

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850204

研究課題名(和文) 犬悪性黒色腫に対する新たな腫瘍特異的キラーT細胞療法に関する研究

研究課題名(英文) A study of tumor-specific T cell therapy for canine melanoma cell lines.

研究代表者

富張 瑞樹 (TOMIHARI, MIZUKI)

帯広畜産大学・畜産学部・講師

研究者番号：00552754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：犬の悪性黒色腫は難治性疾患の一つとされている。これに対し我々は、メラノーマに特異性の高い新たな活性化リンパ球療法(CAT療法)の開発を目的として、犬組織球細胞株DH82や腫瘍抗原ペプチド、抗Gpnmb抗体の併用について検討を行ったが、CATの増殖効率や抗腫瘍活性における有意な増強は認められなかった。一方、免疫不全マウスの皮下に悪性黒色腫細胞株(CMM2)を接種し、同時にCAT、あるいは腫瘍抗原ペプチド存在下で活性化したCATを投与した場合、腫瘍の成長において有意な抑制を認めた。以上より、CAT自体は一定の抗腫瘍活性を有するものの、より実効性を高めるためにさらなる改良が必要なものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Canine malignant melanoma is one of the intractable diseases. In order to develop the new treatment, we focused the CD3-activated T cell (CAT) therapy. To improve it for increasing the specificity for melanoma, we used DH82, melanoma-associated peptides, and anti Gpnmb antibody. However, these combinations did not promote the proliferation of lymphocytes, and not enhance the anti tumor activity of CAT, either. On the other hand, canine melanoma cells (CMM2) was administered subcutaneously into nu/nu mice, and simultaneously injected with CAT or CAT pulsed by melanoma-associated peptides. Then, CAT or CAT pulsed by peptides inoculation caused significantly lower tumor growth than saline's one. In conclusion, CAT certainly showed an anti-tumor activity in nu/nu mice, but further studies were necessary for more improvement of CAT therapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：獣医学 臨床 癌 免疫学 悪性黒色腫 犬

1. 研究開始当初の背景

犬の悪性黒色腫は、高い転移率と低い従来の治療法への反応性から、罹患動物の予後は悪いことが多い。さらに、悪性黒色腫自体が強い免疫寛容を誘導することも知られており、これに対する新たな治療法として、様々な免疫療法の開発が試みられてきた。とくに犬の悪性黒色腫に対しては米国の Wolchok らのグループが開発した DNA ワクチン療法などの臨床応用も始められており、新たな治療法として大きな期待が寄せられていた。

一方で我々は、これまでの診療現場において「活性化自己リンパ球療法」を軸とした免疫療法を行ってきた。これは、患者由来のリンパ球を、*in vitro*において IL-2 ならびに抗 CD3 抗体を用いて活性化、増殖し、患者体内に再び戻す活性化キラー T 細胞療法 (CD3 activated T cell therapy: CAT 療法) のことである。多くの腫瘍症例に対する臨床応用を行ってきたが、残念ながら CAT 療法は腫瘍特異的な実効性に乏しいという大きな欠点があった。

この腫瘍特異性を高めるための方法として、上記 CAT 療法に腫瘍関連抗原ペプチドや樹状細胞を組み合わせる免疫療法が広く知られている。しかしながら、樹状細胞の調整にはコストと時間がさらに必要となり、実際の臨床応用の際には、より簡便かつ実効性の高い方法の開発が切望されていた。

これに対し我々は、とくに悪性黒色腫がもつ免疫寛容誘導因子 Gpnmb に着目し、これによる免疫寛容誘導経路の阻害と、腫瘍抗原ペプチドによる刺激を組み合わせることで、キラー T 細胞による特異的かつ高い抗腫瘍活性を *in vitro*において認めることに成功した。この結果を踏まえて、より *in vivo*に近い形での検討が、本療法の臨床応用のために必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究は、従来の CAT 療法に対し、腫瘍関連抗原ペプチド、ならびに抗 Gpnmb 抗体などを組み合わせることで、さらに簡便、安価、かつ奏功性の高い治療法として改良することを目的とする。具体的には、抗原提示細胞としての犬由来培養細胞株 DH82 の利用と、ヌードマウスにおける、より *in vivo*に近い環境下での抗腫瘍活性を評価することで、その有用性と現実的な臨床応用に向けた詳細な検討を行うものである。

