

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830112

研究課題名(和文)細胞免疫療法と抑制系免疫チェックポイント阻害剤との併用についての基礎的検討

研究課題名(英文)Fundamental study on combination of cellular immunotherapy and suppressive immune checkpoint inhibitor

研究代表者

岡山 哲也(Okayama, Tetsuya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30636535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞免疫療法と、抑制系免疫チェックポイント阻害剤との併用についての基礎的検討を行うことを主目的としている。マウスNK拡大培養率が不十分であったため、マウス脾臓より直接NK細胞を分離し、細胞数が予定より少なくなるため、局所投与とした。加えて、抗PD-1抗体薬についても、局所投与とし、濃度を検討し、10µg/匹を至適濃度とした。これらの条件を元に、併用による検討を行い、抗PD-1抗体薬、NK細胞療法それぞれの単独治療に比べ、併用療法にて抗腫瘍効果が高まる結果であり、今後この結果に対する詳細な検討を予定している。

研究成果の概要(英文)：The main objective of this research is to conduct basic studies on the combination of cellular immunotherapy and suppressive immune checkpoint inhibitor. Since the expansion rate of mouse NK expansion was insufficient, NK cells were separated directly from mouse spleen, and the number of cells was smaller than planned, so we administrated NK cells to local tumor site directly. In addition, we planned to administer the anti-PD-1 antibody drug locally, the concentration was examined, and we decided the optimum concentration was 10 µg / mouse. Based on these conditions, combined study was conducted and the anti-tumor effect was enhanced by combination therapy compared with single treatment of each of anti-PD-1 antibody drug and NK cell therapy, and we will plan to examine detail of this result.

研究分野：癌免疫療法

キーワード：癌免疫療法 細胞療法 免疫チェックポイント阻害剤

1. 研究開始当初の背景

現在、癌に対する標準治療として手術療法や化学療法、放射線治療などが行われているが、1981年以降30年以上に渡って癌は死因の第1位を占め続けており、新たな治療法の確立は急務である。

近年、癌に対する新たな治療法として免疫治療が注目されており、米国FDAにて2つの免疫治療が認可されるに至り (Sipuleucel-T療法、抗CTLA-4抗体療法; ipilimumab)、免疫治療が癌治療の主要な部分を占める新時代を迎えている。

細胞免疫治療は、癌抗原特異的な治療法であるワクチン療法が中心に推進され、基礎・臨床研究も多数行われているが、腫瘍細胞はHeterogeneousな細胞集団であるため、ワクチン療法では腫瘍内の抗原が一致する一部の腫瘍細胞しか標的に出来ず、効果が限定的である可能性が示唆されている。

一方、体外で免疫担当細胞を培養し、体内へ再度移入する細胞免疫療法は、ワクチン療法とは異なり非特異的な治療法であるため、単独使用では効果が低く、現在まで主要な免疫療法とは考えられていなかった。

細胞免疫療法の効果が低かった原因として、癌によって腫瘍局所で引き起こされている免疫抑制機序が、移入した免疫細胞による効果の低下に強く関与していることが明らかとなってきたため、この免疫抑制環境を解除することによる細胞免疫治療の効果増強の検討が行われてきた。

Rosenbergらは、強力な抗癌剤による前処置を行い、体内の血球を全て除去することによって、癌により引き起こされている免疫抑制環境の解除を行い、その後、事前に体外で培養していた自己リンパ球を移入することにより、大きな治療効果を得たが (Rosenberg SA et al, J Clin Oncol, 2008)、幹細胞移植に匹敵する強力な化学療法による前処置が必要であり、リスクが大きすぎたため普及

は困難であったが、近年免疫抑制機序を引き起こしている細胞間の抑制系因子: 抑制系免疫チェックポイントに着目し、この細胞間の抑制系免疫チェックポイントを阻害することにより、免疫抑制機序を解除する薬剤の応用が始まっている。

先述の抗CTLA-4抗体薬もその一種であり、更に他の抑制系免疫チェックポイントであるPD-1や、そのリガンドであるPD-L1を阻害する薬剤による臨床応用も始まり、有望な報告がなされ始めている (Sznol M et al, Clin Cancer Res, 2013)。これらの結果は、細胞免疫療法と併用することにより相乗効果が得られる可能性を示唆している。

