

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592022

研究課題名(和文)NK T細胞をベースとした新規抗腫瘍エフェクター細胞の構築と膵臓癌治療への応用

研究課題名(英文)Invariant NKT cell-based effector T cell expressing a tumor reactive T cell receptor, as a possible cell medicine for pancreatic cancer

研究代表者

植村 靖史 (Uemura, Yasushi)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学部・主任研究員

研究者番号：40364781

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)：最近、癌抗原のT細胞エピトープをペプチドワクチンとして投与する臨床試験が実施されているが期待された効果が認められていないのが現状である。これを改善するために、インバリアントNKT (iNKT) 細胞に着目し、これに癌抗原特異的TCRを導入して抗腫瘍エフェクター細胞を構築した。TCR導入DN iNKT細胞は、癌抗原特異的に強力な細胞傷害活性を示した。一方、TCR導入CD4iNKT細胞は、alpha-GalCer負荷樹状細胞に対して大量のIL-12p70産生を促進し、強力な免疫賦活効果を示した。以上より、iNKT細胞をベースとした抗腫瘍エフェクター細胞は癌の免疫療法に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Currently, cancer antigen-derived T cell epitope peptide vaccines are under development and clinical trials have already been performed. Unfortunately, outcomes have been disappointing. To address these issues, we focused on invariant NKT cells that recognize alpha-GalCer presented by CD1d. We established iNKT cell-based anti-tumor effector T cells that express a tumor reactive T cell receptor (TCR). The TCR-transduced CD4-CD8- (DN) iNKT cells were excellent for tumor antigen-specific cytotoxicity. In contrast, the TCR-transduced CD4+CD8- (CD4) iNKT cells acted as a cellular adjuvant inducing robust IL-12p70 production in alpha-GalCer-loaded dendritic cells. Tumor-reactive TCR-expressing iNKT cell that exert cytotoxic activity and adjuvant activity may be a powerful tool for cancer immunotherapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：外科 膵臓癌 免疫

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は、最も予後の悪い消化器癌の一つであり、有効な治療法がなく、膵臓癌と診断された患者の生存期間は、今日でも10年前とほとんど変わっていない。また、分子標的薬の恩恵を受けている他の癌と比較して、膵臓癌患者の治療選択肢は極めて限られている為、より効果的な治療法の開発が切望されている。

癌に対する抗原特異的免疫療法は、適切な癌抗原を標的とすることで選択的に癌細胞を攻撃できるため、抗癌剤よりも副作用が少なく効果の高い治療法になる可能性を秘めている。最近、膵臓癌特異抗原由来の T 細胞エピトープを患者に投与するペプチドワクチンの臨床試験が国内外の多くの施設で行われている。ところが、癌を特異的に傷害する T 細胞を生体内で増殖させることが困難であること、癌組織における免疫抑制性の微小環境を改善できないこと等に起因して、期待された効果が認められていないのが現状である。したがって、膵臓癌に対する抗原特異的免疫療法を有効な医療技術として確立するためには、免疫賦活効果(アジュバント効果)を有するとともに、膵臓癌細胞を強力に排除しうる T 細胞を体外で増殖させて、これを生体内に投与する新たな養子免疫療法を開発することが必要不可欠である。インバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞は、均一な T 細胞抗原受容体(TCR)を発現して、CD1d 分子に提示された特定の糖脂質抗原 ( $\alpha$ -galactosylceramide:  $\alpha$ -GalCer)を認識する。iNKT 細胞には、強力な細胞傷害活性を示すサブセットと樹状細胞(DC)を賦活化する細胞アジュバントとしての機能に優れているサブセットが存在する。したがって、HLA クラス I 分子拘束性に癌抗原を認識する TCR を iNKT 細胞に発現させ、この強力な細胞傷害活性を膵臓癌細胞に向けることができれば、免疫賦活効果を発揮することで免疫抑制性の癌微小環境を改善するとともに、膵臓癌細胞の選択的排除を誘導する新たな治療法の実現に資することができる。

### 2. 研究の目的

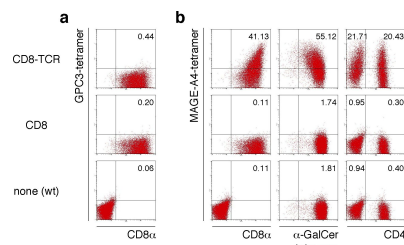
本研究課題は、膵臓癌患者の生命予後を改善するために、強力な細胞傷害活性と免疫賦活効果を発揮するヒト iNKT 細胞に、癌抗原を認識する TCR を人為的に発現させ、膵臓癌細胞を特異的に傷害する抗腫瘍エフェクター細胞を作製する。この iNKT 細胞をベースとしたエフェクター細胞の膵臓癌細胞に対する傷害活性、DC に賦与する機能的修飾、および効果的な生体内投与法を明らかにすることで、これを膵臓癌患者に投与して、免疫抑制性の癌微小環境を改善するとともに、持続的で強力な膵臓癌の排除を誘導する新たな免疫療法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト iNKT 細胞サブセットにがん抗原を特異的に認識する TCR をレトロウィルスを用いて発現させることで抗腫瘍エフェクター細胞を作製する。(1) これを iNKT 細胞本来の抗原、あるいは導入 TCR が認識する抗原を付与した DC を用いて刺激した際のサイトカイン産生性を比較検討する。次に、(2)膵臓癌細胞に示す細胞傷害活性を比較検討して膵臓癌の排除に優れた抗腫瘍エフェクター細胞を同定する。(3)抗腫瘍エフェクター細胞が DC に賦与する機能的修飾(アジュバント効果)を共培養系により明らかにし、免疫抑制性の癌微小環境を改善しうるかを検討する。

### 4. 研究成果

(1)がん抗原特異的TCRを発現するiNKT細胞の作製

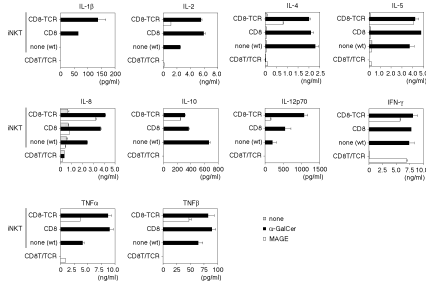


(図 1)

MAGE-A4 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)クローンの TCR $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、および CD8 $\alpha$ / $\beta$ 鎖をレトロウィルスを使用して iNKT 細胞に導入した。コントロールとして CD8 $\alpha$ / $\beta$ 鎖のみを導入したものを作製した。導入した TCR を発現する iNKT 細胞は、

MAGE-A4 テトラマー、 $\alpha$ -GalCer テトラマー共陽性であり、内因性の TCR を保持することが明らかとなった(図 1)。また、iNKT 細胞の 2 つの代表的なサブセット (CD4+CD8 $\beta$ -: CD4 と CD4-CD8 $\beta$ -: DN)の両方に TCR が導入されることを確認した。

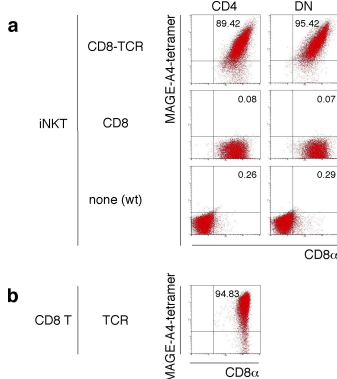
(2) TCR 導入 iNKT 細胞のサイトカイン産生  
TCR 導入 iNKT 細胞と DC を共培養した際の培養上清中のサイトカインをマルチプレックスアッセイで評価した(図 2)。



(図 2)

TCR 導入 iNKT 細胞と $\alpha$ -GalCer 負荷 DC を共培養した場合は、野生型 iNKT 細胞を用いた場合に比較して、IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ の産生が高かった(図 2)。一方、IL-4, IL-5, IL-10 の産生は低かった。MAGE-A4 ペプチド負荷した DC を用いた場合は、TCR 導入 iNKT 細胞との共培養でいくつかのサイトカイン産生上昇が認められた。産生上昇が認められたのは、IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ であった。一方、野生型 iNKT 細胞との共培養ではサイトカインの上昇は認められなかった。

(3) TCR 導入 iNKT 細胞サブセットの分離

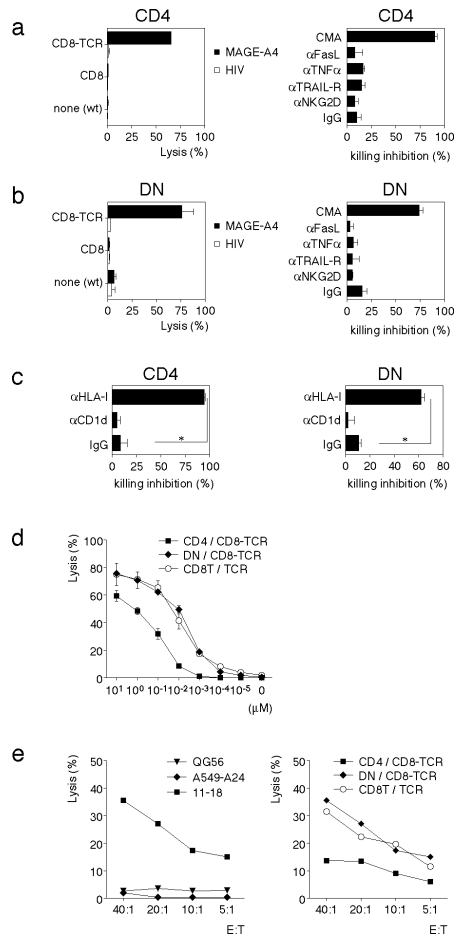


(図 3)

iNKT 細胞には機能的に異なる 2 つの代表的な

サブセットが存在する。TCR 導入した 2 つのサブセットを高速自動セルソーターを使用して分離した(図 3)。

(4) TCR 導入 iNKT 細胞サブセットの細胞傷害活性

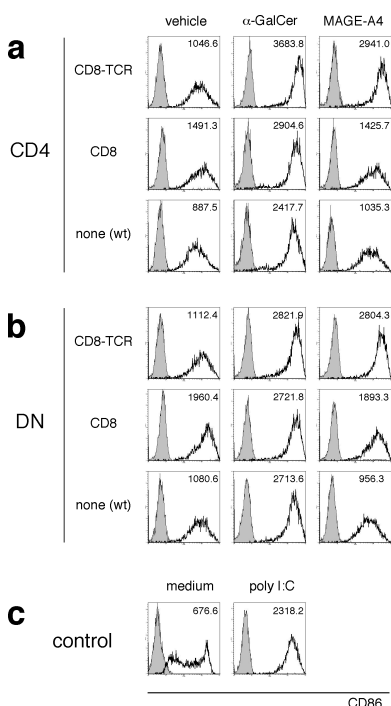


(図 4)

TCR 導入 iNKT 細胞サブセットをエフェクター細胞、T2-A24 をターゲット細胞として細胞傷害性試験を行った(図 4a,b)。TCR 導入した 2 つの iNKT 細胞サブセットは共に MAGE-A4 ペプチド負荷した T2-A24 陽性細胞を傷害した。この傷害活性は、コンカナマイシン A で阻害されたことからパーフォリン依存性の傷害活性であることが示唆された。TCR 導入 iNKT 細胞はがん抗原 (MAGE-A4) を内因性に発現し、HLA-A24 陽性である肺癌細胞株 11-18 に対して細胞傷害性を示した(図 4e)。しかし、MAGE-A4 あるいは HLA-A24 のどちらかを発現しない肺癌細胞株には反応を示さなかった。この傷害活性は、抗 HLA-I 抗体に阻害され、抗 CD1d 抗体では阻害

されないことから HLA-I 拘束性の反応であることが示唆された。特に DN サブセットをベースとしたものは細胞傷害活性が強く、CD4 サブセットをベースとしたものでは傷害活性が弱かった(図4e)。そこで、MAGE-A4 ペプチドを段階希釈して細胞傷害活性を評価したところ(ターゲット: T2-A24)、DN サブセットをベースとしたものは末梢血 CD8T 細胞をベースとしたものと同等の傷害活性を示したが、CD4 サブセットをベースとしたものは著しく傷害活性が低かった(図4d)。

#### (5) DC 成熟の評価



(図5)

DC にα-GalCer あるいは MAGE-A4 ペプチドを負荷して TCR 導入 iNKT 細胞と共培養を行い DC の成熟状態を CD86 発現で評価した(図5)。その結果、TCR 導入 iNKT 細胞は、CD4 サブセットおよび DN サブセット共に、α-GalCer あるいは MAGE-A4 を負荷した DC の CD86 発現を上昇させ、DC の成熟を誘導することが明らかとなった(図5)。

#### (6) DC における IL-12p70 産生

TCR 導入 iNKT 細胞と DC を共培養し、DC から産生される IL-12p70 を評価した。その結果、α-GalCer 負荷 DC との共培養において、CD4 サブセットをベースとした TCR 導入 iNKT 細胞を

用いた場合には、野生型のものより顕著な IL-12p70 産生が認められた。しかしながら、DN サブセットをベースとしたものを用いた場合には、IL-12p70 は検出されなかった。MAGE-A4 ペプチド負荷 DC との共培養においては、TCR 導入、野生型を問わず、CD4 サブセット、DN サブセットいずれを用いた場合にも IL-12p70 産生は検出されなかった。以上より、がん抗原特異的 TCR を導入した DN iNKT 細胞は、がん抗原特異的にがんを傷害するエフェクター細胞として優れる。一方、TCR 導入 CD4 iNKT 細胞は、DC の IL-12p70 産生を顕著に上昇させる細胞アジュバントとして優れることが明らかになった。iNKT 細胞をベースとした抗腫瘍エフェクター細胞は、がんに対する傷害活性を示すばかりではなく、免疫賦活効果を発揮して、がんの免疫抑制機構を解除しうするため、持続的ながんの排除を誘導すると考えられる。

#### 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5件)

1. Kimura, T., Kohno, H., Matsuoka, Y., Murakami, M., Nakatsuka, R., Hase, M., Yasuda, K., Uemura, Y., Sasaki, Y., Fukunaga, S., and Sonoda, Y. CXCL8 enhances the angiogenic activity of umbilical cord blood-derived outgrowth endothelial cells *in vitro* **Cell Biol. Int.** **35: 201-208, 2011.** doi: 10.1042/CBI20090225.
2. Matsuoka Y., Sasaki Y., Nakatsuka R., Takahashi M., Iwaki R., Uemura Y., and Sonoda Y. The low level of c-kit expression marks deeply quiescent murine hematopoietic stem cells **Stem Cells.** **29: 1783-1791, 2011.** doi: 10.1002/stem.721.
3. Nishio N., Fujita M., Tanaka Y., Maki H., Zhang R, Hirotsawa T., Demachi-Okamura A., Uemura Y., Taguchi O., Takahashi Y., Kojima S., Kuzushima K. Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytotoxicity mediated by human  $\gamma\delta$  T cells **J. Immunother.** **35: 598-606, 2012**
4. Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Gotoh H, Zhu D, Nakayama K, Iriguchi S, Uemura Y.

- Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 12: 114-126, 2013  
doi: 10.1016/j.stem.2012.11.002.
5. Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirose T, Maki H, Fujita M, Uemura Y, Akatsuka Y, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, Kuzushima K. An HLA-modified ovarian cancer cell line induced CTL responses specific to an epitope derived from claudin-1 presented by HLA-A\*24:02 molecules. *Hum Immunol*. 74: 1103-1110, 2013  
doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.030. Epub 2013 Jun 24.
- [学会発表](計14件)
1. 近藤紳司, 岡村文子, 牧寛之, Zhang Rong, 植村靖史, 藤田貢, 山本英子, 柴田清住, 吉川史隆, 葛島清隆  
内因性 HLA の発現を抑制し目的の HLA-A24 を発現する人工抗原提示細胞を用いた卵巣癌を傷害する CTL の誘導  
第 15 回日本がん免疫学会総会(大阪府豊中市) 2011 年 6 月 30 日-7 月 1 日
  2. 近藤紳司, 岡村文子, 牧寛之, Zhang Rong, 植村靖史, 藤田貢, 山本英子, 柴田清住, 吉川史隆, 葛島清隆  
内因性 HLA の発現を抑制し目的の HLA-A24 を発現する人工抗原提示細胞を用いた卵巣がんを傷害する CTL の誘導  
第 70 回日本癌学会学術総会(愛知県名古屋) 2011 年 10 月 3 日-10 月 5 日
  3. 松岡由和, 高橋雅也, 岩城隆二, 佐々木豊, 中塚隆介, 河野比良夫, 植村靖史, 井上雅美, 小川啓恭, 高橋隆幸, 石川淳, 日野雅之, 園田精昭  
ヒト造血幹細胞支持能を有するヒト骨髓由来間葉系幹細胞の予期的分離  
第 34 回日本造血細胞移植学会総会(大阪市) 2012 年 2 月 24 日~25 日
  4. 植村靖史  
ヒトインバリアント NKT 細胞を用いた
- がん免疫療法の可能性(教育講演)  
第 34 回日本造血細胞移植学会総会(大阪) 2012 年 2 月 24~25 日
5. 中塚隆介, 植村靖史, 園田精昭  
FACS により予期的に分離されたマウス Sca-1, PDGFR 陽性骨髓幹細胞は同一の表面免疫特性を持つ骨髓由来間葉系幹細胞とは異なる幹細胞特性を有する  
第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会(奥羽大学記念講堂) 2012 年 9 月 14 日~16 日
  6. 宮坂智充, 青柳哲史, 内山美寧, 國島広之, 賀来満夫, 中山俊憲, 植村靖史, 大石和徳, 金城雄樹, 宮崎義継, 川上和義  
23 価肺炎球菌ワクチン接種後の抗体産生における NKT 細胞の役割に関する臨床免疫学的検討  
第 16 回日本ワクチン学会学術集会(横浜市) 2012 年 11 月 17 日~18 日
  7. Yasushi Uemura, Junichi Mineno, Hiroaki Ikeda, Tianyi Liu, Hiroyuki Maki, Shinji Kondo, Rong Zhang, Ayako Okamura, Mitsugu Fujita, Yoshiki Akatsuka, Yoshiaki Sonoda, Hiroshi Shiku, and Kiyotaka Kuzushima.  
Tumor-reactive TCR gene-transduced invariant NKT cells as a possible tool for cancer immunotherapy.  
第 71 回日本癌学会学術総会(札幌市) 2012 年 9 月 19 日~21 日
  8. Motoharu Suzuki, Tianyi Liu, Narumi Hirose, Yayoi Nobori, Ayako Okamura, Yasushi Sakamoto, Kiyotaka Kuzushima, and Yasushi Uemura.  
Modification of IL-12p70/Osteopontin balance in dendritic cells by ligand activation of invariant NKT cells.  
第 71 回日本癌学会学術総会(札幌市) 2012 年 9 月 19 日~21 日

9. Rong Zhang, Tianyi Liu, Motoharu Suzuki, Narumi Hirosawa, Shin Kaneko, Ayako Okamura, Yasushi Sakamoto, Kiyotaka Kuzushima, and Yasushi Uemura  
Regulation of IL-27/Osteopontin balance in dendritic cells by ligand activation of invariant NKT cells.  
第 41 回日本免疫学会学術集会(神戸市)  
2012 年 12 月 5 日～7 日
10. Narumi Hirosawa, Takeshi Sakamoto, Yasushi Uemura, Yuko Suzuki, Yasushi Sakamoto  
Investigation on toxic effects of organophosphate pesticide to endocrine organs related to reproductive system, and identification of target molecules of the chemicals in these organs.  
第 85 回日本生化学会大会(福岡市)  
2012 年 12 月 14 日～16 日
11. 西尾信博, 藤田貢, 田中義正, 牧寛之, 張エイ, 岡村文子, 植村靖史, 田口修, 高橋義行, 小島勢二, 葛島清隆.  
Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytolysis mediated by human gamma-delta T cells. 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 2012, (金沢), [口演]
12. 張エイ, 劉天懿, 千住覚, 廣澤成美, 辻村邦夫, 中西速夫, 園田精昭, 坂本安, 西村泰治, 葛島清隆, 植村靖史  
多能性幹細胞由来の増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法の開発  
第 72 回日本癌学会学術総会(横浜市)  
2013 年 10 月 3 日～5 日
13. 牧寛之, 植村靖史, 張エイ, 竹田和由, 劉天懿, 鈴木元晴, 都築忍, 岡村文子, 赤塚美樹, 西村泰治, 千住覚, 葛島清隆  
TRAIL を発現する多能性幹細胞由来ミエロイド細胞を用いた細胞医薬の開発

第 72 回日本癌学会学術総会(横浜市)  
2013 年 10 月 3 日～5 日

14. Hiroyuki Maki, Yasushi Uemura, Rong Zhang, Tianyi Liu, Motoharu Suzuki, Narumi Hirosawa, Kazuyoshi Takeda, Yasushi Sakamoto, Satoru Senju, Kiyotaka Kuzushima  
Pluripotent stem cell-derived myeloid cells expressing TRAIL as a possible cell medicine for cancer.

第 42 回日本免疫学会学術集会(千葉市)  
2013 年 12 月 11 日～13 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/index.html>

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
植村 靖史 (UEMURA YASUSHI)  
愛知県がんセンター研究所・主任研究員  
研究者番号：4 0 3 6 4 7 8 1

- (2) 研究分担者  
( )  
研究者番号：

#### (3) 連携研究者

葛島 清隆 (KUZUSHIMA KIYOTAKA)  
愛知県がんセンター研究所・部長  
研究者番号：3 0 3 1 1 4 4 2

千住 覚 (SENJU SATORU)  
熊本大学医学薬学研究部・准教授  
研究者番号：5 0 2 7 4 7 0 9

岡村 文子 (OKAMURA AYAKO)  
愛知県がんセンター研究所・研究員  
研究者番号：1 0 5 4 6 9 4 8