

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5月1日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591641

研究課題名（和文） B7-DC-Immunoglobulin 融合蛋白を用いた次世代型免疫療法の開発

研究課題名（英文） Cancer Immunotherapy Targeting B7-DC/B7-H1/PD-1 interaction
May Improve Tumor Microenvironment

研究代表者

吉村 清 (YOSHIMURA KIYOSHI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30346564

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は樹状細胞と T 細胞間の重要な副刺激因子である B7-DC・B7-H1/PD-1 interaction を制御することで、消化器癌肝転移をターゲットとした次世代型免疫療法の開発をすることである。これは、近年の免疫学の進歩により明らかとなった樹状細胞・T 細胞間の適切な刺激を B7-DC 融合蛋白や B7-H1、PD-1 中和抗体でコントロールし、T 細胞の適切な活性化とメモリー化を図ることを目的としており、あらゆる免疫療法に広く応用可能な治療法の開発である。ただし現時点では B7-DC 融合タンパクでの抗腫瘍効果は再現性のある形では見いだせず、B7-H1 中和抗体による効果がむしろ明確に認められた為、同ターゲットへのアプローチに修正して研究を進め一定の成果を得た。

研究成果の概要（英文）：

B7-H1 is a co-signal to modulate immune check point expressed on both subsets of immune effector cells and cancer. B7-H1 is able to induce an anergy of CD8+ T cells through the PD-1 receptor leading to tumor growth and immune suppression. Blockade of B7-H1 with neutralizing antibody is a novel therapy which alters tumor microenvironment. The antibody blockade of this B7-H1/PD-1 interaction may result in the alteration of immune response and tumor microenvironment preventing tumor evasion from the immune system.

Materials and Methods:

BALB/C mice were challenged with colorectal hepatic metastases and then treated with an attenuated *Listeria monocytogenes* (LM) vaccine platform in combination with B7-H1 blocking antibody. Mice were investigated for survival, immunological analysis with flow cytometry and in vitro assay.

Results:

Mice treated with B7-H1+ LM had 70% survival. The analysis of immune subsets demonstrated an increase in expression of B7-H1 on CD8+ T cells of mice treated with LM. In vitro analysis of CD8+ T cell activation showed an increase of 50% in the presence of tumor with B7-H1 blocking antibody.

Discussion:

B7-H1 blockade showed increased survival by preventing the inhibitory signaling between T cells, dendritic cells and tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科学、腫瘍免疫

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：腫瘍免疫、補助シグナル、抗体療法

1. 研究開始当初の背景

我々のグループの一員がB7-DCをKnockoutしたマウスに大腸癌肝転移を作成すると通常のマウスに対し生存曲線がLeft shiftしこのシグナルが肝転移抑制に重要であることを見いだした(J Exp Med, 2005)。このB7-DCはLigandとしてその受容体であるPD-1を通じてネガティブなシグナルをT細胞に与えることがわかっていたため(Nat Immunol, 2001)その結果は意外であり、そこに別のAlternative receptorの存在が推測されているが今日でも同定されていない。ただしこのB7-DC-Fc融合蛋白を用いて、Pilot studyとしてGM-CSF産性腫瘍(癌ワクチンで癌抗原を提示する樹状細胞の誘導能をもつ)と併用した実験を行った際、低濃度では効果を発揮し、高濃度では無効であった。これらはpositive receptorを最初は刺激し、飽和後、negative receptorを刺激したのではないかと考えられる。

本研究が独創的かつ優位であることとして以下の点が上げられる。癌腫を問わず、応用可能であり、癌抗原が同定されたものとの抗原特異的免疫療法との併用も可能であること。世界的な潮流の一つであるT細胞の活性

化後の無力化を防ぐ療法であること。免疫療法の最大の利点の一つのT細胞のメモリー化がその特性から期待されること。また抗体療法とは違う融合蛋白を使う点、さらにその変異型を用いる点が従来の免疫療法と大きく異なる。ターゲットとなるT細胞を活性化するのみでなく、潜在的にはその活性化を遷延させることが可能で、通常はネガティブなシグナルをブロックするやり方をするのに対し、相対的にポジティブなシグナルの増強でこれをさせようとする。この理由はネガティブなシグナルをブロックするやり方で起こりやすいAutoimmune類似の副作用を出さないようにするためである。我々は肝転移モデルの確立に実用レベルで成功した。これは従来の脾臓を全摘するモデルでは抗ガン剤等の有効性は証明できても免疫学的解析が不十分であるため脾臓を温存させることにこだわっているためである。

2. 研究の目的

- (1) マウス大腸癌モデルにてB7-DC-Fc融合蛋白の有効性を検討し、このメカニズムにおける他の候補であるB7-H1中和抗体と抗腫瘍効果の比較を行う。
- (2) これらの治療法における有効な治療法

を選択し、T細胞の増殖や各種のサイトカイン産性を測る。

- (3) 誘導された細胞傷害性 T 細胞が抗原特異的かつ高い活性を持っているかを検討する。
- (4) 一度免疫を受けたマウスが Memory T 細胞を獲得し、その後も癌を拒絶し続けるか検討する。

3. 研究の方法

- (1) マウス大腸癌モデルを用いて研究を進める。BALB/c mice と CT26 (BALB/c mice 由来の大腸癌細胞) を用いる。
- (2) マウスに B7-DC-Fc 融合蛋白あるいは B7-H1 抗体を intraperitoneally に肝転移樹立後治療を開始する。
- (3) まずは 25-200ug/mouse の中で最適な量を調べる。

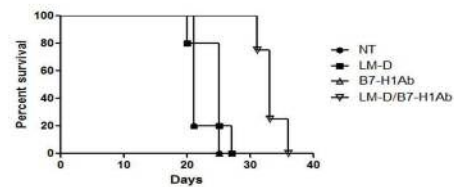
ここで生存曲線の検討をする。肝浸潤 リンパ球をアイソレートし、(a) NK, NKT, DC, CD4+, and CD8+ T cells の絶対数の経時的変化を調べる。

4. 研究成果

マウス癌肝転移モデルにおいてリステリアで免疫賦活し、肝よりリンパ球、樹状細胞を分離し B7-H1、PD-1 の発現がナイーブの細胞より高いことを確認した。さらに免疫賦活下で B7-H1 からの刺激を中和抗体でブロックすると T 細胞の増殖が妨げられず、抗腫瘍効果をより増強することを in vitro, in vivo で示した。ただしここで B7-DC 融合タンパクを用いても再現性がある有効性が現時点では得られなかった。

この結果はレセプター側の PD-1 をブロックした場合と傾向は類似するはずだが、我々の実験では B7-H1 のブロックの方が強い効果を示しておりこれらのメカニズムをさらに探求したい (右上図)。

抗体療法の結果



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 1 件)

- ① 吉村清、岡正朗、消化器外科セミナー 世界における癌免疫療法のトピックスと課題、消化器外科、34 巻 1 号、Page107-112、2011.1、査読無

[学会発表] (計 5 件)

- ① 吉村清、新藤芳太郎、渡邊裕策、前田祥成、前田訓子、井上萌子、山本滋、吉野茂文、裕彰一、岡正朗、B7-H1/PD-1 interaction をターゲットとした癌免疫療法(Cancer Immunotherapy Targeting B7-H1/PD-1 interaction Improves Tumor Microenvironment)、第 70 回日本癌学会総会、2011.10.3、名古屋国際会議場 (愛知)
- ② 吉村清、新藤芳太郎、渡邊裕策、前田祥成、前田訓子、山本滋、吉野茂文、裕彰一、岡正朗、Immune check point inhibition を用いた免疫療法、第 66 回 日本消化器外科学会総会、2011.7.14、名古屋国際会議場 (愛知)
- ③ 吉村清、新藤芳太郎、渡邊祐策、前田祥成、亀井滝士、前田訓子、鈴木伸明、山本滋、吉野茂文、裕彰一、岡正朗、明日の外科医療を構築するための基礎研究 B7-H1/PD-1 interaction をターゲットとし Immune check point inhibition を目的とした免疫療

法、第 111 回日本外科学会総会、2011.5.25、
震災の為紙上発表

④吉村清、裕彰一、岡正朗、B7-H1/PD-1 を
ターゲットとした消化器癌肝転移に対する
免疫療法、第 14 回日本がん免疫学会総会、
2010.7.22、KKR ホテル熊本（熊本）

⑤吉村清、裕彰一、岡正朗、エフェクターメ
カニズムに立脚したバイオセラピー エフェ
クターメカニズムに基づき、副刺激・調節系
因子をターゲットとした消化器癌肝転移に
対する免疫療法、第 22 回日本バイオセラピ
ィ学会、2009.11.26、スイスホテル南海大阪
（大阪）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 清 (YOSHIMURA KIYOSHI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30346564