

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2012～2015  
課題番号：24390326  
研究課題名(和文)キメラ抗原受容体導入発現 T細胞による悪性胸膜中皮腫の免疫療法  
研究課題名(英文)Chimeric antigen receptor gamma delta T cell immunotherapy for the treatment of malignant mesothelioma  
研究代表者  
中島 淳(Nakajima, Jun)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：90188954  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：難治性の疾患である胸膜中皮腫に対する抗原特異的免疫細胞治療を開発するため、T細胞にメソテリン特異的受容体遺伝子(MesoCAR)を導入する技術を確立した。In vitro/ in vivoでのMesoCAR+ T細胞の抗腫瘍効果が確認された。MesoCAR+ T細胞と比較し、遜色ない抗腫瘍効果だった。正常組織に対するoff-tumor/on-target toxicityは認められず、移植片対宿主病も誘導されなかった。MesoCAR+ T細胞を用いた免疫治療は、胸膜中皮腫含むメソセリン陽性腫瘍に対して副作用を起こさずに抗腫瘍効果を発揮する有効な治療法となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To develop antigen-specific immunotherapy for malignant mesothelioma, we established mesothelin-specific chimeric antigen receptor (MesoCAR) induced T cells. MesoCAR mRNA was transduced into T cells, and optimal conditions of MesoCAR+ T cell adoptive therapy for in vivo and in vitro mesothelioma models were investigated. Anti-tumor effects of MesoCAR+ T cells were observed, and the anti-tumor effects were comparable to or might be better than those of MesoCAR+ T cells. Off-tumor/on-target toxicity to normal tissues was not seen, and the graft-versus host disease was not induced. MesoCAR+ T cell adoptive therapy may be an effective treatment without causing major side-effects for mesothelioma or other mesothelin-positive tumors.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：胸膜中皮腫 細胞移入治療 T細胞 メソテリン CAR NOGマウス 細胞傷害活性 抗腫瘍効果

### 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は比較的まれな疾患であり、日本における年間死亡者数は 1258 人(2011 年)だが、10 年前(2001 年)の年間死亡数 772 人と比較すると 1.5 倍以上に増加している。治療は化学療法、手術、放射線が行われるが、大半の患者は受診時にすでに進行しており、全生存期間の中央値は約 1 年とも言われている。この難治性疾患に対する有効な治療法の確立が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性疾患である胸膜中皮腫に対する抗原特異的免疫細胞治療を開発することである。末梢血から採取した患者の自己  $\gamma\delta$  T 細胞にメソテリン特異的受容体遺伝子 (MesoCAR) を導入して中皮腫細胞特異的なキラー T 細胞へと改変し、再び患者に投与する細胞移入治療の開発である。

### 3. 研究の方法

- (1) がん患者に対する自己  $\gamma\delta$  T 細胞移入治療の臨床試験データを用いて、免疫モニタリング法について検討した。
- (2)  $\gamma\delta$  T 細胞へのメソテリン特異的受容体 (MesoCAR) 導入技術を確認し、MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞のエフェクター機能解析を行った。
- (3) NOD/Shi-scid, IL-2R-KO Jic マウス(通称 NOG マウス)を用いた悪性中皮腫モデルを作製し、移入治療に用いる MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞の最適化を行った。
- (4) MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞の in vitro/in vivo での抗腫瘍効果を確認した。
- (5) MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞と MesoCAR-  $\gamma\delta$  T 細胞の比較を行った。

