

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861253

研究課題名(和文)免疫賦活効果を発揮する抗腫瘍エフェクター細胞の作製と肺癌免疫療法への応用

研究課題名(英文) Application of anti-cancer effector cells that exert adjuvant effects for lung cancer

研究代表者

張 エイ (Zhang, Rong)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学部・リサーチレジデント

研究者番号：00643719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん抗原特異的TCR遺伝子導入T細胞(TCR-T細胞)を投与する免疫細胞療法は有望であるが、がん抗原特異的TCRの多くは抗原に対して低親和性であり、強力ながんの排除を誘導できないことが問題である。本研究は、インバリアントNKT(iNKT)細胞の免疫賦活効果を応用することで、がん細胞の細胞傷害感受性とTCR-T細胞の細胞傷害性を向上させることができることを明らかにした。また、in vivoモデルにおいて、iNKT細胞活性を応用すると、TCR-T細胞の抗腫瘍効果を著しく改善することが明らかとなった。本研究は、TCR遺伝子療法の安全性と抗腫瘍効果を向上させる新たな治療法の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adoptive immunotherapy using TCR gene-modified T cells is an attractive strategy for targeting cancer. However, naturally occurring TCRs are of lower affinity, a fact that limits the ability of natural TCRs to recognize the low antigen-HLA levels typically expressed on tumor cells. To address this issue, we used invariant NKT (iNKT) cells, a unique subset of T cells that recognize -GalCer presented by CD1d, as a cellular adjuvant. We found that soluble factors from iNKT cell/ -GalCer-dendritic cell (DC) interaction enhanced the HLA-I expression on cancer cells and upregulated both perforin and granzyme B in TCR gene-modified T cells, in turn enhancing the potency of cellular immunity. Furthermore, in vivo transfer of TCR gene-modified T cells in combination with iNKT/ -GalCer-DC inhibited the tumor growth and significantly prolonged the survival in xenograft model. Thus, the additional transfer of iNKT/ -GalCer-DC may improve the efficacy of TCR gene-modified T cells.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：肺がん 免疫 遺伝子療法 細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は早期発見が困難であり、進行癌として発見されることが多く、本邦ではがん死亡率の第一位を占めている。一部の肺癌においては分子標的薬が奏功するが、多くが再発する為、依然として予後不良の疾患であり、より効果的な治療法の開発が切望されている。

がん抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞 (TCR-T 細胞) を患者に移入する免疫細胞療法は一部のがんで高い奏効率が示されている。一般的に、がん抗原特異的 TCR の多くは抗原に対する親和性が低い為、TCR 遺伝子に変異を導入した高親和性 TCR を応用してきた。しかしながら、TCR の予期せぬ交叉反応によって正常組織の破壊が起こり、患者が死亡した例が報告されている。したがって、より安全で効果の高い応用法の開発が必要である。

インバリアントナチュラルキラー T (iNKT) 細胞は、T 細胞とナチュラルキラー細胞の両方の特徴を有する特殊な T 細胞である。この T 細胞は、均一な T 細胞抗原受容体 (TCR) を発現し、CD1d 分子に提示された糖脂質抗原 ( $\alpha$ -GalCer) を認識する。また、この細胞は、アジュバント (免疫賦活) 機能に優れているため、これの活性を応用することで、TCR に変異を導入せずに高度の安全性とエフェクター効果を発揮させることができると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、iNKT 細胞の細胞アジュバント活性を応用して、TCR 遺伝子導入 T 細胞療法の安全性と抗腫瘍効果を向上させる新たな治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### レトロウィルスベクター

タカラバイオおよび三重大学との共同研究により、hTERT (human telomerase

reverse transcriptase) 特異的 CTL クローンの TCR $\alpha/\beta$  鎖遺伝子を発現するレトロウィルスベクターを構築した。本ベクターは内因性の TCR 発現を抑制する siRNA を発現する。また、hTERT 特異的 TCR 遺伝子には、RNA 干渉をエスケープする変異を導入している為、 $\alpha/\beta$  鎖ミスペアリングを防止して効率よく導入 TCR を発現させることが可能である。hTERT 特異的 TCR 発現 CTL の構築

健康人末梢血単核球 (PBMC) を抗 CD3/CD28 刺激して 3 日後と 4 日後に、レトロネクチン法を用いてレトロウィルス感染を行った。その後 CD4 陰性細胞 (CTL) を磁気分離、増殖した CTL を HLA-A24/hTERT テトラマー、あるいは抗 TCR $\beta$ 2 抗体で染色して hTERT 特異的 TCR 陽性頻度を評価した。

### iNKT 細胞の樹立

PBMC を  $\alpha$ -GalCer 刺激して iNKT 細胞の増殖を誘導した後、V $\alpha$ 24, 6B11 発現を指標に iNKT 細胞を分離した。

