

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461561

研究課題名(和文) 小児がんに対する抗体療法を増強する革新的免疫細胞療法の開発

研究課題名(英文) a novel adoptive T cell therapy exerting ADCC for pediatric cancer

研究代表者

工藤 耕 (Kudo, Ko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20455728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：キメラ型人工受容体(CAR)を用いたT細胞を用いて、抗体療法の効果を増強する新規細胞免疫療法の開発を試みた。はじめにADCCを引き起こすシグナル伝達の改良に関し、CD3zetaに追加して、NK細胞のADCCで利用されている FcγR1 のシグナル伝達分子を追加して組み込んだ遺伝子改変T細胞を作成しADCCの増強が得られるか検討を行い、細胞傷害性、細胞増殖能は同等ないし減弱し、効果の改良には至らなかった。薬剤投与によるがん抗原の発現増加によるADCC増強の検証を行ったが、薬剤処理によりがん特異的抗原の発現が上昇するが、遺伝子改変T細胞の抗腫瘍効果も阻害されることが判明した。

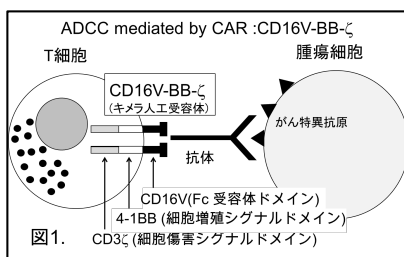
研究成果の概要(英文)：We had already developed chimeric receptor called CD16V-BB-zeta that exerts antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in combination with therapeutic antibodies. The aim of this study was to develop a novel adoptive T cell therapy that improve ADCC using genetically modified chimeric receptor with additional signaling. We generated a new chimeric receptors consisting two signaling molecules of CD3 zeta and Fc epsilon RI gamma to improve ADCC. We transduced this receptor to activated primary T cells and evaluated if additional signaling of Fc epsilon RI gamma improve ADCC. However, no additional improvement was detected on both cytotoxicity and cell proliferation. We also checked if drug administration improve ADCC, which was exerted by CD16V-BB-zeta transduced T cells combined with therapeutic antibodies. Although drug treatment including HDAC inhibitors demonstrated upregulation of tumor specific antigen, no additional cytotoxicity was detected.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：抗体依存性細胞障害 免疫療法 小児がん 抗体療法

## 1. 研究開始当初の背景

キメラ型受容体 (Chimeric antigen receptor: CAR)を用いた遺伝子改変 T 細胞免疫療法は、近年、顕著な有効性が証明された免疫細胞療法の一つである。我々はこの技術に抗体療法を融合した、「抗体製剤との併用で抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を発揮する CAR として、CD16V-BB- $\zeta$ を用いたがんに対する革新的な免疫細胞療法」を開発した。遺伝子導入された細胞は、抗体投与により自己増幅し、同時に抗体依存性細胞傷害を飛躍的に増強する、さらに、抗体の種類を変えても同様の効果を示す万能型 CAR であることを示し、臨床応用を視野に入れている。(Cancer Res2014) (図 1)



しかしながら、CARにおいて、どのようなシグナル伝達分子の組み合わせが最も強力な抗体依存性細胞傷害を示すのかについては未解決であった。また、糖鎖構造改変した高結合型抗体製剤や複数の抗体製剤併用など、抗体側の多様性の本治療法に対する抗体依存性細胞傷害への影響は明らかになっておらず、その解明はより効果的な細胞免疫療法の開発に極めて重要であると考えられた。さらには、細胞免疫療法において、標的とするがん特異抗原の発現低下や消失はその効果を減弱させる。したがって、腫瘍細胞表面の抗原を制御し抗体療法の効果を増強させる新規薬剤の開発は魅力的である。「どのような薬剤か?」「どのような抗原の発現増加を引き起こすか?」「実際に抗腫瘍効果を増強させるか?」は現在分かっておらず、様々な薬剤を用いて、その効果を迅速に知ることができる実験系の開発が切実に求められていた。これらの課題に取り組み、より効果的な T 細胞療法と抗体療法による併用治療法の開発を目指し、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

具体的には以下の目的 3 点に焦点を絞って研究を行った。

- (1) 最も強力な抗体依存性細胞傷害を発揮する CAR のシグナル伝達分子を同定すること。異なるシグナル伝達分子をもつ CAR を作成し、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入しヒト腫瘍細胞あるいは腫瘍細胞株に対する抗腫瘍効果を測定し、至適シグナル分子の組み合わせを同定する。
- (2) 様々な抗体製剤併用時の抗腫瘍効果を

測定すること。複数のがん抗原を同時に発現するヒト腫瘍細胞または腫瘍株に対して複数のモノクローナル抗体製剤の存在下で抗腫瘍効果を測定する。

- (3) 薬剤投与により腫瘍細胞表面のがん特異抗原発現を増加させ、抗体依存性細胞傷害により抗腫瘍効果の増強を検証すること。腫瘍細胞株を薬剤処理し、がん特異抗原の過剰発現を確認後、抗体製剤の存在下で抗体依存性細胞傷害活性を測定する。

## 3. 研究の方法

(1) 「最も強力な抗体依存性細胞傷害活性を発揮する CAR のシグナル伝達分子を同定」について以下の実験を行った。NK 細胞における CD16 分子を介した抗体依存性細胞傷害においては、細胞傷害性シグナルとして CD3 $\zeta$  または Fc $\epsilon$ R  $\gamma$  の二つのシグナル伝達分子が利用されている。このため Fc $\epsilon$ R  $\gamma$  シグナル分子をさらに加えることで抗体依存性細胞傷害の増強が得られるという仮説に基づき、Fc $\epsilon$ R  $\gamma$  シグナルを組み込んだ異なるシグナル伝達分子をもつ CAR ベクターを作成した。レトロウイルスベクターを用い、遺伝子導入を行い 24 時間後にウイルス上清を回収し、末梢血単核球を抗 CD3/CD28 ビーズおよび IL-2 で刺激した活性化 T 細胞に対して、でウイルス上清を加えて遺伝子導入し、GFP で遺伝子導入効率を、抗 CD16 抗体で受容体発現率を確認して、遺伝子改変 CAR-T 細胞を作成した。標的細胞株と抗体製剤存在下に共培養し、抗腫瘍効果及び細胞増殖能に関して解析を行った。抗腫瘍効果である ADCC 活性は、カルセイン染色蛍光色素法を用いた細胞傷害性試験を行い、また、細胞増殖試験は抗体存在下に標的細胞株と培養し細胞数測定により行った。

(2) 「様々な抗体製剤併用による抗体依存性細胞傷害活性の増強効果」については以下の実験を行った。異なる複数の抗体を同時に使用することで相乗効果を示す可能性がある。この仮説を検証するため、複数のがん抗原発現腫瘍細胞株を使用し、対応する複数の抗体製剤カクテルによる抗体依存性細胞傷害活性を測定し CD16V-BB- $\zeta$  T 細胞療法と抗体カクテル療法の併用効果を解析した。

(3) 「薬剤投与により腫瘍細胞のがん特異抗原発現を増加させ、CD16V-BB- $\zeta$  T 細胞療法の抗体依存性細胞傷害増強」に関し、以下の実験を行った。CD20 弱陽性急性リンパ性白血病細胞株 OP-1 を用いて、Histone deacetylase inhibitor 処理を行い、24 時間後に細胞表面 CD20 発現を FACS で測定した。次に、抗 CD20 抗体製剤 (Rituximab) 存在下で活性化 NK 細胞による抗体依存性細胞傷害活性を測定した。ひきつづき、同様に薬剤処理した OP-1 を用いて CD16V-BB- $\zeta$  T 細胞