3. 研究の方法

(1) 犬培養細胞株 DH82 の利用に対する検討
腫瘍特異性を高めるための抗原提示能を利用する目的として、DH82 の利用について

検討した。米国 ATCC (American Type Culture Collection) より犬組織球腫由来細胞株 DH82 を購入し、適切な培養を行った後、 4×10^5 cells/well にてプレートに分注した。これに対し各条件下にて放射線照射を行い、不活化させる条件を決定した。細胞の生存曲線としては wst-8 を用いて代謝活性を測定し、450nm の吸光度において評価した。

条件決定後 (20Gy)、不活化した DH82 (1×10^6 cells/ml) を腫瘍関連抗原ペプチド (Tyrosinase、 $10 \mu\text{M}$) と混和させ、30 分反応させた後、超音波破砕機によって破壊し、膜分画のみを遠心分離した。超音波破砕時にはプロテアーゼ阻害薬のカクテルを添加した。得られた破砕液を、DH82 とリンパ球とが細胞数として 1:10 となるような濃度で、リンパ球の活性化時に添加した。添加後、リンパ球の増殖曲線 (細胞数) ならびに CMM2 に対する細胞傷害活性について検討を行った。また、細胞を破砕せず、そのまま添加する系についてもあわせて検討した。

(2) 抗 Gpnmb 抗体の利用に対する検討

CAT の抗腫瘍活性を高めることを目的として、抗 Gpnmb 抗体 (ポリクローナル抗体) による細胞傷害活性への影響についても比較、検討した。用いた抗体としては、我々が作成した抗体として、犬の Gpnmb ペプチド (細胞外ドメイン、18-19 アミノ酸) を合成し、抗原としてウサギに免疫後、作成したポリクローナル抗体 2 種と、購入可能なヒト Gpnmb に対するモノクローナル抗体 (ab56584, abcam, Cambridge, MA, USA) ならびにポリクローナル抗体 (K-16, santa cruz, Dallas, TX, USA) の、計 4 種の抗体を用いて、それぞれについて検討、解析を行った。抗体は $1 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度で細胞傷害活性の系に添加し、CAT の CMM2 に対する細胞傷害活性として比較、検討した。

(3) 免疫不全マウスにおける改良型 CAT 療法の抗腫瘍活性の検討

免疫不全マウスとして Balb/c nu/nu マウス、ならびに NOD scid マウスを選択し、これに対し犬悪性黒色腫細胞株である CMM1、ならびに CMM2 の 2 種を皮下に接種し (5×10^5 cells) 免疫不全マウスにおいて腫瘍の成長が認められるかどうか等の検討を行った。

上記実験の結果を踏まえて、免疫不全マウスとしては Balb/c nu/nu マウスを、また犬悪性黒色腫細胞株としては CMM2 とを選択した。この CMM2 を nu/nu マウスの左脇腹の皮下に接種し (5×10^5 cells) これに対する活性化リンパ球 (CAT 群) ならびに腫瘍関連抗原ペプチドの添加群 (CAT + pep 群) による抗腫瘍活性について、比較、検討を行った。CAT は、抗 CD3 抗体と IL-2 により活性化させ、CD8 陽性細胞比率が高い (抗腫瘍活性が高い) 増殖開始から 10-18 日の間のものを使

用した。また腫瘍関連抗原ペプチドとして Tyrosinase を選択し、培養時に最終濃度が 10 μ M となるように添加した。このため、CAT 群においても、ペプチドの溶媒である DMSO を同濃度となるように添加した。

さらに、リンパ球の投与方法として、腫瘍細胞株と同時に接種する方法と、腫瘍がある程度の固形塊を形成した後に腫瘍内に直接投与方法とについて、それぞれ検討した。同時に接種した CAT は 5 \times 10⁶ cells ずつ使用し、また腫瘍内投与の際には 1 \times 10⁷ cells ずつ使用した。腫瘍細胞の体積としては、縦、横、高さに 4/3 を掛け合わせたものを便宜上の体積として用いた。

4. 研究成果

(1) DH82 の利用

DH82 に対し、5Gy、10Gy、20Gy、50Gy の条件で放射線照射を行い、24 時間後、さらには 72 時間後における代謝活性を測定した (図 1、n=3)。この結果、5Gy では照射後も代謝活性を有した細胞が少数認められていたが、10Gy、20Gy、50Gy においては、代謝活性の低下が認められた。

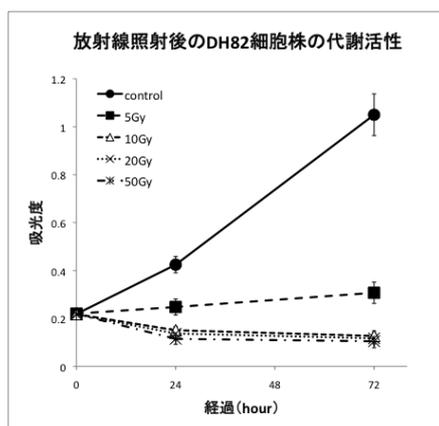


図 1

この結果より、10Gy 以上の条件において十分な不活化が認められるものと考えられた。また、同細胞に対し、mitomycin C (50 μ g/ml、30分、37 $^{\circ}$ C) による不活化も可能であることも確認した。

これらの結果を受けて、まず放射線照射 20Gy を不活化の条件として固定した。照射後の DH82 を腫瘍関連抗原ペプチド (Tyrosinase) と混合させた破砕液を調整し、これによる CAT の増殖曲線、ならびに細胞傷害活性への影響について検討を行ったが、3回の実験すべてにおいて、無添加の群と比較して有意な差を認めなかった。

DH82 を破砕液としたために、ペプチドを抗原として提示する機能を示さなかった可能性を考慮し、DH82 とペプチド (Tyrosinase) との混和後、細胞のままリンパ球に添加した (DH82:リンパ球が 1:10) も

のについても検討を行ったが、CAT の増殖曲線、ならびに細胞傷害活性における有意な上昇を認めることはできなかった。

この結果を考察するためには、DH82 における MHC class 1 の発現を確認する必要がある。既報において、DH82 は MHC class 1 の発現が報告されているが、抗原提示能力として十分な量であったのか、あるいは、我々の培養条件下において異なる発現量があったのか等を確認しなければならない。また一方で、O'cornerらの報告 (2012) で CAT に対し用いられていた artificial APC (人工的な抗原提示細胞) では、形質導入によって過剰量の MHC class 1 が発現されていた。今回、これらについて検討しきれておらず、詳細については不明ではあるが、犬組織球由来の細胞株である DH82 をそのまま利用するという簡便な方法では、CAT に対し十分な増殖効率の向上、ならびに有効な抗原提示能を得ることは難しいものと考えられた。

(2) 抗 Gpnmb 抗体の利用

次に、抗 Gpnmb 抗体の利用による免疫寛容誘導経路の阻害について検討を行った。まず、我々の作成したポリクローナル抗体 2 種を用い、CMM2 に対する CAT の細胞傷害活性への影響について検討を行ったが、抗 Gpnmb 抗体の添加による有意な上昇を認めることはできなかった (図 2)。

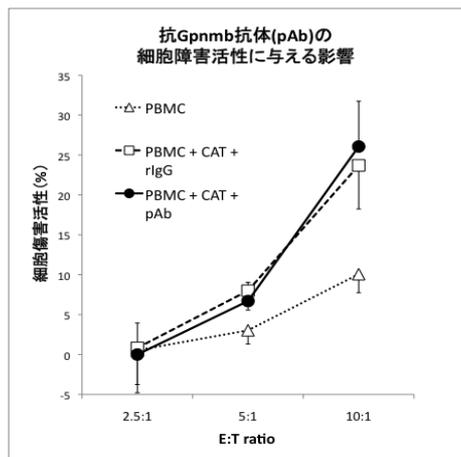


図 2

また、ヒト Gpnmb に対する抗体 2 種においても、再現性のある形で細胞傷害活性の有意な上昇は認められなかった。

これらの結果に対して、一つには抗体の結合性について検討する必要がある。用いた抗体 4 種はすべて、フローサイトメトリーにて細胞株 (CMM2) に結合することを確認しているが、これらの抗体の結合だけでは、本検討に必要なだけの免疫寛容誘導経路の阻害が得られなかった可能性、が考えられた。

