

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590891

研究課題名(和文) ナイーブTリンパ球の特性を考慮した新規複合免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel combined cancer immunotherapy using adoptive naive T cell transfer.

研究代表者

石川 剛 (Ishikawa, Takeshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90372846

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)：養子免疫療法(ACT)で用いる細胞としては分化したリンパ球よりもナイーブ形質を有するリンパ球が適していることが報告されている。本研究ではナイーブTリンパ球と抗CTLA-4抗体を併用し、マウス担癌モデルにおいて抗腫瘍効果を検証した。その結果、抗CTLA-4抗体薬はナイーブTリンパ球を用いたACTと併用した方が、分化型Tリンパ球のACTと併用するよりも強い抗腫瘍効果を発揮した。さらに、併用療法においてナイーブTリンパ球移入群の腫瘍浸潤リンパ球はTh1分化傾向がより強く、Treg細胞数は減少していた。抗CTLA-4抗体薬はナイーブTリンパ球移入療法との併用でより強い臨床効果を発揮すると予想される。

研究成果の概要(英文)：In adoptive cell therapy(ACT), the intrinsic properties of the transferred cell population, particularly its state of differentiation, are considered to be crucial to the success of ACT based approaches, and naive T cells are ideal for ACT because of their in vivo persistence and high proliferative potential. In this study, we evaluated the synergic anti-tumor effect of CTLA-4 blockade combined with ACT considering the state of differentiation of transferred cells in mouse colon cancer model. CTLA-4 blockade combined with naive T-cell transfer showed the strongest antitumor effect among all groups. Moreover, CTLA-4 blockade can drive polarization of tumor-infiltrating T cells toward the T helper 1 lineage and suppress the frequency of Tregs within tumor especially in combination with naive T-cell transfer. These data support the notion that the combination of CTLA-4 blockade and ACT containing a lot of naive cells could exert powerful antitumor effects in clinical setting.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：がん免疫療法 ナイーブTリンパ球 CTLA-4 細胞療法

1. 研究開始当初の背景

がんに対する養子免疫療法(ACT)で用いる細胞として分化したリンパ球よりも、ナイーブ形質を有するリンパ球の方が *in vivo* における抗腫瘍活性が高いことが報告されており、我々はヒトフィブロネクチン組み換え蛋白である RetroNectin を用いたリンパ球拡大培養法でナイーブ T リンパ球を高い含有率で得る方法を利用し、臨床応用へ向けた Phase1 試験を行った。この「RetroNectin 誘導ナイーブ T 細胞リッチリンパ球療法(RIT)」の臨床的有効性を高めるためには、担がん宿主の免疫逃避機構に対する介入も不可欠であると考えられる。しかし、RIT の潜在的有効性を具現化するための方法は確立されていない。また、ACT の臨床応用において、その効果を早期より予測できる免疫モニタリングの必要性は極めて高いが、有用な免疫モニタリング法は開発されていない。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害剤の1つである抗 CTLA-4 抗体と ACT との併用療法の有効性を大腸がんマウス皮下移植モデルを用いて検討する。その際、移入 T リンパ球の分化度の違いが抗腫瘍効果にどのような影響を及ぼすか、また、腫瘍内浸潤リンパ球および Draining lymphnode(DLN), 脾臓におけるリンパ球の phenotype についても検討する。さらに、ACT の臨床における免疫モニタリング法として、末梢血サイトカイン産生能検査の有用性を ACT 施行症例を対象として検討する。

3. 研究の方法

(1) リンパ球の拡大培養およびリンパ球の分離

BALB/c マウス脾臓より脾細胞を集め、その後磁気ビーズを用いて CD3 陽性細胞を positive selection で集めた。その後、CD3 陽性細胞を抗 CD3 抗体, RetroNectin, IL-2, IL-7 などを用いて拡大培養した。培養細胞は、ACT において分化度の違いによる効果の差を検討するため、磁気ビーズを用いて、CD62L^{high} の集団を positive selection で集め、ナイーブ T リンパ球とし、CD62L^{low} の集団を分化型リンパ球として治療に供した。

(2) ACT+抗 CTLA-4 抗体薬併用療法

大腸がん細胞株 colon26 を同系 BALB/c マウスの皮下に移植し、day6 と 13 に分化度の異なるリンパ球移入 (5×10^7 cells) を尾静脈より行い、抗 CTLA-4 抗体 (100 μ g) or control IgG を day5, 8, 10, 12, 15 に腹腔内投与した。Day17 にマウスを解剖し、腫瘍、脾臓・DLN の解析を行った。

(3) フローサイトメーター

腫瘍内、DLN、脾内のリンパ球の phenotype を検討するため、表面抗原 (CD3, CD4, CD8) および細胞内抗原 (Foxp3, IFN γ) をフローサイトメーター (FCM) で解析した。

(4) 組織免疫染色

腫瘍浸潤リンパ球について、CD3 および Foxp3 抗体で免疫染色し、各治療群間を比較検討した。

(5) 腫瘍における T-bet, GATA-3, Foxp3 のウェスタンブロッティング

腫瘍浸潤リンパ球の Helper T 細胞分化 (Th) を明らかにするために、腫瘍蛋白を抽出し、T-bet (Th1), GATA-3 (Th2), Foxp3 (Treg) 発現をウェスタンブロッティングで検討した。

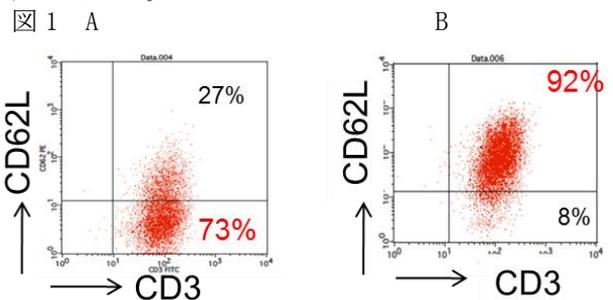
(6) 免疫モニタリング法としての末梢血サイトカイン産生能検査の有用性についての検討

臨床試験などにおいて ACT を施行した症例に対して治療前後で末梢血サイトカイン産生能検査を施行し、臨床効果予測における有用性を検討した。末梢血サイトカイン産生能検査は全血を phytohemagglutinin (25 μ g/mL) で 48 時間刺激し産生される各種サイトカインを BioPlex にて測定し、臨床効果との関連を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 移入細胞の phenotype

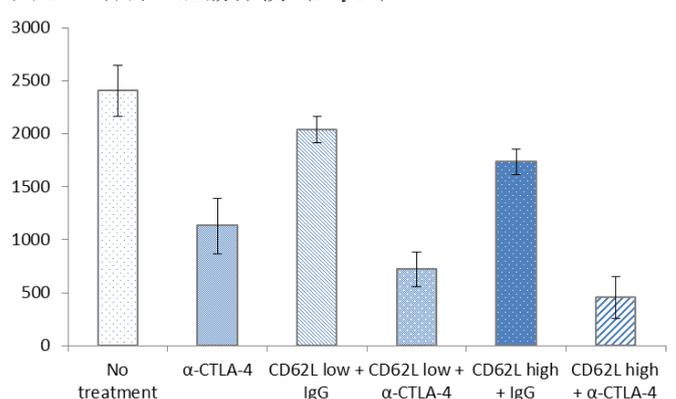
CD62L 磁気ビーズを用いて positive selection した移入細胞の CD62L 陽性率は、CD62L^{high} (ナイーブ T リンパ球) 群で 90% 以上 (図 1B)、CD62L^{low} (分化型リンパ球) 群で 30% 以下 (図 1A) であった。



(2) 抗腫瘍効果

治療介入群の day17 での腫瘍サイズは、無治療群に比し有意に縮小していた。ACT と抗 CTLA-4 抗体薬との併用により抗腫瘍効果は増強し、CD62L^{high} 細胞移入 + 抗 CTLA-4 抗体薬が最も強い抗腫瘍効果を示した (図 2)。

図 2 各群の腫瘍体積 (Day17)

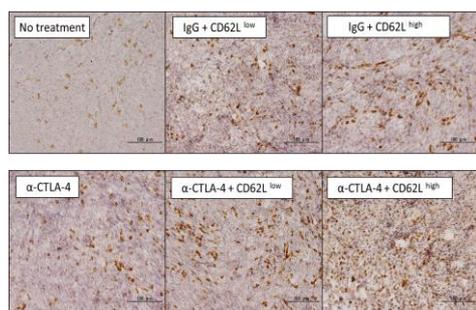


(3) 脾臓、DLN におけるリンパ球の phenotype
脾臓内においては、ACT 介入群で CD4 陽性リンパ球比率は低下し、CD8 陽性細胞比率は増加した。Treg (CD4+Foxp3+) 比率は、抗 CTLA-4 抗体薬投与群でコントロール群に比し増加し、ACT との併用においても抗 CTLA-4 抗体薬は Treg 比率を増加させる傾向を認めた。DLN においても脾臓内と同様に CD4 陽性細胞比率は増加、CD8 陽性細胞比率は低下した。Treg 比率はすべての治療介入群でコントロールに比し増加した。

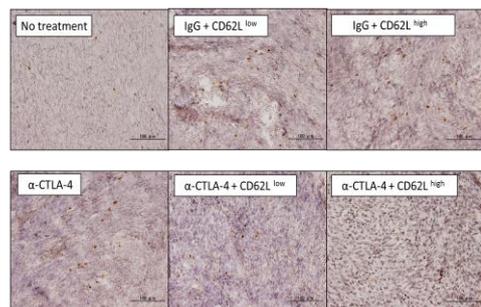
(4) 腫瘍内における浸潤リンパ球の解析
腫瘍内浸潤 CD3 陽性細胞数は治療介入したすべての群でコントロールに比し有意に増加していた。ACT と抗 CTLA-4 抗体薬の併用ではさらに増加し、CD62L^{high} 細胞投与との併用で浸潤細胞数は最も多かった (図 3A)。Foxp3 陽性細胞数については、ACT により腫瘍内浸潤数は増加したが、CD62L^{high} 細胞投与群においては、抗 CTLA-4 抗体薬の併用により低下した (図 3B)。

図 3

A Immunohistochemistry of CD3 (tumor)



B Immunohistochemistry of Foxp3 (tumor)



(5) 腫瘍内ヘルパーT 細胞分化の解析

腫瘍組織の蛋白を抽出し、Tbet, GATA-3, Foxp3 の発現をウェスタンブロッティングにて解析したところ、治療介入によって Th1 分化に關与する Tbet の発現が更新し、ACT と抗 CTLA-4 抗体薬との併用によりさらに強い発現を認めた。GATA-3 発現は、抗 CTLA-4 抗体薬によって低下し、ACT によって亢進した。Foxp3 発現は ACT により更新したが、抗 CTLA-4 抗体薬を併用するとその発現は抑制された。

(6) 臨床症例における ACT の効果予測に有用な免疫モニタリング法の検討

ACT を施行した進行膵癌患者 46 名を対象に末梢血サイトカイン産生能と生存期間についての検討を行った。ACT 介入後に多くのサイトカイン値が有意に増加した (表 1 A)。生存期間に与える影響をこれらサイトカイン産生能検査結果および患者臨床背景因子も含めて多変量解析を行うと、臨床病期、PS とともに、ACT 後に IFN γ 産生能が増加することが、生存期間と有意に関連していた (表 1B)。

表 1 A
膵癌患者における ACT 前後で末梢血サイトカイン産生能の変化

Cytokine	ACT		P-value
	Pre	Post	
IFN- α	6892 \pm 5667	5995 \pm 5517	0.5448
IFN- γ (pg/ml)	1641 \pm 2863	3096 \pm 4488	0.0304
TNF- α (pg/ml)	963.9 \pm 1046	1183 \pm 1510	0.4644
IL-2 (pg/ml)	155.0 \pm 172.1	281.4 \pm 427.6	0.0373
IL-4 (pg/ml)	8.829 \pm 11.60	19.29 \pm 29.88	0.0085
IL-5 (pg/ml)	108.2 \pm 238.7	273.6 \pm 390.7	0.0054
IL-10 (pg/ml)	99.38 \pm 118.0	110.5 \pm 102.3	0.9314
IL-12 (p70) (pg/ml)	6.151 \pm 10.74	16.01 \pm 41.53	0.1283
IL-13 (pg/ml)	443.5 \pm 559.8	1046 \pm 1574	0.0085
GM-CSF (pg/ml)	17.67 \pm 41.14	25.80 \pm 47.91	0.4967

B
生存期間に影響を与える因子 (多変量解析)

Evaluated parameters	Hazard ratio	95%CI	P value
Age (years)	0.981	0.926 to 1.040	0.526
Male sex	1.335	0.345 to 5.161	0.675
Tumor location (Ph) ^a	0.440	0.117 to 1.658	0.225
Stage ^b	3.487	1.145 to 10.615	0.028
ECOG performance status (\geq 2)	24.956	2.099 to 296.73	0.011
Prior chemotherapy ^c	1.242	0.566 to 2.727	0.588
LAK vs RIT (LAK)	0.468	0.140 to 1.565	0.218
Increase of IFN- γ secretion after ACT	0.105	0.013 to 0.850	0.035
Increase of IL-2 secretion after ACT	0.382	0.077 to 1.908	0.241
Increase of IL-4 secretion after ACT	0.502	0.074 to 3.402	0.480
Increase of IL-5 secretion after ACT	0.887	0.105 to 7.474	0.912
Increase of IL-12 secretion after ACT	0.485	0.060 to 3.953	0.499
Number of Treg at baseline (low) ^d	0.321	0.104 to 0.943	0.039
TNF- α at baseline (high) ^d	0.579	0.210 to 1.597	0.291
IL-4 at baseline (high) ^d	0.803	0.306 to 2.105	0.655

基礎的検討において、抗 CTLA-4 抗体薬は ACT の効果をさらに増強する作用があることが示され、その作用は移入する細胞の分化度によっても異なり、naïve phenotype のリンパ球を移入する方が、抗腫瘍効果はより強くなることが示された。我々は、naïve phenotype を多く含むリンパ球の拡大培養法を確立しており、今後、その特性を十分発揮できるような免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の臨床開発に本実験を発展させたいと考えている。

また、臨床における免疫モニタリング法の検

討においては、ACTの効果予測に末梢血IFN γ 産生能検査が有用である可能性が示唆された。今後、さらに臨床例において予測能の検証を行い、その有用性および問題点をあきらかにしていきたい。

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 6 件)

① Ishikawa T, Kokura S, Enoki T, et al. Phase I clinical trial of fibronectin CH296-stimulated T cell therapy in patients with advanced cancer. PLoS One. 2014 Jan 31;9(1):e83786. doi: 10.1371/journal.pone.0083786.

② Ishikawa T, Kokura S, Sakamoto N, et al. Whole blood interferon- γ levels predict the therapeutic effects of adoptive T-cell therapy in patients with advanced pancreatic cancer. Int J Cancer. 2013 Sep 1;133(5):1119-25. doi:10.1002/ijc.28117.

③ Ishikawa T, Kokura S, Sakamoto N, et al. Adoptive cellular therapy enhances the helper T cell response and reduces the number of regulatory T cells. Exp Ther Med. 2011 Jul;2(4):737-743. Epub 2011 May 12.

[学会発表] (計 10 件)

① 石川剛、足立聡子、岡山哲也、他. 未分化型Tリンパ球移入療法の抗腫瘍効果に対する抗CTLA-4抗体の増強効果について. 第26回日本バイオセラピー学会学術集会 2013年12月5日 盛岡

② 石川剛、古倉聡、坂元直行、他. 疫細胞移入療法における低分化型リンパ球移入の意義 -レトロネクチン誘導Tリンパ球療法の第I相臨床試験における解析結果からの検討- 第26回日本バイオセラピー学会学術集会 2013年12月5日 盛岡

③ 足立聡子、古倉聡、岡要、他. 皮下腫瘍モデルマウスにおける抗-CTLA-4抗体の効果について 第72回日本癌学会 2013年10月3日 横浜

④ 石川剛、古倉聡、坂元直行、他. 末梢血サイトカインプロファイルからみた肺癌患者のQOL 第49回日本癌治療学会学術集会 2011年10月28日 名古屋

⑤ Ishikawa T, Kokura S, Sakamoto N, et al. Relationship between plasma cytokine levels and physical or psychological functioning in patients with advanced cancer. The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress, 26 September 2011, Stockholm, Sweden.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 剛 (ISHIKAWA, Takeshi)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：90372846

(2) 研究分担者

古倉 聡 (KOKURA, Satoshi)
(財)ルイ・パストゥール医学研究センター・
研究員
研究者番号：80347442

足立聡子 (ADACHI, Satoko)
京都府立医科大学・医学部・研究員
研究者番号：90546615