

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460914

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害剤を利用した新規免疫細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immune cell therapy combined with immune checkpoint inhibitors

研究代表者

石川 剛 (Ishikawa, Takeshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90372846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害剤(ICI)は、がん薬物療法の治療成績を向上させたが、奏功例は依然少数であり、CTL誘導のない患者ではICIの効果は期待できない。抗がん剤治療等の既存治療や養子免疫療法を併用した複合的免疫療法の開発が、治療成績向上のためには必要である。本研究により、ICIとT細胞療法併用は、抗腫瘍効果を増強し、その機序として、腫瘍内のFoxp3陽性細胞の減少とTh1シフトが寄与していることが示唆された。また、抗がん剤は、がん細胞上のPD-L1発現を亢進させ、抗腫瘍免疫を減弱させている可能性が示唆された。本研究結果はICIを利用したより有効な複合的免疫療法開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although immune checkpoint inhibitors (ICI) improve clinical outcomes in numerous malignancies, the achievement of durable response is rare in many cancers and the anti-tumor effects of ICI cannot be expected in patients with an absence of CTLs in tumors. Development of new multidisciplinary treatment using immunotherapies and conventional treatment including chemotherapy is necessary for improving treatment outcomes of ICI. This study indicated that adoptive T-cell therapy combined with ICI potentiate the antitumor effects, partially resulting from Th1 polarization and the reduction of the number of Foxp3(+) cells in the tumor. In the study on the effect of anticancer drugs on immune checkpoint molecules, we observed that PD-L1 surface protein expression was enhanced, when pancreatic cancer cell lines were stimulated by anticancer drugs. We believe that our results of the present study will contribute to the development of new immune-based combination therapies.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：免疫チェックポイント阻害剤 がん免疫療法 細胞移入療法

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害剤の臨床開発がすすみ、複数のがん種において実臨床で使用され、これまでの殺細胞性抗がん剤ではみられなかったような効果を示している。しかし、その有効性は多くのがん種でおよそ2割程度であり、腫瘍特異的細胞障害性T細胞(CTL)がそもそも誘導されていない症例では、免疫チェックポイント阻害剤単独での効果は期待できない。腫瘍特異的 CTL 誘導を惹起することが、免疫チェックポイント阻害剤の奏功率を高めるための1つのアプローチと考えられ、がんワクチン療法との併用や養子免疫療法との併用などが検討されている。中でもがんに対して細胞傷害性を有する免疫細胞を体外で大量に作成し、患者に投与する養子免疫療法は、遺伝子改変技術や細胞培養技術の向上により、近年、様々な特性をもった免疫細胞の効率的な拡大培養が可能となり、免疫チェックポイント阻害剤の効果を高めるための併用療法として期待される。

ヒトフィブロネクチン組み換え蛋白である RetroNectin を用いたリンパ球拡大培養法は、高い培養効率とともに、有意に高い低分化型Tリンパ球含有率を示すことが報告されており、われわれは、この方法で拡大培養した細胞療法のがん患者における安全性を確認し、報告した(Ishikawa et al., PLoS One. 2014 31:9(1):e83786)。また、少量の末梢血より、高純度で高い活性化能を有する natural killer (NK)細胞を培養する方法を開発し、その臨床応用を進めている。

Tリンパ球だけでなく、NK細胞においても免疫チェックポイント分子は発現しており、RetroNectin 誘導低分化型Tリンパ球療法および高純度NK細胞療法と、免疫チェックポイント阻害剤との併用療法は、それぞれの抗腫瘍効果を相乗的に増強し、優れた複合的免疫療法となる可能性が期待されるが、臨床開発を念頭に、それらを実証するための基礎研究は十分には行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

① Tリンパ球療法およびNK細胞療法と免疫チェックポイント阻害剤との併用効果の検討を行い、その効果発現メカニズムを解明する。

② 抗がん剤治療も含めた既存治療と免疫療法との新たな複合的免疫療法開発のため、抗がん剤ががん細胞上の免疫チェックポイント分子の発現に与える影響について明らかにする。

3. 研究の方法

① マウス大腸がん細胞株 colon26 を同系 BALB/c マウスの皮下に移植し、脾細胞中の CD3 陽性細胞を retronectin, IL-2, IL-17 など刺激、拡大培養して得られたリンパ球を移入(day6とday13)した。この際、移入リン

パ球の分化度の違いによる差異を検討するため、CD62L low の分化型リンパ球と CD62L high の未分化型リンパ球に磁気ビーズを用いて分類し投与した。さらに、免疫チェックポイント阻害剤である抗 CTLA-4 抗体を投与し、その併用効果を比較検討した。

