

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390266
 研究課題名 (和文) 腫瘍免疫に基づくホジキンリンパ腫の病態解明と新規治療法の開発研究

研究課題名 (英文) Development of novel treatment strategy against Hodgkin lymphoma based on the immunopathogenesis

研究代表者
 上田 龍三 (UEDA RYUZO)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：20142169

研究成果の概要 (和文)：腫瘍組織に浸潤するリンパ球 (TIL: Tumor infiltrating lymphocyte) 中のTregの存在は、様々ながんにおいて腫瘍細胞を宿主の免疫応答から回避させるだけでなく、癌ワクチンなどの癌免疫療法が未だ十分な効果をあげられない一因と考えられており、この制御性T細胞の制御は癌免疫療法が克服すべき大きな課題と考えられている。NOGマウスを用いたホジキンリンパ腫モデルにおいてCCR4抗体の投与はホジキンリンパ腫周囲のTregの数を減少せしめた。CCR4抗体はホジキンリンパ腫のみならず、様々ながんに対し、新しい概念の薬剤としての臨床応用が期待される。

研究成果の概要 (英文)：We have demonstrated that the anti-CCR4 mAb reduces the number of Treg cells among TIL in an in vivo NOG mouse model (bearing human tumor & engrafted with human immune cells). These results indicate that use of anti-CCR4 mAb could represent a novel strategy for the treatment not only of Hodgkin lymphoma, but also many other types of cancer by overcoming suppressive effects of Treg cells on the host's immune response to tumor cells. In the near future, the efficacy of the anti-CCR4 mAb in the latter context will also be established in clinical trials in humans.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ホジキンリンパ腫、腫瘍免疫、CCR4、EB ウィルス、MUM1/IRF-4

1. 研究開始当初の背景

ホジキンリンパ腫は絶対的多数の反応性リンパ球を主体とした炎症性背景のなかに、腫瘍細胞(ホジキン細胞、Reed-Sternberg細胞)が散在するのを組織学的特徴とする悪性リンパ腫である。欧米諸国で特にその発症頻度は高く、悪性リンパ腫のなかの約30%を占め、抗がん剤治療の進歩により治癒率の向上を認める一方、難治性の経過をたどる一群を認めることから新たな治療法の開発が切望されている。その病変部位の反応性リンパ球の生物学的役割は長らく不明であり、これまでも議論の的にされてきた。申請者らは、ホジキンリンパ腫細胞はCCR4のリガンドであるTARC/CCL17、MDC/CCL22を自己分泌することでCCR4陽性リンパ球を遊走させること、さらには遊走されたCCR4陽性リンパ球はT細胞の活性化を抑制する制御性T細胞(Treg)の機能を有していることを明らかにした。このことから抗CCR4抗体によってホジキンリンパ腫細胞周辺のTreg細胞を除去して宿主の抗腫瘍免疫の回復させる新しい免疫療法の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究者自身らの基礎研究をもとに開発された抗CCR4抗体を使用して、新たな概念の免疫療法、即ち、“制御性T細胞(Treg)の制御”をコンセプトとした治療法の確立である。

腫瘍組織に浸潤するリンパ球(TIL: Tumor infiltrating lymphocyte)中のTregの存在は、様々ながんにおいて腫瘍細胞を宿主の免疫応答から回避させるだけでなく、癌ワクチンなどの癌免疫療法が未だ十分な効果をあげられない一因と考えられており、この制御

性T細胞の制御は癌免疫療法が克服すべき大きな課題と考えられている。

本研究ではホジキンリンパ腫をその対象疾患とするが、本免疫療法の確立は他の多くのがんに適応可能と考える。

3. 研究の方法

文書での説明と同意が得られたホジキンリンパ腫患者から得られた病変部組織標本を用いて、CCR4、CCR4のリガンドTARC/CCL17・MDC/CCL22、EBER、LMP2、FOXP3の発現様式を解析した。

また、EBV陽性リンパ芽球様B細胞株(LCL)あるいはホジキンリンパ腫細胞株、を用い、NOGマウスをレシピエントとし、ホジキンリンパ腫モデルマウスを作製し、CCR4抗体及びLMP2特異的CTLの抗腫瘍効果を解析した。

4. 研究成果

ホジキンリンパ腫検体によるホジキンリンパ腫の免疫病態の解析:

文書での説明と同意が得られたホジキンリンパ腫症例で、CCR4、CCR4のリガンドTARC/CCL17・MDC/CCL22、EBER、LMP2、FOXP3の発現様式を解析した。研究者らは、これまでにホジキンリンパ腫の細胞株を使用して、ホジキンリンパ腫では腫瘍細胞及びその支持組織がCCR4のリガンドを産生してCCR4陽性制御性T細胞を周囲に遊走させる宿主免疫回避機構があることを明らかにし、報告してきた。ホジキンリンパ腫の免疫病態を明らかにするために、現在、これら、病理免疫組織学的知見が得られた症例において、治療反応性や予後などの各種臨床情報を併せて解析中であり、研究者らが臨床開発中のCCR4抗体

の適応となりうるホジキンリンパ腫重集団を同定しつつある。

ホジキンリンパ腫モデルマウスを使用した、病態解析 新規治療法の開発:

HLA-A2 または 24 を有する健常人から、HLA-A2 または 24 拘束性の LMP2 特異的 CTL を誘導し、増殖、調製した。これらの CTL クローンが HLA-A2 または 24 陽性の LCL 特異的に、強い細胞傷害活性を示すことを *in vitro* の 51Cr アッセイで確認した。

さらに LCL は TARC/CCL17 高産生の、ホジキンリンパ腫と同一の形質を有することを確認した。NOG マウスに LCL を生着させ、さらに autologous の PBMC をマウスに注入した。結果、LCL (大細胞) の周囲に反応性細胞が集積する、ホジキンリンパ腫類似の組織病変を有するモデルマウスを作製する系を確立した。また NOG マウスにホジキンリンパ腫細胞株を生着させ、human PBMC を投与することによっても、ホジキンリンパ腫類似の組織病変を有することを確認した。本モデルにおいて LMP2 特異的 autologous CTL は単独で有意な抗腫瘍効果を示し、実際に腫瘍局所にテトラマー陽性の CTL の集積を認めた。また、本モデルへの抗 CCR4 抗体投与は TIL 中の Treg の数を減少させた。現在 CTL 療法が直面する最も大きな障害は腫瘍局所の制御性 T 細胞の存在である。本研究の発展により、この最大の障害を臨床的に乗り越えることが期待される。CTL 及び抗 Treg 薬剤としての CCR4 抗体の併用効果が、ヒト化モデルマウスで安定して観察されており、今後の臨床応用が期待される。

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 18 件)

- ① Ishii T, Ishida T, Utsunomiya A, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S, Imada K, Uchiyama T, Akinaga S, Shitara K, Ueda R. Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Clin Cancer Res.* 2010;16:1520-1531. 査読有
- ② Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Yamaguchi K, Yamada Y, Hanada S, Tamura K, Nakamura S, Inagaki H, Ohshima K, Kiyoi H, Ishida T, Matsushima K, Akinaga S, Ogura M, Tomonaga M, Ueda R. Phase I Study of KW-0761, a Defucosylated Humanized Anti-CCR4 Antibody, in Relapsed Patients with Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma and Peripheral T-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2010;28:1591-8. 査読有
- ③ Ito A, Ishida T, Utsunomiya A, Sato F, Mori F, Yano H, Inagaki A, Suzuki S, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exerts potent ADCC against primary ATLL Cells mediated by autologous human immune cells in NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mice *in vivo*. *J Immunol.* 2009;183: 4782-91. 査読有