### 4. 研究成果

- (1) 治療に用いる MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞の投与細胞数、投与間隔、投与回数などを設定するための基礎的なデータを集積する目的で、結腸・直腸癌肺転移切除後の再発予防に対する自己  $\gamma\delta$  T 細胞治療の臨床試験 (UMIN000000854)において  $\gamma\delta$  T 細胞の投与を受けた患者から得られた検体を用いて、フローサイトメーターによる末梢血中の T 細胞の動態の解析とサイトカインの産生を検討した。1 - 2 週間ごとに計 8 回投与された  $\gamma\delta$  T 細胞は、IL-2 の併用投与や内因性リンパ球の除去等の処置を必要とせず、生体内で安定して蓄積されていくことが確認された。蓄積したリンパ球は、PMA/ionomycin やイソペンテニルニリン酸陽性腫瘍細胞に反応して IFN  $\gamma$  を産生し、かつ細胞傷害性顆粒を分泌するエフェクター機能を維持していた。
- (2) このような自己  $\gamma\delta$  T 細胞に MesoCAR のメッセンジャーRNA(mRNA)を導入するため、MesoCAR の cDNA に 3' UTR とポリ A を付加して、より安定的な受容体発現を可能にする mRNA

合成用のコンストラクトを作成し、エレクトロポレーション (EP) 法で導入した。(図 1)

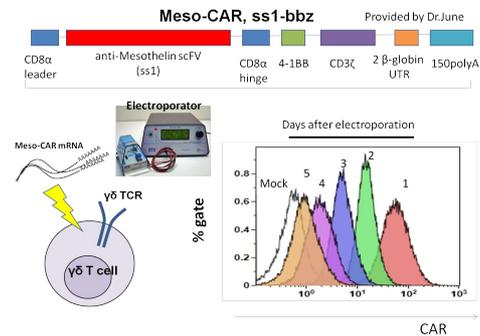


図 1. EP 法による MesoCARmRNA の導入  
導入した CAR の導入効率・発現率をフローサイトメーターで解析し最適化を行った。MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞は、メソテリン陽性細胞株を特異的に認識し、IFN  $\gamma$  の産生と細胞傷害活性を示すことを確認した。

(3) 続いて、NOG マウスを用いた中皮腫モデルの作製と移入治療に用いる MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞の最適化を行った。マウスに接種する腫瘍細胞株は、悪性中皮腫細胞株 ACC-Meso4、メソテリンのトランスフェクタント A431-meso について検討し、接種約 50 日後に安定して腫瘍の増殖を認めた ACC-Meso4 をモデル腫瘍に選択した。MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞の最適化のため、 $\gamma\delta$  T 細胞を培養開始 10, 12, 14 日後で MesoCARmRNA 導入を行い、CAR の発現を比較したところ、発現の強さに差はなくいずれも 3 日間 CAR の発現が持続した。

(4) 腫瘍細胞に対する in vitro の反応性を IFN  $\gamma$  産生と細胞傷害活性で比較したところ、10 日目の MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞が最も高かった。培養後に得られる  $\gamma\delta$  T 細胞数は 10, 12, 14 後と順に増加した。十分な細胞量を確保できエフェクター機能が最も強い 10 日目の MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞が治療に最適と考えられた。また ACC-Meso4 担癌 NOG マウスに培養 10 日目の MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞を 3 日おきに腫瘍内へ投与し in vivo の抗腫瘍効果を検討したところ、コントロールの MesoCAR-  $\gamma\delta$  T 細胞を投与した群に比べ、有意に抗腫瘍効果を示した。(図 2)

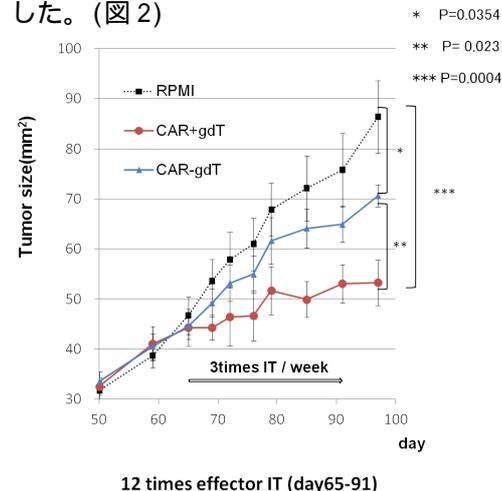


図 2. MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果 (in vivo)

(5) 最後に、MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞と MesoCAR+  $\alpha\beta$  T 細胞の比較を行った。MesoCAR を導入した および T 細胞は、いずれも ACC-MESO4 などのメソテリン発現細胞株を認識し IFN- $\gamma$  を産生したが、 $\gamma\delta$  T 細胞は同時に Th2 タイプのサイトカインである IL-6、IL-10 も産生した。(図 3)

Cytokine production by Meso-CAR+  $\gamma\delta$  T cells and  $\alpha\beta$  T cells

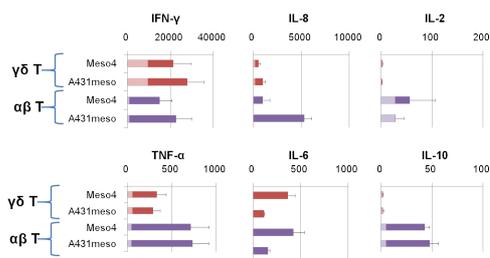


図 3. MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞と MesoCAR+  $\alpha\beta$  T 細胞におけるサイトカイン産生能の比較  
また in vitro において MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞は、MesoCAR+  $\alpha\beta$  T 細胞と同程度かそれより強い細胞傷害活性を示した。(図 4)

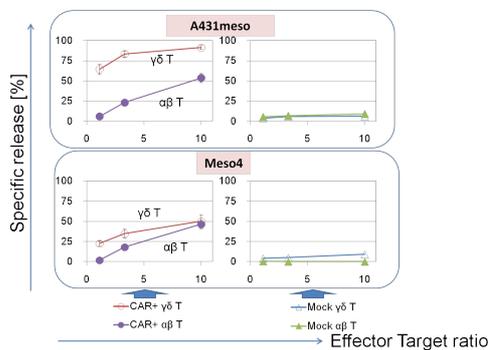


図 4. MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞と MesoCAR+  $\alpha\beta$  T 細胞における抗腫瘍効果の比較(in vitro)

また ACC-MESO4 担癌マウスに対する養子移入においても、MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞は MesoCAR+  $\alpha\beta$  T 細胞よりも強い腫瘍増殖抑制効果を示した。さらに、MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞移入においては、正常組織に対する、いわゆる off-tumor/on-target toxicity は見られず、移植片対宿主病 (GVHD) も誘導されなかった。MesoCAR+  $\gamma\delta$  T 細胞を用いた免疫治療は、悪性胸膜中皮腫や他のメソテリン発現悪性腫瘍に対しても、副作用を起こさず、抗腫瘍効果を発揮する有効な治療法となる可能性が示された。

#### <引用文献>

都道府県(20大都市再掲)別にみた中皮腫による死亡数の年次推移(平成7年~23年)厚生労働省ホームページより(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/tokusyuu/chuuhisyu11/index.html>)

#### 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10件)

Izumi T, Kondo M, Takahashi T, Fujieda N, Kondo A, Tamura N, Murakawa T, Nakajima J, Matsushita H, Kakimi K. Ex vivo characterization of T-cell repertoire in patients after adoptive transfer of V $\beta$ 9V $\beta$ 2 T cells expressing the interleukin-2 receptor  $\alpha$ -chain and the common  $\gamma$ -chain. *Cytotherapy*. 2013 Apr;15(4):481-91. 査読あり  
doi: 10.1016/j.jcyt.2012.12.004.

Hosoi A, Matsushita H, Shimizu K, Fujii S, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Maekawa R, Matsushima K, Kakimi K. Adoptive cytotoxic T lymphocyte therapy triggers a counter-regulatory immunosuppressive mechanism via recruitment of myeloid-derived suppressor cells. *Int J Cancer*. 2014 Apr 15;134(8):1810-22. 査読あり  
doi: 10.1002/ijc.28506.

Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T, Nakajima J. T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2014;3(1):23-33. 査読あり  
doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.01.

