

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 25 年 8 月 23 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300333

研究課題名（和文）

低フコシル化抗体を用いた包括的がん免疫療法の開発

研究課題名（英文）

Development of comprehensive immunotherapy by defucosylated antibody

研究代表者

上田 龍三（UEDA RYUZO）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：20142169

研究成果の概要（和文）：微小環境を含め、ヒト腫瘍の病態を反映する、NOG マウスヒト腫瘍モデル作成し、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)による、autologous 治療実験モデルを構築した。成人 T 細胞白血病(ATL)細胞を移入した NOG マウスに、HTLV-1 Tax 特異的 CTL を投与したところ、著明な治療効果が示された。免疫治療開発においては、腫瘍局所における免疫動態の解析が必須であり、本研究により構築された、治療実験モデルは今後益々重要となろう。

研究成果の概要（英文）： Therapeutic experimental model in autologous system by antigen specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) using human tumor inoculated NOG mice which mimic pathological features of human tumor including micro environment in the tumor. Significant therapeutic effect was demonstrated in Adult T-cell leukemia (ATL) cells inoculated NOG mice treated with infusion of HTLV-1 Tax specific CTL. The therapeutic mouse model in our study will be more important because the analysis of immune dynamism in tumor site is essential for the immunotherapy development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：低フコシル化抗体、CCR4、制御性 T 細胞(Treg)、CT 抗原、細胞傷害性 T 細胞(CTL)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍免疫研究の進歩に伴い、腫瘍局所における免疫環境が明らかになりつつあった。例えば、免疫チェックポイントに関わる免疫抑制性のレセプターが機能性 T 細胞上に高発現し、がん細胞や、抗原提示細胞、またその他の間質細胞上には、そのリガンドが高発現することが知られていた。また、多くの癌種において、抑制性 T 細胞(Treg)のがん局所への浸潤が明らかにされていた。このような知見から、がん局所においては腫瘍免疫に対する

強力な抑制機構が存在し、有効な抗腫瘍効果を得るには、がん細胞を特異的、直接的に攻撃する、抗体・ワクチン/細胞免疫療法に加え、がん細胞及びがん支持組織が構築する抗腫瘍免疫抑制機構の解除を組み合わせた、“包括的がん免疫療法”の構築が必須であると考えられるに至っていた。米国においては、免疫チェックポイント分子(CTLA-4, PD-1, PD-L1)を標的とした抗体療法の治験がすでに実施され、最近になって次々と、その臨床的有効性が報告されている。このことは、腫瘍免疫抑制機構の解除が免疫治療開発にお

いて重要な要素となることを、強く認識させることとなった。

一方、我々は、低フコシル化 CCR4 抗体(モガムリズマブ)が、臨床試験として成人 T 細胞白血病(ATL)患者に安全に投与でき、且つ約 50%の患者に顕著な抗腫瘍性を認める成果を発表してきていた。また、本抗体は抗腫瘍免疫抑制機構で重要な役割を果たす Treg を選択的に除去可能であることも併せて明らかにしていた。こうした背景から、モガムリズマブによる抗 Treg 除去効果をがん局所における、腫瘍免疫再活性化、さらに、新たな治療法開発に展開できるのではないかと考え、本研究の実施に至った。

2. 研究の目的

本研究では、CCR4 抗体とがんワクチンの同時投与、及び CCR4 抗体と細胞療法の併用による新世代の“包括的がん免疫療法”の基盤を構築し、造血器腫瘍のみならず固形腫瘍への臨床応用を推し進め、低フコシル化 CCR4 抗体による制御性 T 細胞の制御を軸とした、包括的がん免疫療法を『医療』として確立すること。

3. 研究の方法

1) ヒト腫瘍微小環境を再現できるモデルマウスの作成

低フコシル化 CCR4 抗体による Treg の制御に基づく包括的がん免疫療法の基盤構築のため NOD/Shi-scid, IL-2R γ null (NOG) マウスを用いてヒト免疫担当移入担がんモデルの作成を試みた。造血器腫瘍患者から得られた、腫瘍細胞を NOG マウスに移入し、腫瘍を形成させ、その微小環境について形態学的、病理学的、免疫学的な検討を行なった。

