

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09218

研究課題名(和文) 遺伝子改変T細胞を用いた肺癌に対する新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of Engager T cells for immunotherapy of lung cancer

研究代表者

岩堀 幸太 (IWAHORI, KOTA)

大阪大学・医学系研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：80566448

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)：がん免疫療法として、我々はBiTEを発現する遺伝子改変T細胞(Engager-T細胞)を開発した。本研究では、Engager-T細胞を肺癌に対する治療に応用するために、肺癌腫瘍検体を用いて、その免疫学的特徴および腫瘍微小環境におけるBiTEの作用を解析した。その結果、BiTEを介した肺癌腫瘍内T細胞の癌細胞傷害活性が腫瘍内細胞の免疫プロファイルおよび喫煙歴と関連していることを示した。本研究結果より患者背景(喫煙歴など)や肺癌腫瘍内の免疫プロファイルがEngager-T細胞の効果予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated T cells expressing a secretable bispecific T-cell engager (Engager-T cells) for cancer immunotherapy. For the development of Engager T cells against lung cancer, we evaluated detailed immunological aspects in clinical specimens from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. We analyzed the immune profiles and T cell cytotoxicity of lung tumor tissue from NSCLC patients. By using bispecific T-cell engager (BiTE) to assess the cytotoxicity of T cells, we found that the cytotoxicity of tumor-infiltrated T cells correlated with immune profiles and smoking status of NSCLC patients. These results imply predictive biomarkers for the efficacy of Engager-T cells.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

現在行われている肺癌に対する治療法は手術療法、放射線療法、化学療法があるが、進行肺癌に対してはこれらの治療により治癒を目指すのは困難であるのが現状であり、新たな治療法として免疫療法の開発が進んでいる。特に PD-1 抗体および PD-L1 抗体の非小細胞肺癌に対する有効性が報告され、免疫療法が肺癌に対しても有効であることが明らかになりつつある。

(1) キメラ抗原受容体 chimeric antigen receptor (CAR) 遺伝子改変 T細胞

近年米国から腫瘍免疫回避機構に打ち勝つための遺伝子操作が加えられたキメラ抗原受容体 chimeric antigen receptor (CAR) 遺伝子改変 T細胞を用いた免疫療法(養子免疫療法)の臨床試験が報告されており、特に血液腫瘍においてその有効性が報告されている。CAR は腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体可変領域の軽鎖(VL)と重鎖(VH)を直列に結合させた一本鎖抗体(scFv)をN末端側に、T細胞受容体(TCR)鎖をC末端側に持つキメラ蛋白の総称であり、CARを発現させたT細胞はscFv領域で腫瘍抗原を認識した後、その認識シグナルを引き続きTCR鎖を通じてT細胞内に伝達することで腫瘍抗原特異的にT細胞を活性化し抗腫瘍活性を示す(図1)。しかし、CAR-T細胞を用いた癌免疫療法は体外から戻したCAR-T細胞のみで抗腫瘍効果を発揮させる養子免疫療法であり、特に固形癌ではCAR-T細胞が体内で増殖し難いため臨床試験においても十分な効果がみられていない。

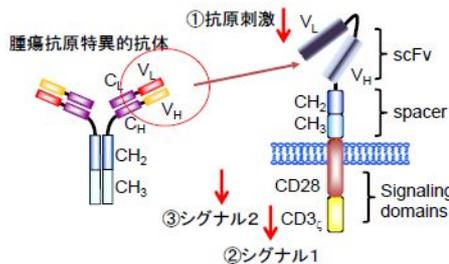


図1. キメラ抗原受容体(CAR)  
CARのscFvが抗原に結合する(①)と細胞内部のSignaling domainsを介してCD3からシグナル1(②)が、CD28からシグナル2(③)が入りT細胞が活性化される。

(2) 二重特異性抗体 (BiTE)

これに対し、体内に存在するT細胞を用いて腫瘍抗原特異的に抗腫瘍効果を発揮させる方法として、癌抗原およびT細胞抗原の双方に対して特異性を持つ二重特異性抗体(BiTE)の開発が進んでいる。BiTEは腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体のVLとVHを直列に結合させたscFvとT細胞抗原CD3に特異的なモノクローナル抗体のVLとVHを直列に結合させたscFvを直列に結合させた一本鎖二重特異性抗体であり、BiTEが腫瘍抗原とT細胞抗原CD3の両方に同時に結合することによってT細胞が活性化され腫瘍抗原特異的に抗腫瘍効果を発揮する(図2)。しかし、BiTEは体内での半減期が約2時間と短く