腫瘍近傍のリンパ節および腫瘍組織の腫瘍浸潤リンパ球の解析をおこなった。

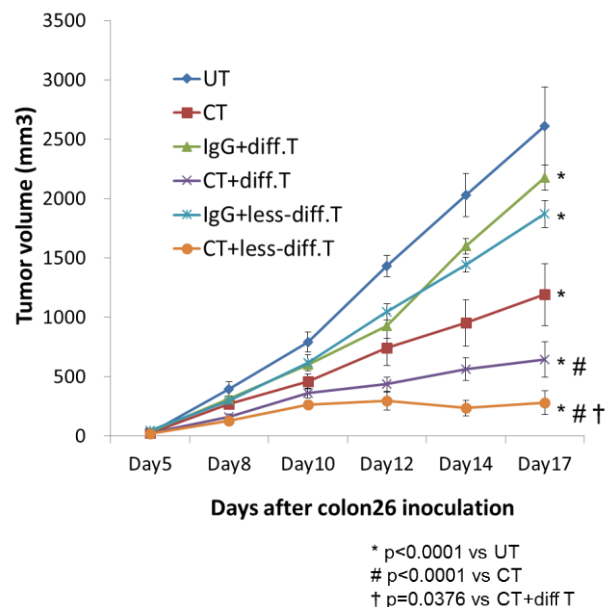
② ヒト膵癌細胞株である MIA PaCA-2, AsPC-1, 及びマウス膵癌細胞株である Pan02 を使用した。細胞を 3.0×10^5 / ml に調製後、Gemcitabine (GEM), paclitaxel (PTX), 5-fluorouracil (5FU) を添加し 37°C で 24-72 時間培養した後に、PD-L1 発現を flow cytometry (FCM) および qRT-PCR で評価した。また、AsPC-1 を抗腫瘍剤 (GEM, PTX, 5-FU) で刺激を行い、24-48 時間後に細胞を回収し STAT1 およびリン酸化 STAT1 の蛋白発現を western blot (WB) で解析した。AsPC-1 をプレートに播種し、JAK2 阻害薬 (AG490) で 1 時間刺激した後、抗腫瘍剤 (GEM, PTX, 5-FU) を加え、PD-L1 発現を FCM および qRT-PCR で評価した。

4. 研究成果

① 免疫細胞療法と免疫チェックポイント阻害剤の併用効果

抗 CTLA-4 抗体 (CT) 単独、Tリンパ球移入療法単独でも抗腫瘍効果がみられたが、それらを併用すると抗腫瘍効果はさらに増強した。リンパ球の分化度に注目すると、未分化型リンパ球と抗 CTLA-4 抗体との併用療法が最も高い抗腫瘍効果を発揮した (図1)。

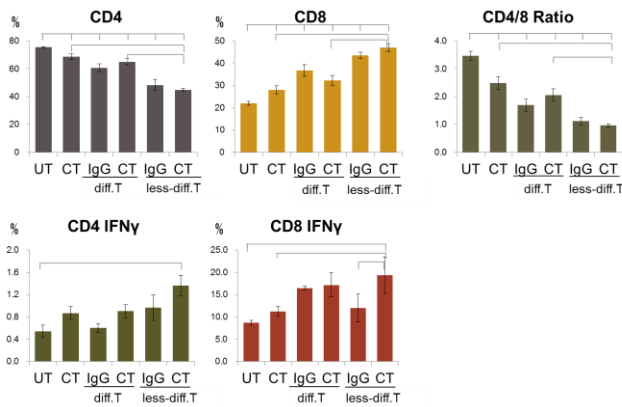
<図1>



ドレナージリンパ節のリンパ球の表現型を FCM で解析すると、抗 CTLA-4 抗体 (CT) 単投与および Tリンパ球移入により、CD8 陽性リンパ球の比率が上昇し、IFN γ 陽性 CD4 お

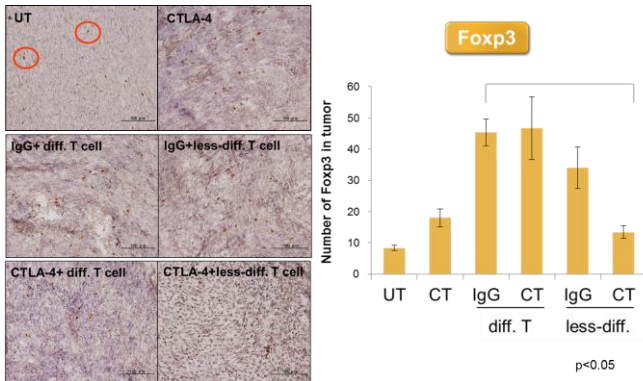
よび CD8 細胞が増加していた (図 2)。

<図 2>



腫瘍浸潤リンパ球の解析では、分化型 T リンパ球移入で Foxp3 陽性浸潤リンパ球が増加したが、未分化型 T リンパ球移入ではその増加はやや低く、CTLA-4 抗体を併用すると有意に増加は抑制された (図 3)。