また、リンパ球療法の質的検討として、既に臨床応用されている従来からのリンパ球療法で用いられている培養方法では成熟したリンパ球が多く培養されてくるが、理論的には培養細胞が成熟したリンパ球に比べ未熟: ナイーブなリンパ球である方が体内に移入した後の増殖能や、新たな癌認識の獲得能などが高いため、より一層効果が高まる可能性が示唆されており (Gattinoni L et al, Nat Rev Immunol, 2006)、ナイーブリンパ球が豊富なリンパ球療法が理想とされていたが、培養が困難であった。しかし、われわれのグループはFibronectinの組み換えタンパク質であるRetroNectinを用いることによって従来よりもナイーブなリンパ球を多い比率で培養することに成功し (Yu SS et al, Cancer Gene Ther, 2008)、このナイーブリッチな培養細胞を体内へ移入するナイーブリッチリンパ球療法 (以下RIT療法) に対する第相臨床試験を実施し、安全性を確認した上で、既に臨床応用を行っている。

更に、われわれのグループは従来の方法より高純度なNK細胞の培養技術を確立し、高純度NK細胞療法に対しての第I相試験も行い、単独治療での安全性を確認した (Sakamoto N et al. J Transl Med, 2015.)

更なる効果増強への手段として、NK 細胞が有する ADCC 活性を利用した第 Ⅲ 相臨床試験も行っている。

このような状況であるため、われわれはこれらの細胞免疫療法と、抑制系免疫チェックポイント阻害剤との併用を近々開始することが出来るアドバンテージを有しており、理論上は相乗効果を得る可能性が高いが、安全かつ効果的な両者の併用についての検討は、世界でも報告は全く行われておらず不明であり、臨床応用が目前に迫っている現在、基礎的検討を行うことは喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、前述の研究背景を踏まえ、細胞免疫療法と、腫瘍局所での免疫抑制環境を解除する抑制系免疫チェックポイント阻害剤との併用についての基礎的検討を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

近年 NK 細胞は活性化することによって CTLA-4 分子が発現してくることや(Karo J et al. J Immunology, 2012)、PD-1 分子の発現も報告されている(Norris S et al. Viral Immunol, 2012)。

一方、リンパ球については、ナイーブリンパ球に CTLA-4 分子が高発現していること、またナイーブリンパ球が成熟し、エフェクター細胞になることにより PD-1 分子の発現が高まることが知られている。

更に、CTLA-4 分子は免疫抑制系細胞である Treg などにも発現しているため、サイトカインなどによる影響も検討する必要があると思われる。

故に、NK 細胞療法、リンパ球療法両者とも、抗 CTLA-4 抗体薬、抗 PD-1 抗体薬との併用の検討を行う必要があると思われる。

1) 担癌マウスに対する NK 細胞療法と抗 CTLA-4 抗体薬、抗 PD-1 抗体薬との併用の検討

討

2) 担癌マウスに対する RIT 療法と抗 CTLA-4 抗体薬、抗 PD-1 抗体薬との併用の検討

3) 担癌マウスに対する NK 細胞療法、RIT 療法と抗 CTLA-4 抗体薬、抗 PD-1 抗体薬との併用の検討

を行い、各種細胞免疫治療と、各種抑制系免疫チェックポイント阻害剤との併用による抗腫瘍効果や、免疫学的検討を研究計画提出時には予定しており、細胞免疫療法；ナイーブリンパ球療法・高純度 NK 細胞療法と抑制系免疫チェックポイント阻害剤；抗 CTLA-4 抗体・抗 PD-1 抗体薬との併用による効果増強の方法論や、免疫学的評価、副作用の発現などについての基礎的検討を行うため、以下のような研究計画を当初立てていた。

研究計画 1；担癌マウスモデルにおける、ナイーブリンパ球療法と抗 CTLA-4 抗体薬との併用による抗腫瘍効果の検討

研究計画 2；担癌マウスモデルにおける、ナイーブリンパ球療法と抗 PD-1 抗体薬との併用による抗腫瘍効果の検討

研究計画 3；担癌マウスモデルにおける、高純度 NK 細胞療法と抗 CTLA-4 抗体薬との併用による抗腫瘍効果の検討

研究計画 4；担癌マウスモデルにおける、高純度 NK 細胞療法と抗 PD-1 抗体薬との併用による抗腫瘍効果の検討

研究計画 5；担癌マウスモデルにおける、ナイーブリンパ球療法、高純度 NK 細胞療法と抗 PD-1 抗体薬、抗 CTLA-4 抗体薬との併用による抗腫瘍効果の検討

これらの検討のうち、実際に本研究機期間内に、行えた研究方法としては、

- 1) マウスからの NK 細胞取得手技の確定
- 2) マウス NK 細胞の PD-1 発現の有無

3) 使用予定のマウス大腸がん細胞株である Colon26 の PD-L1 発現の有無

4) マウス大腸がん皮下腫瘍移植モデルにおける抗 PD-1 抗体薬の至適濃度の決定

5) マウス大腸がん皮下腫瘍移植モデルにおける NK 細胞単独治療の至適細胞数の決定

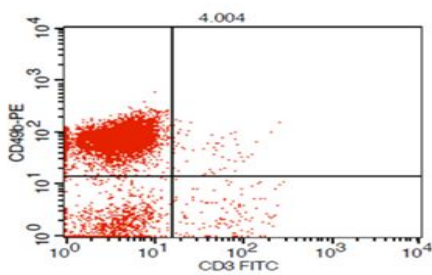
6) マウス大腸がん皮下腫瘍移植モデルにおける抗 PD-1 抗体薬と NK 細胞併用療法の抗腫瘍効果の検討

であり、次項の研究成果にて詳細を述べる。

4. 研究成果

1) マウスからの NK 細胞取得手技の確定

以前の共同研究者らの検討では、免疫不全マウスである SCID マウスより、脾臓細胞に IL2 刺激を行うことで、NK 細胞の拡大培養の手技は確立していた。同様の手技にて、今回使用予定であった BALB/c マウスにて同様に検討を行ったが、全脾臓細胞や予め脾臓より NK 細胞を分離し、IL2 刺激にて培養を行うなど、様々な条件設定で拡大培養を行ったが、安定した拡大培養は困難であった。そのため、本研究に用いる NK 細胞は、BALB/c マウスの脾臓より、NK 細胞を磁気にて分離する方法を取ることとした。分離した細胞が純度の高い NK 細胞であることを確認し、平均して、1 匹のマウス脾臓より $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の NK 細胞を取得することが出来た。

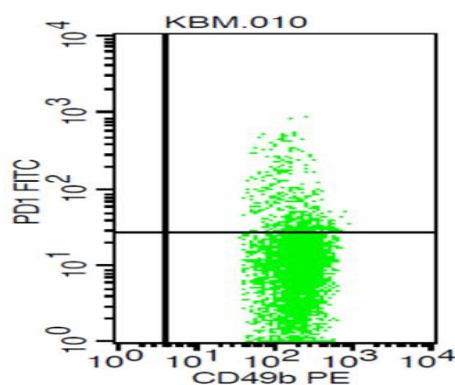


Quad	% Gated	% Total
UL	0.00	0.00
UR	10.61	4.25
LL	0.00	0.00
LR	89.39	35.79

2) マウス NK 細胞の PD-1 発現の有無

既報(Norris Set al. Viral Immunol 2012)では、NK 細胞にも、抑制系免疫チェックポイントである PD-1 発現が報告されている。本研究で使用する BALB/c マウスの NK 細胞が PD-1 発現を有するか検討した。

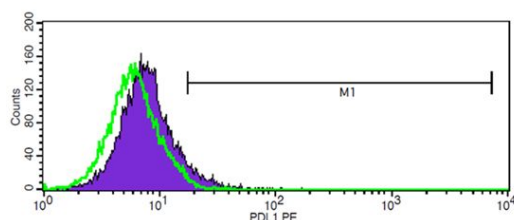
前述の脾臓より磁気分離した NK 細胞について、PD-1 発現について FACS を行い、PD-1 発現を有することを確認した。



Quad	% Gated	% Total
UL	83.47	49.37
UR	0.96	0.57
LL	13.51	7.99
LR	2.06	1.22

3) 使用予定のマウス大腸がん細胞株である Colon26 の PD-L1 発現の有無

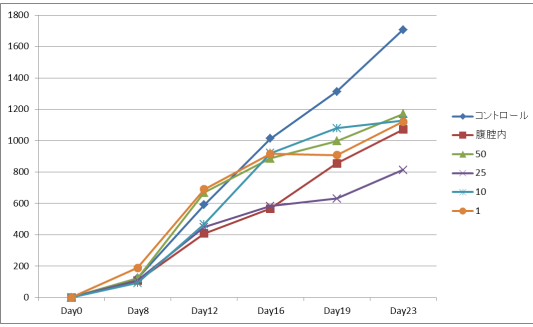
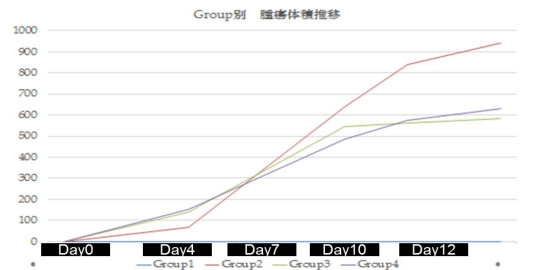
本研究で使用する BALB/c マウスの NK 細胞での PD-1 発現は確認できたため、次に、本研究で使用する BALB/c マウスの大腸がん細胞株である Colon26 細胞での PD-L1 発現について、FACS を行ったところ、Colon26 に PD-L1 発現を認めることを確認した。



