

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10137

研究課題名(和文) 癌抗原ペプチド、T細胞刺激と免疫抑制性細胞制御による癌特異的CTL誘導と細胞療法

研究課題名(英文) Cancer antigen-specific CTL induction and immune cell therapy using cancer antigen peptide, T cell co-stimulation, and immunosuppressive cell regulation

研究代表者

三宅 亨 (Miyake, Toru)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70581924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗腫瘍免疫細胞療法の問題点は、誘導できる腫瘍特異的CTL数に限界があること、担癌生体内へ移入されたCTLは増殖できず、機能抑制やアポトーシスに陥る事である。マウスHER2陽性乳癌に対し移入したHER2特異的CTLが担癌宿主環境内で増殖し、抗腫瘍活性を維持できる方法を開発し、そのメカニズムの一端を解明する研究をおこなった。その結果、腫瘍特異的CTLを樹立する過程で、癌抗原ペプチド刺激とT細胞へのOX40補助刺激をうけたCTLは、in vitroでは増殖や分化が抑制され、担癌宿主へ移入後に分裂増殖し、抗腫瘍効果を発揮し、腫瘍特異的メモリーCTLとして宿主内に長期維持できることを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)： The main problems of anti-tumor immune cell therapy are followings; there is a limitation of the number of tumor-specific CTLs that can be induced; CTLs transferred to tumor bearing host cannot proliferate in vivo, lose their function, and undergo apoptosis.

We studied to develop a method by which HER2-specific CTL transferred into the HER2-positive breast tumor-bearing mouse can proliferate in the tumor-bearing environment and maintain antitumor activity. As a result, we have demonstrated that tumor Ag-specific CTLs that were generated in vitro in the presence of an MHC-class I-restricted peptide and OX40 co-stimulation are early-differentiated effector T cells and also have the ability to eradicate tumors, and the potential for expansion and maintenance in tumor-bearing host.

研究分野：消化器外科

キーワード：免疫細胞治療 養子免疫 抗体療法 補助刺激 免疫チェックポイント阻害

1. 研究開始当初の背景

癌ワクチン療法や細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 療法などがヒト癌免疫治療に臨床応用されてきたが、未だ満足のいく臨床成果は得られていない。生体では癌抗原 (自己抗原) に対する免疫寛容 (トレランス) が働くために、ワクチンのみでは癌抗原特異的 CTL の誘導が難しく、多くの場合 CTL はアナジーに陥りアポトーシスを起こすと考えられる。また、*in vitro* で癌抗原特異的 CTL を作製し細胞移入しても、生体のトレランス機能に負け CTL 機能が抑制され抗腫瘍作用を失ってしまう。したがって、免疫トレランスを打破する方法の開発が、ヒト癌免疫治療を成功へと導く鍵となる。

CTL 細胞療法の場合、免疫トレランスを打破して抗腫瘍効果を増強するには、1) 癌抗原に高い特異性をもつ CTL を樹立する事、2) 細胞移入する CTL 機能を高めると同時に、移入された担癌生体内でも増殖できる能力を保持させる事、さらに、3) 担癌生体の免疫トレランスを調節している制御性 T 細胞の機能を抑制する環境を作り出す事だと考えている。

我々は腫瘍抗原 (HER2/neu) に対する免疫トレランスが成立したマウスモデルにおいて、TNF Receptor Family の一つで T 細胞の補助刺激因子である OX40 (CD134) を介するシグナルを作用させると、CTL がトレランスに打ち勝って誘導され、アポトーシス抑制蛋白が増加しアポトーシスが抑制され、かつ、強い抗腫瘍効果を発揮することを示した (Murata S, et al. *J Immunol*, 2006)。また、この OX40 シグナルは CD4⁺ ヘルパー T 細胞を介してだけでなく、CD8⁺ T 細胞 (CTL) にも直接作用し、CTL を直接的に機能増強することを見いだした (Murata S, et al. *J Immunol*, 2006)。さらに、免疫トレランスの維持に重要な働きを持つ制御性 T 細胞 (Treg) に OX40 シグナルが入ると、Treg の抑制作用に不可欠な転写因子 Foxp3 の発現が減弱し、Treg がその抑制機能を失い、その結果 CTL の抗腫瘍効果が増強することを *in vitro*, *in vivo* で初めて示した (Kitamura N, et al. *Int J Cancer*, 2009)。