<図 3>



さらに、腫瘍組織における WB では Th1 分化に関わる Tbet の発現が、治療介入群で亢進しており、抗-CTLA-4 抗体薬は、未分化型 T リンパ球移入療法において腫瘍局所 (腫瘍内、局所リンパ節) のリンパ球における Foxp3 発現を抑制し、Th1 へ誘導することで、細胞療法の抗腫瘍効果を増強していることが示唆された。

②抗がん剤が、がん細胞上の PD-L1 発現に及ぼす影響

FCM により各種抗がん剤の膵がん細胞上の PD-L1 発現に及ぼす影響を検討したところ、すべての抗がん剤 (GEM, 5FU, PTX) と膵がん細胞株 (ヒト膵癌細胞株 MIA PaCA-2, AsPC-1, 及びマウス膵癌細胞株 Pan02) の組み合わせで、抗がん剤刺激により PD-L1 発現は亢進した (図 4 Pan02 の FCM 結果)。

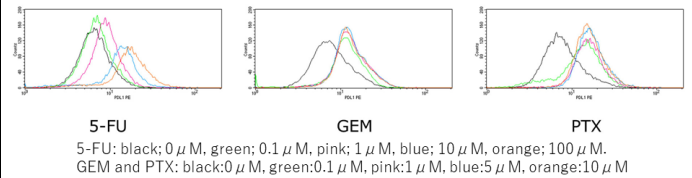
qRT-PCR による PD-L1 mRNA 発現の検討では、AsPC1 と Pan02 ではすべての抗がん剤で PD-L1 発現が増強したが、MIA PaCA-2 においては、GEM, 5FU においては PD-L1 mRNA の発現変化は認めなかった。

AsPC1 を用いて、抗がん剤刺激後の細胞内

シグナル伝達経路を解析すると、すべての抗がん剤刺激で STAT1 のリン酸化の亢進を認めた。抗がん剤刺激前に JAK2 阻害剤を添加しておくことで、抗がん剤誘導による PD-L1 発現は濃度依存性に減弱し、高濃度の JAK2 阻害剤存在下では、PD-L1 発現はほぼ完全にキャンセルされた。

<図 4>

Pan02



本検討により、膵臓がん診療で使用される各種抗がん剤は、膵臓がん細胞株において、JAK/STAT 経路を介してがん細胞上の PD-L1 発現を誘導することが示された。今後、臨床において、各種殺細胞性抗がん剤と免疫療法の併用療法を開発していくうえで、抗がん剤の免疫チェックポイント分子発現への影響も考慮する必要がある。

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 4 件)

- Doi T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Mizushima K, Yasuda T, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Naito Y, Itoh Y. The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1 expression in pancreatic cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2017;37(3):1545-1554. doi:10.3892/or.2017.5399 (査読有り)
- Matsuyama T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Adachi S, Mizushima K, Kimura R, Okajima M, Sakai H, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Itoh Y. Tumor inoculation site affects the development of cancer cachexia and muscle wasting. *Int J Cancer.* Int J Cancer. 2015 Dec 1;137(11):2558-65. doi:10.1002/ijc.29620. (査読有り)
- Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, Sakai F, Kato A, Tanabe M, Enoki T, Mineno J, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med.* 2015 Aug 25;13(1):277. doi:10.1186/s12967-015-0632-8. (査読有り)
- Ishikawa T, Adachi S, Okayama T, Kokura S, Mizushima K, Doi T, Matsuyama T, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Naito Y, Itoh Y,

Yoshikawa T. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 inhibition increases the anti-tumor activity of adoptive T-cell therapy when carried out with naïve rather than differentiated T-cells. *Oncol Rep.* 2015;33(5):2545-52. doi:10.3892/or.2015.3815. (査読有り)

[学会発表] (計 12 件)

