

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590384

研究課題名(和文)造血幹細胞移植により腫瘍部の免疫寛容を根本的に打破する免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of immunosuppressive microenvironment-breaking immune therapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

青木 一教 (Aoki, Kazunori)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：60270675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くの固形がんは免疫療法に対して抵抗性を示す。これは、腫瘍が免疫抑制環境を構築しているからである。我々は、造血幹細胞を遺伝子工学的に改変することにより、腫瘍部の免疫抑制環境を打破し、強力な腫瘍免疫を誘導する新規免疫療法の開発を行った。免疫抑制環境の主因である制御性T細胞は自己免疫反応を抑える役目を有するので全身性に減らすことは望ましくない。そこで、低酸素状態などの腫瘍に特徴的な環境下でのみ、制御性T細胞特異的に遺伝子を発現することのできる新たな遺伝子発現システムを構築し、腫瘍部のみで制御性T細胞を特異的に除去し腫瘍免疫を誘導する治療法開発の基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) leads to an induction of antitumor immunity. However, many solid cancers are resistant to immune therapies, because they establish the immunosuppressive microenvironment in tumors. The regulatory T cells (Tregs) is a main factor of tumoral immunosuppression. On the other hand, the systemic depletion of Tregs may induce autoimmune reaction. Here, we developed a novel immune therapy with the genetic engineering of hematopoietic stem cells, which fundamentally break the immunosuppressive microenvironment in tumors. To eradicate Tregs in tumors only, we first analyzed the dynamics of Tregs in tumors after HSCT, and based the findings, we successfully developed a hypoxia-inducible Treg-specific transgene expression system, which is a basis of novel immune therapy.

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：免疫抑制環境 制御性T細胞 造血幹細胞移植 低酸素 遺伝子導入 プロモーター

1. 研究開始当初の背景

現在、ペプチドワクチンや樹状細胞療法など様々な戦略で腫瘍免疫を誘導する免疫療法の臨床開発が進んでいる。しかし、固形がんでは多くの症例が免疫治療に抵抗性を示す。これは、宿主免疫が腫瘍細胞を認識することができない事に起因する。一方、近年、自家造血幹細胞移植により新たな免疫系を再構築することで、抗腫瘍効果が誘導できることが明らかとなってきている。そこで、我々は、免疫治療に造血幹細胞移植を併用する新たな免疫遺伝子・細胞複合療法の基礎開発を進めている。実際、いままでに、マウス骨髄移植モデルを用いて移植早期の免疫再構築が起こっている時期に、腫瘍内へのインターフェロン遺伝子などの免疫遺伝子治療を組み合わせることにより、全身性の腫瘍特異的免疫を誘導できることを示してきた。

自家造血幹細胞移植により腫瘍免疫を誘導する機序は、Homeostatic proliferationにある。すなわち、造血幹細胞移植等でリンパ球減少状態に陥った個体は、リンパ球数を維持するために移入したリンパ球が急速に増殖する(Homeostatic proliferation: HP)。このHPの際にはリンパ球増殖に必要なシグナル閾値が低下しているため、正常な場合とは違って自己抗原もT細胞の増殖を誘導できるようになる。従って、HPの際にがん抗原を暴露すると、がん抗原を認識するリンパ球が急速に増殖し腫瘍特異的免疫反応を効率的に誘導することができる。

しかし、自家造血幹細胞移植による免疫治療を臨床応用する上での大きな制約は、抗腫瘍効果が、腫瘍の持つ免疫抑制性環境により長期間持続しない点にある。我々の検討でも、自家造血幹細胞移植と免疫遺伝子治療との複合により強力に抗腫瘍免疫を活性化しても、移植後4週間ほどで腫瘍は再び増殖しはじめ、完全に治癒させることは難しい。腫瘍での免疫抑制性環境の構築の主因は、制御性T細胞が腫瘍部やリンパ節で増えることによる。しかし、制御性T細胞を全身から除去してしまうと自己免疫疾患を引き起こしてしまう。そこで、腫瘍部のみで制御性T細胞を除去することが可能になれば、自己免疫疾患を発症することなく、造血幹細胞移植後の抗腫瘍免疫効果を持続的に強化し、腫瘍を完全に退縮でき、そして、これは多くの免疫療法と組み合わせることができる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、自家造血幹細胞移植の腫瘍免疫抑制環境への効果を明らかとし、腫瘍部のみで免疫抑制環境を打破することで、抗腫瘍免疫を強く誘導する新たな免疫細胞・遺伝子療法の基盤となる研究を行う。研究期間内には、以下のことを明らかとする。

- (1) 造血幹細胞移植後の腫瘍部における制御性T細胞の動態と、その免疫抑制性環境構築における役割を明らかとする。
- (2) 低酸素状態などの腫瘍に特徴的な環境下で、制御性T細胞特異的に遺伝子を発現することのできる新規プロモーターを開発する。
- (3) 開発した新規プロモーターによる外来遺伝子発現系を造血幹細胞に導入して、マウスで造血幹細胞移植を行い、生体内で導入造血幹細胞から制御性T細胞が分化することを確認する。

最終的に自殺遺伝子と組み合わせ、腫瘍部で特異的に制御性T細胞を除去する新たな免疫療法の基盤とする。

3. 研究の方法

本研究では、造血幹細胞を遺伝子工学的に改変することにより、腫瘍部のみで免疫抑制性環境を根本的に打破し、強力な腫瘍免疫を誘導する新規免疫治療戦略の開発を目指し、平成23・24年度は、造血幹細胞移植後に腫瘍部では制御性T細胞がどのように回復するか、その動態を理解した。ついで、平成24・25年度は、低酸素状態である腫瘍部のみで制御性T細胞特異的に作動する新規プロモーターを開発し、生体内で遺伝子導入した造血幹細胞から制御性T細胞が分化することを確認した。

【平成23・24年度】

我々は、免疫刺激遺伝子の導入による自然免疫および獲得免疫の強化に、自家造血幹細胞移植後ではリンパ球が抗腫瘍免疫を誘導しやすい特性を利用して腫瘍特異的免疫反応を高める免疫遺伝子・細胞複合療法の基礎開発を行っている。自家造血幹細胞移植は同種造血幹細胞移植と比較して、移植片対宿主病を起こさないで安全性にも優れており、動物実験でも有害事象は認められていない。

しかし、造血幹細胞移植当初は抗腫瘍免疫を強く誘導できるが、やがて減弱し腫瘍を完全に退縮させることは困難である。そこで、まず、造血幹細胞移植後の抗腫瘍免疫の誘導・減弱と、免疫抑制環境の主要な構成要因である制御性T細胞との関連を、マウス骨髄移植モデルを用いて包括的に理解することとした。具体的には、以下の研究を行った。

- (1) 造血幹細胞移植を行うことにより、どのように腫瘍部での免疫抑制環境が減弱するか、そして、どのように腫瘍部で再び免疫抑制環境が再構築されるかを明らかとするために、自家造血幹細胞移植マウスモデルを用いて、脾臓および腫瘍に浸潤する制御性T細胞の経時的経過を解析した。
- (2) 造血幹細胞移植後に回復してくる制御

性 T 細胞の由来は、造血幹細胞移植の際に同時に移入する制御性 T 細胞が増殖する場合と、造血幹細胞から分化する場合の 2 つが考えられる。両者の腫瘍における免疫抑制環境の再構築に果たす役割に違いがあるのかを明らかとするために、GFP 遺伝子改変マウスの骨髓細胞と GFP 陰性の T 細胞を一緒に移入して、腫瘍部にて増殖する制御性 T 細胞の GFP 発現を解析した。

(3) 移植時に移入した制御性 T 細胞が、造血幹細胞移植による抗腫瘍免疫誘導や免疫抑制環境確立においてどのように影響するのかを明らかとするために、磁気ビーズを用いて移植片から制御性 T 細胞を除去した後に造血幹細胞移植を行い、抗腫瘍効果の増強や腫瘍免疫の活性化を解析した。

【平成 24・25 年度】

腫瘍部のみで制御性 T 細胞を除去する新たな免疫療法の基礎開発として、(1)低酸素状態などの腫瘍に特異的な環境下で制御性 T 細胞において作動する新規遺伝子発現系を開発した。ついで、(2)この遺伝子発現系を造血幹細胞に遺伝子導入し、生体内で Treg が分化するか検討した。

(1) 低酸素状態で働く制御性 T 細胞特異的遺伝子発現系の開発

Foxp3 は制御性 T 細胞に特異的に発現している転写因子であり、Foxp3 遺伝子のプロモーターとエンハンサーを用いることにより、制御性 T 細胞特異的に遺伝子を発現することが可能となる。

また、低酸素状態は、生体では腫瘍や動脈硬化などの病的な部位でしか起こらない。そこで、低酸素下で遺伝子発現を誘導する Hypoxia responsive element と、正常酸素下で遺伝子発現を抑制する Hypoxia-regulated silencer element を組み合わせた hypoxia 誘導配列を作成し、それを Foxp3 プロモーター上流に配置した低酸素誘導型制御性 T 細胞特異的プロモーターを構築した。

この新規プロモーターの性能を評価するために、本プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合したコンストラクトを作成し、Foxp3 陽性リンパ球及び Foxp3 陰性リンパ球にそれぞれレトロウイルスを用いて導入する。正常酸素状態および低酸素状態で培養し、本コンストラクトが低酸素下で制御性 T 細胞特異的に発現するか検討した。

(2) 低酸素誘導制御性 T 細胞特異的プロモーターを導入した造血幹細胞からの、生体内での制御性 T 細胞の分化

このコンストラクトを、レトロウイルスベクターを用いて Lin⁻ c-Kit⁺造血幹細胞に遺伝子導入後、マウスに移入して生体内で制御性 T 細胞に分化するかどうか検討した。

4. 研究成果

(1)造血幹細胞移植後の腫瘍免疫誘導と、免疫抑制環境の主因である制御性 T 細胞の関連を、マウス骨髓移植モデルを用いて検討した。同系の造血幹細胞移植後、脾臓においては CD4⁺T 細胞中の制御性 T 細胞の割合が約 40% に上昇し 5 週後にコントロールレベル(25%)に戻るのに対し、CT26 や MethA 腫瘍部では制御性 T 細胞の割合が明らかに減少して(5%)、5 週後にコントロールレベル(15%)に戻った(図 1)。このように、脾臓と腫瘍部で制御性 T 細胞の動態が正反対であることを示し、同系の造血幹細胞移植により腫瘍の免疫抑制性環境を解除できることを明らかとした。

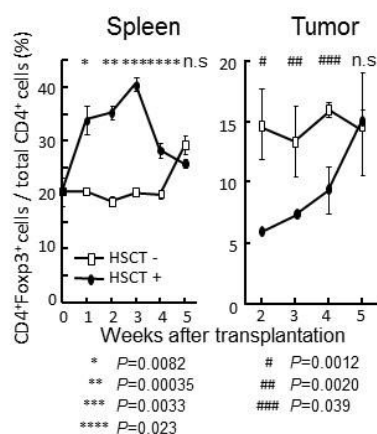


図1 造血幹細胞移植後の脾臓と腫瘍における制御性T細胞の頻度

(2)造血幹細胞移植後に回復する制御性 T 細胞の由来は、移植片に存在する制御性 T 細胞が増殖する場合と、造血幹細胞から分化する場合がある。両者の免疫抑制性環境構築に果たす役割を明らかとするために、GFP 遺伝子改変マウスの骨髓細胞や T 細胞を用いて造血幹細胞移植を行い、制御性 T 細胞の由来を検討した。すると、脾臓では、40-60%が造血幹細胞から分化した制御性 T 細胞であったのに対し、腫瘍では 70%が移植片に存在する制御性 T 細胞が増殖したものであった(図 2)。

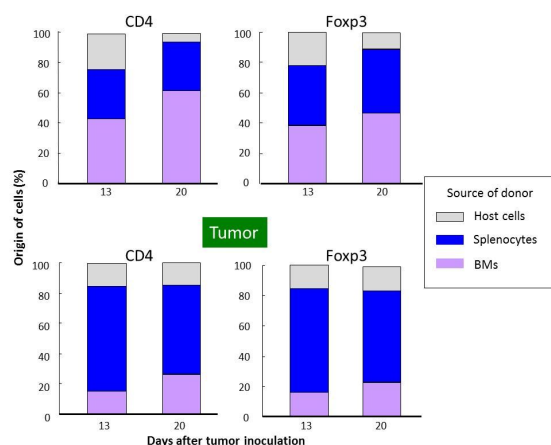


図2 造血幹細胞移植後の脾臓と腫瘍における制御性T細胞の由来

このように脾臓と腫瘍の制御性 T 細胞では、造血幹細胞移植後に由来が異なることが明らかとなった。そこで、移植片から制御性 T 細胞を除去して同系の造血幹細胞移植を行う、腫瘍免疫が活性化し、抗腫瘍効果が有意に増強され(図3)、制御性 T 細胞を除去することが抗腫瘍免疫誘導に有用であることを明らかとした。

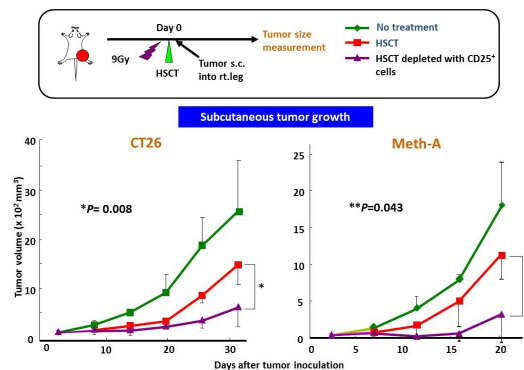


図3 移植片からの制御性T細胞除去による腫瘍免疫の増強

(3)低酸素状態などの腫瘍特異的な環境下で、制御性 T 細胞において作動する新規遺伝子発現系を開発するために、Hypoxia responsive element と、Hypoxia-regulated silencer element を組み合わせた hypoxia 誘導配列を作成し、それを Foxp3 プロモーター上流に配置した低酸素誘導型制御性 T 細胞特異的プロモーターを構築した。ついで、この新規プロモーターの性能を評価するために、本プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合したコンストラクトを作成し、Foxp3 陽性及び Foxp3 陰性細胞にそれぞれレトロウイルスを用いて導入し、正常酸素状態および低酸素状態で培養した。a) Foxp3 プロモーターとエンハンサーを組み合わせることで、制御性 T 細胞特異的な遺伝子発現が可能であり、CT26 などの Foxp3 非発現細胞での遺伝子発現は認められないこと、b)この Foxp3 プロモーター・エンハンサーに、低酸素下で遺伝子発現を誘導する Hypoxia responsive element を組み合わせて、低酸素状態において制御性 T 細胞特異的な遺伝子発現が可能であること、c)正常酸素分圧下で遺伝子発現を抑制する Hypoxia-regulated silencer element を組み合わせて、正常酸素分圧下では制御性 T 細胞での外来遺伝子発現が抑制されること、とい

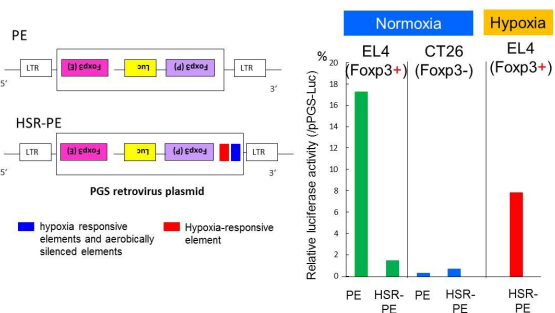


図4 低酸素誘導型Foxp3 特異的プロモーターの構築

った特徴を有することを確認した(図4)。

(4)本プロモーターを、レトロウイルスベクターを用いて造血幹細胞に遺伝子導入し、マウスに移入することにより、生体内で導入細胞から制御性 T 細胞が分化することを確認した。このように、腫瘍部のみで制御性 T 細胞を特異的に除去し腫瘍免疫を誘導する新たな治療法開発の基盤を確立した。