胞と抗 CD20 抗体を加えて培養を行い、抗体依存性細胞傷害活性を測定し、薬剤処理しなかった群での抗腫瘍効果と比較を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗体依存性細胞傷害を發揮する CAR 至適シグナル分子の決定

CD16V-BB- $\zeta$ - $\gamma$ 受容体を作成し、ヒト T 細胞に遺伝子導入を行い、抗体存在下での細胞傷害性および細胞増殖能を解析した。はじめに、抗腫瘍効果を解析する目的で標的細胞を Daudi 細胞として、Rituximab 存在下にカルセイン染色蛍光色素法を用いた細胞傷害性試験を行い、抗体依存性細胞傷害活性を測定し、シグナルドメインに Fc $\epsilon$ R  $\gamma$ をもたない CD16V-BB- $\zeta$ による抗体依存性細胞傷害活性と比較を行った。シグナルドメインに Fc $\epsilon$ R  $\gamma$ を加えると細胞傷害性は、細胞増殖能は同等ないし減弱することが判明し効果の改良には至らなかった。(図1.)

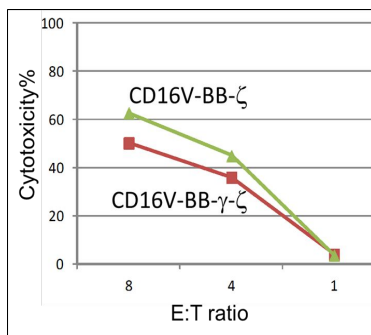


図1. CD16V-BB- $\zeta$ - $\gamma$ 受容体の ADCC 活性 標的細胞 Daudi 細胞に対する、Rituximab 存在下での ADCC 活性を測定したところ、CD16V-BB- $\zeta$ に比べて同等あるいは低い ADCC 活性を示した。

##### (2) 抗体製剤併用による CD16V-BB- $\zeta$ T 細胞療法の抗体依存性細胞傷害増強効果

我々は CD19、CD20 共発現している細胞株 NALL-1 に対して、抗 CD19 抗体製剤および抗 CD20 抗体製剤を同時に投与し遺伝子改変 CD16V-BB- $\zeta$ 発現 T 細胞による抗体依存性細胞傷害活性を測定したところ、図2. のように相乗効果を得た(未発表)。

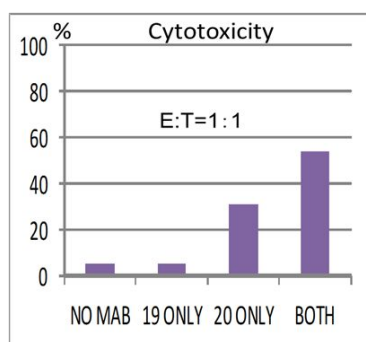


図2. 抗 CD19、抗 CD20 両方陽性の NALL-1 細胞株に対する抗腫瘍効果。左から抗体を加えない群、抗 CD19 抗体のみ加えた群、抗 CD20 抗体のみ加えた群、両方の抗体を加えた群の ADCC 活性を示す。両方の抗体を加えた群では単一抗体療法に比べて高い ADCC 活性を示した。

また、小児神経芽腫の腫瘍組織標本の免疫染色で CD30 の発現の高い腫瘍が一部存在し、腫瘍株に発現しているものを特定した。この腫瘍細胞株を用いて、抗 GD2 抗体製剤と抗 CD30 抗体製剤の併用で相乗効果が得られるか、抗体依存性細胞傷害試験を現在行っている。

##### (3) 薬剤投与による CD16V-BB- $\zeta$ T 細胞療法の抗体依存性細胞傷害増強効果

CD20 弱陽性急性リンパ性白血病細胞株 OP-1 を用いて、Histone deacetylase inhibitor (HDACi)処理を行い、24 時間後に細胞表面 CD20 発現を FACS で測定したところ、発現の亢進が認められた。陽性細胞率 11%から 29%に増加し MFI においても有意に上昇を認めた。

