

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18123

研究課題名（和文）癌微小環境を標的としたV $\gamma$ 9V $\delta$ 2T細胞癌免疫細胞療法の基盤構築

研究課題名（英文）Foundation for Vgamma9Vdelta2 T cell anti-tumor immunotherapy targeting tumor microenvironment

研究代表者

清水 輝記（Shimizu, Teruki）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師

研究者番号：90530361

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）：本研究課題では、膀胱癌担癌患者の培養実施および抗腫瘍効果を実施し、投与したT細胞の癌微小環境下での免疫疲弊に関する検討を行った。培養後のT細胞にTim-3が高発現していた。同定したTim-3の役割をフローサイトメトリーの実験系で検討した所、E:T比10:1において抗Tim-3抗体を処置することでT細胞の抗腫瘍効果が有意に増強することがTCCSUP株において示された。以上から抑制性分子Tim-3ブロック抗体を使用するとT細胞の効果が増強する事象をin vitro実験系で示せた。これらの結果の担癌モデルマウスを用いてin vivo実験系での再現性につき今後予定していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌担癌患者の培養実施および抗腫瘍効果を実施し、結果、良好な培養効率を確認できたためT細胞免疫療法の臨床応用に向けた予備検討を行う事ができた。細胞療法の際に投与したT細胞の癌微小環境下での免疫疲弊に関する細胞分子メカニズムに着目した検討を実施した。癌微小環境によるT細胞免疫疲弊にTim-3分子が関与する事を明らかにした。Tim-3分子の抗体を投与することがT細胞細胞療法の癌細胞の治療効果を高める結果、本経路を標的としたTMEに対する免疫アプローチが、膀胱癌のみならず他固形癌に対してのより有効なT細胞免疫細胞療法の確立への基盤構築となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, the blood samples suffering from urinary bladder cancer were collected, cultured and tested for efficiency of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell expansion and quality of cancer cell-killing ability. Of immune exhaustion markers examined, Tim-3 molecule was identified which was highly expressed on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T during culture period. We proposed that manipulating the tumor microenvironment to reduce the expression of exhaustion marker "Tim-3" was essential to improve cancer outcomes. By blocking Tim-3 pathway, we showed the potential for targeting Tim-3 to assist in enhancing an V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T anti-tumor immune response in in vitro experiment in TCCSUP bladder cancer cell line using flow cytometry. We will continue to work on the essential role of Tim-3 molecule, which may be a promising therapeutic target to improve V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-based adoptive immunotherapy for urinary bladder cancer in in vivo mouse model experiment as well as in vitro experiment.

研究分野： T細胞、癌免疫細胞療法

キーワード： T細胞 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T細胞 癌微小環境 膀胱癌 免疫疲弊 Tim-3

### 1. 研究開始当初の背景

$\gamma\delta$ T 細胞は、体内に侵入してきた微生物を排除する、体内に発生した非自己である癌細胞を駆逐するといった主に自然免疫を担当する免疫細胞であるが、容易に体外増幅培養可能なこと、体外増幅した場合には  $V\gamma9V\delta2$  の亜型が特異的に増幅されること、また様々な癌腫に対する抗腫瘍効果が *in vitro* および *in vivo* の実験データから解明されていることから、 $\gamma\delta$ T 細胞免疫療法の臨床試験が既に行われている。しかし静脈内投与での全身投与による臨床試験では、安全性は確認されているものの、治療効果は満足いく治療結果ではない。治療効果を更に確固たるものにするためには、癌組織内における免疫疲弊に関与するメカニズムの解明が必要であると考えた。癌組織内においては T 細胞が疲弊され、癌細胞に有効なエフェクター機能を保った状態でアプローチできないことが知られており、癌微小環境 (Tumor Microenvironment:以下 TME)、とりわけ免疫抑制系細胞や癌線維芽細胞などが多大な影響を及ぼすと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、膀胱癌担癌患者の培養実施および抗腫瘍効果を確認し、投与した $\gamma\delta$ T 細胞の癌微小環境下での免疫疲弊に関与する細胞分子メカニズムに着目した検討を行う。癌微小環境による免疫疲弊に関与する細胞分子メカニズムの一端を明らかにすることができれば漸新かつ先駆的な TME に対する免疫アプローチが構築され、膀胱癌のみならず他固形癌に対してのより有効な $\gamma\delta$ T 細胞免疫細胞療法の確立への基盤構築となることが期待される。