今後、Foxp3 プロモーター下流に自殺遺伝子である単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子を組み込む(低酸素誘導制御性 T 細胞特異的自殺遺伝子発現システム)。HSV-tk はプロドラッグであるガンシクロビルをリン酸化して細胞における DNA の合成を障害することにより細胞死を誘導する。このコンストラクトを、レトロウイルスベクターを用いて制御性 T 細胞に遺伝子導入し、担がんマウスに移入する。プロドラッグであるガンシクロビルを腫瘍内投与して、腫瘍内に浸潤している制御性 T 細胞を除去し、腫瘍免疫を増強できるか検討する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Suzuki K, Aida K, Miyakawa R, Narumi K, Udagawa T, Goto N, Yoshida T, Ohshima Y, Aoki K. Pre-immunization of donor lymphocytes enhances antitumor immunity of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Med* 2; 636-645, 2013.

Udagawa T, Narumi K, Suzuki K, Aida K, Miyakawa R, Ikarashi Y, Makimoto A, Chikaraishi T, Yoshida T, Aoki K. VEGF-D-mediated blockade of regulatory T cells within tumors is induced by hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* 191: 3440-3452, 2013.

Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Ochiya T, Yoshida T, Chikaraishi T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. *Hum. Gene Ther* 23: 173-186, 2012.

Narumi K, Udagawa T, Kobayashi A, Hara H, Kondoh A, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Takeshita F, Ochiya T, Okada T, Yamagishi M, Yoshida T, Aoki K. *In vivo* interferon- α gene transfer enhances antitumor immunity after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Gene Ther* 19: 34-48, 2012.

〔学会発表〕(計16件)

Narumi K, Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity induced by autologous hematopoietic stem cell transplantation is enhanced by a priming of the donor T lymphocytes to tumor-associated antigens. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. February 21-25, 2013 (Maui).

Narumi K, T Udagawa T, Miyakawa R, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of regulatory T cells within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第41回日本免疫学会総会. 2012年12月.

青木一教. 固形がんに対する新たな免疫遺伝子・細胞療法の開発. 第6回日本緩和医療学会. 2012年10月.

Miyakawa R, Suzuki K, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第71回日本癌学会総会. 2012年9月.

Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity of hematopoietic stem cell transplantation differs by a priming status of donor cells. 第71回日本癌学会総会. 2012年9月.

Aoki K, Udagawa T, Narumi K. Suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第71回日本癌学会総会. 2012年9月.

Aoki K, Narumi K, Udagawa T. Combination therapy of hematopoietic stem cell transplantation and intratumoral interferon gene transfer to sarcoma (Symposium). 第18回日本遺伝子治療学会学術集会. 2012年7月.

Narumi K, Udagawa T, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. The American Society of Gene Therapy 's 15th Annual Meeting. May 16-19, 2012 (Philadelphia).

K Narumi, T Udagawa, Y Ikarashi, T Ochiya, T Yoshida, K Aoki. *In vivo* delivery of interferon- α gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance after autologous

hematopoietic stem cell transplantation. The American Society of Gene Therapy 's 14th Annual Meeting. May 18- 21, 2011 (Seattle).

T Udagawa, K Narumi, Y Ikarashi, S Ohnami, T Yoshida, K Aoki. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses immunotolerant environment in tumors and induces antitumor immunity. 第70回日本癌学会総会. 2011年10月.

T Udagawa, K Narumi, T Ochiya, T Yoshida, K Aoki. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of type I interferon gene transfer for sarcoma. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会. 2011年7月.

〔図書〕(計1件)

Narumi K, Aoki K. Combination of immune gene therapy with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation against solid cancers. In: Cellular and Genetic Practices for Translational Medicine ed. by J-Y. Kwak and J-Y. Han. Research Signpost, Kerala, India 2011, p227-246.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 一教 (AOKI, Kazunori)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号: 60270675