Matsushita H, Hosoi A, Ueha S, Abe J, Fujieda N, Tomura M, Maekawa R, Matsushima K, Ohara O, Kakimi K. Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN- $\gamma$ -dependent cell cycle arrest. *Cancer Immunol Res*. 2015 Jan;3(1):26-36. 査読あり  
doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0098.

Karasaki T, Nagayama K, Kawashima M, Hiyama N, Murayama T, Kuwano H, Nitadori JI, Anraku M, Sato M, Miyai M, Hosoi A, Matsushita H, Kikugawa S, Matoba R, Ohara O, Kakimi K, Nakajima J. Identification of Individual Cancer-Specific Somatic Mutations for Neoantigen-Based Immunotherapy of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016 Mar;11(3):324-33. 査読あり  
doi: 10.1016/j.jtho.2015.11.006.

Matsushita H, Sato Y, Karasaki T, Nakagawa T, Kume H, Ogawa S, Homma Y, Kakimi K. Neoantigen load, antigen presentation machinery, and immune signatures determine prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2016 Mar 15. [Epub ahead of print]

査読あり

Kakimi K, Karasaki T, Matsushita H, Sugie T. Advances in personalized cancer immunotherapy. Breast Cancer. 2016 Mar 21. [Epub ahead of print]査読あり

宮井まなみ、垣見和宏. V 9V 2T 細胞を用いたがん免疫治療. 医学のあゆみ 2013, Vol. 244 No.9 ; 854-860

垣見和宏、宮井まなみ. T 細胞によるがん免疫治療. 実験医学増刊 2013, Vol. 31 No.12 ; 185-189

松下博和. がん免疫編集機構における自然免疫系と適応免疫系の役割. 実験医学増刊 2013, Vol. 31 No.12 ; 92-99

[学会発表](計 16 件)

Kazuhiro Kakimi. Autologous T cell transfer therapy for the treatment of Solid Cancer. The 9th Catholic International Stem Cell Symposium: step up to Translational Research, Seoul, Korea. 2012/9/15

Kazuhiro Kakimi. Autologous T cell transfer therapy for the treatment of Solid Cancer. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. "Cancer Immunology and Immunotherapy". Vancouver, British Columbia, Canada. 2013/1/30

Kazuhiro Kakimi, Hirokazu Matsushita, Akihiro Hosoi, Ryuji Maekawa, and Osamu Ohara. Killing and IFN- $\gamma$ -dependent G1 cell cycle arrest is the mechanism of regulation of tumor growth by Cytotoxic T Lymphocytes. AACR Annual Meeting 2013, Washington DC, USA. 2013/4/6-10

Hirokazu Matsushita, Akihiro Hosoi, Satoshi Ueha, Jun Abe, Michio Tomura, Ryuji Maekawa, Osamu Ohara, Kazuhiro Kakimi. Killing and IFN- $\gamma$ -dependent G1 cell cycle arrest is the mechanism of regulation of tumor growth by Cytotoxic T Lymphocytes. 21st Annual cancer research Institute International cancer Immunotherapy Symposium Cancer Immunotherapy 2013: Dynamics of Host-Tumor Interaction. Grand Hyatt New York Hotel at Grand Central, New York, NY 2013/9/30-10/2

垣見和宏 (特別講演) 癌免疫治療新時代に向けて. 第 34 回癌免疫外科研究会、岡山県、岡山市. 2013/5/16-17

河上裕、徐明利、谷口智恵、野地しのぶ、南雲春菜、岡本正人、桜井敏晴、藤田知信、鳥越俊彦、佐藤昇志、中面哲也、垣見和宏、池田裕明、珠玖洋、奥野清隆、杉浦史哲、中山睿一、裕彰一、岡正朗、伊東恭吾. ヒトがん免疫病態の解明と免疫バイオマーカーの同定. 第 17 回日本がん免疫学会総会、山口県宇部市. (日本バイオセラピー学会と日本がん免疫学会との合同特別企画) 2013/7/3

