

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659489

研究課題名（和文） 可溶性T細胞レセプター修飾分子を用いた革新的がん治療法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel cancer therapy using soluble T-cell receptor

研究代表者

安川 正貴（Yasukawa Masaki）

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60127917

研究成果の概要（和文）：

近年、腫瘍特異的T細胞レセプター（TCR）遺伝子導入による悪性腫瘍に対する新規遺伝子治療が注目されている。さらに、TCR 遺伝子産物を可溶化し、様々な修飾を加えて、がんの治療や免疫療法感受性の予測などに応用しようとする試みが始まろうとしている。本研究では、その基礎研究として、我々が樹立した WT1, hTERT および Aurora-A kinase 特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL クローン）から TCR 遺伝子を単離し、末梢血 T 細胞に遺伝子導入して作製した人工 CTL の様々な抗腫瘍効果を検討した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we attempted to establish a novel immunotherapy for cancer using tumor antigen-specific soluble T-cell receptor (TCR). The data obtained from the series of experiments are follows. 1) WT1, hTERT, and Aurora-A kinase-derived peptide-specific cytotoxic T cell (CTL) clones were established. 2) TCR genes were isolated from these CTL clones. 3) A novel retrovirus vector expressing TCR genes and inhibiting expression of endogenous TCR has been developed. 4) WT1-specific hTERT-specific, and Aurora-A kinase-specific TCR gene-transduced T cells showed antigen-specific cytotoxicity and exerted anti-leukemia effects in vitro and in vivo. Now, we are attempting to produce WT1-specific soluble TCR molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：免疫療法、遺伝子治療、細胞傷害性T細胞、T細胞レセプター、白血病

1. 研究開始当初の背景

現在開発されつつあるがんワクチンは、がん特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）の体内誘導を主な目的としている。CTL はその細胞表面に発現されている T 細胞受容体（TCR）によって、がん細胞表面の HLA とがん特異的抗原由来ペプチドとの複合体を特異的に認識して排除する。そこで、がん特異的 TCR 遺伝

子を末梢血 T 細胞に遺伝子導入して、人工 CTL を作製し、その養子免疫による新規免疫遺伝子治療の開発が進んでいる。

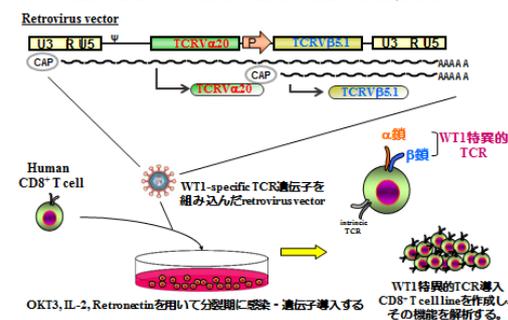
CTL を用いた養子免疫療法を主体とする細胞免疫療法は、CTL の標的となるがん抗原由来ペプチドと HLA との複合体（HLA/ペプチド複合体）ががん細胞表面に十分量発現されていることを前提としている。しかし、その評

価方法は、mRNA の半定量的 PCR 法や、免疫染色を用いた間接的評価であり、HLA/ペプチド複合体を直接評価しているのではない。これが、がん免疫療法の臨床的効果の不安定さに深く関わっていると考えられるが、HLA/ペプチド複合体を直接定量出来る方法は、未だ確立されていない。我々は、これまで数々のがん抗原ペプチドの同定を行い、その抗原特異的 CTL クローンを樹立してきた実績を持つ。さらに、その CTL クローンから単離した TCR 遺伝子を導入した人工 CTL の臨床応用の可能性を報告した。現在、がん特異的 TCR を用いた免疫遺伝子治療の臨床研究計画が進行している。本研究では、この TCR 遺伝子・・・鎖タンパク質二量体分子を溶液中で安定的に結合させた、モノクローナル抗体様構造である可溶性 TCR 分子を作成して、がん細胞表面の HLA/ペプチド複合体を直接標識する方法を確立し、その定量的評価や新規治療法への応用を目指す斬新的発想に至った。

2. 研究の目的

我々がこれまでに樹立した、がん関連抗原を特異的に認識する CTL クローンから TCR 遺伝子を単離し、その発現ベクターを構築する。さらに、TCR 遺伝子導入 T 細胞の様々な機能を解析する。最終的に、TCR 遺伝子産物を合成し、可溶性 TCR を作製することを目的とした。今回は、一連の研究の初期段階として、TCR 遺伝子の単離と発現ベクターの構築、さらにはその遺伝子発現 T 細胞の機能解析を遂行した。

WT1特異的CTLクローン由来TCRを組み込んだ Retrovirus vectorとヒトCD8⁺T cellへの遺伝子導入



3. 研究の方法

(1) がんおよび白血病特異的 CTL クローン樹立：すでに報告した方法によって、WT1, hTERT および Aurora-A kinase 由来ペプチド特異的 HLA 拘束性 CTL クローンを樹立した。
 (2) TCR 遺伝子クローニングおよび発現ベクター構築：これら CTL クローンから完全長 TCR- α および TCR- β 鎖 cDNA を単離した。さらに、タカラバイオ株式会社との共同研究によって、内在性 TCR 発現を抑制する (si-TCR) WT1-TCR, hTERT-TCR および Aurora-A-TCR 発

現レトロウイルスベクターを構築した。

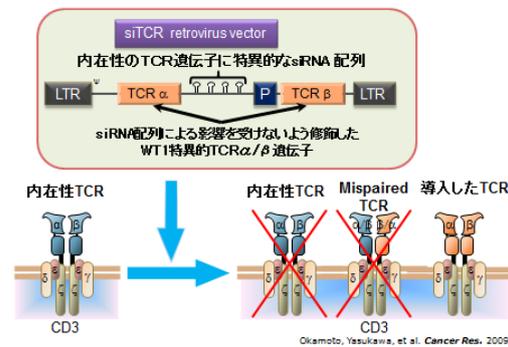
(3) In vitro T 細胞機能解析：まず、TCR 遺伝子導入による HLA 拘束性ペプチド特異性の獲得を、テトラマー解析ならびに ⁵¹Cr 放出細胞傷害試験で確認した。次に、腫瘍細胞に対する細胞傷害性を同様に確認した。他方、ケモカインレセプター遺伝子導入による機能獲得を、対応ケモカインによるケモタキシスならびに発光システムによる in vivo モデルで解析した。

(4) 遺伝子導入 T 細胞移入効果判定：まず、コントロール CTL, TCR 遺伝子単独導入 CTL、および TCR とケモカインレセプター遺伝子同時導入 CTL の抗腫瘍効果を in vitro で検討した。さらに、腫瘍細胞移植マウスにこれらの CTL を移入し、腫瘍への集積と抗腫瘍効果を in vivo で検討した。

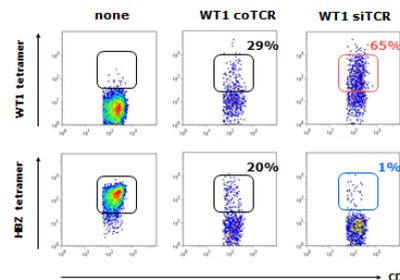
4. 研究成果

(1) 新規レトロウイルスベクターの構築
 我々は、タカラバイオ株式会社との共同研究で、内在性 TCR 発現を抑制し、発現させたい TCR のみを選択的に発現できる新規レトロウイルスベクターを構築した。このベクターを用いることで、目的とすべき TCR 発現効率が向上し、内在性 TCR ならびにミスペアリング TCR の発現を抑制できることが示された。

内在性TCR発現を抑制するレトロウイルスベクターの開発
 タカラバイオ株式会社との共同研究



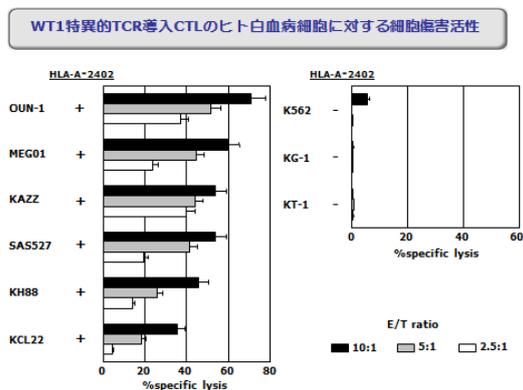
si-TCRベクターによってWT1 TCRの発現効率の改善と mispairingの回避が可能になる



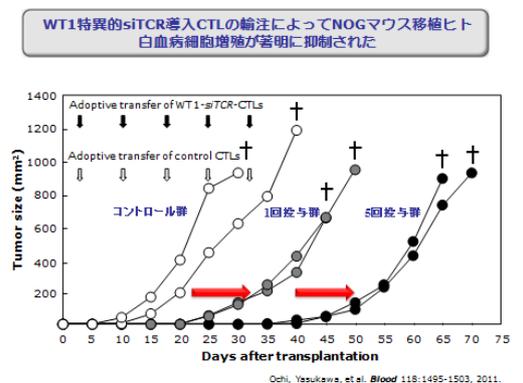
(2) TCR 遺伝子導入 T 細胞の抗原特異性の獲得

WT1-TCR, hTERT-TCR および Aurora-A-TCR 発現人工 CTL の抗原特性を検討したところ、

親 CTL クローン同様に、WT1, hTERT および Aurora-A ペプチド特異的 HLA 拘束性の細胞傷害活性を示した。



(3) TCR 遺伝子導入 T 細胞の抗白血病効果
HLA-A24 陽性 WT1 発現ヒト白血病細胞を NOG マウスに移植後、コントロール CD8 陽性 T 細胞 (コントロール CTL) または WT1-TCR 遺伝子導入人工 CTL を移入した。その後、マウスの生存率、ならびにヒト白血病細胞のマウス体内での増殖を経時的に観察した。その結果、WT1-TCR 遺伝子導入 CTL を移入した場合のみ、明らかな白血病細胞の増殖抑制とマウスの生存期間延長が認められた。



以上のことから、がん特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた養免疫療法は、安全で効率的ながん治療法となることが示された。現在、我々が単離した TCR 遺伝子を用いて、TCR タンパク質の合成を試みており、可溶性 TCR による新規治療法の開発も遂行している。

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 16 件)

1. Iwami K, Natsume A, Ohno M, Ikeda H, Mineno J, Nukaya I, Okamoto S, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Wakabayashi T.

Adoptive transfer of genetically modified Wilms' tumor 1-specific T cells in a novel malignant skull base meningioma model. *Neuro Oncol.* 2013 Mar 3. [Epub ahead of print] 査読有

2. Asai H, Fujiwara H, An J, Ochi T, Miyazaki Y, Nagai K, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Inoue H, Yasukawa M. Co-introduced functional CCR2 potentiates in vivo anti-lung cancer functionality mediated by T cells double gene-modified to express WT1-specific T-cell receptor. *PLoS One* 8:e56820, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0056820 査読有

3. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Hayashi T, Yasukawa M. Novel causative and neutral mutations in a patient with protein C deficiency. *Thromb Res.* 2013 Feb 7. [Epub ahead of print] doi:pri: S0049-3848(13)00026-1. 10.1016/j.thromres.2013.01.021. 査読有

4. Okamoto S, Amaishi Y, Goto Y, Ikeda H, Fujiwara H, Kuzushima K, Yasukawa M, Shiku H, Mineno J. A promising vector for TCR gene therapy: differential effect of siRNA, 2A peptide, and disulfide bond on the introduced TCR expression. *Mol Ther Nucleic Acids.* 18:1:e63, 2012. doi: 10.1038/mtna.2012.52. 査読有

5. Kanda, T., Ochi, T., Fujiwara, H., Yasukawa, M., Okamoto, S., Mineno, J., Kuzushima, K. and Tsurumi, T. HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther.* 19:566-571, 2012. doi: 10.1038/cgt.2012.34. 査読有

6. Shikata, H., Yakushijin, Y., Matsushita, N., Sakai, A., Sugita, A., Nakamura, N., Yamanouchi, J., Azuma, T., Hato, T. and Yasukawa, M.: The role of activation-induced cytidine deaminase (AID/AICDA) in the progression of follicular lymphoma. *Cancer Sci.* 103:415-421, 2012. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02186.x. 査読有

7. Nagai, K., Ochi, T., Fujiwara, H., An, J., Shirakata, T., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., Melenhorst, J. J., Gostic, E., Price, D. A., Ishii, E. and

- Yasukawa, M.: Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T-lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity. *Blood* 119:368-376, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-06-360354. 査読有
8. Hasegawa, H., Lei, J., Matsumoto, T., Onishi, S., Suemori, K. and Yasukawa, M.: Lysophosphatidylcholine enhances the suppressive function of human naturally occurring regulatory T cells through TGF- β production. *Biochem Biophys Res Commun.* 415:526-531, 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.119. 査読有
9. Yamanouchi, J., Hato, T., Niiya, T., Miyoshi, K., Azuma, T., Sakai, I. and Yasukawa, M.: A new four-way variant t(5;17;15;20)(q33;q12;q22;q11.2) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol.* 94:395-398, 2011. doi: 10.1007/s12185-011-0929-1. 査読有
10. Ochi, T., Fujiwara, H. and Yasukawa, M.: Requisite considerations for successful adoptive immunotherapy with engineered T lymphocytes using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11:699-713, 2011. doi: 10.1517/14712598.2011.566853. 査読有
11. Ochi, T., Fujiwara, H., Okamoto, S., An, J., Nagai, K., Shirakata, T., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H. and Yasukawa, M.: Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked anti-leukemia reactivity and safety. *Blood* 118:1495-1503, 2011. doi: 10.1182/blood-2011-02-337089. 査読有
12. Takahara, A., Koido, S., Ito, M., Nagasaki, E., Sagawa, Y., Iwamoto, T., Komita, H., Ochi, T., Fujiwara, H., Yasukawa, M., Mineno, J., Shiku, H., Nishida, S., Sugiyama, H., Tajiri, H. and Homma, S.: Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol. Immunother.* 60:1289-1297, 2011. doi: 10.1007/s00262-011-1033-3. 査読有
13. Nagai, K., Fujiwara, H., Ochi, T., Okamoto, S., Mineno, J., Shiku, H., Koh, K., Sugita, K., Ishii, E. and Yasukawa, M.: Feasibility of gene-immunotherapy using WT1-specific T-cell receptor gene transfer for infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangement. *Blood Cancer J.* 1:e10, 2011. doi: 10.1038/bcj.2011.8. 査読有
14. Yasukawa, M., Ochi, T., and Fujiwara, H.: Adoptive T-cell immunotherapy using T-cell receptor gene transfer: aiming at a cure for cancer. *Immunotherapy* 3:135-140, 2011. doi: 10.2217/imt.10.103. 査読有
15. Yamanouchi, J., Hato, T., Niiya, T., Nakagawa, K., Kumon, Y., Fujiwara, H., Yakushijin, Y. and Yasukawa, M.: Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation assay for platelet response to cilostazol. *Platelets* 22:135-142, 2011. doi: 10.3109/09537104.2010.525976. 査読有
16. An, J., Fujiwara, H., Suemori, K., Niiya, T., Azuma, T., Tanimoto, K., Ochi, T., Akatsuka, Y., Mineno, J., Ozawa, H., Ishikawa, F., Kuzushima, K. and Yasukawa, M.: Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int. J. Hematol.* 93:176-185, 2011. doi: 10.1007/s12185-010-0758-7. 査読有

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.m.ed1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安川 正貴 (Yasukawa Masaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60127917