- ④ Ding J, Komatsu H, Iida S, Yano H, Kusumoto S, Inagaki A, Mori F, Ri M, Ito A, Wakita A, Ishida T, Nitta M, Ueda R. The Asn505 mutation of c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity. *Blood*. 2009;114:3325-8. 査読有
- ⑤ Inagaki A, Ishida T, Yano H, Ishii T, Kusumoto S, Ito A, Ri M, Mori F, Ding J, Komatsu H, Iida S, Ueda R. Expression of the ULBP ligands for NKG2D by B-NHL cells plays an important role in determining their susceptibility to rituximab-induced ADCC. *Int J Cancer*. 2009;125:212-21. 査読有
- ⑥ Ri M, Iida S, Ishida T, Ito A, Yano H, Inagaki A, Ding J, Kusumoto S, Komatsu H, Utsunomiya A, Ueda R. Bortezomib-induced apoptosis in mature T-cell lymphoma cells partially depends on upregulation of Noxa and functional repression of Mcl-1. *Cancer Sci*. 2009;100:341-8. 査読有
- ⑦ Ito A, Ishida T, Yano H, Inagaki A, Suzuki S, Sato F, Takino H, Mori F, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mouse model. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58: 1195-206. 査読有
- ⑧ Yano H, Kayukawa S, Iida S, Nakagawa C, Oguri T, Sanda T, Ding J, Mori F, Ito A, Ri M, Inagaki A, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Inagaki H, Suzuki A, Ueda R. Overexpression of carboxylesterase-2 results in enhanced efficacy of topoisomerase I inhibitor, irinotecan (CPT-11), for multiple myeloma. *Cancer Sci*. 2008;99:2309-14. 査読有
- ⑨ Yano H, Ishida T, Imada K, Sakai T, Ishii T, Inagaki A, Iida S, Uchiyama T, Ueda R. Augmentation of antitumor activity of defucosylated chimeric anti-CCR4 monoclonal antibody in SCID mouse model of adult T-cell leukaemia/lymphoma using G-CSF. *Br J Haematol*. 2008;140:586-9. 査読有
- ⑩ Kondo E, Tanaka T, Miyake T, Ichikawa T, Hirai M, Adachi M, Yoshikawa K, Ichimura K, Ohara N, Moriwaki A, Date I, Ueda R, Yoshino T. Potent synergy of dual antitumor peptides for growth suppression of human glioblastoma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:1461-71. 査読有
- ⑪ Ohmura Y, Yoshikawa K, Saga S, Ueda R, Kazaoka Y, Yamada S. Combinations of tumor-specific CD8+ CTLs and anti-CD25 mAb provide improved

immunotherapy. *Oncol Rep.* 2008;19:1265-70. 査読有

- ⑫ Yano H, Ishida T, Inagaki A, Ishii T, Ding J, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody combined with immunomodulatory cytokines: a novel immunotherapy for aggressive/refractory mycosis fungoides and sezary syndrome. *Clin Cancer Res.* 2007;13:6494-500. 査読有
- ⑬ Yano H, Ishida T, Inagaki A, Ishii T, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R. Regulatory T-cell Function of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Int J Cancer.* 2007; 120:2052-7. 査読有
- ⑭ Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, Shibata T, Fukushima T, Takatsuka Y, Ikeda S, Masuda M, Nagoshi H, Ueda R, Tamura K, Sano M, Momita S, Yamaguchi K, Kawano F, Hanada S, Tobinai K, Shimoyama M, Hotta T, Tomonaga M; Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *J Clin Oncol.* 2007;25:5458-64. 査読有
- ⑮ Li C, Takino H, Eimoto T, Ishida T, Inagaki A, Ueda R, Suzuki R, Yoshino T, Nakagawa A, Nakamura S, Inagaki H. Prognostic Significance of NPM-ALK Fusion Transcript Overexpression in

ALK-positive Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Mod Pathol.* 2007;20: 648-55. 査読有

- ⑯ Utsunomiya A, Ishida T, Inagaki A, Ishii T, Yano H, Komatsu H, Iida S, Yonekura K, Takeuchi S, Takatsuka Y, Ueda R. Clinical Significance of a blood eosinophilia in adult T-cell leukemia/lymphoma: a blood eosinophilia is a significant unfavorable prognostic factor. *Leuk Res.* 2007;31:915-20. 査読有
- ⑰ Shimizu S, Yoshinouchi T, Niimi T, Ohtsuki Y, Fuzita J, Maeda H, Sato S, Yamadori I, Eimoto T, Ueda R. Differing distributions of CXCR3-andCCR4-positive cells among types of interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases. *Virchows Arch.* 2007;450: 51-8. 査読有
- ⑱ Yoshinouchi T, Naniwa T, Shimizu S, Ohtsuki Y, Fujita J, Sato S, Eimoto T, Ueda R. Expression of chemokine receptors CXCR3 and CCR4 in lymphocytes of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. *Respir Med.* 2007; 101:1258-64. 20 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ueda R. CCR4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in ATLL. 8th AACR/JCB Conference. 5-9 February, 2010: Waikoloa, Hawaii.

② Yamamoto K, Tobinai K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Tomonaga M, Matsushima K, Shitara K, Akinaga S, Ueda R. Phase I study of KW-0761, a Defucosylated Patients (Pts) with Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma (ATLL) or Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL): Updated Results. The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology. 6-9 Dec., 2008, San Francisco, CA, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 龍三 (UEDA RYUZO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20142169

(2) 研究分担者

小松 弘和 (KOMATSU HIROKAZU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60336675

石田 高司 (ISHIDA TAKASHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80405183

稲垣 宏 (INAGAKI HIROSHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30232507