### 3. 研究の方法

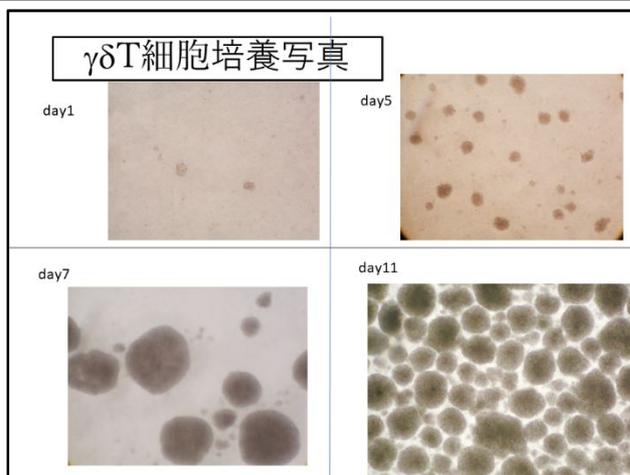
- (1) 膀胱癌担癌患者 5 名由来末梢血での $\gamma\delta$ T 細胞の *ex-vivo* 培養および抗腫瘍効果確認  
既に確立した培養プロトコルに従い膀胱癌患者由来末梢血単核球の培養を実施
- (2) 11 日間の培養経過中の $\gamma\delta$ T 細胞表面に現する抑制性分子マーカーの経時的発現変化の検討  
培養の初期、中期、完了時において $\gamma\delta$ T 細胞に発現する免疫疲弊分子の確認をフローサイトメトリーにて実施
- (3) 免疫疲弊分子 Tim-3 (anti-human CD366) が $\gamma\delta$ T 細胞の膀胱癌細胞株抗腫瘍効果に与える影響の検討  
 $\gamma\delta$ T 細胞と区別するためにがん細胞株(UMUC-3, TCCSUP)を CFSE で染色し、 $\gamma\delta$ T 細胞との共培養を E:T 比 1:1 もしくは 10:1 で行い 4 時間後 PI にて染色し、CFSE<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>分画を癌アポトーシス分画としてフローサイトメトリー法 (FCM) を用いて抗腫瘍効果を評価する。  
抗腫瘍効果の FCM アッセイ時以下薬剤処置を行う  
1) ZOL (処置濃度 5  $\mu$ M) 2) IgG 抗体 (control) (処置濃度 0.5  $\mu$ g/mL)  
3) anti Tim-3 (処置濃度 10  $\mu$ g/mL) 4) anti Galectin9 (処置濃度 10  $\mu$ g/mL)

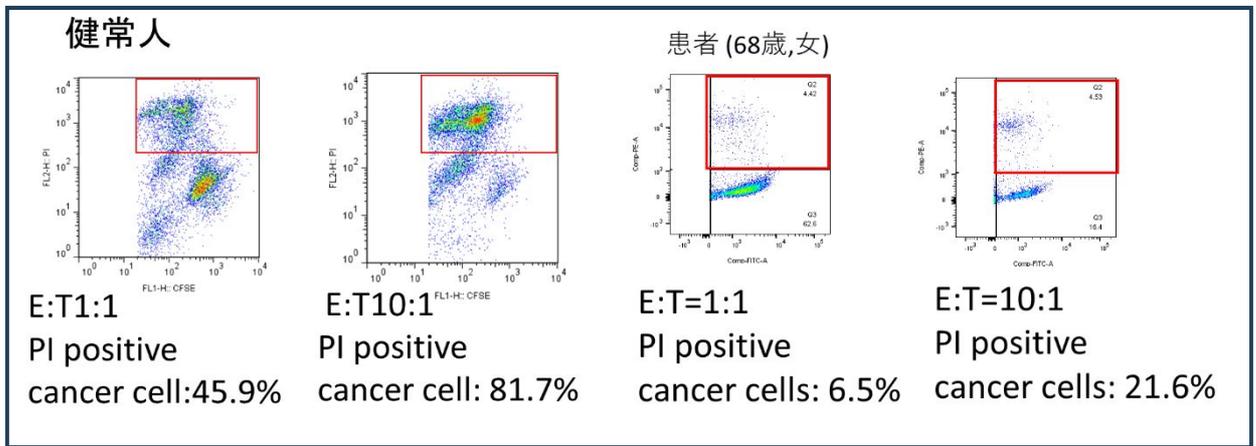
### 4. 研究成果

- (1) 膀胱癌担癌患者 5 名由来末梢血での $\gamma\delta$ T 細胞の *ex-vivo* 培養結果および抗腫瘍効果確認

T.T 氏	87 歳	男	筋層非浸潤性膀胱癌 BCG 後	増幅効率	1568.8 倍	$\gamma\delta$ T 細胞分画	79.7%
K.I 氏	78 歳	男	筋層非浸潤性膀胱癌 BCG 後	増幅効率	339.6 倍	$\gamma\delta$ T 細胞分画	79.4%
N.Y 氏	68 歳	女	筋層非浸潤性膀胱癌 BCG 後	増幅効率	3267.6 倍	$\gamma\delta$ T 細胞分画	77.8%
T.S 氏	67 歳	男	筋層非浸潤性膀胱癌 BCG 後	増幅効率	287.9 倍	$\gamma\delta$ T 細胞分画	87.8%
M.N 氏	75 歳	男	筋層非浸潤性膀胱癌 BCG 後	増幅効率	247.9 倍	$\gamma\delta$ T 細胞分画	30.6%

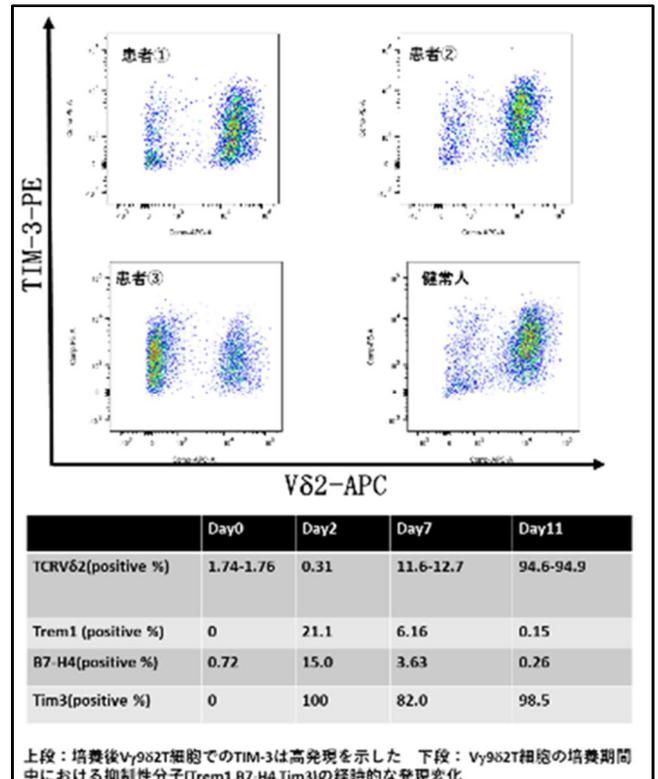
膀胱癌患者末梢血での 11 日間培養後の $\gamma\delta$ T 細胞への分化誘導、増幅効率、ともに、5 名全員で良好であった。 $\gamma\delta$ T 細胞の分化を誘導するとされる単球由来の cluster の経時的形成は、提示した写真の如く良好だった  
続いて培養した同細胞 3 名分を用いて膀胱癌細胞株 UMUC3, TCCSUP に対する抗腫瘍効果を FCM 法で検討した。結果、健常人末梢血由来の培養後の $\gamma\delta$ T 細胞と比較すると抗腫瘍効果は mild であった。TCCSUP 株に対する実験実施例を以下に示す。





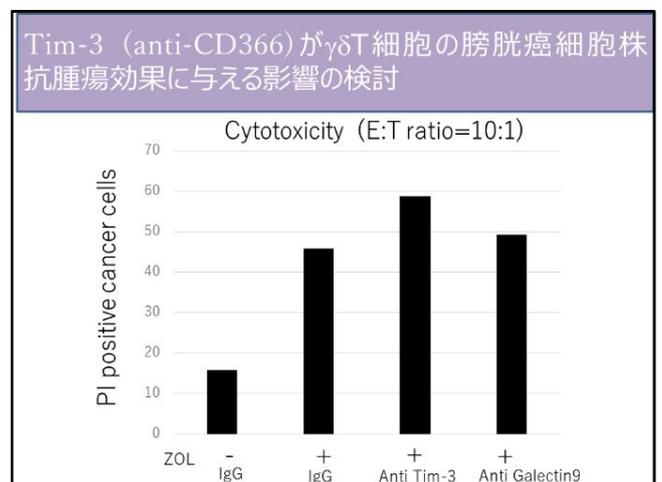
(2) 11 日間の培養経過中の $\gamma\delta$ T 細胞表面に現する抑制性分子マーカーの経時的発現変化の検討

末梢血より末梢血単核球 (PBMC) を分離し、 $\gamma\delta$ T 細胞培養を開始。 $\gamma\delta$ T 細胞細胞表面上の抑制性分子/活性化分子 (Trem1, B7-H4, Tim-3, BTN3A1, CD107a/b, IFN $\gamma$ ) の発現が day0, 2, 5, 7, 11 と経時的変化するか FCM 法での解析を行った。培養期間内を通じて Tim-3 が高発現を示していた。一方で、他の免疫疲弊分子 Trem1 や B7-H4 に関しては図の結果のごとく T 細胞における発現はほぼ認められなかった。免疫活性化分子である CD107a/b や IFN においても培養期間内の経時的な意義ある発現変化や発現高値を認めることはなかった。(data not shown)。更に $\gamma\delta$ T 細胞への分化誘導は day7 ではまだわずか 10%程度であるがその後急激に誘導され day11 の培養終了時に約 90%に到達することが判明した。



(3) 免疫疲弊分子 Tim-3 (anti-human CD366)が $\gamma\delta$ T 細胞の膀胱癌細胞株抗腫瘍効果に与える影響の検討

Tim-3 が $\gamma\delta$ T 細胞に抑制性分子として与える影響に関して、Tim-3 のブロック抗体と Galectin-9 を用いて検討した。抗腫瘍効果は FCM 法を用いて行い、Tim-3 のブロック抗体を添加することにより $\gamma\delta$ T 細胞の膀胱癌細胞株 TCCSUP, UMUC3 に対する抗腫瘍効果が増強する可能性につき検討した。E:T=10:1 において抑制性分子 Tim-3 ブロック抗体を使用することで $\gamma\delta$ T 細胞の効果増強する可能性が右図の如く膀胱癌細胞株 TCCSUP 株において示唆された。一方で Galectin-9 抗体をブロックすることは抗腫瘍効果への寄与は確認されなかった。



今後は *in vivo* のマウスモデルの実験系においても Tim-3 抗体を使用することで $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果が増強しうるかを確認していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 清水輝記, 森岡由佳子, 宮下雅垂, 友金眞光, 芦原英司, 浮村 理	4. 巻 15(4)
2. 論文標題 T細胞を用いたがん免疫療法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 泌尿器科	6. 最初と最後の頁 365-374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomogane M, Sano Y, Shimizu D, Shimizu T, Miyashita M, Toda Y, Hosogi S, Tanaka Y, Kimura S, and Ashihara E	4. 巻 Volume 573, 8
2. 論文標題 Human V 9V 2 T cells exert anti-tumor activity independently of PD-L1 expression in tumor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 132-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.005	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 -

1. 著者名 6.Miyashita M, Shimizu T, Ashihara E, and Ukimura O	4. 巻 Volume 22 ,16
2. 論文標題 Strategies to Improve the Antitumor Effect of T Cell Immunotherapy for Clinical Application	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	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) 10.3390/ijms22168910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masatsugu Miyashita, Mako Tomogane, Yuichi Nakamura, Teruki Shimizu, Atsuko Fujihara, Osamu Ukimura, and Eishi Ashihara	4. 巻 40(10)
2. 論文標題 Sphere-derived prostate cancer stem cells are resistant to gd T cell cytotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5481-5487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水輝記、藤原敦子、浮村理、芦原英司
2. 発表標題 T細胞癌免疫療法に対する癌微小環境による免疫疲弊の克服
3. 学会等名 第12回4大学連携研究フォーラム共同研究成果発表（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 友金眞光、大村真穂、佐野友亮、清水大器、宮下雅亜、清水輝記、戸田侑紀、細木誠之、芦原英司
2. 発表標題 T細胞の体外増幅培養における予測可能なバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第11回4大学連携研究フォーラム（京都Web開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下雅亜、友金眞光、佐野友亮、清水輝記、藤原敦子、浮村理、芦原英司
2. 発表標題 前立腺がん幹細胞に対する T細胞の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮下雅亜、友金眞光、清水輝記、藤原敦子、本郷文弥、芦原英司、浮村理
2. 発表標題 前立腺がん幹細胞に対する T細胞の抗腫瘍効果検討
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子・細胞研究会
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
---------	---------