2) 腫瘍抗原特異的傷害性 T 細胞 (CTL) の大量培養法の確立

NOG マウスに移植した腫瘍を腫瘍免疫によって除去することのできる系を作成するため、主に、ATL 患者由来末梢血単核球 (PBMC) を用いて HTLV-1 Tax 特異的 CTL の大量培養法について、すでに確立している EBV 特異的 CTL 培養法を基本として検討した。また、調製した CTL の機能について解析するため、細胞内サイトカインアッセイ、細胞傷害試験を行った。

3) NOG マウスヒト腫瘍モデルを用いた特異的 CTL による治療実験

ATL 患者由来 ATL 細胞を移植した NOG マウスに、Tax 特異的 CTL を輸注し、血中、及び各臓器に浸潤した腫瘍細胞、CTL の動態を中心に解析した。また併せて、生存試験についても行い、CTL の治療効果について検討した。

4) 腫瘍精巢抗原 (CT 抗原) に対する免疫応答の検討

一般固形腫瘍での検討に向け、代表的な CT 抗原である、NY-ESO-1. XAGE1b に対する免疫応答を、造血器腫瘍 (ATL, ホジキンリンパ腫) において検討した。液性免疫については、ELISA 法を用いた患者血清中抗体測定により、細胞性免疫については患者 PBMC のエトープペプチドに対する反応性を、MHC-tetramer、細胞内サイトカインアッセイにより検討した。また、各腫瘍における NY-ESO-1 の発現についても検討した。

4. 研究成果

1) ヒト腫瘍微小環境を再現できるモデルマウスの作成

造血腫瘍モデルとして患者由来の腫瘍細胞から、NOG マウスで継代可能な i) ATL, ii) バーキットリンパ腫, iii) 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL), iv) EB ウイルス関連 T 細胞リンパ腫, v) びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫, vi) マントル細胞リンパ腫のモデルを確立した。いずれのマウスにおいても微小環境を含め、ヒトの病態をよく反映していた。

2) 腫瘍抗原特異的傷害性 T 細胞 (CTL) の大量培養法の確立

ATL 患者由来 PBMC を HLA-A2 または、HLA-A24 拘束性 HTLV-1 Tax エトープペプチドにて刺激し、7 日間培養後、CD137 モノクローナル抗体固相プレートを用いたパニング法にて、CD137 陽性細胞のみを回収、その後 7 日間培養した。次に、OKT3 (CD3 モノクローナル抗体) / CD137 モノクローナル固相培養プレート上で 18 時間、刺激した後、細胞を、培養バッグに移し、さらに、7-14 日間培養した。以上、約 1 か月の培養により、HTLV-1 Tax 抗原特異的 CTL を 20mL 程度の患者末梢血から 10^8 個以上に増殖させることができた (図 1)。調製した細胞の機能解析を細胞内

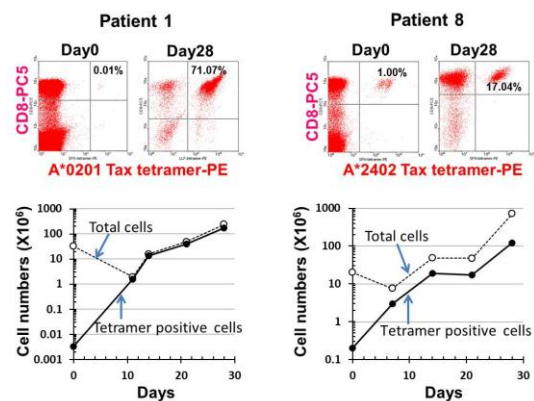


図1 HTLV-1 Tax 特異的CTLのex vivo増殖

サイトカインアッセイ (図 2)、細胞傷害試験で行ったところ、Tax 抗原特異的に強い機能

活性が自己の腫瘍細胞に対しても認められた(図3)。

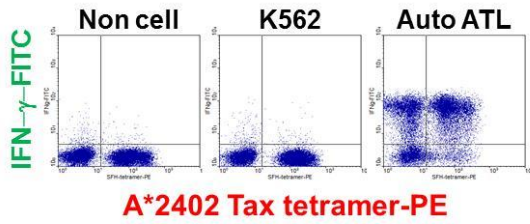
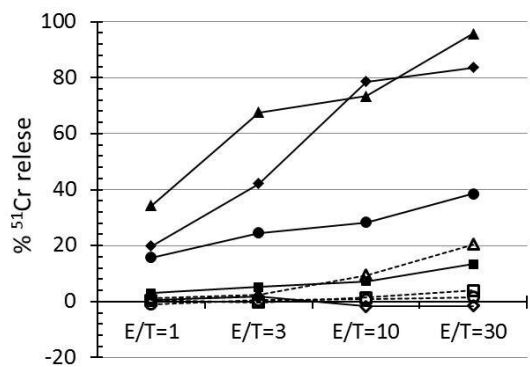


図2 HTLV-1 Tax 特異的CTLの自己ATL細胞に対する免疫応答
増殖させたCTLと、自己ATL細胞を4時間共培養させた後、細胞内IFN γ を検出した。



	HLA-type		Tax expression	
	A24	A2	protein	mRNA
□ K562	-	-	-	-
○ MT1	-	-	-	-
△ MT4	-	-	+	+
◇ HUT102	-	-	+	+
◆ MT2	+	-	+	+
▲ TL-Su	+	-	+	+
■ ATN-1	+	-	-	+
● Auto ATL	+	+	-	+

図3 HTLV-1 Tax 特異的CTLのATL細胞株、自己ATL細胞に対する傷害活性

3) NOG マウスヒト腫瘍モデルを用いた特異的CTLによる治療実験

を。次に、1-2 週間程度で短期間培養した慢性ATL 3例からATL細胞を得、 10^7 個をNOGマウスにi.p.投与した後、2日目から約7日おきに、それぞれの患者から上記に示した方法で調製したHTLV-1 Tax-CTLを約 5×10^6 個ずつ、i.p.投与した。Day45にてマウスを屠殺し、血中、及び各臓器に浸潤したATL細胞、CTLをフローサイトメトリー、及び免疫染色にて解析した。CD8陽性細胞の著しい浸潤が、ATL腫瘍局所に認められ、同時に血中、脾臓、肝臓からのATL細胞の明らかな減少と血清中可溶性IL-2Rの著明な減少が観察された。さ

らに、Tax-CTLを投与したマウスにおいて生存期間が著しく延長した。ATL細胞を移入後、80日目において、Tax-CTLを投与しなかったコントロール群では、5例中全例が死亡したが、Tax-CTL投与では、全例とも生存しつづけた(図4)。

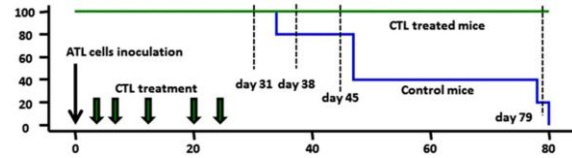


図4 HTLV-1 Tax 特異的CTL投与による生存期間の延長

4) 腫瘍精巢抗原(CT抗原)に対する免疫応答の検討

ATL患者、及びホジキンリンパ腫患者から得られた腫瘍組織に発現するCT抗原について検討した、ATLにおいては、NY-ESO-1(61.4%), MAGE-A3(31.6%), MAGE-A4(61.4%)についてmRNAが検出された。ホジキンリンパ腫においては30%においてNY-ESO-1 mRNAの発現がみられた。またこれらの結果は、免疫染色でのタンパク発現の検討結果と概ね一致していた。図5にホジキンリンパ腫におけるNY-ESO-1の免疫染色像を示した。また、CT抗原に対する、液性免疫応答、細胞性免疫応答について検討したところ、NY-ESO-1に対して、強い応答がATL、ホジキンリンパ腫双方においてみられた。ELISA法にて、NY-ESO-1に対する自己抗体が、ATL、ホジキンリンパ腫のいずれにおいても約15%に検出された。細胞性免疫応答については、エピトープペプチドに対する、特異的な応答をMHC-tetramer、細胞内サイトカインアッセイにて検討し、こちらにおいても、ATL、ホジキンリンパ腫双方において、明瞭な応答がみられた。図6に代表例を示した。

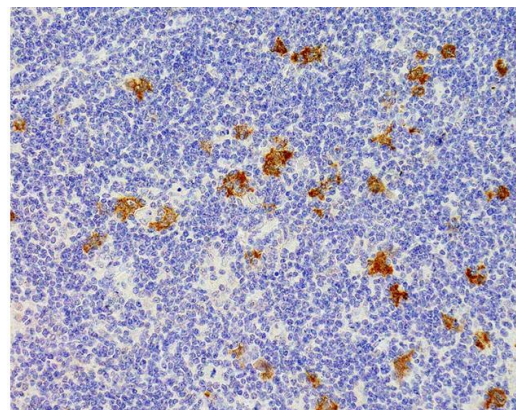


図5 ホジキンリンパ腫における、NY-ESO-1の発現

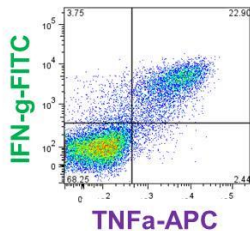


図6 ホジキンリンパ腫における、NY-ESO-1 に対する細胞性免疫応答
ホジキンリンパ腫由来PBMCをエピートープペプチド存在下、14日間培養したのち、同じペプチドで2時間再刺激後、細胞内IFNg, TNF-aを同時検出した。

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 22 件)

- 1) Ishida T, Suzuki S, Ueda R.(他 13 名) Autologous Tax-Specific CTL Therapy in a Primary Adult T Cell Leukemia/Lymphoma Cell-Bearing NOD/Shi-scid, IL-2Rnull Mouse Model. *J Immunol.* 2013 Jun 3. [Epub ahead of print] 有
- 2) Ishida T, Suzuki S, Ueda R. (他 12 名) Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model. *Leuk Res.* 2013;37:21-7 有
- 3) Ishida T, Ueda R. (他 5 名) Stevens-Johnson Syndrome associated with mogamulizumab treatment of adult T-cell leukemia / lymphoma. *Cancer Sci.* 104, 647-50, 2013 有
- 4) Ishida T, Ueda R. (他 7 名) Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepatol Res.* 2013 [Epub ahead of print] 有
- 5) Ishida T, Ueda R. (他 19 名) Defucosylated Anti-CCR4 Monoclonal Antibody (KW-0761) for Relapsed Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: A Multicenter Phase II Study. *J Clin Oncol.* 2012; 30:837-42. 有
- 6) Suzuki S, Ishida T, Ueda R. (他 14 名) Tax is a potential molecular target for immunotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* 2012; 103:1764-73. 有
- 7) Ishida T, Ueda R. (他 10 名) Potent antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human lymphoma mouse model. *Blood Cancer J.* 2012 Apr;2(4):e67. 有
- 8) Ueda R. (他 8 名) Bath-PUVA Therapy Decreases Infiltrating CCR4-Expressing Tumor Cells and Regulatory T Cells in Patients With Mycosis Fungoides. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013 Jun;13, 273-80 有
- 9) Ishida T, Ueda R. Antibody therapy for adult T-cell leukemia-lymphoma. *Int J Hematol.* 2011;94:443-4 有
- 10) Ueda R. (他 8 名) Risk of Japanese carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, the first autosomal-dominantly inherited risk factor for hematological neoplasms, to develop monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Cancer Sci.* 2011; 102(3):565-8.
- 11) Ueda R. (他 3 名) Clinical significance of hepatitis B virus (HBV)-DNA monitoring to detect HBV reactivation after systemic chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2011 ;1:29(4):e100; author reply e101.
- 12) Ueda R. (他 5 名) Serodiagnosis of Mycobacterium avium-complex pulmonary disease with an enzyme immunoassay kit that detects anti-glycopeptidolipid core antigen IgA antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2010 Nov 18.
- 13) Ishida T and Ueda R Immunopathogenesis of lymphoma: Focus on CCR4. *Cancer Sci.* 2011; 102(1):44-50.
- 14) Ueda R. (他 7 名) Anticipatory nausea among ambulatory cancer patients undergoing chemotherapy-prevalence, associated factors, and impact on quality of life. *Cancer Sci.* 2010; 101(12):2596-600.
- 15) Ueda R. (他 3 名) Reactivation of hepatitis B virus following rituximab-plus-steroid combination chemotherapy. *J Gastroenterol.* 2011; 46(1):9-16.

- 16) **Ishida T, Ueda R.** (他 11 名) A complement-dependent cytotoxicity-enhancing anti-CD20 antibody mediating potent antitumor activity in the humanized NOD/Shi-scid, IL-2R γ (null) mouse lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother*, 2010 Dec. 59(12):1791-1800.
- 17) **Ueda R.** (他 6 名) Significance of thymidylate synthase for resistance to pemetrexed in lung cancer. *Cancer Sci*. 2010 Jan; 101(1):161-6.
- 18) **Ishida T, Ueda R.** (他 10 名) Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(5):1520-31.
- 19) **Ishida T, Ueda R.** (他 18 名) 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(9):1591-8.
- 20) **Ueda R.** (他 7 名) ABCC11/MRP8 confers pemetrexed resistance in lung cancer. *Cancer Sci*. 2010; 101(11): 2404-2410.
- 21) **Ueda R.** (他 3 名) A case of compensated liver cirrhosis because of hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load in which sustained virological response was achieved by 2-year administration of very low dose recombinant interferon alpha-2b. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22(1): 121-122.
- 22) **Ueda R.** (他 10 名) Efficacy of S-1 monotherapy for non-small cell lung cancer after the failure of two or more prior chemotherapy regimens. *Oncology Letters* 2010; 1: 147-150

[学会発表] (計 23 件)

<海外>

- 1) **Ueda R.** Chemokine receptor 4 (CCR4) is a promising target for development of new tumor immunotherapy. *Inter. Academy for Advanced Oncology (IAAO)*,

Aug. 3, 2012. Tokyo

- 2) **Ishida T, Ueda R.** Anti-CCR4 Monoclonal antibody, Mogamulizumab, targeting regulatory T cells. *Lloyd J. Old Memorial Symposium in Cancer Immunology. -Challenge for the next generation of Dr. Old's view-* Sept. 21, 2012. Sapporo
- 3) **Suzuki S, Ueda R.** (他 3 名) Development of CTL preparation kit for adoptive T cell immunotherapy. 20th Annual Cancer Research Institute International Symposium. *Cancer Immunotherapy* 2012. Oct. 1-3, 2012. New York.
- 4) **Ueda R.** Chemokine receptor 4(CCR4) is a promising new target for tumor immunotherapy. *The Sino-Japan Symposium on Translational Research for Cancer Therapy*. Nov. 27, 2012. Kobe
- 5) **Ishida T, Ueda R.** (他 17 名) Multicenter phase II study of Mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-CCR4 antibody, in patients with relapsed peripheral and cutaneous T-cell lymphoma 54th ASH2012(abstract #795 Oral presentation) Dec. 9, 2012. Atlanta
- 6) **Ueda R.** Immunology and antibody therapy: Targeting chemokine receptors. *T-Cell Lymphoma Forum*, Jan. 28, 2011, San Francisco, CA.

<国内>

- 1) **上田龍三** バイオテクノロジーが招く、近未来の医学. 第 21 回日本 Cell Death 学会 講演 H24 年 7 月 28 日 名古屋(名古屋大学医学部)
- 2) **上田龍三** 日本発 CCR4 抗体開発の歩みーベンチワークからベットサイドまでー. 第 16 回日本がん免疫学会総会、平成 24 年 7 月 26 日 札幌
- 3) **上田龍三、石田高司** モガムリズマブはがんワクチン両方の効果増強を目的として併用されるべき有力な新規抗体薬候補である. (シボ 12; 次世代がん免疫治療の展望)、第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 21 日 札幌、第 71 回日本癌学会学術総会抄録集、71:461, 2012
- 4) **Ueda R.** (他 4 名) Impact of overweigh on outcomes of hematopoietic stem cell

transplantation: Meta-analysis. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct. 19, 京都. 臨床血液 53(9):1056, 2012

- 5) Ishida T, Suzuki S, Ueda R, (他 14 名) Potent antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human ATL mouse model. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct. 19, 京都. 臨床血液 53(9):1069, 2012
- 6) Ishida T, Suzuki S, Ueda R. (他 9 名) Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOG mouse model. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct. 19, 京都. 臨床血液 53(9):1131, 2012
- 7) Ishida T, Ueda R. (他 11 名) Reactivation of hepatitis B virus infection in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct. 19, 京都. 臨床血液 53(9):1422, 2012
- 8) 上田龍三: がん抗体療法の進歩—抗 CCR4 抗体を中心に—. 日本がん分子標的治療学会第 15 回学術集会 基調講演 平成 23 年 6 月 東京 (ホテル日航東京)
- 9) Ishida T, Ueda R. (他 18 名) A Multicenter phase II study of KW-0761 for relapsed ATL. 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会 平成 23 年 7 月 横浜
- 10) Ishida T, Ueda R. (他 6 名) Establishment of an angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) model in the NOG mouse. 第 73 回日本血液学会学術集会 平成 23 年 9 月 名古屋
- 11) Suzuki S, Ishida T, Ueda R. (他 11 名) Enhancement of HTLV-1 tax protein expression and the response of tax specific CTL by HDAC inhibitor. 第 73 回日本血液学会学術集会 平成 23 年 9 月 名古屋
- 12) Ishida T, Ueda R (他 10 名) Bevacizumab-induced potent antitumor effect in a microenvironment-dependent mouse lymphoma model. 第 73 回日本血液学会学術集会 平成 23 年 9 月 名古屋
- 13) 上田龍三: がんの薬物療法最前線. 第 18 回日本癌学会市民公開講座 平成 23 年

10 月 名古屋

- 14) 石田高司, 鈴木進, 上田龍三 (他 8 名) Bevacizumab-induced potent antitumor effect in a microenvironment-dependent mouse lymphoma model. 第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 名古屋
- 15) Suzuki S, Ishida T, Ueda R. (他 9 名) Enhancement of HTLV-1 tax protein expression and the response of tax specific CTL by HDAC inhibitor. The 73th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct. 10, Nagoya
- 16) 上田龍三 がんの薬物療法最前線第 18 回 日本癌学会市民公開講座 June Nagoya 2011
- 17) 上田龍三 がん抗体療法の進歩—CCR4 抗体を中心に—日本がん分子標的治療学会 第 15 回学術集会 June Nagoya 2011

〔図書〕 (計 1 件)

- 1) Suzuki S, Ishida T, Yoshikawa K and Ueda R. Progress in clinical use of CCR4 antibody for Treg cell suppression. Inflammation and Immunity in Cancer. Springer Japan KK, Tokyo, In press

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件) ○取得状況 (計 0 件)
出願、及び取得は双方ともありません。

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田龍三 (UEDA RYUZO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20142169

(2) 研究分担者

石田高司 (ISHIDA TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 80405183

鈴木進 (SUZUKI SUSUMU)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70518422

(3) 連携研究者

連携研究者はいません。