

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15601

研究課題名(和文) がん微小環境の制御による腫瘍浸潤免疫細胞の誘導と新規がん免疫療法への応用

研究課題名(英文) Induction of tumor infiltrating immune cells through regulation of tumor microenvironment and its application for novel cancer immunotherapy

研究代表者

笹田 哲朗 (Sasada, Tetsuro)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・がんワクチンセンター・部長

研究者番号：70293967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、がん微小環境の人工的制御により腫瘍局所への免疫細胞浸潤、異所性リンパ様組織形成を効率よく誘導する方法を開発することである。マウス移植腫瘍モデルを用いて、ケモカインCCL21・CXCL13による微小環境制御の腫瘍増殖、免疫細胞浸潤に対する影響を検討した。CCL21・CXCL13を強制発現した細胞株をマウスに移植したところ、腫瘍の増殖速度低下、マウスの生存期間延長を認めた。また、CXCL13・CCL21の強制発現は腫瘍局所へのT細胞・B細胞浸潤を誘導したが、異所性リンパ様組織は形成されなかった。今後も、他のケモカイン・サイトカインに関して引き続き検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop the method to efficiently induce infiltration of immune cells and formation of ectopic lymphoid structures within tumor tissues through artificial modulation of tumor microenvironment. This study examined the effects of chemokines, CCL21 and CXCL13, on tumor growth and immune cell infiltration in murine tumor models. The murine tumor cell lines transfected with CCL21 or CXCL13 showed retardation of tumor growth when implanted into mice, resulting in prolongation of survival of tumor-bearing mice. In addition, they induced infiltration of T cells and B cells within tumor tissues, but did not develop ectopic lymphoid structures. We will further investigate the effects of other chemokines and cytokines on tumor growth and immune cell infiltration and identify the methods to artificially develop ectopic lymphoid structures within tumor tissues.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍浸潤免疫細胞 ケモカイン サイトカイン 異所性リンパ様組織 がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

以前より腫瘍局所へのT細胞浸潤の多寡ががん患者の予後に相関すると報告されてきたが、我々はT細胞のみならずB細胞、樹状細胞、マクロファージ、など多彩な免疫細胞から構成される異所性リンパ様組織 (tertiary lymphoid structure) の存在が膵がん患者の予後改善と強く相関することを明らかとした。同様にがん組織に浸潤する異所性リンパ様組織の臨床的重要性は、肺がん、悪性黒色腫、乳がん、大腸がん、など他のがん種でも最近次々に報告されている。こうした腫瘍局所への免疫細胞の浸潤・集積はがん免疫療法が臨床効果を発揮するための必須要件の一つと考えられるが、元々腫瘍局所へ免疫細胞の浸潤・集積を認める症例は限られる。従って、がん微小環境を人工的に制御することで、効率よく腫瘍局所へ免疫細胞を浸潤・集積させ、異所性リンパ様組織を誘導させうる免疫学的アプローチの開発を着想した。

異所性リンパ様組織は慢性感染症や自己免疫疾患などの慢性炎症組織でしばしば観察され、その成因として lymphotoxin などのサイトカインやT細胞・B細胞遊走因子である CCL21、CXCL13 などのケモカインが関与するとされている。一方、がん組織においても、これら各種サイトカイン・ケモカインが免疫細胞の腫瘍局所への浸潤・集積に関連すると示唆する報告はあるが、異所性リンパ様組織誘導の分子メカニズムは十分に解明されているとは言えない。

2. 研究の目的

ケモカイン CCL21、CXCL13 やサイトカイン lymphotoxin- α に注目し、がん微小環境の制御により効率的に腫瘍局所へ免疫細胞を浸潤・集積させ、異所性リンパ様組織を誘導させうる方法をマウス腫瘍モデルを用いて開発する。

本研究は、“がん抗原特異的な免疫細胞をいかに効率的に腫瘍局所へ浸潤・集積させるか”という、これまでのがん免疫研究・臨床試験で明らかとなった重要課題の解決を目指すものである。本研究の成果は可及的早期に臨床応用したいと考えており、がん免疫療法発展のブレークスルーとなるものと期待される。