さらに、CTL 細胞移入を受ける前に、担癌マウスに agonistic な作用を持つ anti-OX40 抗体を投与しておく、Treg 機能が抑制され、移入した CTL の抗腫瘍機能が増強維持されることも示した (Ueki T, et al. *Mol Med Rep*, 2009)。

2. 研究の目的

これまでの研究結果を踏まえ、OX40 のもつ制御性 T 細胞の機能抑制作用と CTL 機能増強作用に着目し、さらに強力な抗腫瘍 CTL 細胞治療開発に繋げたい。特徴ある作用を持つ免疫作用物質 OX40 を利用し、担癌生体内での免疫トレランスに打ち勝つ、癌抗原特異的 CTL 細胞治療法の樹立を本研究の目的と

する。

3. 研究の方法

癌抗原特異的 CTL の樹立と移入された担癌生体内での機能維持

マウスモデル：ヒト細胞療法を念頭に置き、TCR トランスジェニックマウスではなく、wild-type マウス (FVB/N) モデルを用いた。

癌ペプチド特異的 CTL の樹立と細胞移入：wild-type マウス (FVB/N) モデルであっても、養子移入可能で担癌生体で検出可能な癌抗原特異的 CTL を、これまでの研究で確立できている。(Ueki T, Murata S. et al. *Mol Med Rep*, 2009)

- 腫瘍抗原ペプチド (RNEU₄₂₀₋₄₂₉) を、T2D^q 細胞 (抗原提示細胞) にパルスし、NT 腫瘍接種と HER2/neu ワクチン接種を受けたマウス脾細胞より Nylon wool カラムで分離した T 細胞と接触培養させた。
- RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺ T 細胞を誘導し増殖させた。
- CD8⁺ T 細胞を磁器ビーズ分離キットでポジティブセレクションした。
- RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺ T 細胞を含む CD8⁺ T 細胞を、NT 腫瘍接種を受け担癌状態になったマウスに、6x10⁷ 個を養子移入した。
- 養子移入 6 日目に、レシピエント脾臓中の RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺ T 細胞を細胞内 IFN- 染色 (ICS) により検出した。

以下の様に、agonistic な作用を持つ anti-OX40 抗体による T 細胞の OX40 補助刺激という免疫作用介入処置を受けて誘導された CTL を用いて、担癌レシピエントに細胞移入した。移入された腫瘍抗原特異的 CTL が、OX40 補助刺激を受けずに誘導された CTL と比較し、抗腫瘍免疫機能が長期間維持され、抗腫瘍効果が増強されるかどうかを明らかにした。

評価は腫瘍径の測定と、レシピエント脾臓細胞における RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺ T 細胞を細胞内 INF- 染色 (ICS) でおこなった。

【免疫的介入・処置】

1) 抗 OX40 抗体と共培養し OX40 補助刺激を受けた CTL を、レシピエント担癌マウスへ養子移入した。

2) RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺ T 細胞が最も多く誘導できる至適日数を決定した。

3) 誘導された RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺ T 細胞において、effector T 細胞の早期分化状態を示す CD27, CD62L, CCR7 マーカー陽性細胞の割合を調べた。

4) 誘導された RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺ T 細胞において、anti-apoptotic マーカー Bcl-2 発現を調べた。

5) 誘導された RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺ T 細胞において、CSFE 染色により細胞分裂の状態を

調べた

6) 誘導された RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺T 細胞を含む CD8⁺T 細胞を、レシピエント担癌マウスへ養子移入した。

7) レシピエント担癌マウスの腫瘍径測定をおこない抗腫瘍効果を調べた。

8) CTL 細胞移入 6 日目に、レシピエント脾細胞における RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺T 細胞を細胞内 INF- 染色 (ICS) で調べ、移入した RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺T 細胞の担癌環境での機能維持状態を調べた。

9) CTL 細胞移入 42 日目に、レシピエント脾細胞における RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺T 細胞を細胞内 INF- 染色 (ICS) で調べ、移入した RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺T 細胞が担癌環境で機能維持し、メモリーCTL 細胞となりうるかを調べた。