### モノサイト DC の誘導

CD14 陽性細胞に IL-4 と GM-CSF を添加して 6 日間培養したものを DC とした。抗原特異性評価

hTERT ペプチドを段階希釈して HLA-A24 陽性細胞 (T2-A24) に加え、細胞傷害活性をクロミウム放出試験にて評価した。

hTERT 陽性肺がん細胞に対する細胞傷害活性の評価

HLA-A24 陽性 hTERT 陽性肺がん細胞株 PC-9 を IFN- $\gamma$  で 48 時間処理したもの、IFN- $\gamma$  処理のないものにおける HLA クラス I 分子の発現をフローサイトメトリーにて解析した。また、これらに対する細胞傷害活性をクロミウム放出試験にて評価した。

生体内抗腫瘍効果の評価

PC9 と hTERT-TCR 導入 CTL を混合して、BALB/c-RJ (RAG2<sup>-/-</sup>-JAK3<sup>-/-</sup>) マウスに皮下移植した。iNKT 細胞と  $\alpha$ -GalCer 負荷有/無 DC は腹腔内に投与した。腫瘍の大きさは経時的に in vivo イメージングおよび腫瘍径測定するとともに生存期間を評価した。

#### 4. 研究成果

##### hTERT 特異的 TCR 遺伝子導入 CTL

hTERT 特異的 TCR 遺伝子導入 CTL (hTERT-TCR-CTL) をテトラマー染色した (図 1)。siTCR ベクターを用いることで高頻度の hTERT-TCR 発現を実現した。

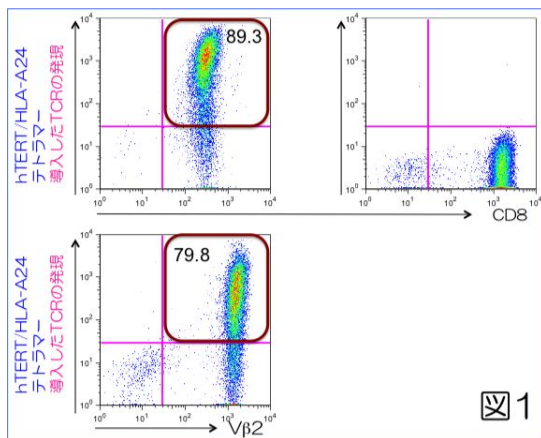


図 1

##### 細胞傷害活性の評価

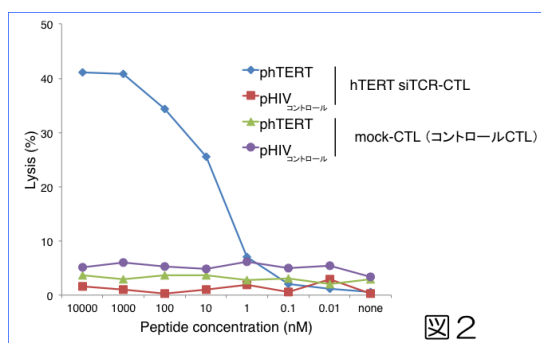


図 2

hTERT-siTCR-CTL は、hTERT ペプチド濃度依存性に細胞傷害活性を示した (E:T=10:1) (図 2)。

阻害試験により、細胞傷害活性は HLA-I 拘束性、パーフォリン依存性であることが分かった。HLA-A24<sup>+</sup> hTERT<sup>+</sup> 肺がん細胞株に対する細胞傷害活性を

評価した。hTERT-TCR-CTL は、単独では肺がん細胞株を傷害しなかった。これに hTERT ペプチドを添加すると傷害した (data not shown)。

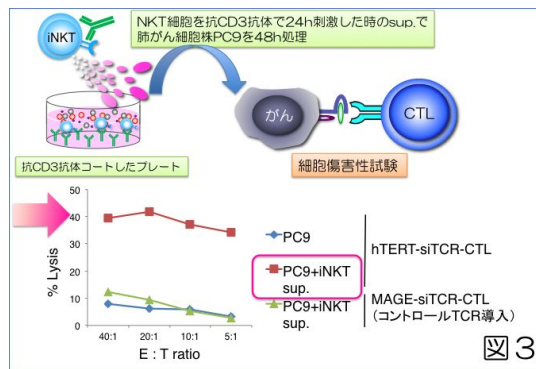


図 3

##### 傷害メカニズム

iNKT 細胞を抗 CD3 抗体で 24 時間刺激した時の培養上清 (sup.) で、肺がん細胞株 PC9 を 48 時間処理すると、hTERT-TCR-CTL に傷害された (図 3)。

iNKT 細胞を CD3 刺激した時の液性因子をマルチプレクスアッセイで解析したところ、IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ などの Th1 サイトカインと IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 など Th2 サイトカインが含まれていた。

一方、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17A、IL-22 などの炎症性サイトカインは存在しなかった (data not shown)。細胞傷害感受性を上昇させる責任因子を調べる為に、中和抗体を用いた解析を行った。その結果、iNKT 細胞に由来する IFN- $\gamma$ が重要な役割を果たすことが分かった (data not shown)。一方、定量 RT-PCR の評価では、hTERT 発現に変化は認められなかった (data not shown)。

次に、iNKT 細胞の sup. で PC9 を処理して HLA-I 発現を評価したところ、PC9 の著しい HLA-I 発現上昇を認め、この効果は抗 IFN- $\gamma$ 抗体にて阻害された。

以上、まとめると NKT 細胞由来の IFN- $\gamma$ は、がん細胞の HLA-I 上昇を誘導

して、細胞傷害感受性を上昇させることが分かった。

次に、hTERT-TCR-CTL への影響を調べた。iNKT と  $\alpha$ -GalCer-DC を 24 時間共培養した sup. を hTERT-TCR-CTL に添加して 48h 処理、細胞内パーフォリン、グランザイム発現、および IFN- $\gamma$  処理がん細胞に対する細胞傷害活性を評価した。その結果、iNKT 細胞と  $\alpha$ -GalCer-DC を共培養した sup. は、hTERT-TCR-CTL のパーフォリン・グランザイム上昇を誘導した。阻害試験の結果、iNKT 細胞と DC の相互作用による IL-2 と IL-12 がパーフォリン・グランザイム上昇に重要であることが分かった (data not shown)。さらに、IFN- $\gamma$  処理がん細胞株に対する細胞傷害活性を評価したところ、 $\alpha$ -GalCer-DC と iNKT 細胞の相互作用によって産生される液性因子が重要であることが分かった (図 4)。

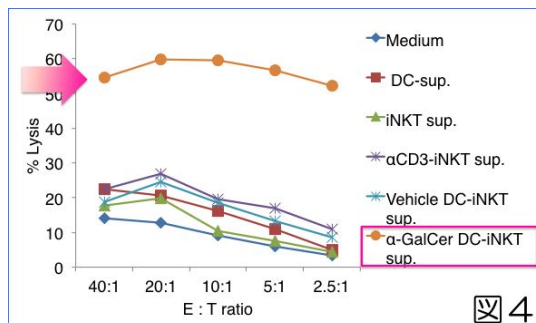


図 4

中和抗体を用いた阻害試験の結果、iNKT 細胞と DC の相互作用による IL-2 と IL-12 が hTERT-TCR-CTL の細胞傷害活性を上昇させることが分かった。

以上、まとめると iNKT 細胞と DC の相互作用による IL-2 と IL-12 が TCR 導入 CTL のパーフォリン・グランザイム発現を上昇させ、細胞傷害活性を高めることが明らかとなった。

生体内抗腫瘍効果を評価

PC9 と hTERT-TCR-CTL を混合して、マウスに皮下移植した。in vivo イメージングで解析したところ、コントロール

群に比べ、hTERT-TCR-CTL と  $\alpha$ -GalCer-DC/iNKT 細胞を併用したもので著しい抗腫瘍効果が認められた (図 5)。また、この併用投与によって腫瘍径の増大を抑制し、生存期間を延長した。hTERT-TCR-CTL と  $\alpha$ -GalCer-DC/iNKT 細胞を併用して 2 回追加投与したものでは、さらに生存期間の延長が認められた (data not shown)。

$\alpha$ -GalCer あり・なしで DC と iNKT 細胞を腹腔内投与して、24 時間後のマウス血清中のヒトサイトカインをマルチプレックス解析した。その結果、確かにヒト IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12p70 がマウス末梢血中に存在することを確認した。

まとめ

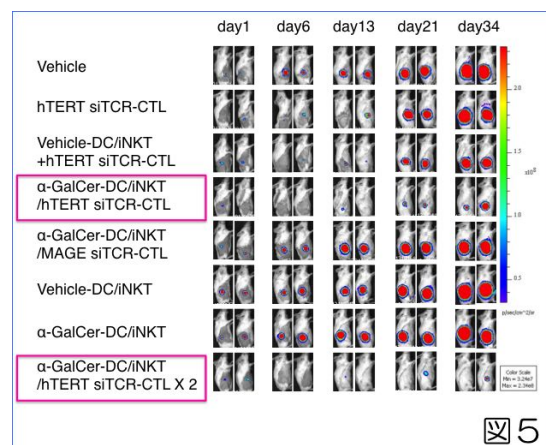


図 5

活性化 iNKT 細胞によって産生される IFN- $\gamma$  は、がんの HLA-I 発現上昇を促進して、TCR 導入 CTL による細胞傷害感受性を上昇させる。一方、活性化 iNKT 細胞と DC の相互作用により、産生される IL-2 と IL-12 は TCR 導入 CTL のパーフォリン、グランザイム上昇を促進し、細胞傷害活性を上昇させる。つまり、iNKT 細胞のアジュバント効果と「がん」の細胞傷害感受性上昇により、TCR 遺伝子導入 T 細胞の抗腫瘍効果を増強できると考えられる。

近年、T 細胞の活性を促進あるいは抑制する多くの分子が存在することが明

らかとなった。これらを阻害する方法との併用により、さらに効果の高い TCR 遺伝子導入 T 細胞療法が実現できるかもしれないと考えている。

#### 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3件)

1. Zhang R., Liu T., Senju S., Haruta M., Hirosawa N., Suzuki M., Tatsumi M., Ueda N., Maki H., Nakatsuka R., Matsuoka Y., Sasaki Y., Tsuzuki S., Nakanishi H., Araki R., Abe M., Akatsuka Y., Sakamoto Y., Sonoda Y., Nishimura Y., Kuzushima K. and Uemura Y.

Generation of mouse pluripotent stem cell-derived proliferating myeloid cells as an unlimited source of functional antigen-presenting cells.

Cancer Immunol. Res. in press

2. 張工イ, 劉天懿, 鈴木元晴, 廣澤成美, 坂本安, 葛島清隆, 植村靖史  
iNKT 細胞と樹状細胞の相互作用による IL-27/osteopontin 産生制御  
臨床免疫・アレルギー科, 61: 158-163, 2014
3. 張工イ, 鈴木元晴, 上田格弘, 巽美奈子, 劉天懿, 葛島清隆, 植村靖史,  
iNKT 細胞による樹状細胞の機能修飾  
臨床免疫・アレルギー科, 62: 307-313, 2014

[学会発表](計7件)

1. 張工イ, 劉天懿, 千住覚, 廣澤成美, 辻村邦夫, 中西速夫, 藺田精昭, 坂本安, 西村泰治, 葛島清隆, 植村靖史  
多能性幹細胞由来の増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法の開発  
第72回日本癌学会学術総会(横浜市)  
2013年10月3日~5日
2. 牧寛之, 植村靖史, 張工イ, 竹田和由,

劉天懿, 鈴木元晴, 都築忍, 岡村文子, 赤塚美樹, 西村泰治, 千住覚, 葛島清隆  
TRAIL を発現する多能性幹細胞由来ミエロイド細胞を用いた細胞医薬の開発  
第72回日本癌学会学術総会(横浜市)  
2013年10月3日~5日

3. Hiroyuki Maki, Yasushi Uemura, Rong Zhang, Tianyi Liu, Motoharu Suzuki, Narumi Hirosawa, Kazuyoshi Takeda, Yasushi Sakamoto, Satoru Senju, Kiyotaka Kuzushima  
Pluripotent stem cell-derived myeloid cells expressing TRAIL as a possible cell medicine for cancer.  
第42回日本免疫学会学術集会(千葉市)  
2013年12月11日~13日
4. 上田格弘, 植村靖史, 張工イ, 劉天懿, 巽美奈子, 安井裕, 葛島清隆, 清井仁, 金子新  
BCR-ABL 特異的ヘルパーT細胞のリプログラミングとCML治療への応用  
第18回日本がん免疫学会総会(ひめぎんホール・松山市)2014年7月30日~8月1日
5. 上田格弘, 植村靖史, 張工イ, 劉天懿, 巽美奈子, 安井裕, 葛島清隆, 清井仁, 金子新  
Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation.  
第73回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜・横浜市)2014年9月25日~27日
6. Norihiro Ueda, Yasushi Uemura, Rong Zhang, Tian-Yi Liu, Minako Tatsumi, Yutaka Yasui, Kiyotaka Kuzushima, Hitoshi Kiyoi, Shin Kaneko  
Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation

第 43 回日本免疫学会学術集会 ( 国立京都国際会館・京都市 ) 2014 年 12 月 10 日～12 日

7. 上田格弘, 植村靖史, 張エイ, 劉天懿, 巽美奈子, 安井裕, 葛島清隆, 清井仁, 金子 新

BCR-ABL-specific T helper cells facilitate propagation of antigen-specific CTLs via DC maturation.

第 76 回日本血液学会学術集会 ( 大阪国際会議場・大阪市 ) 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日

〔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

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/05shuyo\\_meneki/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/05shuyo_meneki/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

張 エイ ( ZHANG RONG )  
愛知県がんセンター研究所・リサーチレジデント  
研究者番号 : 00643719

### (2) 研究協力者

葛島 清隆 ( KUZUSHIMA KIYOTAKA )  
愛知県がんセンター研究所・部長  
研究者番号 : 30311442

植村 靖史 ( UEMURA YASUSHI )  
国立がんセンター・ユニット長  
研究者番号 : 40364781