24時間持続投与が必要であり、また全身投与によりBiTEの腫瘍部位特異的な集積がみられないという問題点がある。

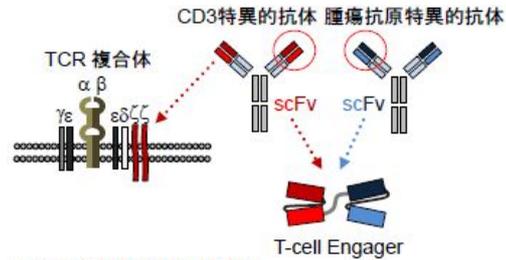


図2. 二重特異性抗体(BiTE)  
T細胞抗原CD3に特異的なモノクローナル抗体可変領域の軽鎖(VL)と重鎖(VH)を直列に結合させた単鎖抗体(scFv)と腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体可変領域の軽鎖(VL)と重鎖(VH)を直列に結合させた単鎖抗体(scFv)を直列に結合させた組換え分子

(3) BiTEを発現する遺伝子改変T細胞(Engager-T細胞)

このようなCAR-T細胞およびBiTEの問題点を克服するために申請者らはBiTEを発現する遺伝子改変T細胞(Engager-T細胞)を発明した(Iwahori K et al. Molecular Therapy 2014)。このEngager-T細胞はBiTEを発現するレトロウイルスベクターをT細胞に導入することでT細胞からBiTEを分泌させる機能をもつ。申請者らはヒトのEngager-T細胞を用いた実験から次のような予備的な研究結果を得ている(図3)。

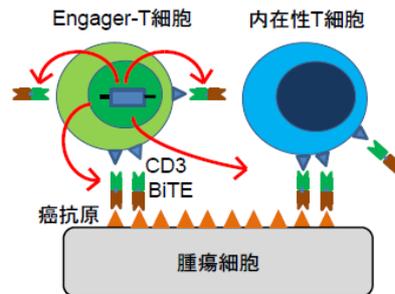


図3. Engager-T細胞  
BiTEがEngager-T細胞および内在性T細胞のCD3に結合する。この時点ではBiTEは一個のため活性化されない。多価のBiTEが腫瘍細胞上の特異抗原に結合するとT細胞が活性化され、活性化されたEngager-T細胞からBiTEの分泌が亢進する。

Engager-T細胞はBiTEを分泌することによりEngager-T細胞のみでなく遺伝子導入されていないT細胞も腫瘍抗原特異的に活性化した。

腫瘍抗原特異的に活性化されたEngager-T細胞はBiTEの発現を亢進した。

腫瘍を移植したヌードマウスへのEngager-T細胞の投与により抗腫瘍効果がみられた(図4)。

これらの予備的な研究結果から、Engager-T細胞は腫瘍抗原特異的に活性化されてBiTEの分泌を亢進させることによって腫瘍部位特異的にBiTEを作用することができると考えている。エフェクター細胞である

T細胞自身から BiTE を分泌させ、腫瘍部位特異的に活性化され分泌が亢進することで、低い血中 BiTE 濃度で腫瘍部位特異的に効率的に T 細胞を活性化できることが期待される。

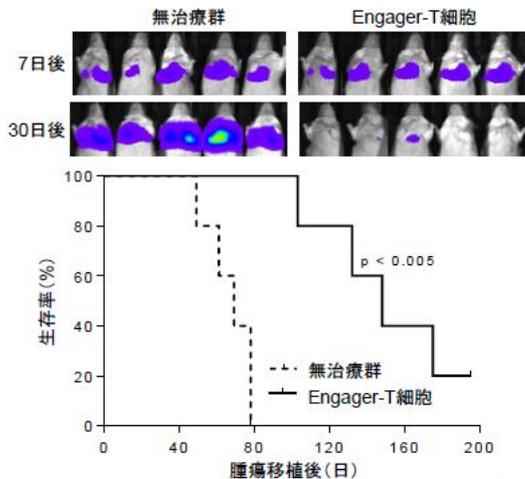


図4. ノドマウスの肺に癌細胞株A549を移植した7日後に Engager-T細胞を尾静脈投与した結果、無治療群と比較して腫瘍の縮小(上図)と生存期間の延長(下図)がみられた

## 2. 研究の目的

本研究は、Engager-T 細胞を肺癌に対する治療に応用するために、肺癌腫瘍検体を用いて、その免疫学的特徴および腫瘍微小環境における BiTE の作用を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

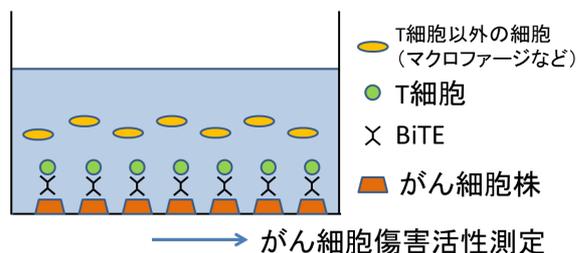
(1) 臨床検体を用いた肺癌腫瘍組織中の免疫細胞の頻度、機能分子の発現解析

肺癌腫瘍検体における免疫担当細胞の頻度、機能分子の発現解析を FACS を用いて行う。検体が得られた当日に凍結せずに解析を行うことで、リンパ球系・単球系のみでなく顆粒球系細胞についても解析を行う。

(2) BiTE を用いた肺癌腫瘍検体における T 細胞の癌細胞傷害活性の解析

BiTE を用いて、肺癌腫瘍検体から採取した免疫担当細胞と癌細胞株との共培養を行い、T 細胞による癌細胞傷害活性を MTS アッセイを用いて評価する(図5)。さらに免疫担当細胞からのサイトカイン分泌(IFNg および IL-2 など)を調べる。

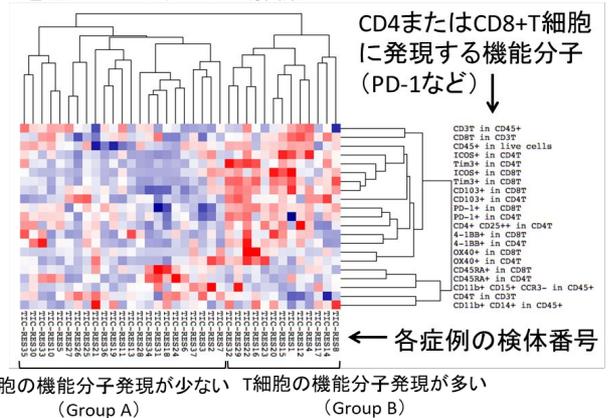
図5 T細胞によるがん細胞傷害活性の測定



## 4. 研究成果

非小細胞肺癌組織中の T 細胞に発現する PD-1、Tim-3 などの分子の発現を FACS を用いて測定した結果、PD-1 などの分子を発現する T 細胞の割合が少ない患者群(A グループ)と多い患者群(B グループ)に分かれる傾向がみられた(図6)。さらに、喫煙者 13 例中 12 例が B グループとなっており、免疫プロファイルと喫煙歴との関連が示唆された。

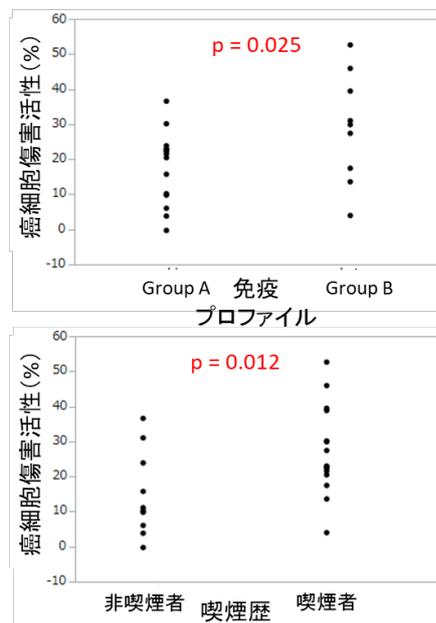
図6 腫瘍内T細胞の免疫プロファイル (各症例におけるT細胞に発現する機能分子の頻度を基にしたクラスター解析)



T細胞の機能分子発現が少ない T細胞の機能分子発現が多い (Group A) (Group B)

次に、非小細胞肺癌腫瘍検体における腫瘍内 T 細胞の癌細胞傷害活性を図5の方法で BiTE を用いて測定した結果、肺癌腫瘍内 T 細胞の癌細胞傷害活性が腫瘍内細胞の免疫プロファイルおよび喫煙歴と関連していることが示唆された(図7)。

図7 腫瘍内T細胞の癌細胞傷害活性



これらの研究成果から、BiTE を発現する遺伝子改変 T 細胞である Engager-T 細胞を肺癌

に対する治療に応用するにあたって、患者背景（喫煙歴など）や肺癌腫瘍内の免疫プロファイルがその効果予測因子となる可能性が示唆された。

(4)研究協力者 ( )

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

岩堀幸太、肺癌組織における免疫プロファイリング、第76回日本癌学会学術総会、2017年

岩堀幸太、非小細胞肺癌における免疫プロファイルの検討、第3回日本骨免疫学会、2017年

〔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

岩堀 幸太 (IWAHORI, Kota)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師  
研究者番号：80566448

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：