10) 誘導された RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺T 細胞を含む CD8⁺T 細胞を、レシピエント担癌マウスへ養子移入する直前に、CSFE でラベリングをおこない、レシピエント担癌マウスへ養子移入後 6 日目に、移入した CD8⁺T 細胞の細胞分裂状態を調べた。

4. 研究成果

腫瘍抗原ペプチド (RNEU₄₂₀₋₄₂₉) 刺激により *in vitro* で誘導される HER2 特異的 CD8⁺T 細胞数は、培養 7 日目で最大になることがわかった。

OX40 補助刺激を受けて誘導された RNEU₄₂₀₋₄₂₉ 特異的 CD8⁺T 細胞 (HER2 特異的 CTL) (HER2-specific CTL with OX40-cos) は、OX40 補助刺激を受けずに誘導された HER2 特異的 CTL (HER2-specific CTL without OX40-cos) に比べ、誘導過程で分裂増殖は少なかった。また、effector T 細胞の早期分化状態を示す CD27, CD62L, CCR7 マーカー陽性細胞は有意に多かった。さらに、anti-apoptotic マーカー Bcl-2 発現も有意に高値であった。

HER2 陽性乳癌マウスへ CTL 細胞移入療法を行うと、OX40 補助刺激を受けて誘導された HER2 特異的 CTL は、担癌マウス内で分裂増殖していた。また、HER2 特異的 CTL 機能を維持でき、腫瘍拒絶することができた。さらに移入 T 細胞は腫瘍拒絶後も長期間 HER2 特異的 CTL 機能を維持し、メモリーCTL となることができた。

一方、OX40 補助刺激を受けずに誘導された HER2 特異的 CTL は、担癌宿主内では分裂増殖できず、HER2 特異的 CTL 機能も失い、腫瘍は増殖していった。

以上の結果から、腫瘍特異的 CTL を樹立する過程で癌抗原ペプチド刺激と T 細胞の OX40 補助刺激をうけて誘導された CTL は、*in vitro* では増殖や分化が抑制され、担癌宿主へ移入されたあと分裂増殖し、抗腫瘍効果を発揮し、腫瘍特異的メモリーCTL として宿主内に長期維持できることが初めて明らかと

なった。

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)

In vivo antitumor function of tumor antigen-specific CTLs generated in the presence of OX40 co-stimulation *in vitro*.
Pham Minh N, Murata S, Kitamura N, Ueki T, Kojima M, Miyake T, Takebayashi K, Kodama H, Mekata E, Tani M.
Int J Cancer. 2018;142(11):2335-2343.

[学会発表](計2件)

Immunological activities of adoptively transferred tumor antigen-specific CTLs costimulated with OX40 signaling *in vitro*
Pham Minh Ngoc, Satoshi Murata, Naomi Kitamura, Tomoyuki Ueki, Masatsugu Kojima, Toru Miyake, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Yuki Kawai, Yataro Daigo, Eiji Mekata, Masaji Tani
第76回日本癌学会学術総会 2017年 横浜

Using OX40 co-stimulation *in vitro* to generate tumor antigen-specific CTLs for adoptive cell transfer therapy
Pham Minh Ngoc, Satoshi Murata, Naomi Kitamura, Tomoyuki Ueki, Katsushi Takebayashi, Masatsugu Kojima, Toru Miyake, Hirokazu Kodama, Eiji Mekata, Masaji Tani
第46回日本免疫学会学術集会 2017年 仙台

[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:
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:
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

三宅 亨 (MIYAKE, Toru)

滋賀医科大学・外科学講座・助教

研究者番号：70581924

(2) 研究分担者

北村直美 (KITAMURA, Nomi)

滋賀医科大学・救急集中治療医学講座・助教

研究者番号：30572474

谷 眞至 (TANI, Masaji)

滋賀医科大学・外科学講座・教授

研究者番号：60236677

清水智治 (SHIMIZU, Tomoharu)

滋賀医科大学・外科学講座・准教授

研究者番号：70402708

目片英治 (MEKATA, Eiji)

滋賀医科大学・総合外科学講座・教授

研究者番号：80314152

村田 聡 (MURARA, Satoshi)

滋賀医科大学・腫瘍センター・講師

研究者番号：90239525

(3) 研究協力者

Pham Minh Ngoc (大学院生)

小島正継 (MASATSUGU Kojima) (助教)