3. 研究の方法

マウスメラノーマ細胞株 (B16-F10 ; C57BL/6 マウス由来) に CCL21、CXCL13 の各遺伝子を導入した強制発現株およびコントロール株 (空ベクターを遺伝子導入した細胞株) を樹立した。コントロール株および各遺伝子の強制発現株 (単独あるいは複数を混合して) をマウスに移植し、腫瘍増殖速度およびがん微小環境の特性を比較・検討した。がん微小環境の評価として、摘出腫瘍組織における免疫細胞浸潤を免疫組織染色法により

解析した。特に、腫瘍局所に異所性リンパ様組織を誘導するかどうかに注目した。

なお、使用するマウス、腫瘍細胞株の種類により解析結果が異なる可能性があるため、他の乳腺腫瘍細胞株 (4T1 ; BALB/c マウス由来) を用いて同様の解析を実施した。

4. 研究成果

(1) マウス腫瘍細胞株 (B16-F10 あるいは 4T1) に CXCL13 あるいは CCL21 を遺伝子導入した強制発現株 (CXCL13 発現株、CCL21 発現株) およびコントロール株を樹立した。CXCL13・CCL21 強制発現の腫瘍増殖、腫瘍局所での免疫細胞浸潤に対する影響を調べた。(2) コントロール株、CXCL13 発現株、CCL21 発現株、両者の混合 (CXCL13 発現株 + CCL21 発現株) をマウス皮下に移植し、腫瘍増殖速度を測定したところ、CXCL13 発現株、CCL21 発現株ではコントロール株と比較して、腫瘍増殖速度が有意に低下した。また、CXCL13 発現株と CCL21 発現株との混合 (CXCL13 + CCL21) では、CXCL13 発現株あるいは CCL21 発現株単独と比較して腫瘍増殖速度に差を認めなかった。4T1 細胞株での結果を図 1 に示すが、B16-F10 細胞株においても同様な結果が得られた (なお、両細胞株ともに各群での個体差が大きかったために、同じ移植実験を 3 回ずつ繰り返すことにより、再現性を確認した)。

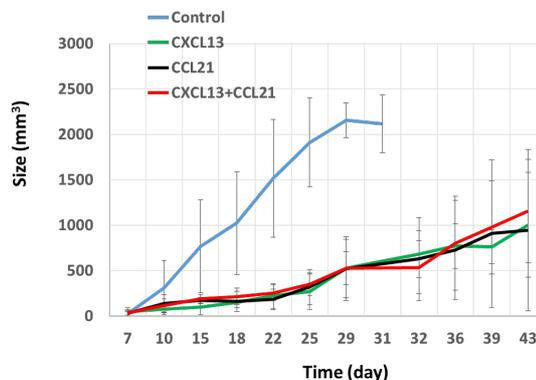


図 1 : 強制発現株 (4T1細胞株) の増殖

なお、CXCL13 発現株、CCL21 発現株を移植したマウスにおいては、肝臓および脾臓の腫大を認めた。摘出した肝臓・脾臓組織を HE 染色および免疫組織染色で調べたところ、転移腫瘍は認めず顆粒球の浸潤によることが判明した。現在、そのメカニズムを探索中である。

(3) CCL21 発現株、CXCL13 発現株ではコントロール株と比較して、生存期間が有意に延長した。B16-F10 細胞株での結果を図 2 に示すが、4T1 細胞株においても同様な結果が得られた。なお、CCL21 発現株と CXCL13 発現株との混合 (CCL21 発現株 + CXCL13 発現株) では、CCL21 発現株単独あるいは CXCL13 発現株単独と比較して生存期間に差を認めなかった (デ