垣見和宏 (招待講演) クリニカルゲノミクスへの期待: がん免疫治療の見地から. かずさ DNA 研究所/産総研 生命情報工学研究センター共催ワークショップ. 2013/11/20

Kazuhiro Kakimi. Autologous T Cell Transfer Therapy for The Treatment of Cancer. 第 42 回日本免疫学会総会/学術集会、千葉県千葉市. 2013/12/11-13

垣見和宏 (招待講演) がん免疫治療新時代に向けて. 第 11 回東レ先端融合研究シンポジウム、神奈川県鎌倉市. 2014/7/2

垣見和宏 (招待講演) Development of T cell-based cancer immunotherapy. 第 18 回日本がん免疫学会総会、愛媛県松山市. 2014/8/1

井上雄太、村山智紀、此枝千尋、一瀬淳二、日野春秋、長山和弘、松下博和、似島純一、安樂真樹、村川知弘、垣見和宏、中島淳 抗 mesothelin-キメラ型抗原受容体導入 T リンパ球による免疫療法の有用性. 第 55 回日本肺癌学会総会、京都府京都市. 2014/8/29

松下博和、中島淳、井上雄太、村川知弘、垣見和宏. 養子免疫治療におけるキメラ抗原受容体遺伝子導入ターゲット細胞としての V 9V 2T 細胞. 第 73 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市. 2014/9/27

Takahiro Karasaki, Kazuhiro Nagayama, Manami Miyai, Hirokazu Matsushita, Shingo Kikugawa, Ryo Matoba, Paul Horton, Osamu Ohara, Kazuhiro Kakimi, Jun Nakajima In silico prediction of neoantigen for lung cancer targeting shared somatic mutations. 第 19 回日本がん免疫学会総会 (ICCIM2015) 東京都文京区. 2015/7/9

Takuya Takahashi, Kosuke Odaira, Kaori Kambara, Nao Fujieda, Takamichi Izumi, Yukari Kobayashi, Hirokazu Matsushita, Kazuhiro Kakimi. Galectin-9 and Tim-3 interaction constrains V 9V 2 T cell-based immunotherapy. 第 19 回日本がん免疫学会総会 (ICCIM2015) 東京都文京区 2015/7/9

松下博和、中島 淳、井上雄太、長岡孝治、上羽悟史、松島綱治、垣見和宏 メソテリン特異的キメラ抗原受容体発現 T 細胞を用いた養子免疫療法. 第 7 回 血液疾患免疫療法研究会学術集会 (SIHDS 2015)、東京都文京区. 2015/9/26

唐崎隆弘、長山和弘、川島光明、檜山紀子、村山智紀、桑野秀規、似鳥純一、安樂真樹、佐藤雅昭、垣見和宏、中島 淳 既存のデータベースから抽出した遺伝子変異をターゲットとした肺癌ペプチドワクチン開発の限界について. 第 56 回 日本肺癌学会学術集会、神奈川県横浜市. 2015/11/28

〔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 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

中島 淳 (NAKAJIMA, Jun)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：9 0 1 8 8 9 5 4

### (2) 研究分担者

垣見和宏 (KAKIMI, Kazuhiro)  
東京大学・医学部附属病院・特任教授  
研究者番号：8 0 2 7 3 3 5 8

### (3) 研究分担者

村川知弘 (MURAKAWA, Tomohiro)  
東京大学・医学部附属病院・登録研究員  
研究者番号：5 0 3 5 9 6 2 6

### (4) 研究分担者

松下博和 (MATSUSHITA, Hirokazu)

東京大学・医学部附属病院・特任講師  
研究者番号：8 0 5 9 7 7 8 2

### (5) 研究分担者

佐野 厚 (SANO, Atsushi)  
東京大学・医学部附属病院・登録診療員  
研究者番号：2 0 5 6 9 8 3 4