

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16458

研究課題名(和文)大腸がん患者に対する養子細胞療法におけるリンパ節の有用性の検討

研究課題名(英文)Utility of tumor-draining lymph nodes as new source of cell therapy for colorectal cancer patients

研究代表者

岡村 和美 (OKAMURA, Kazumi)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター 免疫ゲノム医療開発プロジェクト・研究員

研究者番号：80768630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：所属リンパ節は抗腫瘍免疫における重要な部位であり、腫瘍反応性リンパ球が存在していると考えられるが、それが細胞療法に有効であるかを検討した。手術時に摘出したリンパ節由来のリンパ球と、同患者から培養した自己の腫瘍細胞を共培養することにより、腫瘍反応性T細胞を効率的に体外で増殖させることが可能であった。またこれら増殖したT細胞のT細胞受容体は腫瘍に浸潤しているリンパ球(TIL)と同様のTCRを持つものであり、これらはPD1を発現するCD8陽性T細胞が多くを占めていた。これらの事より、リンパ節は細胞療法の新たな細胞源として用いられると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在免疫療法、とりわけ細胞療法は効果が期待される治療法である反面、すべての患者に適用できる治療法とはなり得ていない。今回、手術時に同時に摘出したリンパ節を用いる事により多くの患者で抗腫瘍効果を持つリンパ球を体外で増幅でき、細胞療法が行える可能性が示された。自己の細胞を用いることによる、安全面、また経済的な面での優位性が高いだけでなく、リンパ節細胞の保存は簡便であり、再発時などの局面ですぐに適用できる治療法として期待される。

研究成果の概要(英文)：Tumor-draining lymph nodes are primary sites, where anti-tumor lymphocytes are primed to tumor-specific antigens and play pivotal roles in immune responses against tumors. Lymphocytes from TDLNs resected during surgical operation were cultured with autologous-tumor cells for 2 weeks and evaluated tumor-reactivity by IFN- γ ELISPOT assay. We investigated the commonality of T cell receptor (TCR) clonotypes expanded by the co-culture with tumor cells with those of tumor infiltrating lymphocytes (TILs). We found that that TCR clonotypes of PD-1-expressing CD8+ T cells in lymph nodes commonly shared with those of TILs in primary tumors and lymphocytes having tumor-reactivity and TCR clonotypes shared with TILs could be induced from non-metastatic lymph nodes when they were co-cultured with autologous tumor cells. Our results imply that tumor-reactive effector T cells were present and could be expanded in vitro in the presence of autologous tumor cells and possibly be applied for ACT.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：養子免疫療法 大腸癌 T細胞受容体 所属リンパ節 腫瘍浸潤リンパ球

1. 研究開始当初の背景

腫瘍浸潤リンパ球(TILs)を用いた養子免疫療法は進行期の悪性黒色腫の患者への有用性が報告されているが、大腸がん患者への効果は限定的である。がん自体の免疫原性だけでなく、TILの腫瘍微小環境下での機能不全などの原因の一つである。そのため、新たな細胞療法の細胞ソースとして手術時に同時に摘出されるリンパ節に着目した。しかし、転移のないリンパ節では腫瘍反応性 T 細胞の比率が少ない事が予測され、細胞療法に用いるためにはそれらを特異的に対外で増殖させることができるかどうか鍵となると考えられた。

2. 研究の目的

手術時に同時に摘出された病理学的に転移のないリンパ節中に、腫瘍反応性 T 細胞が存在する事を証明し、またこれらを体外で増幅し、細胞療法の細胞ソースとして用いることができるかを検討すること

3. 研究の方法

(1)患者さんから摘出された腫瘍組織から、自己の腫瘍細胞株を樹立し、また同時に腸間膜とともに摘出されたリンパ節細胞を 2 週間共培養する事により、腫瘍反応性 T 細胞を体外で増幅させた。

(2)腫瘍に浸潤している T リンパ球の T 細胞受容体 (TCR) の clonotype と、自己腫瘍細胞株と共培養して増殖した T リンパ球の TCR の clonotype を比較し、腫瘍反応性を決定している因子を検討する。