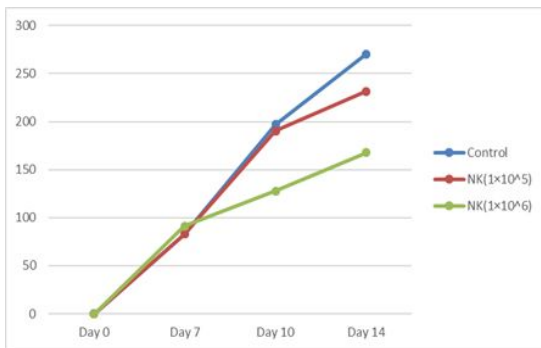
4) マウス大腸がん皮下腫瘍移植モデルにおける抗 PD-1 抗体薬の至適濃度の決定

マウス大腸がん細胞株である、Colon26

を皮下移植し、皮下腫瘍モデルを作成した。その上で、抗 PD-1 抗体薬の全身投与としての腹腔内投与を行ったところ、100 μg と 250 μg 投与にて、抗腫瘍効果の差がなかったことより、100 μg を抗 PD-1 抗体薬の全身投与における投与量の基準と設定した。ただ、昨今抗 PD-1 抗体薬の非常な高薬価が社会的に問題となっており、さらに当初想定されていたより遥かに全身的な強い副作用の発現も判明してきており、これらへの対策も喫緊の課題となってきた。近年免疫チェックポイント阻害剤の局所投与にて効果があった報告があり (Aurelien M et al. J Clin Invest, 2013) 局所投与を検討した。腹腔内投与と同様の効果を 10 μg でも得たため、今後の検討は、10 μg にて行うこととした。



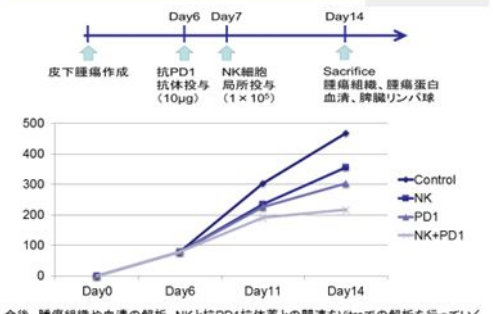
5) マウス大腸がん皮下腫瘍移植モデルにおけるNK細胞単独治療の至適細胞数の決定
マウスNK細胞の全身投与では、以前の検討では、 1×10^7 個のNK細胞を全身投与していた。局所投与であり、 1×10^6 個以下の検討を行ったところ、ほぼ容量依存性に抗腫瘍効果を認め、今後の併用での検討を考慮し、局所投与の細胞量を 1×10^5 個に設定した。



6) マウス大腸がん皮下腫瘍移植モデルにおける抗PD-1抗体薬とNK細胞併用療法の抗腫瘍効果の検討

マウス大腸がん細胞株を皮下移植し、NK細胞投与前日に抗PD-1抗体薬を投与するモデルにおいて、各単独治療に比べ、併用療法において、抗腫瘍効果の増強を認める結果を得た。今後、この結果について、詳細な検討を行うことを予定している。

NK細胞と抗PD1抗体薬局所投与併用についての検討



今後、腫瘍組織や血清の解析、NKと抗PD1抗体薬との関連をVitroでの解析を行っていく

<引用文献>

Rosenberg SA et al, J Clin Oncol, 2008.
 Sznol M et al, Clin Cancer Res, 2013.
 Gattinoni L et al, Nat Rev Immunol, 2006.
 Yu SS et al, Cancer Gene Ther, 2008.
 Sakamoto N et al. J Transl Med, 2015.

Karo J et al. J Immunology, 2012.
Norris S et al. Viral Immunol,
2012.
Aurelien M et al. J Clin Invest,
2013

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

岡山 哲也 (Okayama, Tetsuya)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研
究院)・助教
研究者番号：30636535

(2)研究協力者

水島 かつら (Mizushima, Katsura)
安田 知世 (Yasuda, Tooyo)
土井 敏文 (Doi, Toshifumi)
石川 剛 (Ishikawa, Takeshi)