

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10100

研究課題名(和文) 進行食道癌におけるペプチドプールを用いた術後補助免疫療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of postoperative adjuvant immunotherapy using peptide pool of tumor antigens in advanced esophageal cancer

研究代表者

中村 哲 (Nakamura, Tetsu)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10403247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：B16メラノーマ細胞株およびEL4T細胞リンパ腫に卵白アルブミン(OVA)が導入されたB16-OVA及びEG-7の腫瘍樹立マウスで、ova8 peptide transgenic (OT-1)マウス及び通常のマウスモデルでのT細胞の活性化を確認した。腫瘍内での採取可能な抗原特異的T細胞の数は非常に少なく検出が困難であったために、腫瘍内の抗原特異的T細胞の誘導を行い、腫瘍内T細胞の採取効率を改善させることができた。これらの腫瘍反応性T細胞のシーケンスを行い、データの整合性を検討する。この後、iPS細胞化を行う予定である。この技術を早急に確立し、ヒトの応用を試みる予定である。

研究成果の概要(英文)：In B16-OVA and EG-7 tumor-established mice, in which ovalbumin (OVA) was introduced into B16 melanoma cell line and EL4 T cell lymphoma, activation of antigen-specific T cells was confirmed. Since the number of antigen-specific T cells that can be harvested in the tumor was very small and it was difficult to detect, induction of antigen-specific T cells in the tumor was performed to improve the collection efficiency of intratumoral T cells. We will sequence these tumor reactive T cells and examine data consistency. After that, iPS cellularization will be carried out. We will establish this technology as soon as possible and try to apply human applications.

研究分野：上部消化管

キーワード：食道癌 補助療法 T細胞 ペプチドプール 養子免疫

1. 研究開始当初の背景

食道癌の根治切除後無再発生存率は約 40% で、根治切除可能な症例でも未だ半数以上再発を来するのが現状である。これはリンパ節転移が発症後早期より成立するためであると考えられ、現在では術前補助化学療法が標準的治療となった。また、食道癌の外科治療は内視鏡外科手術や 術前呼吸リハビリの導入、周術期管理の進歩により合併症を低減して、早期退院・早期社会復帰に向け ADL の低下を最小限に抑える治療が可能となった。しかしながら、治療成績向上を実現させるために補助的治療を行う場合、食道癌術後の状態は、身体的な制限、ADL 低下により治療が制限される傾向にある。このため、進行食道癌の治療成績の向上において有害事象が少なく有効性の高い術後補助療法の開発が急務であるといえる。

培養 T 細胞輸注する養子療法(Adoptive T cell transfer; ACT)は、一部の癌腫でのみ有効性が認められる(SA Rosenberg, et al. Clin Cancer Res. 2011)が、食道癌では未だその効果は不十分である。食道癌において、効果が期待できる腫瘍抗原の候補としては、NY-ESO-1 が挙げられる (Cheever MA, et al Clin Cancer Res. 2009)。NY-ESO-1 は癌/精巢抗原に分類され、NY-ESO-1-特異的 CD4+T 細胞及び CD8+T 細胞を in vitro において効率的に刺激し、分離することが可能となること、癌患者では NY-ESO-1 に対する液性免疫及び細胞性免疫の応答が誘導されることが示されている。一方、最近、iPS 細胞技術を使用し、悪性黒色腫患者由来のリンパ球を用いて、細胞を初期化し、リンパ球を再生することが可能となった (Vizcardo R, et al. Cell Stem Cell. 2013)。腫瘍反応性 T 細胞から iPS 細胞を作製し、これから分化させた T 細胞が単一の T 細胞受容体を持つことが示された。これは単に細胞を初期化できたということだけでなく、第一に遺伝子再構成を受けた受容体をもつ T 細胞は、iPS となって初期化された後、その成熟過程で受容体の再度の再構成を受けず、T 細胞受容体が維持されたことが示された。第二に iPS 細胞技術はこれまで困難とされた T 細胞のクローン化を自在にし、大量の供給が可能となることを示した。我々はこの技術を応用し、ヒト進行食道癌患者において、NY-ESO-1 陽性患者の末梢血リンパ球及び腫瘍浸潤リンパ球を採取し、ペプチドプールを用いて活性化する。活性化された T 細胞を iPS 細胞クローン化技術により、マウス

で構築したシステムを用いて、有効な T 細胞受容体を同定する。

2. 研究の目的

iPS 細胞技術を使用し T 細胞のクローン化を自在にし、大量の供給を可能とする。腫瘍反応性 T 細胞は、老化・疲弊した状態であるので、これを“若返り”させることにより、増殖能・細胞障害性を取り戻し、繰り返し輸注を行うことで、持続的に抗腫瘍効果を発揮すること、T 細胞受容体の遺伝子配列をシーケンスし、有効な T 細胞受容体の同定を可能とすること目的とする。

3. 研究の方法

マウス腫瘍樹立モデルによる抗原特異的 T 細胞の誘導し、これより iPS 細胞を作成し、iPS 由来 T 細胞への誘導を行い、この T 細胞受容体をシーケンスしデータの整合性の解析を行う。次にヒト食道癌患者で上記の方法で iPS 由来 T 細胞への誘導を行う。この際、生検組織と血清で患者の絞り込みを行う。具体的には、腫瘍樹立マウスでのペプチドプールを用いた抗原刺激で、マウスは C57BL/6 を使用し、マウス腫瘍細胞は C57BL/6 マウス由来の B16 悪性黒色腫細胞株に卵白アルブミン(ovalbumin; OVA)が導入されたものを使用する。OVA の全長配列を含むペプチドプールである、PepTivator® Ovalbumin を使用して、骨髄由来樹状細胞にて免疫し、治療を行う。免疫は 5 日毎に 3 回を行い、20 日目に末梢血リンパ球、及び腫瘍浸潤リンパ球を採取する。次に、マウス末梢血/腫瘍浸潤リンパ球の採取とペプチドプールによる活性化を行う。刺激し、活性化されたリンパ球を FCM で活性化を確認する。活性化末梢血・腫瘍浸潤リンパ球を用いた iPS 細胞作成を行う。次に、iPS 細胞より分化させた腫瘍反応性 CD8+T 細胞を作成し、その機能を検証する。さらに、これらの樹立された T 細胞受容体のシーケンス解析を行い、腫瘍反応性 T 細胞受容体の同定を行う。この結果より、有効なペプチド配列も決定できる。B16 や EL4 に関するシーケンスデータはあるので、そのデータとの整合性を検証し、ネオアンチゲン同定に利用する。これらの方法が検証できればヒト腫瘍組織生検及び末梢血抗体測定による对照患者の絞り込み、ヒト食道癌患者末梢血/腫瘍浸潤リンパ球の採取とペプチドプールによる活性化、進行食道癌患者の末梢血及び手術時に採取可能なリンパ球を培養する。PepTivator® NY-ESO-1 - premium

grade(human, Miltenyi Biotec)を使用し、活性化を行う。末梢血・腫瘍浸潤リンパ球を用いた iPS 細胞作成し、活性化されたリンパ球に SV40 にて山中因子を導入し、iPS 細胞を作成する。

4 . 研究成果

腫瘍樹立マウスでのペプチドプールを用いた抗原刺激で、活性化されたリンパ球を確認した。B16 メラノーマ細胞株および EL4 T 細胞リンパ腫に卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) が導入された B16-OVA 及び EG-7 でも、ova8 peptide transgenic (OT-I)マウスモデルでも通常のマウスで活性化を確認できた。腫瘍内にての特異的 T 細胞の数が少ないために、NKT 細胞を介した特殊な免疫方法で腫瘍内の抗原特異的 T 細胞の導入を行い、これに成功した。脾臓内及び腫瘍内で有効に導入されることを確認した。これらの腫瘍内 T 細胞の効率的な導入により、採取細胞数を増加させることができた。このため、これらの T 細胞のシーケンスを行なっている段階である。腫瘍反応性 T 細胞が含まれていることを確認し、シーケンスを行い、データの整合性を検討する予定である。この技術を早急に確立し、ヒトの応用を試みる予定である。ヒトの T 細胞の iPS 細胞化に関しては、共同研究者が $\gamma\delta$ T 細胞の iPS 細胞化に成功しているために、この技術を取り入れて行く予定である。

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 8 件)

Kimihiro Yamashita, Akira Arimoto, Masayasu Nishi, Tomoko Tanaka, Mitsugu Fujita, Eiji Fukuoka, Yutaka Sugita, Akio Nakagawa, Hiroshi Hasegawa, Satoshi Suzuki, Yoshihiro Kakeji.

Application of iNKT Cell-targeted Active Immunotherapy in Cancer Treatment. Anticancer Res. 査読有、2018、in press

② Daisuke Watanabe, Michiyo Koyanagi-Aoi, Mariko Taniguchi-Ikeda, Yukiko Yoshida , Takeshi Azuma, Takashi Aoi. The Generation of Human $\gamma\delta$ T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells from Whole Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture. Stem Cells Transl Med. 査読有、7(1)、2017、pp.34-44
doi: 10.1002/sctm.17-0021.

Ryo Ishida, Michiyo Koyanagi-Aoi, Nobu Oshima, Yoshihiro Kakeji, Takashi Aoi The Tissue-Reconstructing Ability of Colon CSCs Is Enhanced by FK506 and Suppressed by GSK3 Inhibition. Mol Cancer Res. 査読有、15(10)、2017、pp.1455-1466.
doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0071.

西 将康、山下 公大、長谷川 寛、田中 智子、有本 聡、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、 α -galactosylceramide 付加細胞投与による NKT 細胞活性化を介した抗腫瘍免疫療法、Cytometry research、査読有、Vol.27、2017、pp.7-12
https://doi.org/10.18947/cytometryresearch.27.1_7

瀧口 豪介、西田 満、栗田 佳菜、掛地 吉弘、南 康博、Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis、Cancer Sci、査読有、Vol.107、2016、pp.290-297、doi: 10.1111/cas.12871

山下 公大、長谷川 寛、藤田 隆、西 将康、田中 智子、有本 聡、鈴木 知志、神垣 隆、掛地 吉弘、Host CD40 Is Essential for DCG Treatment Against Metastatic Lung Cancer、Anticancer Res、査読有、Vol.36、2016、pp.3659-3665
<http://ar.iiarjournals.org/content/36/7/3659.full>

石田 諒、掛地 吉弘、青井 貴之、癌幹細胞研究の課題、Cytometry research、査読有、26 巻、2016、pp.7-13
doi:10.18947/cytometryresearch.26.2_7

西 将康、 α -galactosylceramide 付加細胞投与による NKT 細胞活性化を介した抗腫瘍免疫療法、Cytometry research、査読有、27 巻、2016、pp.7-12
https://doi.org/10.18947/cytometryresearch.27.1_7

[学会発表](計 5 件)

西 将康、山下 公大、長谷川 寛、田中 智子、有本 聡、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、腫瘍抗原導入 DCG を用いた抗腫瘍免疫活性化の検討、第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会、2017.6.11、神戸国際会議場 (兵庫県)

西 将康、山下 公大、長谷川 寛、田中 智子、有本 聡、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、押切 太郎、松田 武、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、腫瘍抗原導入 DCG を用いた抗原特異的な抗腫瘍免疫活性化、第 38 回癌免疫外科研究会、2017.5.25、倉敷アイビースクエア(岡山県)

長谷川 寛、山下 公大、西 将康、田中 智子、有本 聡、山本 将士、金治 新悟、松田 武、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、alpha-galactosylceramide による NKT 細胞活性化と肝傷害、第 26 回日本サイトメトリー学会学術集会、2016.7.23、九州大学医学部百年講堂 中ホール (福岡県)

西 将康、山下 公大、山本 将士、金治 新悟、金光 聖哲、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、Allogeneic DCG 療法を用いた NKT 細胞の活性化に伴う抗腫瘍降下の検討、第 71 回日本消化器外科学会総会、2016.7.15、アスティとくしま (徳島県)

石田 諒、大嶋 野歩、掛地 吉弘、青木 貴之、特定因子の導入による人工大腸癌幹細胞の誘導、第 25 回日本サイトメトリー学会学術集会、2015.7.15、ソラシティカンファレンスセンター (東京都)

[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

中村 哲 (NAKAMURA, Tetsu)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10403247

(2)研究分担者

神垣 隆 (KAMIGAKI, Takashi)
神戸大学・医学研究科・客員教授
研究者番号：20372641

掛地 吉弘 (KAKEJI, Yoshihiro)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：80284488

山下 公大 (YAMASHITA, Kimihiro)
神戸大学・医学部附属病院・特命助教
研究者番号：80535427

(3)連携研究者

青井 貴之 (AOI, Takashi)
神戸大学・医学研究科・特命教授
研究者番号：00546997

(4)研究協力者

田中 智子 (TANAKA, Tomoko)
神戸大学・医学部附属病院・医員

西 将康 (NISHI, Masayasu)
神戸大学・医学部附属病院・医員