ータ示さず)。

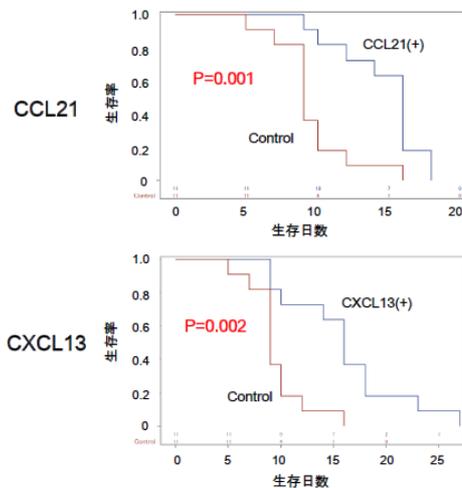


図2：強制発現株 (B16-F10細胞株) 移植マウスの生存期間

(4) 摘出した腫瘍組織をホルマリン固定したのち、免疫組織染色(抗 CD3 抗体、抗 CD45R 抗体、抗 FoxP3 抗体)により腫瘍局所へ浸潤する T 細胞、B 細胞、制御性 T 細胞を同定した。図 3 に B16-F10 細胞株(コントロール株および CCL21 発現株)での抗 CD3 抗体を用いた免疫染色の結果(CD3 陽性細胞は赤く染色)を例示する。

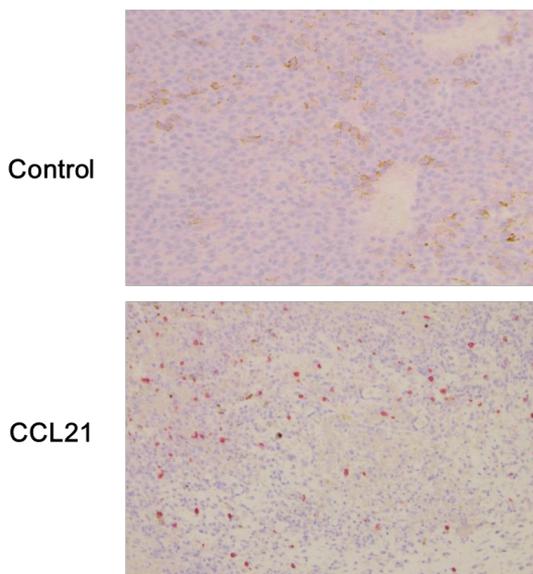


図3：腫瘍 (B16-F10細胞株) への T 細胞浸潤

同定した T 細胞、B 細胞、制御性 T 細胞の腫瘍単位面積当たりの個数を計算した (4T1 細胞株での結果を図 4 に示す)。CCL21 発現株ではコントロール株と比較して有意に T 細胞、B 細胞の浸潤が増加していた。CXCL13 発現株においてもコントロール株と比較して T 細胞、B 細胞浸潤が増加する傾向にあったが、個体間のばらつきが大きく統計学的な有意差を認めなかった。制御性 T 細胞数においては各群間に統計学的な有意差を認めなかった。なお、異所性リンパ様組織と思われる

リンパ球の集積は認められなかった。

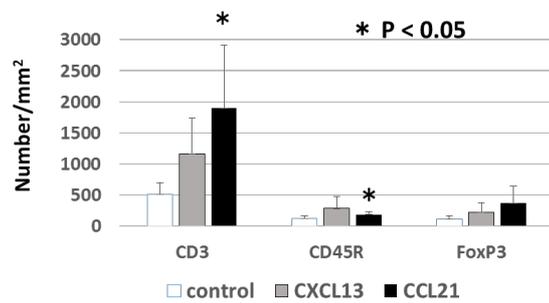


図4：腫瘍 (4T1細胞株) への免疫細胞浸潤

(5) 本研究の結果、CXCL13 あるいは CCL21 の強制発現は腫瘍局所への T 細胞・B 細胞浸潤を誘導し、腫瘍増殖を抑制することが示唆されたが、当初目的とした異所性リンパ様組織は誘導しなかった。現在、サイトカイン lymphotoxin- α を強制発現したマウス腫瘍細胞株 (B16-F10 あるいは 4T1) をマウス皮下に移植し、腫瘍増殖、腫瘍局所での免疫細胞浸潤に対する影響 (異所性リンパ様組織の誘導できるかどうか) を検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

Ishii H, Azuma K, Kawahara A, Matsuo N, Tokito T, Konishita T, Yamada K, Sasada T, Akiba J, Hoshino T. Programmed cell death-ligand 1 expression and immunoscore in stage II and III non-small cell lung cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncotarget*. 2017, 8(37):61618-61625. 査読有
DOI:10.18632/oncotarget.18651.

Ono T, Azuma K, Kawahara K, Sasada T, Hattori S, Sato F, Shin B, Chitose S, Akiba J, Umeno H. Association between PD-L1 expression combined with tumor-infiltrating lymphocytes and the prognosis of patients with advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017, 6;8(54):92699-92714. 査読有
DOI:10.18632/oncotarget.21564.

Suekane S, Ueda K, Nishihara K, Sasada T, Yamashita T, Koga N, Yutani S, Shichijo S, Itoh K, Igawa T, Noguchi M. Personalized peptide vaccination as second-line treatment for metastatic upper tract urothelial carcinoma. *Cancer Sci*. 2017, 108(12):2430-2437. 査読有
DOI:10.1111/cas.13404.

Yutani S, Shirahama T, Muroya D, Matsueda S, Yamaguchi R, Morita M,

Shichijo S, Yamada A, Sasada T, Itoh K. Feasibility study of personalized peptide vaccination for hepatocellular carcinoma patients refractory to loco-regional therapies. *Cancer Sci.* 2017, 108(9):1732-1738. 査読有 DOI:10.1111/cas.13301.

Ohtake J, Sasada T. Are peptide vaccines viable in combination with other cancer immunotherapies? *Future Oncol.* 2017, 13(18):1577-1580. 査読有 DOI:10.2217/fo-2017-0136.

Yada E, Wada S, Yoshida S, Sasada T. Use of patient-derived xenograft (PDX) mouse models in cancer research and treatment. *Future Science OA*, 4(3):FS0271. 査読有 DOI:10.4155/fsoa-2017-0136.

Sakamoto S, Matsueda S, Takamori S, Toh U, Noguchi M, Yutani S, Yamada A, Shichijo S, Yamada T, Suekane S, Kawano K, Naitou M, Sasada T, Hattori N, Kohno N, Itoh K. Immunological evaluation of peptide vaccination for cancer patients with the HLA -A11(+) or -A33(+) allele. *Cancer Sci.* 2017,108(4):598-603. 査読有 DOI:10.1111/cas.13189.

Shirahama T, Muroya D, Matsueda S, Yamada A, Shichijo S, Naito M, Yamashita T, Sakamoto S, Okuda K, Itoh K, Sasada T, Yutani S. A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine with low dose cyclophosphamide in biliary tract cancer. *Cancer Sci.* 2017, 108(5):838-845. 査読有 DOI:10.1111/cas.13193.

Sakamoto S, Yamada T, Terazaki Y, Yoshiyama K, Sugawara S, Takamori S, Matsueda S, Shichijo S, Yamada A, Noguchi M, Itoh K, Hattori N, Kohno N, Sasada T. Feasibility Study of Personalized Peptide Vaccination for Advanced Small Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2017, 18(6):e385-e394. 査読有 DOI:10.1016/j.clcc.2017.03.011.

Yokomine M, Matsued S, Kawanoa K, Sasada T, Yamashita T, Komatsu N, Shichijo S, Tasaki K, Matsukuma M, Itoh K, Kamura T, Ushijima K. Enhancement of humoral and cell mediated immune response to human papillomavirus 16 L1 derived peptides after vaccination with prophylactic bivalent human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine in healthy females. *Exp Ther Med.* 2017, 13(4):1500-1505. 査読有

DOI:10.3892/etm.2017.4150.

笹田哲朗: 遺伝子変異新規抗原(ネオアンチゲン)を標的としたがん免疫療法。(特集)がん免疫療法. *日本臨床* 2017, 75(2):189-195. 査読無

笹田哲朗. ネオアンチゲンを標的としたがん免疫療法. *医学のあゆみ* 2017, 263(1): 17917-17923. 査読無

Takayama K, Sugawara S, Saijo Y, Maemondo M, Sato A, Takamori S, Harada T, Sasada T, Kakuma T, Kishimoto J, Yamada A, Noguchi M, Itoh K, Nakanishi Y. Randomized Phase II Study of Docetaxel plus Personalized Peptide Vaccination versus Docetaxel plus Placebo for Patients with Previously Treated Advanced Wild Type EGFR Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Immunol Res.* 2016;2016:1745108. 査読有 DOI:10.1155/2016/1745108.

Wada S, Yada E, Ohtake J, Fujimoto Y, Uchiyama H, Yoshida S, Sasada T. Current status and future prospects of peptide-based cancer vaccines. *Immunotherapy.* 2016, 8(11): 1321-1333. 査読有

DOI:10.2217/imt-2016-0063.

Sasada T, Azuma K, Ohtake J, Fujimoto Y. Immune responses to epidermal growth factor receptor (EGFR) and their application for cancer treatment. *Frontiers in Pharmacology.* 2016, 7:405. 査読有 DOI:10.3389/fphar.2016.00405.

笹田哲朗: がんワクチン療法の進歩。(特集)がん免疫療法 - 最近の進歩と展望. *Pharma Media* 2016, 34(10): 17-22. 査読無

[学会発表](計 9 件)

Tetsuro Sasada, Junya Ohtake, Satoshi Wada, Erika Yada, Shintaro Yoshida: Comprehensive analysis of T cells responsive to neoantigens derived from tumor-specific genetic mutations. AACR 108th Annual Meeting, 2017.

大竹淳矢、里吉哲太、和田聡、矢田英理香、三神裕美、吉田慎太郎、塩沢学、笹田哲朗: 大腸がんにおける免疫細胞の形質・機能の解析と免疫抑制機構の解明 第 21 回日本がん免疫学会総会、2017.

Junya Ohtake, Tetsuta Satoyoshi, Satoshi Wada, Erika Yada, Hiromi Mikami, Shintaro Yoshida, Manabu Shiozawa, Tetsuro Sasada. Elucidation of potential immune suppressive mechanisms in colorectal cancer. 第 76 回日本癌学会学術集会, 2017.

Junya Ohtake, Tetsuta Satoyoshi, Keisuke Kazama, Satoshi Wada, Erika Yada, Hiromi Mikami, Shintaro Yoshida, Manabu Shiozawa, Tetsuro Sasada. Comprehensive analysis of immunological tumor environment in colorectal cancer. 第46回日本免疫学会学術集会, 2017.

Junya Ohtake, Satoshi Wada, Erika Yada, Yuki Fujimoto, Hidemi Uchiyama, Shintaro Yoshida, Tetsuro Sasada: Comprehensive analysis of T cell responses specific to neoantigens derived from gene mutations. 第75回日本癌学会学術集会, 2016.

Erika Yada, Junya Ohtake, Tetsuro Sasada, Satoshi Wada: Establishment of pancreatic patient-derived xenograft (PDX). 第75回日本癌学会学術集会, 2016.

Junya Ohtake, Satoshi Wada, Erika Yada, Yuki Fujimoto, Hidemi Uchiyama, Shintaro Yoshida, Tetsuro Sasada: High immunogenicity of neoantigens derived from tumor-specific gene mutations. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016.

大竹淳矢、和田 聡、矢田英理香、藤本佑希、内山秀美、吉田慎太郎、笹田哲朗: 突然変異遺伝子に対する特異的T細胞反応の網羅的解析. 第20回日本がん免疫学会総会, 2016.

矢田英理香、大竹淳矢、吉田慎太郎、藤本佑希、内山秀美、笹田哲朗、和田 聡: 膵臓がんゼノグラフトの有用性の検証 ~ 治療の新規標的分子の探索に向けて ~. 第20回日本がん免疫学会総会, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹田 哲朗 (SASADA, Tetsuro)
神奈川県立がんセンター・がんワクチンセンター・部長
研究者番号: 70293967

(2) 研究分担者

大竹 淳矢 (OHTAKE, Junya)
神奈川県立がんセンター・臨床研究所・研究員
研究者番号: 10758915