(3)腫瘍反応性リンパ球が増殖させることができなかつた要因を腫瘍細胞株の HLA 発現パターン及び、リンパ節細胞の RNA 解析などを行い検討する。

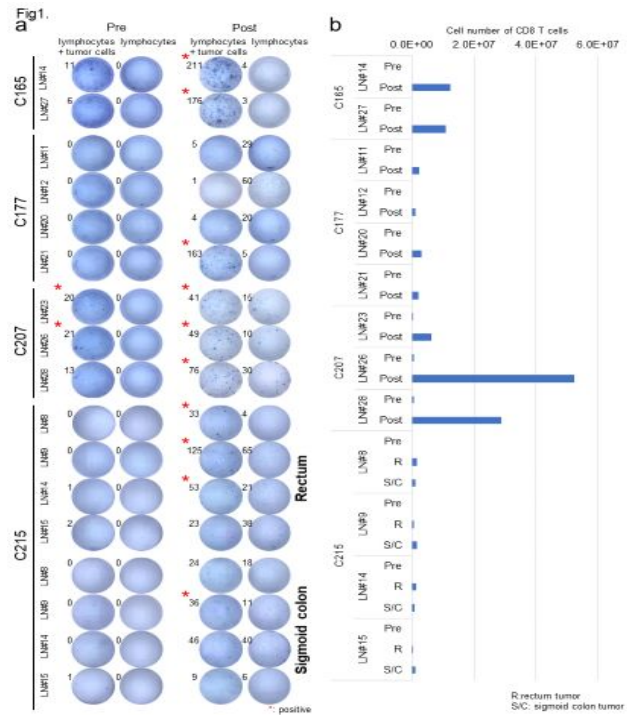
4. 研究成果

(1) 4人の患者の腫瘍組織より腫瘍細胞株を樹立した。1人の患者においては同時期に二つの腫瘍病変を認めたため、2箇所より樹立した。また同時に摘出された病理学的に転移が陰性であるリンパ節細胞のリンパ球を分離し樹立した腫瘍細胞で刺激し、IFN ELISPOT assay により腫瘍反応性を検討した。1例(C207)を除いて腫瘍反応性 T 細胞は認められなかった。(Fig.1a Pre)それらのリンパ球細胞を腫瘍細胞株と抗 PD-1 抗体及び、抗 CD28 抗体存在下にて 2 週間共培養した結果、腫瘍反応性を示した。(Fig.1a Post)

これらの結果から、自己から樹立した腫瘍細胞株と共培養する事により、腫瘍反応性 T 細胞を体外で増幅させられることが判明した。また腫瘍反応性を示したサンプルにおいては CD8T 細胞の増加が顕著であった。(Fig.1b)

(2)次に、C165 と C207 の二人の検体を用い、腫瘍浸潤性 T 細胞の TCR の clonotype と、共培養により増殖した T 細胞の TCR clonotype をそれぞれ比較した。C165 は腫瘍組織の 4 か所から培養して得られた T 細胞及び、C207 では腫瘍組織に浸潤していたリンパ球の TCR とそれぞれ比較を行った。(Fig 2a、2b)それらの結果から、腫瘍反応性を示した、C165 の二つのリンパ節及び、C207 から得られたすべてのリンパ節においては腫瘍浸潤性 T リンパ球と共通の TCR を持つ T 細胞が腫瘍細胞株との共培養により増加している事が判明した。これらの事より、腫瘍反応性を示す一つの要因として、腫瘍浸潤性 T リンパ球と共通した TCR を持つリンパ球を体外で増幅させることができるか一つの鍵であることは分かった。

また、リンパ節細胞由来の CD4 及び、CD8 リンパ球を PD1 の発現パターンによりソートした結果、PD1 を発現している、CD8T 細胞と、腫瘍浸潤リンパ球の TCR は共通性が高い事も判明した。しかし、この症例は Lynch 症候群と診断されているものであり、免疫原性の高い腫瘍によりこの現象が認められた可能性も考えられた。また、C177 および、C215 においては各々のリンパ節から培養されたリンパ球の TCR の共通性を確認した。C177 では一つのリンパ節のみ腫瘍反応性を



示したが、残り3つのリンパ節においては共通したTCRを持つリンパ球が増加している一方、腫瘍反応性を示した一つのリンパ節では異なるTCRを持つT細胞の増加が認められた。またC215では直腸がんと共に培養したリンパ球は3つのリンパ節で腫瘍反応性を示した一方、S状結腸癌と共に培養したサンプルでは1つのみが腫瘍反応性を示した。これらの各リンパ節間におけるTCRの共通性を検討したところ、直腸がん由来の細胞株に反応した3つのリンパ節では共通したTCRをもつリンパ球の増加が認められた。以上の結果より、腫瘍反応性はある特定の腫瘍抗原により活性化された特異的なTCRを持つT細胞を効率的に増幅させられるかに依存している事が判明した。

(3)最後に腫瘍反応性を示さなかったリンパ節における特徴の検討を行った。C177では4つのリンパ節のうち3つにおいて、腫瘍と共に培養した後、腫瘍細胞株で刺激するとIFN

Fig 2.