また一方で、CMM2 を含めた培養細胞株の全てにおいて、Gpnmb が mRNA、ならびに蛋白質として発現することを確認している

が、一方でその発現量自体が症例由来の腫瘍組織と比べると非常に少ないことも認めている。このため、本検討に用いた CMM2 では、Gpnmb を介した免疫寛容誘導が有効に機能していない可能性が考えられた。今後、Gpnmb に対するさらに詳細な検討を行うためには、本検討の結果から考えると Gpnmb の発現の少ない培養細胞株では限界があり、例えば犬 Gpnmb 蛋白質をコードしたプラスミドを形質導入し、過剰発現させた細胞株を作製した後、これに対する阻害実験を行う、などにより、その有効性について新たに検討を行う必要があるものと考えられた。

(3) 免疫不全マウスにおける検討

まず、CMM1(Pu)と CMM2(Mi)の2種の悪性黒色腫細胞株を、免疫不全マウスである Balb/c nu/nu マウスと NOD scid マウスの左脇腹の皮下に接種した。この結果、どちらの免疫不全マウスにおいても 21-28 日後に至るまで良好な腫瘍の増大を認めた。また、どちらの細胞株においても、ほとんどの個体において接種 28 日前後において中心部の自壊を認めたが(9 個体/12 個体中)、nu/nu マウスでは自壊、壊死部が広がるにつれて腫瘍全体の成長曲線が鈍るのに対し、scid マウスでは自壊後、28 日を越えても腫大を続ける傾向が認められた。これは nu/nu マウスにおいては NK 細胞が残存しているのに対し、scid マウスでは NK 細胞も存在しないため、自壊部の炎症が強く起こらないためと考えられた。このため、CAT 投与後、周囲の NK 細胞を始めとした免疫細胞の関与により抗腫瘍効果が増大するという仮説のもと、nu/nu マウスを選択した。

CMM2 (Mi) を nu/nu マウスに接種する際に、生食のみを投与する群(コントロール)と、CAT を投与する群(CAT)、さらには Tyrosinase のペプチドを活性化時に添加した群(CAT + pep)の3群を設定し、腫瘍とリンパ球を同時に近傍の皮下に接種した後、その腫瘍体積を計時的に計測した。この結果、CAT 群と CAT + pep 群では、コントロール群と比較して有意に腫瘍の成長が抑制された。さらに、第 23 病日においては、CAT + pep 群の腫瘍体積が有意に低値を示していた。(図 3、n=6)このことより、活性化したリンパ球は、in vivo においても一定の抗腫瘍活性を有すること、さらには腫瘍関連抗原ペプチドの添加によって、抗腫瘍活性が有意に増強される可能性が示唆された。

しかしながら一方で、投与するリンパ球の数を減らした場合には(CMM2 と同数)、3 群の間の腫瘍体積の成長に有意な差異は認められなかった。このことより、抗腫瘍活性を示すためには、存在する腫瘍細胞に対してある一定以上の細胞数の CAT が必要である可能性が示唆された。

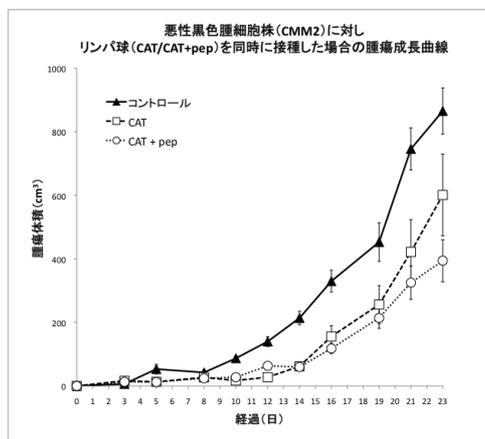


図 3

次に、固形腫瘍に対する CAT、あるいは CAT + pep の抗腫瘍活性を検討するために、ある程度大きさになった腫瘍組織に対し、腫瘍内に直接リンパ球を投与し、その後の腫瘍体積を計時的に計測した。リンパ球は CMM2 接種後 14、16、19 日の計 3 回投与した。この結果、同時に投与した場合は異なり、コントロール群と CAT 群、CAT + pep 群の間において有意な差異は認められなかった。(図 4、n=5、矢印は腫瘍内投与)