1. 土井俊文、石川剛、岡山哲也、安田知代、岡要、坂元直行、鎌田和浩、堅田和弘、内山和彦、半田修、高木智久、内藤裕二、伊藤義人 抗癌刺激は JAK/STAT 経路を介し、膵癌細胞株の PD-L1 発現を亢進する 第 20 回日本がん免疫学会総会 H. 28 年 7 月 27 日～7 月 29 日 大阪・大阪国際交流センター
2. Doi T, Ishikawa T, Yasuda T, Okayama T, Oka K, Sakamoto N, Naito Y, Itoh Y. The expression of PD-L1 on human and murine pancreatic ductal adenocarcinoma is enhanced by anticancer agents via the JAK/STAT pathway. The 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 16-20, 2016, New Orleans (USA)
3. 土井俊文、石川剛、岡要、安田知代、岡山哲也、坂元直行、鎌田和浩、堅田和弘、内山和彦、半田修、高木智久、内藤裕二、伊藤義人. 抗癌剤は膵癌細胞株の PD-L1 発現を増強し、温熱処理は抗癌剤誘導 PD-L1 発現を抑制する 第 28 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 H. 27 年 12 月 3 日・4 日 川越・川越東武ホテル
4. 岡要、土井俊文、石川剛、岡山哲也、安田知代、坂元直行、堅田和弘、鎌田和浩、内山和彦、半田修、高木智久、内藤裕二、伊藤義人 膵癌細胞株における PD-L1 発現に対する抗癌剤、及び温熱治療の影響についての検討 The influence of anticancer agents and heat treatment on PD-L1 expression on pancreatic cancer cell lines. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日 名古屋・名古屋国際会議場
5. Sakamoto N, Ishikawa T, Doi T, Okayama T, Konishi H, Kokura S, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. Elevated levels of plasma VEGF associated with the attenuation of whole blood IFN- γ production and QOL impairment in patients with advanced gastric cancer. 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 20, 2015. Philadelphia (USA)
6. Doi T, Okayama T, Ishikawa T, Oka K, Sakamoto N, Naito Y, Itoh Y. The influence of anticancer agents and hyperthermia on PD-L1 expression on human and murine pancreatic cancer cell lines. 106th Annual Meeting of the American

Association for Cancer Research, April 20, 2015. Philadelphia (USA)

7. Ishikawa T, Sakamoto N, Okayama T, Kokura S, Ideno M, Kato A, Enoki T, Kitagawa M, Mineno J, Yasuda T, Doi T, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. A novel expansion method for functional natural killer cells and its clinical application. 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 21, 2015. Philadelphia (USA)
8. 岡山 哲也, 石川 剛, 坂元 直行, 古倉 聡, 出野 美津子, 加藤 彰子, 榎 竜嗣, 峰野 純一, 吉田 直久, 鎌田 和浩, 堅田 和弘, 内山 和彦, 半田 修, 高木 智久, 小西 英幸, 八木 信明, 内藤 裕二, 吉川 敏一, 伊藤 義人 NK 細胞を用いた胃癌に対する Trastuzumab の抗腫瘍効果増強についての検討 JDDW2014 2014 年 10 月 24 日 神戸・神戸国際会議場
9. 坂元 直行, 石川 剛, 岡山 哲也, 出野 美津子, 榎 竜嗣, 峰野 純一, 古倉 聡, 内藤 裕二, 伊藤 義人, 吉川 敏一 進行・再発消化器がんを対象とした新規培養法を用いた高純度 NK 細胞療法の第 I 相臨床試験 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日 横浜・パシフィコ横浜
10. 石川 剛, 足立 聡子, 岡山 哲也, 岡 要, 土井 俊文, 坂元 直行, 鎌田 和浩, 内山 和彦, 半田 修, 高木 智久, 古倉 聡, 内藤 裕二, 伊藤 義人 CTLA-4 阻害薬は分化型よりも未分化型 T 細胞を用いた養子免疫療法との併用においてより強い効果を発揮する 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日 横浜・パシフィコ横浜
11. Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Sakamoto N, Ideno M, Muraki N, Kato A, Enoki T, Mineno J, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. Advantages and clinical application of fibronectin CH296-stimulated T cells in cancer immunotherapy 105th AACR Annual Meeting 2014, April 7, San Diego, CA (USA)
12. Okayama T, Kokura S, Ishikawa T, Sakamoto N, Ideno M, Sakai F, Kato A, Enoki T, Mineno J, Konishi H, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. High purity and activity NK cells therapy in patients with advanced gastrointestinal cancer: Phase I study 105th AACR Annual Meeting 2014, April 7, San Diego, CA (USA)

[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：
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

石川 剛 (ISHIKAWA Takeshi)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：90372846

(2) 研究分担者

岡山 哲也 (OKAYAMA Tetsuya)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：30636535

坂元 直行 (SAKAMOTO Naoyuki)
公益財団法人 ルイ・パストゥール医学研
究センター・がん免疫医科学研究室・研究
員
研究者番号：40547981

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()