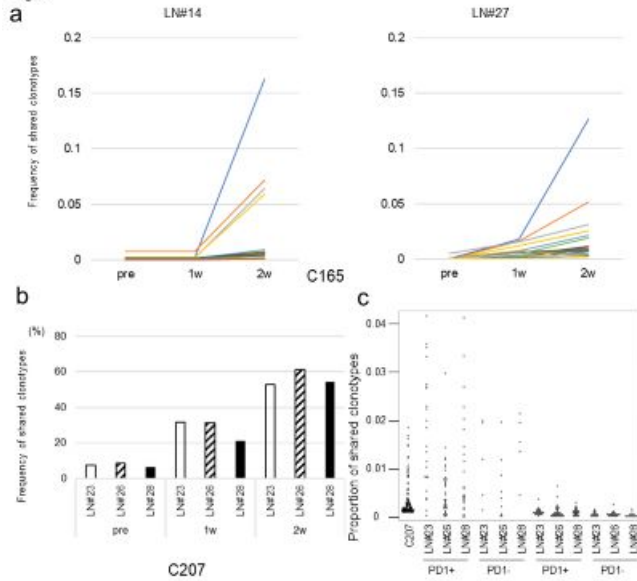
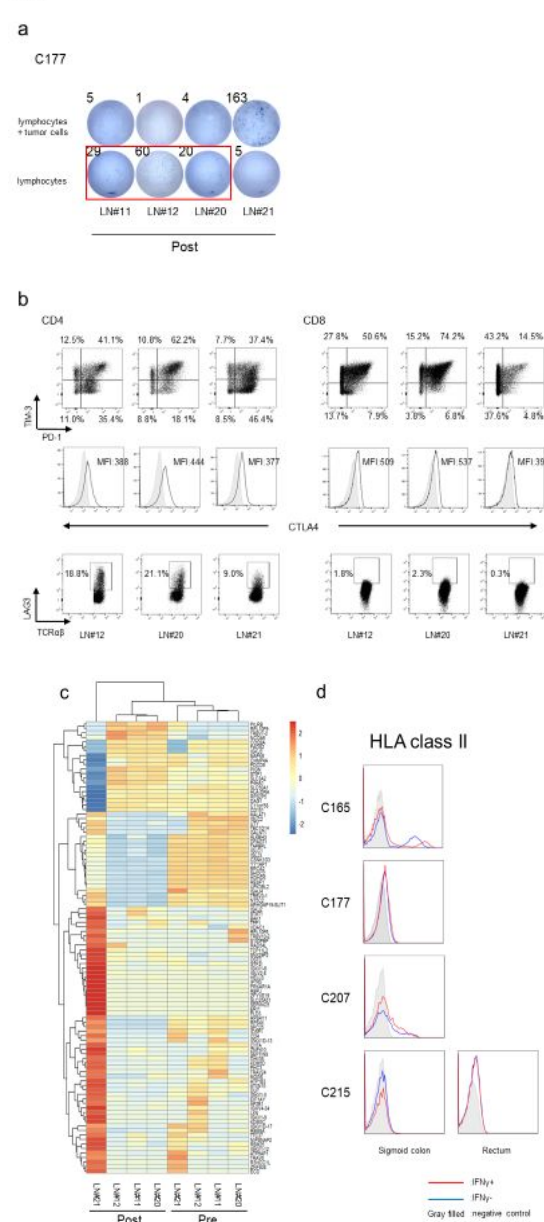


Fig3.



の産生が、抑制された(Fig.3a)。また、共培養後の細胞のPD-1、TIM3、LAG3、CTLA4などの抑制性の因子を検討したところ、腫瘍反応性を示したLN#21ではこれらの抑制性の因子の発現が他のリンパ節由来の細胞よりも少ない事が判明した(Fig.3b)。またRNA sequenceで比較した結果、共培養する前においては各リンパ節間においてはRNA発現パターンに有意差は見られなかったが、共培養後のサンプルにおいてはLN#21のみが非常に特徴的なRNAの発現パターンを示した(Fig 3c)。サンプル数が少ないため、有意差ははっきりしないが、CD86、CD80、HLA class IIの発現上昇が判明した。これらのことからHLA class IIを介した、CD4の活性化も腫瘍反応性T細胞の増殖には重要な役割を果たしている可能性が示唆された。腫瘍細胞のHLA class I及び、class IIの発現を調べた結果、class Iの発現パターンには差が見られなかったが、class IIの発現パターンは様々であり、class II発現の低い腫瘍においては、腫瘍反応性Tリンパ球が増殖させにくいといった傾向が観察された。以上の結果より、腫瘍反応性CD8Tリンパ球を体外で効率的に増殖させるためには、腫瘍抗原によるCD8T細胞の活性化及び、増殖だけでなく、HLA class IIを介した、CD4の活性化も非常に重要な役割を果たしている事が判明した。以上のことから、所属リンパ節から腫瘍反応性T細胞を増殖させ得ることは可能であり、腫瘍組織と同時に摘出されるリンパ節は非常に多いため、それら一つからでも腫瘍反応性T細胞を効率的に増殖させ得ることができれば、有効な細胞ソースとなる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamura Kazumi, Nagayama Satoshi, Tate Tomohiro, Chan Hiu Ting, Kiyotani Kazuma, Nakamura Yusuke	4. 巻 20
2. 論文標題 Lymphocytes in tumor-draining lymph nodes co-cultured with autologous tumor cells for adoptive cell therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12967-022-03444-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村和美、中村祐輔、清谷一馬
2. 発表標題 大腸がん患者に対する所属リンパ節を用いた細胞療法の有効性の検討
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------