

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390294

研究課題名（和文） がん特異的T細胞レセプターとケモカインレセプター同時発現によるがん免疫療法の開発

研究課題名（英文） Development of cancer immunotherapy using co-transfer of cancer-specific TCR gene and chemokine receptor gene

研究代表者

安川 正貴 (YASUKAWA MASAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60127917

研究成果の概要（和文）：

新たながん免疫療法開発の目的で、がん特異的T細胞レセプター（TCR）遺伝子と、がん病変局所に高発現しているケモカインレセプター遺伝子を同時に導入した人工細胞傷害性T細胞（CTL）の抗腫瘍効果を検討した。その結果、がん特異的TCR遺伝子とケモカインレセプター遺伝子を同時に導入した人工CTLを用いた養子免疫療法は、従来のTCR遺伝子療法に比べ抗腫瘍効果が高くまた安全であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

In order to develop a novel cancer immunotherapy, we verified the efficacy and safety of adoptive transfer using cytotoxic T lymphocytes (CTLs) transduced with cancer-specific T-cell receptor (TCR) gene and receptor gene for chemokine which is abundantly produced in cancer microenvironment. Our data demonstrate that adoptive transfer of artificial CTLs expressing both cancer-specific TCR and chemokine receptor is more effective and safe than that of CTLs expressing only cancer-specific TCR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：がん免疫療法、T細胞レセプター遺伝子、ケモカイン・ケモカインレセプター、WT1、Aurora-A kinase、白血病、肺がん

1. 研究開始当初の背景

最近、悪性腫瘍に対する様々な細胞免疫療法が開発されているが、これまでの臨床試験

の結果は必ずしも満足できるものではなく、更なる創意工夫が必要である。抗腫瘍免疫応

答はさまざまな免疫担当細胞によって担われているが、がん特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がその中心的役割を演じている。従って、効果的ながん特異的細胞免疫療法は、生体内でいかに効率よくがん幹細胞特異的 CTL を誘導し、また CTL をがん幹細胞が存在するニッチに集積できるかが重要なポイントである。しかし、現在臨床研究が進行しているがんペプチドワクチン療法や樹状細胞療法での効果には CTL 誘導能に限界があることが分かってきた。従って、予め *ex vivo* で大量のがん特異的 CTL を培養し、その体内移入による adoptive immunotherapy (CTL 養子免疫療法) に大きな期待が寄せられている。

われわれは今までに、種々の白血病腫瘍関連抗原を同定し、これらタンパク質由来合成ペプチドを用いて、白血病幹細胞を特異的に認識する CTL クローンを樹立し、その機能的解析を行ってきた。さらに、これまでに樹立したがん特異的 CTL クローンから TCR 遺伝子を単離し、その発現ベクターを構築した。この TCR 遺伝子を導入することによって、従来困難であったがん特異的 CTL 誘導が容易に可能になることが期待できる。

リンパ球の体内動態にはケモカイン/ケモカインレセプターシステムが深く関与している。また、炎症組織やがん組織では、正常組織にはほとんど検出されないケモカインの産生が認められることが知られている。つまり、がん特異的 CTL にがん組織で選択的に高産生されているケモカインに対するレセプターを強制発現させることにより、効率的にがん組織に集積させることが予想でき、このことによって治療効果の大幅な向上が期待できる。

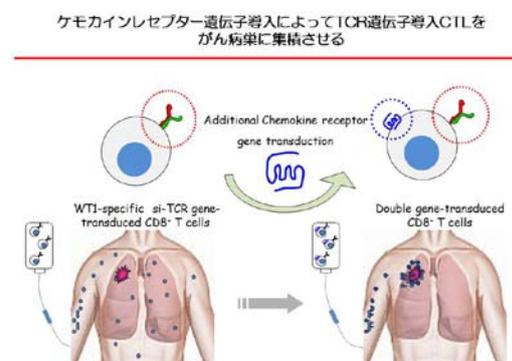
このような背景のもと、本研究では、従来の課題を解決できる新規がん免疫療法の開発を試みた。

2. 研究の目的

上記した理論によって、がん特異的 TCR 遺伝子とがん組織や白血病細胞に高発現されるケモカインに対するレセプター遺伝子を同時に強制発現させた CTL による抗腫瘍効果を、ヒト白血病細胞および固形がん細胞移植マウスモデルを用いて検証することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

研究の方法の概念を示す。



(1) がんおよび白血病特異的 CTL クローン樹立：すでに報告した方法によって、WT1 および Aurora-A kinase 由来ペプチド特異的 HLA 拘束性 CTL クローンを樹立した。

(2) TCR 遺伝子クローニングおよび発現ベクター構築：これら CTL クローンから完全長 TCR- α および TCR- β 鎖 cDNA を単離した。さらに、タカラバイオ株式会社との共同研究によって、内在性 TCR 発現を抑制する (si-TCR) WT1-TCR および Aurora-A-TCR 発現レトロウイルスベクターを構築した。

(3) 腫瘍組織でのケモカイン発現プロファイル：ヒト肺がん細胞株および白血病細胞株で高発現しているケモカインを定量的 RT-PCR 法で測定した。

(4) ケモカインレセプター遺伝子クローニングおよび発現ベクター構築：肺がん細胞で高発現している CCL2 に対するレセプター

CCR2 および白血病骨髄ニッチで高発現している SDF-1 に対するレセプターCXCR4 発現ベクターを構築した。

(5) がん特異的 TCR 遺伝子とケモカインレセプター遺伝子同時導入 T 細胞の作製：末梢血 CD8 陽性 T 細胞に上記 TCR 遺伝子とケモカインレセプター遺伝子を同時移入した。

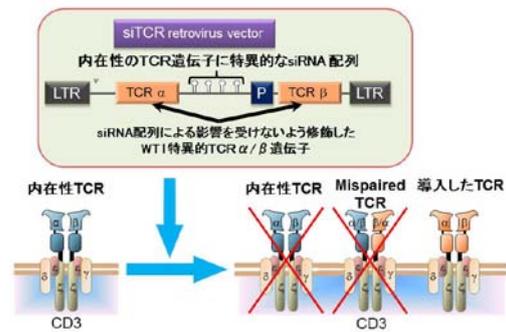
(6) *In vitro* T 細胞機能解析：まず、TCR 遺伝子導入による HLA 拘束性ペプチド特異性の獲得を、テトラマー解析ならびに ⁵¹Cr 放出細胞傷害試験で確認した。次に、腫瘍細胞に対する細胞傷害性を同様に確認した。他方、ケモカインレセプター遺伝子導入による機能獲得を、対応ケモカインによるケモタキシスならびに発光システムによる *in vivo* モデルで解析した。

(7) 遺伝子導入 T 細胞移入効果判定：まず、コントロール CTL、TCR 遺伝子単独導入 CTL、および TCR とケモカインレセプター遺伝子同時導入 CTL の抗腫瘍効果を *in vitro* で検討した。さらに、腫瘍細胞移植マウスにこれらの CTL を移入し、腫瘍への集積と抗腫瘍効果を *in vivo* で検討した。

4. 研究成果

(1) WT1 および Aurora-A kinase 特異的 CTL クローンの樹立および TCR 遺伝子発現ベクターの構築：WT1 および Aurora-A kinase 特異的 CTL クローンから TCR 遺伝子を単離し、その発現レトロウイルスベクターを構築した。さらに、内在性 TCR の発現を抑制し、効率よく TCR を発現できる si-TCR ベクターを初めて構築した。

内在性TCR発現を抑制するレトロウイルスベクターの開発

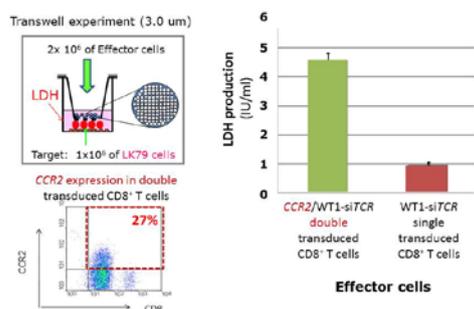


(2) WT1 および Aurora-A kinase 特異的 TCR 遺伝子導入人工 CTL の抗腫瘍効果：WT1 および Aurora-A kinase 特異的 TCR 遺伝子導入人工 CTL は、白血病細胞および肺がん細胞を HLA 拘束性に傷害したが、造血幹細胞を含め、正常細胞には影響を及ぼさないことが、*in vitro* ならびにヒト化マウス *in vivo* 実験系で証明された。

(3) 肺がん細胞でのケモカイン発現と CCL2 発現ベクターの構築：ヒト肺がん細胞株を網羅的に解析したところ、CCL2 が高発現されていることが明らかとなった。そこで、そのレセプターである CCR2 の発現ベクターを構築した。

(4) がん特異的 TCR とケモカインレセプター遺伝子同時導入による抗腫瘍効果の増大：WT1 特異的 TCR 遺伝子と CCR2 遺伝子を同時導入した人工 CTL は、CCL2 および肺がん細胞に対して遊走能を示し、WT1 特異的 TCR 遺伝子単独発現 CTL よりも効率よく肺がん細胞を傷害できることが、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験系で証明された。

CCR2およびWT1-siTCR遺伝子導入CD8⁺T細胞の腫瘍細胞への遊走と抗腫瘍活性



以上の結果から、がん特異的 TCR 遺伝子とがん組織に高発現しているケモカインに対するレセプター遺伝子を同時に導入した人工 CTL を用いた養子免疫療法は従来の TCR 遺伝子療法に比べ、効果的であることが示された。現在、多くの悪性腫瘍に応用すべく、他の TCR 遺伝子およびケモカインレセプター発現ベクターを構築しており、臨床応用を計画している。

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 32 件)

1. Shikata, H. Yasukawa, M. (他 8 名, Last author) : The role of activation-induced cytidine deaminase (AID/AICDA) in the progression of follicular lymphoma. *Cancer Sci.* 103:415-421, 2012. 査読有
2. Nagai, K., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 9 名, Last author) Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T-lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity. *Blood* 119:368-376, 2012. 査読有
3. Hasegawa, H., Yasukawa, M. (他 4 名, Last author) : Lysophosphatidylcholine enhances the suppressive function of human naturally occurring regulatory T cells through TGF- β production. *Biochem Biophys Res Commun.* 415:526-531, 2011. 査読有
4. Ochi, T., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 7 名, Last author) Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked anti-leukemia reactivity and safety. *Blood* 118:1495-1503, 2011. 査

読有

5. Yasukawa, M., Fujiwara, H. (他 1 名, First author) Adoptive T-cell immunotherapy using T-cell receptor gene transfer: aiming at a cure for cancer. *Immunotherapy* 3:135-140, 2011. 査読有
6. Nagai, K., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 7 名, Last author) Feasibility of gene-immunotherapy using WT1-specific T-cell receptor gene transfer for infant acute lymphoblastic leukemia with *MLL* gene rearrangement. *Blood Cancer J.* 1:e10, 2011. 査読有
7. Ochi, T., Fujiwara, H. and Yasukawa, M.: Requisite considerations for successful adoptive immunotherapy with engineered T lymphocytes using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11:699-713, 2011. 査読有
8. Takahara, A., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 13 名, 10 番目) Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol. Immunother.* 60:1289-1297, 2011. 査読有
9. Miyazaki, Yasukawa, M. (他 7 名, 8 番目) FDG-PET can evaluate the treatment for fungal liver abscess much earlier than other imagings. *Ann. Hematol.* 2011 Mar 1. [Epub ahead of print] 査読有
10. An, J., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 10 名, Last author) Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int. J. Hematol.* 93:176-185, 2011. 査読有
11. Lei, J., Hasegawa, H., Yasukawa, M. (他 2 名, Last author) Peroxisome proliferator-activated receptor α and γ agonists together with TGF- β convert human CD4⁺CD25⁻ T cells into functional Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 185:7186-7198, 2010. 査読有
12. Shultz, L., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 9 名, 11 番目) Generation of functional human T cells with HLA-restricted immune responses in HLA-class I expressing NOD/SCID/IL2 γ^{null} humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 13022-13027, 2010. 査読有
13. Nagai, K., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 9 名, Last author) Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. *PLoS*

- One* 5:e14173, 2010. 査読有
14. MacNamara, A., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 7 名, 7 番目) HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS Pathog.* 6: e1001117, 2010. 査読有
 15. Yasukawa, M. Fujiwara, H. (他 5 名, First author) Allo-HLA reactivity of leukemia-specific cytotoxic T lymphocytes. e-Letter. *Blood* Accessed April 19, 2010. 査読有
 16. Yasukawa, M. Fujiwara, H. (他 2 名, First author) Relapse of renal cell carcinoma with disappearance of HLA class I following hTERT peptide vaccination. *Ann. Oncol.* 21:2122-2124, 2010. 査読有
 17. Azuma, T., Fujiwara, H., Yasukawa M. (他 6 名, Last author) Derivative (1;18)(q10;q10) in essential thrombocythemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 199:62-64, 2010. 査読有
 18. Ochi, T., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 5 名, Last author) Aurora-A kinase: A novel target of cellular immunotherapy for leukemia. *Blood* 113:66-74, 2009. 査読有
 19. Okamoto, S., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 4 名, 5 番目) Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.* 69:9003-9011, 2009. 査読有
 20. Matsubara, E., Yasukawa, M. (他 6 名, Last author) The role of zinc finger protein 521/early hematopoietic zinc finger protein in erythroid cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 284:3480-3487, 2009. 査読有
 21. Suemori, K., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 5 名, Last author) HBZ is an immunogenic protein but not a target antigen for HTLV-1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 90:1806-1811, 2009. 査読有
 22. Suemori, K., Fujiwara, H., Yasukawa, M. (他 6 名, Last author) Identification of a novel epitope derived from CML66 which is recognized by anti-leukaemia cytotoxic T lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 146:115-118, 2009. 査読有
 23. Yasukawa, M. Fujiwara, H. (他 5 名, First author) Clinical efficacy of WT1 peptide vaccination in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Am. J. Hematol.* 84:314-315, 2009. 査読有

[学会発表] (計 30 件)

1. Miyazaki Y, Yasukawa M. et al. Human Telomerase Reverse Transcriptase-Specific

- T-Cell Receptor Gene Transfer Redirects T-Lymphocytes to Exert Effective Antitumor Reactivity Against Adult T-Cell Leukemia. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology. 2011, 12, 12, San Diego, U.S.A.
2. Asai A, Yasukawa M., et al. Forced Expression of CC Chemokine Receptor 2 Enhances Anti-Cancer Reactivity Mediated by T Lymphocytes Beforehand Redirected Toward WT1 Inside the Tumor Microenvironment. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology, 2011, 12, 10, San Diego, U.S.A.
 3. Ochi T, Yasukawa M. et al. Redirected CD4⁺ T Cells Using WT1-Specific T-Cell Receptor Gene Transfer Can Supply Multifactorial Help to Enhance the Anti-Leukemia Reactivity Mediated by Similarly Redirected CD8⁺ T Cells Using the Identical Gene Transfer. 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology. 2011, 12, 12. San Diego, U.S.A.

[図書] (計 13 件)

1. 安川正貴 「造血器腫瘍に対する細胞免疫療法」 Annual Review 血液 2012 174-182 頁 中外医学社 東京 2012
2. 安川正貴 「免疫療法」 造血器腫瘍学 230-235 頁 日本臨床社 東京 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: T 細胞レセプター及び当該レセプターをコードする核酸

発明者: 安川正貴、他 4 名

権利者: 安川正貴、愛媛大学、タカラバイオ株式会社

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2010/056089

出願年月日: 2009 年 4 月 3 日

国内外の別: 国内・国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.med1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安川 正貴 (YASUKAWA MASAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60127917

(3) 連携研究者

長谷川 均 (HASEGAWA HITOSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 40164826

藤原 弘 (FUJIWARA HIROSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20398291