

## 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 04 月 03 日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890084

研究課題名（和文）NOGマウスを用いたがん特異的ヒトT細胞の機能解析：CD8、CD4細胞相互作用

研究課題名（英文）Functional analysis of cancer-specific human T cells in NOG mice : Cell interaction of CD4 ,CD8 cells.

## 研究代表者

王 立楠 （ Wang linan ）

三重大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00589484

研究成果の概要（和文）：申請者らは抗原ペプチドMAGE-A4143-151を認識するHLA-A2402拘束性CTLクローン由来TCR遺伝子導入ヒト末梢血CD8+T細胞のin vivo機能評価を行った。免疫不全（NOG）マウスにヒト食道癌細胞株を移植し、HLA-A24拘束性MAGE-A4特異的TCR遺伝子導入ヒトT細胞の移入による腫瘍縮小効果を検討した結果、抗原特異的な腫瘍他退縮を認めた。本研究により、ヒトT細胞のin vivo機能評価システムが確立できた。

研究成果の概要（英文）：Adoptive cell therapy (ACT) for cancer, in which T cells are collected from patient's peripheral blood, modified by the transduction of tumor-antigen specific T cell receptor (TCR) and re-administered to the same patient, is increasingly the subject of clinical trials. In this study, we aimed to establish a mouse model to analyze "in vivo" functions of the transferred T cells by utilizing immunocompromised (NOG) mice. We observed the regression of transplanted human esophageal tumor (HLA-A2402+, MAGE-A4+) growth only when T cells modified to express TCR, recognizing MAGE-A4 (p143-151) peptide in the context of HLA-A2402, were co-administered. This model will provide us more detailed information about mechanism of efficacies of transferred T cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

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：(1)MAGE-A4 (2)NOG mouse (3)CEA (4)T-body

## 1. 研究開始当初の背景

20世紀後半から分子生物学及び細胞生物学的解析が加速度的に進行し、それらの成果に基づく新しい医薬品や医療品の開発が大きく期待されている。とりわけ各種遺伝子や細胞を用いた新時代の治療法への期待は大きい。しかしながら、再生医療を含む各種細胞医療や遺伝子治療の開発は、現在のところその薬理・薬効の検証はおおむねヒトへの投与によってのみ実証せざるを得ない。これらの分野におけるいわゆるトランスレーショナル・リサーチをより効率良く進行させるには動物モデルによるヒト細胞医薬品の機能活性の in vivo 評価系が強く望まれるゆえんである。

本研究において、我々が初めて開発した T 細胞療法の有効性を検証可能な NOG マウスの実験系を進展させ、ヒトリンパ球を用いた細胞療法やがんワクチン療法の薬理効果を評価可能な動物モデルを作製することを目指す。

近年、がんに対する免疫療法として腫瘍特異抗原認識 T 細胞を体外で増殖させがん患者に移入する T 細胞移入療法や、さらに腫瘍抗原特異的 T 細胞レセプター (TCR) を遺伝子導入した患者自己リンパ球を輸注する臨床試験の良好な結果が発表され (Rosenberg ら, Science 2006)、多くのがん患者に適用性の高い、有効な新規治療法として大きく期待される。

しかしながら、ヒト腫瘍に対するヒト T 細胞移入療法の大きな問題点の一つとして、上述のごとく多くの細胞医療製剤と同様に投与薬剤そのものである調整ヒト T 細胞についてはその有効性を評価する in vivo 動物モデルが存在しない点が挙げられる。つまり、投与薬剤であるヒト T 細胞、及び治療対象のヒトがん細胞はマウス等他の動物種においては異種細胞であり、宿主の免疫系、特に宿主 T 細胞により拒絶される為に単純に投与することが出来ない。さらにヒトと他の動物種における抗原の相違、T 細胞バイオロジーの相違といった理由からヒト T 細胞移入療法はマウス等の実験動物自身の腫瘍-T 細胞系では正確に評価できない。

以上の理由から、これまでの T 細胞移入療法における薬理・薬効はほとんど実験動物では検証されないまま臨床研究が開始され、臨床研究のヒトにおける結果から初めてその情報を得る努力がなされているのが現状である。この現状から派生する問題点として、

ヒト臨床試験が実施される以前に無効な薬剤の十分な選別がかからず、多くの臨床試験を行なうことになり開発の効率が悪く、有効性の情報を得るまでに長期の時間と人的・物的資源、費用を要することが挙げられる。さらに同様の理由から安全性についても現存の動物実験から得られる情報は限られている。

## 2. 研究の目的

近年ヒト細胞医薬品への期待が大きいが、がんに対する遺伝子導入 T 細胞移入療法も有効な新規治療法として期待されている。しかしながら投与薬剤そのものである調整ヒト T 細胞についてその有効性を評価する in vivo 動物モデルは存在しない。我々は重度免疫不全マウスである NOG マウスを用いて、がん抗原特異的 T 細胞レセプター遺伝子を導入した遺伝子改変ヒト T 細胞の移入療法により、ヒトがん細胞株の治療効果が評価可能となる、初めてのヒト T 細胞療法の薬理・薬効評価系の基礎データを得ている。本申請研究では我々の経験と知見をもとに動物宿主においてヒト免疫系を再構築し、がんワクチンや細胞療法の薬理・薬効を評価可能な in vivo 動物モデルを確立し、トランスレーショナル・リサーチにおける試験薬物の前臨床試験に貢献することを目指す。

MAGE-A4 はがん精巣抗原の一つであり、その発現は多くの腫瘍と精巣に限られ、がん治療の理想的な標的抗原の一つである。我々は抗原ペプチド MAGE-A4<sub>143-151</sub> を認識する HLA-A2402 拘束性 CTL クローンを作製し、レトロウイルスベクターを用いたこの CTL 由来 TCR 遺伝子のヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T 細胞への導入システムを樹立した (Hiasa ら, Gene Therapy 2007)。本 TCR 遺伝子を導入された T 細胞 (GMC) は MAGE-A4-HLA-2402 テトラマーと反応し MAGE-A4 陽性腫瘍細胞と反応して IFN $\gamma$  を産生した。我々は NOG マウスにヒト食道癌細胞株を移植し、HLA-A24 拘束性 MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入ヒト T 細胞の移入による治療実験を行なった。MAGE-A4 陽性 HLA-A24 陽性食道癌細胞株 KE4 は遺伝子導入細胞 (GMC) を移入したマウスにおいて退縮を示したが、遺伝子非導入細胞 (NGMC) 移入マウスにおいては退縮を示さなかった。同じマウスに移植された HLA-A24 陰性細胞株 QG56 の成長は GMC と NGMC の移入により差が見られなかった。

## 3. 研究の方法

本研究計画は以下の 2 コンポーネントより

なる。

- 1) 我々の樹立した MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入 CD8<sup>+</sup>細胞を用いた NOG マウスにおける MAGE-A4 陽性腫瘍細胞治療の系を發展させ、腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup>細胞と共に同一ドナー由来のヘルパーCD4<sup>+</sup>T 細胞(Th1 細胞、Th2 細胞)、Th17 CD4<sup>+</sup>T 細胞、あるいは抑制性機能を持つ CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞を移入する。抗腫瘍効果、細胞の局在と増殖、フェノタイプの変化、インビボ生存性につき検討する。また、その際の CD8-CD4 相互作用におけるサイトカイン、細胞表面分子、及び細胞内シグナル伝達物質の役割を解析する。
- 2) CEA 特異的抗体と細胞内シグナル伝達分子とのキメラ分子の遺伝子導入細胞 (T-body)を用いて腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞と腫瘍特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞とのインビボにおける相互作用を解析す (T-body 技術は CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>両細胞に抗原特異的の反応性を付与可能である。

#### 【研究計画・方法 (平成 2 2 年度)】

1. NOG マウスにおける MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入 CD8<sup>+</sup>T 細胞と、非特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の相互作用の検討

##### 1-1. CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞の再構成

MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入 CD8<sup>+</sup>T 細胞による抗原特異的腫瘍治療モデルの系に非特異的 CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞を加えて移入する。非特異的 CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞は抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞からのサイトカインと細胞-細胞相互作用により活性化されると共に、自身は抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞をさらに活性化すると考えられる。腫瘍増殖抑制効果を検討すると共に、移入 T 細胞の局在、増殖、細胞表面フェノタイプの変化をフローサイトメトリーにて解析し、抗原特異的サイトカイン産生能、増殖能を細胞内サイトカイン染色法、ELISA、ELISPOT アッセイ、<sup>[3H]</sup>チミジン取り込みアッセイにより解析する。

近年、CD8<sup>+</sup>T 細胞のメモリーフェノタイプの獲得とインビボ生存性の獲得には Wnt- $\beta$ カテニン系のシグナル伝達と、mTOR シグナル伝達が重要な働きを担うことが明らかとなりつつある (Gattinoni ら Nature Med 2009, Rao ら Immunity 2010 他)。本研究では CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞の存在が CD8<sup>+</sup>T 細胞内のこれらのシグナル伝達に与える影響を解析する。関連する遺伝子とそのコードする蛋白の発現を定量的 RT-PCR 法、Western blotting 法、細胞内蛋白染色法により検討し、それぞれのシグナルの特異的阻害剤を加えることによりその経路を詳細に同定し、経路遮断による細胞の変化を解析する。

##### 1-2. Th17 CD4<sup>+</sup>T 細胞の再構成

近年、CD4<sup>+</sup>T 細胞の中で IL-17 を産生する一群、Th17 CD4<sup>+</sup>T 細胞が注目されている。Th17 CD4<sup>+</sup>T 細胞は炎症を誘導/増強することによりがんの生存/増殖を助ける場合があると共に、がん免疫監視機構の一翼を担いがんの退縮を導く場合もある 2 面性が指摘されて

