞のヒト浸潤性膀胱癌細胞株(253J、TCCSUP)に対する抗腫瘍効果について LDH 細胞障害試験を用いて検討する。 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果に最も影響を与える要因はその活性状態なのかサイトカイン産生能力なのかは不明であるため、タイムスケジュールは詳細に検討する。

(3) 動物実験

実験(1)、(2)における *in vitro* の実験を証明するため、マウス膀胱癌モデルを用いて副刺激を調節した $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果ならびに安全性を検討する。

BALB/c マウス皮下に 253J、TCCSUP をそれぞれ 1×10^7 cells 移植し、腫瘍径が 5mm になった後にマウスを下記の 4 群に無作為に振り分ける。

群(未治療群)

群(未前処置 $\gamma\delta$ T 細胞 投与群)

群(4-1BB 抗体または PD-L1 抗体前処置 $\gamma\delta$ T 細胞 投与群)

群(4-1BB 抗体 + PD-L1 抗体前処置 $\gamma\delta$ T 細胞 投与群)

実験(2)同様に 4-1BB 抗体、PD-L1 抗体単独、または両者で前処置した $\gamma\delta$ T 細胞を週に 1 回 1×10^6 cells ずつ腹腔内投与する。週に 1 回体重、腫瘍径ならびに腫瘍重量を計測し、抗腫瘍効果ならびに安全性について検討する。5 週をエンドポイントとし安楽死させた後、摘出腫瘍重量を測定するとともに、PD-L1 抗体投与による自己免疫疾患の発生については安楽死後に主要臓器を

摘出して病理学的に検討する。期待された抗腫瘍効果が得られない場合は $\gamma\delta$ T細胞の投与方法の変更（尾静脈投与等）、投与細胞数の変更、投与タイミングの変更等を考慮し、再度検討する。この実験により $\gamma\delta$ T細胞に対する副刺激を調節することで、制限された投与細胞数においても抗腫瘍効果を増強させることが出来るかを証明する。

4. 研究成果

(1) $\gamma\delta$ T細胞の4-1BB、PD-1の発現の検討

精製した $\gamma\delta$ T細胞をTCR/CD3刺激し24時間後の4-1BB、PD-1の発現が最大に増強したため、この時点の $\gamma\delta$ T細胞を以後の実験に使用した。

(2) 副刺激による $\gamma\delta$ T細胞のエフェクター機能の検討

$\gamma\delta$ T細胞と4-1BB抗体共培養によりCD69の活性はCD3刺激単独と比較して1.7倍に有意に向上した。同様にPD-L1抗体との共培養では1.3倍と $\gamma\delta$ T細胞の活性状態は向上したが有意差は認めなかった。更に4-1BB抗体、PD-L1抗体両者との共培養では $\gamma\delta$ T細胞の活性状態は1.8倍まで有意に向上した。（図1）

以上より4-1BB抗体により $\gamma\delta$ T細胞の活性状態を有意に向上させることが証明できた。

また、通常の $\alpha\delta$ T細胞と同様に $\gamma\delta$ T細胞も活性刺激を受けることによりアポトーシスが誘導されるが、PD-L1抗体の存在によりアポトーシスを呈した $\gamma\delta$ T細胞の割合

が有意に減少した。このことからPD-L1抗体の存在下で活性刺激を受けると、 $\gamma\delta$ T細胞はアポトーシスに誘導されにくい可能性が示唆された。（図2）

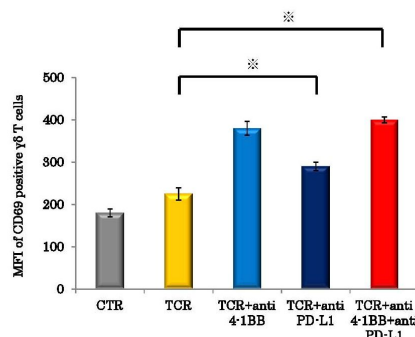


図1

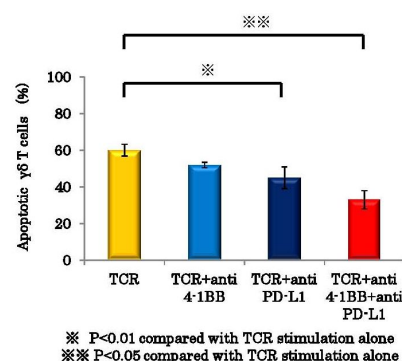


図2

$\gamma\delta$ T細胞と4-1BB抗体共培養により $\text{IFN}\gamma$ の産生は1.2倍に増強し、PD-L1抗体との共培養では1.2倍に増強したが、TCR/CD3単独刺激と比較していずれも有意差を認めなかった。更に4-1BB抗体、PD-L1抗体両者との共培養では $\text{IFN}\gamma$ の産生は1.5倍まで増強したが有意差を認めなかった。 $\gamma\delta$ T細胞から放出されるパーフォリン、グランザイムに関して $\text{IFN}\gamma$ と同様の結果であった。以上より4-1BB抗体、PD-L1抗体による $\gamma\delta$ T細胞の $\text{IFN}\gamma$ の産生能力の向上は認められなかった。（図3）

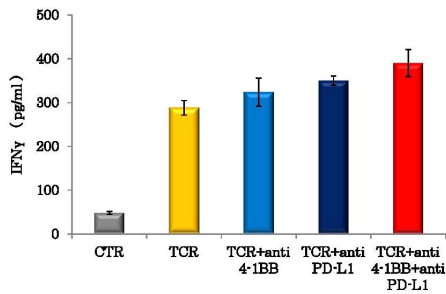
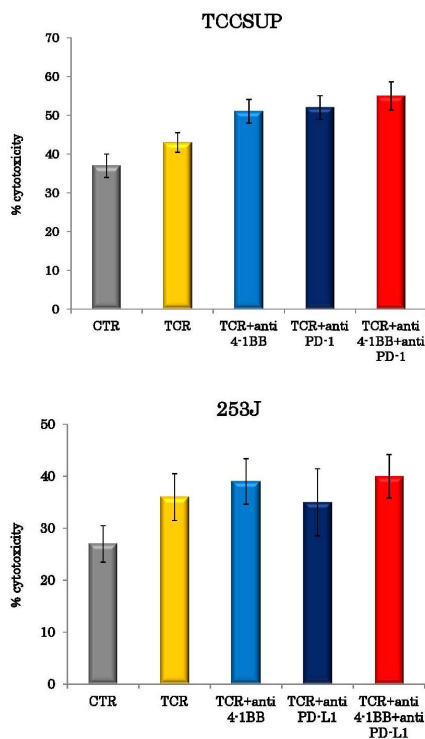
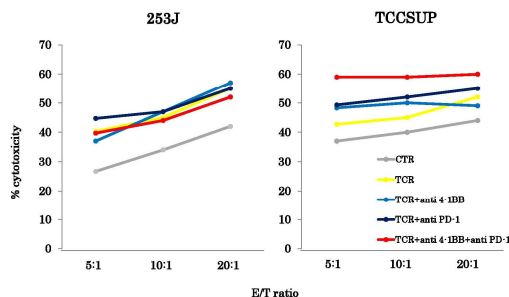


図 3

ヒト膀胱癌細胞株 TCCSUP に対する抗腫瘍効果は併用により 1.4 倍向上したが有意差は認めなかった。一方 253J に対する抗腫瘍効果は併用でも抗腫瘍効果の向上を認めなかった。(図 4) E/T 比を増やしても同様の結果であった。(図 5)



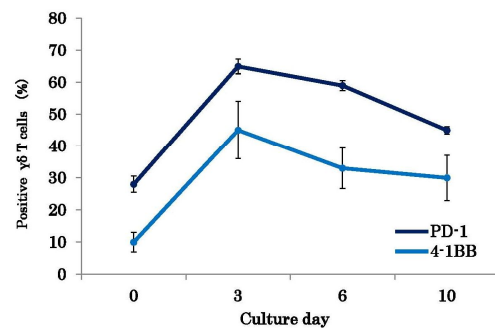
(図 4)



(図 5)

腫瘍細胞株による抗腫瘍効果の違いは TCCSUP が PD-1 のリガンドである PD-L1 が中等度発現していたのに対して 253J は殆ど発現していなかったこと、即ち腫瘍細胞側の PD-L1 発現の程度によるものであることをフローサイトメーターで証明した。以上より PD-L1 陽性の腫瘍細胞株である TCCSUP に対しては $\gamma\delta$ T 細胞の副刺激を調節した抗腫瘍効果の向上を認めたが、TCR/CD3 単独刺激と比較して有意差を証明できなかった。

その理由の検索のため、各培養スケジュールにおける $\gamma\delta$ T 細胞の 4-1BB、PD-1 発現状況のプロファイルを行った。フローサイトメーターから培養 3 日目に 4-1BB、PD-1 を発現した $\gamma\delta$ T 細胞の割合が最も多かったが、10 日間の培養後はいずれも過半数の $\gamma\delta$ T 細胞が陰性であった。(図 6)



(図 6)

そのため 10 日間の培養の後、全ての $\gamma\delta$ T 細胞を使用した本実験では 4-1BB/4-1BB リガンド経路調節ならびに PD-1/PD-L1 経路遮断の有用性を証明できなかったと考える。培養 3 日目の $\gamma\delta$ T 細胞、または 10 日間培養後の陽性 $\gamma\delta$ T 細胞のみを抽出し、4-1BB、PD-1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞のみを対象とすれば有用性を証明できる可能性はあると考える。しかし、担癌患者の $\gamma\delta$ T 細胞の培

養効率はもともと悪いことを考慮すると、
更に細胞数を減少させる方法は臨床的に意
義が少ないと考える。

以上より本実験では $\gamma\delta$ T 細胞を用いた
養子免疫療法における 4-1BB/4-1BB リガ
ンド、PD-1/PD-L1 を介した副刺激調節の
意義を証明できなかった。

(引用文献)

- 1 Kobayashi H et al. Cancer Immunol
Immunother 56: 469-476, 2007
- 2 Suzuki T et al. Anticancer Res
30:4509-4514, 2010
- 3 Melero I et al. Trends in
Pharmacological Sciences 29:383-390,
2008
- 4 Blank C et al. Cancer Immunol
Immunother 56: 739-745, 2007

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者

鈴木 透 (SUZUKI, Toru)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00441296