次に、抗 CD20 抗体製剤 (Rituximab) 存在下(1 $\mu$ g/mL)に CD16V-BB- $\zeta$  T 細胞と標的細胞である CD20 陽性 B 細胞リンパ腫 Daudi 細胞と共培養を行い、抗体依存性細胞傷害活性を測定し、薬剤処理しなかった群の ADCC 活性と比較を行った。結果は図3. に示すように薬剤処理で標的とする表面抗原の発現が増加しても、有意な抗腫瘍効果の上昇は得られなかった。

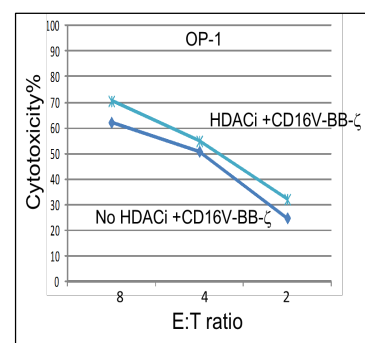


図3. HDACi による CD16V-BB- $\zeta$ 療法の抗体依存性細胞傷害活性 薬剤処理 48 時間後に Rituximab 存在下に細胞傷害性試験により抗腫瘍効果を比較した。薬剤処理を行わない群と比較し有意な上昇が認められなかった。

NK 細胞の実験系では HDACi 薬剤処理による免疫能に対する負の影響により細胞傷害性が低下することが報告されており、遺伝子改変 T 細胞療法においても同様の現象が起きている可能性が示唆された。

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 1件)

工藤 耕, 「T Lymphocytes Expressing a CD16 Signaling Receptor Exert Antibody-Dependant Cancer Cell Killing」  
第76回日本血液学会 2016年11月2日、大阪国際会議場(大阪府-大阪市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 6件)

1. 名称: Chimeric receptor that triggers antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors

発明者: Campana, Dario and Kudo, Ko

権利者: UNUM Therapeutics

番号: 13243N-PCT/JP

出願年月日: 2016年11月10日

国内外の別: 国内

2. 名称: Chimeric receptor that triggers antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors

発明者: Campana, Dario and Kudo, Ko

権利者: UNUM Therapeutics

番号: 13243N-PCT/EP

出願年月日: 2016年8月24日

国内外の別: 国外

3. 名称: Chimeric receptor that triggers antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors

発明者: Campana, Dario and Kudo, Ko

権利者: UNUM Therapeutics

番号: 13243N-PCT/ZA

出願年月日: 2016年4月22日

国内外の別: 国外

4. 名称: Chimeric receptor that triggers antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors

発明者: Campana, Dario and Kudo, Ko

権利者: UNUM Therapeutics

番号: 13243N-PCT/IL

出願年月日: 2016年4月13日

国内外の別: 国外

5. 名称: Chimeric receptor that triggers antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors

発明者: Campana, Dario and Kudo, Ko

権利者: UNUM Therapeutics

番号: 13243N-PCT/AU

出願年月日: 2016年3月31日

国内外の別: 国外

6. 名称: Chimeric receptor that triggers antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors

発明者: Campana, Dario and Kudo, Ko

権利者: UNUM Therapeutics

番号: 13243N-PCT/US

出願年月日: 2015年5月21日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤 耕 (KUDO, Ko)

弘前大学医学部附属病院・助教

研究者番号: 20455728

(2)研究分担者

土岐 力 (TOKI, Tsutomu)

弘前大学大学院医学研究科・講師

研究者番号: 50195731

(3)研究分担者

佐藤 知彦 (SATO, Tomohiko)

弘前大学医学部附属病院・助教

研究者番号: 70587005

(辞職のため平成26年度のみ)

(4)連携研究者

伊藤 悦朗 (ITO, Etsuro)

弘前大学大学院医学研究科・教授

研究者番号: 20168339

(4)研究協力者

Dario Campana

National University of Singapore,

Department of Pediatrics