いる。これら Th17 CD4<sup>+</sup>T 細胞を誘導するサイトカイン環境でインビトロで刺激培養した CD4<sup>+</sup>T 細胞を輸注することにより Th17 CD4<sup>+</sup>T 細胞を優先的に再構成し、NOG マウスの体内でがん特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞に与える影響につき、上記 1-1 と同様な手法により解析する。

##### 1-3. 制御性 T 細胞の再構成

近年、抗腫瘍免疫応答における制御席 T 細胞の免疫抑制機序の重要性がさらにクローズアップされている。制御席 T 細胞を CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ビーズにより集め、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞と共に NOG マウスに移入し抗腫瘍効果と共に、移入 CD8<sup>+</sup>T 細胞と制御性 T 細胞の解析を行なう。

#### 【研究計画・方法 (平成 2 3 年度)】

2. NOG マウスにおける CEA 特異的抗体キメラ遺伝子導入 CD8<sup>+</sup>T 細胞 (CD8<sup>+</sup>T-body) と、同遺伝子導入 CD4<sup>+</sup>T 細胞 (CD4<sup>+</sup>T-body) の相互作用の検討

申請者らはがんを特異的に認識するレセプターとして、がん抗原特異的 TCR に加え、がん抗原特異的抗体と細胞内シグナル伝達分子とのキメラ分子による人為的レセプターの基礎検討を行ってきた。これらのキメラ分子を発現するリンパ球は T-body と呼ばれ、抗体は MHC 拘束性にかかわらずに標的を認識することから T-body はそれが CD8<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞であることに関わらずに抗原を強い親和性で認識することが可能である。

#### 4. 研究成果

(1) 平成 2 2 年度にこれらの基礎検討を進め、導入効率を高め安定した T-body 作製系を確立する。平成 2 3 年度にはこれらの T-body を NOG マウスに輸注し、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞と抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞とのインビボにおける相互作用を解析する。

平成 2 3 年度に申請者らはがんを特異的に認識するレセプターとして、がん抗原特異的 TCR に加え、がん抗原特異的抗体と細胞内シグナル伝達分子とのキメラ分子による人為的レセプターの基礎検討を行ってきた。これらのキメラ分子を発現するリンパ球は T-body と呼ばれ、抗体は MHC 拘束性にかかわらずに標的を認識することから T-body はそれが CD8<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞であることに関わらずに抗原を強い親和性で認識することが可能である。

応募者らは CEA 特異的 T-body のレトロウイルスベクターコンストラクトを作製した。このレトロウイルスベクターを用いて、健康人の末梢血単核球 (PBMC) へ遺伝子導入を行った。CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>+</sup>T 細胞の両細胞において、標識遺伝子の発現を認めた。これらの遺伝子導入リンパ球は CEA 陽性ヒト胃癌細胞株を特

異的に認識し、サイトカイン (IFN $\cdot$ ) を産生した。

平成23年度に申請者らは抗原ペプチド MAGE-A4143-151を認識するHLA-A2402拘束性 CTLクローン由来TCR遺伝子導入ヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T細胞のin vivo機能評価を行った。免疫不全 (NOG) マウスにヒト食道癌細胞株を移植し、HLA-A24拘束性MAGE-A4特異的TCR遺伝子導入ヒトT細胞の移入による腫瘍縮小効果を検討した結果、抗原特異的な腫瘍他退縮を認めた。本研究により、ヒトT細胞のin vivo機能評価システムが確立できた。

(2) 副刺激分子GITRを介する刺激は細胞の生存性に寄与することが明らかになっており、さらに申請者等はGITRシグナルが、エフェクターT細胞が制御性T細胞による抑制に対して抵抗性を獲得することを世界で初めて明らかにしている (Wang et al. Clin Cancer Res16, 2781-91, 2011)。そのため、GITRのシグナル伝達ドメインが付加されたCEA特異的CARは長期生存が期待されると共に腫瘍局所での制御性T細胞による抑制を回避し、in vivoで高い効果が得られると予想される。また、in vitroでの機能解析において、GITRシグナル付加によりin vivoでの生存・持続性の鍵を握るとされるIL-2産生能が有意に高くなることを既に見出している

## 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2件)

1. T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/ $\gamma$  cnull mice. Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H. Cancer Science. 査読有 103-17-25, 2012.
2. Intracellular Tumor-Associated Antigens Represent Effective Targets for Passive Immunotherapy.

Noguchi T, Kato T, Wang L, Maeda Y, Ikeda H, Sato E, Knuth A, Gnjjatic S, Ritter G, Sakaguchi S, Old LJ, Shiku H, Nishikawa H. Cancer Science. 査読有 1;72(7):1672-1682. Epub 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

王立楠 (Wang linan)  
三重大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：00589484