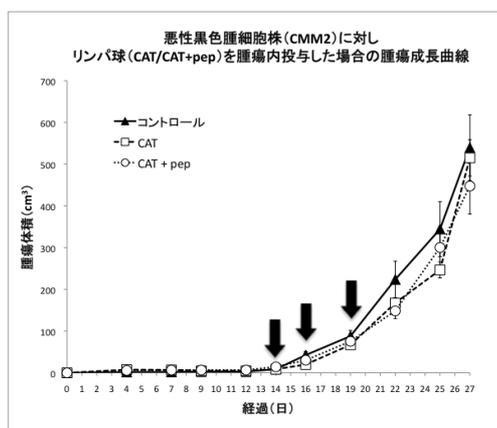


図 4

この結果は、従来より臨床現場の獣医師から指摘されていた、「固形腫瘍に対して CAT が腫瘍退縮効果を認めないのではないか」という経験と一致していた。このことより、本検討で用いた腫瘍抗原ペプチドの添加では、この問題を突破するだけの抗腫瘍効果の増強を認めることはできなかったものと考えられた。

腫瘍抗原ペプチドとして、今回は Tyrosinase を選択したが、Gpnmb と同様に、腫瘍細胞株においてはすべての腫瘍関連抗原の発現量が、症例由来の腫瘍組織と比較して著しく低くなっている。in vitro においては外からペプチドを細胞株に添加し、一時的に発現量が増加したように mimic させることが可能であるが、in vivo においては発現量が低いままであった可能性が考えられた。臨

床現場への応用においても、腫瘍関連抗原を利用した免疫療法の場合には、その抗原自体の発現量に左右される可能性が強く示唆されている。このため、より深く考察するために、本検討で用いたマウス皮下の腫瘍組織における Tyrosinase 蛋白質の発現量についても、追加で検討する必要があるものと考えられた。

また、同様の実験（2回目）において、腫瘍内投与によって一部破壊された腫瘍組織が、次回測定時にさらに大きくなる様子が、複数の個体、かつ全ての群で観察された。このことより、有効性の低い腫瘍内投与は、いたずらに腫瘍組織を破壊し、結果として全体の腫瘍の増殖を助長させてしまう可能性が考えられた。

全体を通して、CAT、ならびに CAT + pep においては、in vitro と同様に in vivo でも一定の抗腫瘍活性があることが示された。しかしながら一方で、より簡便、かつ効果の高い CAT 療法の改良、開発という目的に対しては、多くの面で課題が山積しているという現状を認識せざるを得ない結果となってしまった。このため今後は、今回使用した腫瘍抗原ペプチドの添加量に対する検討や、DH82 ではなし得なかった適切かつ新たな抗原提示の利用、あるいは GpnmB を始めとした CTLA4、PD1/PDL1 等の免疫寛容誘導経路の阻害などの併用を模索していくことで、犬悪性黒色腫に対するより効果的な抗腫瘍活性の増強を検討する必要があるものと考えられた。

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 1 件)

A comparison of the immunological effects of propofol and isoflurane for maintenance of anesthesia in healthy dogs.

Tomihari M., Nishihara A., Shimada T., Yanagawa M., Miyoshi M., Miyahara K., Oishi A.

J Vet Med Sci., 2015 (in press) (査読有り)

DOI: 10.1291/jvms.14-0611

〔学会発表〕(計 2 件)

「家族性発症を認めた犬の肥満細胞腫症例における遺伝学的検討」

富張瑞樹

平成 26 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、岡山コンベンションセンター(岡山県、岡山市)

2015 年 2 月 13 日

「帯広畜産大学動物医療センターにおける

活性化自家リンパ球療法の現状と問題点」

富張瑞樹

第 2 回動物臨床免疫療法研究会(招待講演)
大阪府立大学りんくうキャンパス(大阪府、泉佐野市)

2013 年 10 月 26 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富張 瑞樹 (TOMIHARI, Mizuki)

帯広畜産大学・畜産学部・臨床獣医学研究
部門・診断治療学分野・准教授

研究者番号：00552754

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし