

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390300

研究課題名(和文) 生体内機能的T細胞の運命決定因子の解明とそのT細胞レセプター改変細胞療法への応用

研究課題名(英文) Identification of factors that determine the fate of functional T cells in vivo and development of effective TCR gene-modified T cell therapy

研究代表者

池田 裕明 (IKEDA, Hiroaki)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40374673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：CD28刺激は短命で強い細胞傷害性のT細胞を、VLA-4/5を介した刺激はメモリー形成能が高く再刺激時マルチファンクション性が高いIT細胞を生成することを示した。食道癌に対するMAGE-A4特異的TCR遺伝子導入T細胞輸注療法の第1層臨床試験で、リンパ球減少性前処置を施さない場合、輸注細胞の長期血中存在と臨床効果は比例しないことを見出した。内因性TCR発現を抑制する独自開発ベクターを用い、非自己のリンパ球による細胞療法においてGvHD発症を抑えつつ腫瘍特異性を付与する技術を確立した。細胞内抗原由来ペプチドとHLAの複合体を認識する抗体を取得し、これを用いたキメラ抗原受容体の有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：We found that CD28 stimuli induced short-lived but highly cytotoxic T cells whereas VLA-4/5 stimuli induced T cells with memory formation potential and high multifunctionality upon recall. We performed a phase I clinical trial with T cells with genetically engineered to express MAGE-A4-specific TCR for esophageal cancer patients. In this trial, we found that the long-term existence of the infused cells did not correlate with the clinical response when the patients did not receive lympho-depletive pre-treatment. Utilizing an original retroviral vector that inhibits the expression of endogenous TCR, we demonstrated a model of adoptive therapy with allogeneic T cells that induce less GvHD and increased tumor reactivity. We generated an antibody that reacted to the complex of HLA and a peptide from intracellular antigen and showed the usefulness of a chimeric antigen receptor that utilize this antibody.

研究分野：腫瘍免疫、細胞療法、遺伝子治療

キーワード：T細胞 マルチファンクション性 T細胞輸注療法 遺伝子治療 癌 免疫記憶 T細胞受容体 キメラ抗原受容体

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍特異的 T 細胞の輸注療法は米国 NCI のグループが進行期悪性黒色腫や滑膜肉腫を対象に著明な有効性を示し、大きく期待されている (Rosenberg, *Nat Rev Cancer* 2008)。しかしながら、腫瘍特異的 T 細胞輸注療法はその技術的困難さもあり、コントロールされた研究として実施している施設は世界的にも非常に限られており、我国では申請者らのグループ以外にない。

T 細胞輸注療法の成否は輸注 T 細胞の生体内における生存性、機能発現により規定されることが知られる (Gattinoni, *Nat Med* 2011)。分離/調製可能な腫瘍特異的 T 細胞は数が限られており、輸注する場合には体外における培養、増殖が不可欠である。しかし、体外の培養、増殖の過程で T 細胞が生体内生存性/機能性を失うことが本治療法の大きな障害となっており (Gattinoni, *Nat Rev Immunol* 2006)、有効性の向上には T 細胞の生体内運命決定因子解明が必須である。

T 細胞の生体内分化、運命にかかわる因子については、抗原刺激、共刺激分子、液性因子、それらの細胞内シグナルに関して精力的に研究されている領域ではあるが、いまだ多くが不明のままである (Seder, *Nat Rev Immunol* 2008)。特にその制御法の輸注療法への応用は今後の重要な課題である (Gattinoni, *Sci Transl Med* 2009)。

### 2. 研究の目的

腫瘍特異的な T 細胞輸注療法は新規治療法として期待されている。申請者らは腫瘍特異的 T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子を導入した患者リンパ球による新規 T 細胞療法臨床試験を開始した世界的にも先導的なグループである。輸注療法の効果は、輸注 T 細胞の体内生存性/機能性の不十分さに制限されており、有効性の向上には機能的 T 細胞の体内運命決定因子の解明が必須である。

本研究では申請者らが T 細胞の体内運命評価の優れたバイオマーカーとして見出したマルチファンクショナル性を指標とし、近年 T 細胞の質と運命に関わる因子として発見した分子群の情報を発展させ、接着関連分子と液性因子刺激の細胞内シグナルと T 細胞運命への関与を解析する。これにより特異的 T 細胞の体内運命決定因子を解明し、その制御による効果的な TCR 改変 T 細胞療法開発を行う。

### 3. 研究の方法

(1) インテグリンファミリーを始め細胞間と細胞-マトリックス間接着に関連する分子群からのシグナルをマウス T 細胞に与え、マルチファンクショナル性、フェノタイプ、機能、遊走性、遺伝子群発現への影響を、T 細胞の体外調製時と、輸注後の生体内において解析。輸注後長期生存性を含めた体内運命と抗腫瘍効果の関連につき、腫瘍特異的 TCR Tg マウスを用い解析する。

共通ガンマ鎖サイトカインを中心に液性因子からのシグナルを T 細胞に与え、同様に解析する。

(2) T 細胞を負に制御する分子群、特に IDO の反応性エレメントと共抑制分子につき特異的 siRNA を搭載したレトロウイルスベクターを用いた T 細胞の質の制御を検討。レトロウイルスによる遺伝子導入マウスモデルを用いて、遺伝子改変 T 細胞の生体内評価を行う。

(3) 上記で得られた結果につき、ヒト T 細胞における検証を NOG マウスを用いて行う。

(4) 遺伝子改変 T 細胞輸注療法の医師主導治験の実施を進め、ヒトに投与された T 細胞の運命を解析する。

(5) 非自己 T 細胞を用いた T 細胞輸注療法の開発、ファージディスプレイライブラリーを用いた新規腫瘍特異的抗体の取得を進め、新規の有効な T 細胞輸注療法を開発する。

### 4. 研究成果

(1) CD28 刺激は短命で強い細胞傷害性の T 細胞を、VLA-4/5 を介した刺激はメモリー形成能が高く再刺激時マルチファンクショナル性が高い T 細胞を生成することを示した。

(2) 食道癌に対する MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法の第 1 層臨床試験で、リンパ球減少性前処置を施さない場合、輸注細胞の長期血中存在と臨床効果は比例しないことを見出した。

(3) 内因性 TCR 発現を抑制する独自開発ベクターを用い、非自己のリンパ球による細胞療法において GvHD 発症を抑えつつ腫瘍特異性を付与する技術を確立した。

(4) ファージディスプレイライブラリー法を用い、細胞内抗原由来ペプチドと HLA の複合体を認識する抗体を取得し、これを用いたキメラ抗原受容体の有効性を示した。

### 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 11 件)

. Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H. Adoptive transfer of MAGE-A4 T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with recurrent esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 21(10):2268-2277, 2015.

- DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-1559  
査読有り
- . Ishihara M, Seo N, Mitsui J, Muraoka D, Tanaka M, Mineno J, Ikeda H, Shiku H. Systemic CD8+ T Cell-Mediated Tumorcidal Effects by Intratumoral Treatment of Oncolytic Herpes Simplex Virus with the Agonistic Monoclonal Antibody for Murine Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor. **PLoS One**. 9(8):e104669. 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0104669 査読有り
  - . O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Gross E, Tran M, Mayfield SP, Ikeda H, Bui JD. Interleukin-17D mediates tumor rejection through recruitment of natural killer cells. **Cell Rep**. 7(4):989-998, 2014. DOI:10.1016/j.celrep.2014.03.073 査読有り
  - . Hosoi H, Ikeda H, Imai N, Amaike C, Wang L, Orito Y, Yamane M, Ueno H, Ideno M, Nukaya I, Enoki T, Mineno J, Takesako K, Hirano S, Shiku H. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8+ T cells. **Eur J Immunol**. 44:1727-1758, 2014. DOI:10.1002/eji.201343969 査読有り
  - . Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific T lymphocytes does not induce renal injury. **J Hematol Oncol**. 7:3, 2014. DOI:10.1186/1756-8722-7-3 査読有り
  - . Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino S, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osako M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, Doki Y, Shiku H. Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients. **J Transl. Med.**, 11:246, 2013. DOI:10.1186/1479-5876-11-246 査読有り
  - . 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-Oncology**. 15(6):747-758. 2013. DOI:10.1093/neuonc/not007 査読有り
  - . Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y. Limited expression of cancer-testis antigen in renal cell carcinoma patients. **Mol. Clin. Oncol**. 1: 326-330, 2013. 査読有り
  - . 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** 1:e63, 2012. DOI:10.1038/mtna.2012.52 査読有り
  - . Ikeda H. Gene-modified lymphocytes: from caution to promise for effective cancer immunotherapy. **Immunotherapy** 4(3): 241-244, 2012. DOI:10.2217/imt.12.1 査読有り
  - . Noguchi T, Kato T, Wang L, Maeda Y, Ikeda H, Sato E, Knuth A, Gnjatich S, Ritter G, Sakaguchi S, Old LJ, Shiku H, Nishikawa H. Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy. **Cancer Res**. 72(7):1672-1682, 2012. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-3072 査読有り
- [学会発表](計29件)  
) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Isao Tawara, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Naoyuki Katayama, Hiroshi Shiku. Tumor-specific TCR-engineered donor lymphocyte infusion therapy with reduced GVHD induction utilizing novel

retrovirus vector silencing endogenous TCR expression. American Society of Hematology 56<sup>th</sup> annual meeting, SF(USA), 2014/12/8.

) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Tumor-specific donor Lymphocyte infusion therapy with allogeneic T cells utilizing novel retrovirus vector silencing endogenous TCR expression. Society for immunotherapy of Cancer 29<sup>th</sup> Annual Meeting. National Harbor (USA), 2014/12/8.

) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会 東京慈恵会医科大学 (東京) 2014/8/8.

) Yasushi Akahori, Motohiro Yoneyama, Hiroaki Ikeda, Yuki Orito, Yoshihiro Miyahara, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Development of chimeric antigen receptor immunotherapy targeting intracellular WT1 gene product. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会 京慈恵会医科大学 (東京) 2014/8/8.

) Hiroaki Ueno, Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Development of TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第18回日本がん免疫学会総会 ひめぎんホール (松山市) 2014/7/4.

) Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Makiko Yamane, Sachiko Okamoto,

Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第42回日本免疫学会学術集会 幕張メッセ (千葉市) 2013/12/12.

) 池田裕明 遺伝子改変T細胞輸注療法のトランスレショナルリサーチ 第41回日本臨床免疫学会総会 海峡メッセ下関 (下関市) 2013/11/29.

) Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Naoko Imai, Yoshihiro Miyahara, Mikiya Ishihara, Naoyuki Kataya, Hirofumi Yosioka, Daisuke Tomura, Ikuei Nukaya, Junishi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. In vivo persistence of adoptively transferred TCR gene-transduced lymphocytes with anti-tumor reactivity in patients with MAGE-A4 expressing cancer. Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer, National Harbor (USA) 2013/11/9.

) Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Naoko Imai, Yoshihiro Miyahara, Mikiya Ishihara, Yasuhiro Nagata, Naoyuki Kataya, Hirofumi Yosioka, Daisuke Tomura, Ikuei Nukaya, Junishi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Adoptively Transferred TCR gene-transduced Lymphocytes persists with anti-tumor reactivity in patients with MAGE-A4+ esophageal cancer. ESFCT and SETGyC collaborative congress, Madrid (Spain), 2013/10/26.

) Naoko Imai, Makiko Yamane, Kazuko Shirakura, Linan wang, Hiroaki Ikeda, Hiroshi Shiku. Acquisition of multifunctionality impacts CD8+ T cell survival and memory formation. 第72回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (横浜市) 2013/10/4.

) Hiroaki Ikeda. Adoptive cell therapy with antigen receptor engineered cells. 第72回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (横浜市) 2013/10/3.

) 池田裕明 抗原受容体遺伝子改変T細胞輸注療法 第17回日本がん免疫学会総会、ANAクラウンプラザホテル (宇部市)、2013/7/4.

) 池田裕明 T細胞輸注療法 -遺伝子改変T細胞の利用- 第17回がん分子標的学会学術集会 国立京都国際会館 京都市 2013/6/13.

) Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Makiko Yamane, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene therapy with allogeneic T cells. The 4<sup>th</sup> JSH international symposium, 道後温泉大和屋本店 (松山市) 2013/5/24.

) Ikeda H, Kageyama S, Imai N, Miyahara Y, Ishihara M, Kawamura A, Yamane M, Tomura D, Okamoto S, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H. ANTIGEN RECEPTOR GENE-MODIFIED LYMPHOCYTES: HARNESSING T CELLS FOR EFFECTIVE CANCER TREATMENT WITH NOVEL VECTORS AND MANIPULATIONS. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Maui (USA), 2013/2/24

) Imai N, Kawamura A, Yamane M, Wang L, Shirakura K, Shirakura K, Amaike C, Goto Y, Okamoto S, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H. Evaluation of vector construction of TCR gene therapy for cancer utilizing a novel mouse model. 第41回日本免疫学会学術集会 神戸国際会議場 (神戸) 2012/12/6.

) Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Katayama N, Ueda S, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako

K, Shiku H. In vivo persistence of adoptively transferred TCR gene-transduced lymphocytes in patients with esophageal cancer. 第71回日本癌学会学術総会 ロイトン札幌 (札幌) 2012/9/19.

) 池田裕明、影山慎一、宮原慶裕、今井奈緒子、石原幹也、岡本幸子、糠谷育衛、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋 遺伝子改変T細胞の臨床応用 第16回日本がん免疫学会総会 北海道大学学術交流会館 (札幌) 2012/7/28.

) 今井奈緒子、河村あゆみ、山根真妃子、王立楠、後藤優美、岡本幸子、峰野純一、竹迫一任、池田裕明、珠玖洋 T細胞レセプター遺伝子導入リンパ球輸注療法のマウスモデルによる解析 第16回日本がん免疫学会総会 北海道大学学術交流会館 (札幌) 2012/7/26.

) Ikeda H, Kageyama S, Imai N, Miyahara Y, Ishihara M, Kawamura A, Yamane M, Tomura D, Okamoto S, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H. Clinical application of gene-modified lymphocytes for cancer immunotherapy. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会 ホテル熊本テルサ (熊本) 2012/6/29.

[図書](計5件)

) 土川貴裕、京極典憲、我孫子剛大、和田雅孝、宮谷内健吾、池田裕明、影山慎一、珠玖洋、平野聡 進行・再発癌に対する新規癌ワクチンCHP-MAGE-A4の臨床応用と特異的免疫応答の解析 分子細胞治療フロンティア2015 236ページ(157-162) 飯田橋パピルス 2014.

) 池田裕明 がんに対する免疫細胞療法 JSI Newsletter Vol.23 No. 1 40ページ(8-9) 特集 癌免疫・細胞療法Revisited 日本免疫学会事務局 2014.

〔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.shikuken.jp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

池田裕明（IKEDA, Hiroaki）

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40374673

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし