

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591908

研究課題名(和文) 癌免疫療法に用いる治療用細胞のリアルタイム抗腫瘍活性評価システムの開発

研究課題名(英文) The development of the system estimating realtime antitumor activity of activated T lymphocytes in cancer immunotherapy

研究代表者

森崎 隆 (MORISAKI, Takashi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：90291517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：活性化リンパ球では、random migration速度が、活性化前リンパ球より有意に亢進し、これが癌細胞障害活性に關与する可能性が見出された。phosphorylated FTY720 (FTYP)を添加すると、活性化リンパ球のrandom migration速度が有意に抑制され、それに伴い、癌細胞障害活性も有意に低下することが分かった。さらに免疫不全マウスを用いて、FTYP投与による腫瘍増殖抑制効果を確認した。これらの結果より、活性化リンパ球のrandom migration速度が癌細胞傷害活性のbiomarkerになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In activated T lymphocytes, velocity of random migration increases than resting lymphocytes and it may contribute to cytotoxicity against cancer. Addition of phosphorylated FTY720 (FTYP) suppresses the velocity of random migration in activated T lymphocytes and it leads to the decrease in cytotoxicity against cancer. In addition, we confirmed the antitumor effect by the administration of FTYP using in vivo mice model. These results suggest that random migration in activated T lymphocytes may become a useful biomarker for therapeutic effect of cancer immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：random migration 運動能 活性化リンパ球 細胞障害活性 バイオマーカー 治療効果予測 FTYP

1. 研究開始当初の背景

現在、癌に対する免疫療法の効果を評価するために、末梢血中の腫瘍細胞特異的 T リンパ球(CTL)誘導を皮膚反応、ELISPOT 法、あるいはテトラマー法によって評価する方法が用いられている。しかし、これら評価法は、解析機器の整備や評価に熟練を要する。一方、治療用細胞の抗腫瘍活性を客観的に評価する方法は、クロミウム遊離試験など特殊な機器や施設の整備が必要となる。このことが、細胞療法を標準化する上での問題であり、結果的に、細胞療法が新たな治療法として認定されるための高いハードルとなっている。この問題を乗り越える方法としては、GMP グレードの合成癌関連ペプチドを用いるペプチドワクチン療法や比較的定量的評価が可能な樹状細胞や腫瘍由来のエキソソームを用いる方法や、人工抗原提示細胞作成などが試みられている。しかし、いずれの方法も日常臨床の場で使用可能なレベルには達していない。

我々は、これまで癌に対する細胞免疫療法を一般的な治療法として確立するために、人工免疫組織の開発やエキソソームによる標準化などに取り組んできた。その結果、エキソソームは凍結保存可能であり、細胞傷害性 T 細胞(CTL)誘導能をある程度客観的に評価可能だが、エキソソーム精製は複雑な作業工程を必要とし、臨床の場で治療に応用するまでには少なくとも3~5年を要すると予想される。しかし、癌に対する細胞・免疫療法は研究型医療あるいは保険外医療として既に日常診療の場で実施されている。これら現状においては、治療用細胞の質や治療効果を客観的に評価可能なシステム開発は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

我々は、難治性固形腫瘍に対する樹状細胞を基盤とする細胞免疫療法を開発し実施中である(免疫監視機構構築療法)。しかし、治療用細胞の抗腫瘍活性を抗癌剤(ED50のような)のように定量的かつリアルタイムに評価することは容易ではない。このことが、細胞療法に用いる治療用細胞の標準化を困難にしており、細胞療法を一般的な治療法として確立する上での障害の一つとなっている。したがって、本研究では、「細胞・免疫療法の標準化を目指し、日常診療の場(ベッドサイド)において、治療用細胞の抗腫瘍活性をリアルタイムに定量評価するシステムを開発する」ことを主目的とする。

3. 研究の方法

(1) 治療用細胞の定量的リアルタイム抗腫瘍活性評価システムの確立: 治療用リンパ球(CTL、活性化リンパ球、活性化NK細胞)の培養腫瘍細胞に対する傷害活性(%傷害活性/6時間)、傷害速度(50%傷害時間、個々の癌細胞における経時的傷害プロセス

カーブなど)および運動能(平均的移動速度)などを解析する方法を確立する。

(2) 定量的リアルタイム抗腫瘍活性評価システムの症例への応用: 培養腫瘍細胞あるいは自己腫瘍細胞を標的として、治療経過中の生体内リンパ球の傷害活性をリアルタイムで解析し、臨床応用の可能性を検証する

(3) 定量的リアルタイム抗腫瘍活性機能評価カルテの臨床的意義の検証: 平成 24、25 年度に実施した症例(目標 50 例)の定量的リアルタイム抗腫瘍活性機能評価カルテを用いて、臨床結果(腫瘍縮小、病勢コントロール、生存期間)との関連解析を実施する。

4. 研究成果

(1) 治療用リンパ球の細胞障害活性につき、従来から行っている方法と、リアルタイムタイムラプス解析法の2つで解析した。即ち、従来法は、リンパ球と癌細胞を混合培養し、6時間後に生存している癌細胞数をWST-8を用いて解析する方法で行い、リアルタイムタイムラプス解析法は、カルセイン染色した癌細胞とリンパ球を混合培養し、カルセインの蛍光強度を経時的に計測する方法で行った。図1の通り、2つの解析で導かれる結果に矛盾はなく、細胞傷害活性の評価法にリアルタイムタイムラプス解析を用いる妥当性が示された。

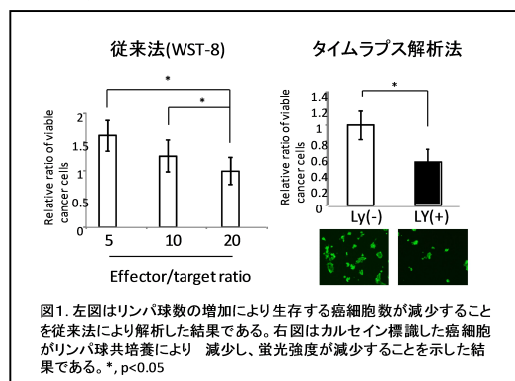


図1. 左図はリンパ球数の増加により生存する癌細胞数が減少することを従来法により解析した結果である。右図はカルセイン標識した癌細胞がリンパ球共培養により減少し、蛍光強度が減少することを示した結果である。*, p<0.05

(2) 本研究の中で、活性化リンパ球では、random migration 速度が、活性化前リンパ球より有意に亢進し、これが癌細胞障害活性に

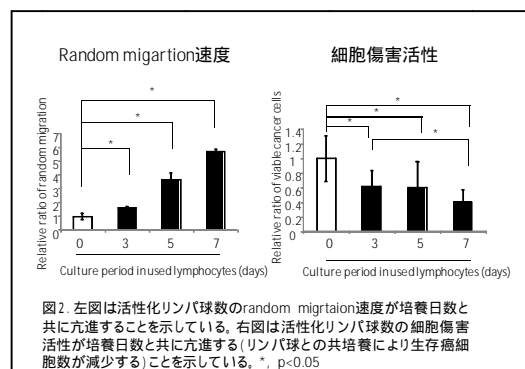


図2. 左図は活性化リンパ球数のrandom migration速度が培養日数と共に亢進することを示している。右図は活性化リンパ球数の細胞傷害活性が培養日数と共に亢進する(リンパ球との共培養により生存癌細胞数が減少する)ことを示している。*, p<0.05

関与する可能性が見出された(図2)。Random migration 速度を制御する受容体である Sphingosine-1-phosphate receptor 1 を阻害する因子 phosphorylated FTY720 (FTYP) を添加すると、活性化リンパ球の random migration 速度が有意に抑制され、それに伴い、癌細胞障害活性も有意に低下することが分かった(図3)。さらに免疫不全マウスを用いて、FTYP 投与による腫瘍増殖抑制効果を確認した(図4)。これらの結果より、活性化リンパ球の random migration 速度が癌細胞傷害活性の biomarker になることが示唆された(業績3)。

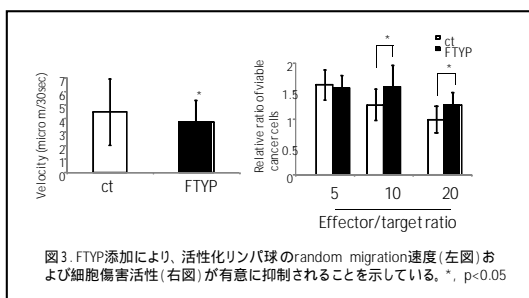


図3. FTYP添加により、活性化リンパ球のrandom migration速度(左図)および細胞傷害活性(右図)が有意に抑制されることを示している。*, p<0.05

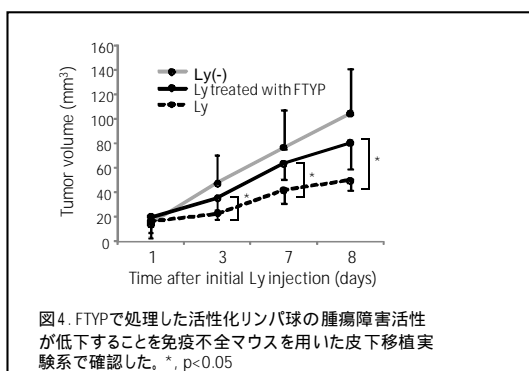


図4. FTYPで処理した活性化リンパ球の腫瘍増殖活性が低下することを免疫不全マウスを用いた皮下移植実験系で確認した。*, p<0.05

(3) 現在、活性化リンパ球の random migration 速度と、治療効果および患者予後との関連を解析中である(論文作成中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Morisaki T, Hirano T, Koya N, Kiyota A, Tanaka H, Umebayashi M, Onishi H, Katano M, NKG2D-directed cytokine-activated killer lymphocyte therapy combined with gemcitabine for patients with chemoresistant metastatic solid tumors. *Anticancer Res*, 査読有, 34(8), 2014, 4529-4538. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075096>
Umebayashi M, Kiyota A, Koya N, Tanaka H, Onishi H, Katano M, Morisaki T, An epithelial cell adhesion molecule- and CD3 bispecific antibody plus activated T-cells can eradicate chemoresistant

cancer stem-like pancreatic carcinoma cells *in vitro*. *Anticancer Res*, 査読有, 34(8), 2014, 4509-4520. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075094>

Onishi H, Kiyota A, Koya N, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, Morisaki T, Random migration contributes to cytotoxicity of activated CD8⁺ T-Lymphocytes but not NK cells. *Anticancer Res*, 査読有, 34(8), 2014, 3947-3956.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075016>

Onishi H, Morisaki T, Kiyota A, Koya N, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, The Hedgehog inhibitor suppresses the function of monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有, 436(1), 2013, 53-59.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.057.

Onishi H, Morisaki T, Kiyota A, Koya N, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, The Hedgehog inhibitor cyclopamine impairs the benefits of immunotherapy with activated T and NK lymphocytes derived from patients with advanced cancer. *Cancer Immunol Immunother* 査読有, 62(6), 2013, 1029-1039.

doi: 10.1007/s00262-013-1419-5.

Suzuki H, Onishi H, Morisaki T, Tanaka M, Katano M, Intratumoral FXP3⁺VEGFR2⁺ Regulatory T Cells Are Predictive Markers for Recurrence and Survival in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Immunol* 査読有, 146(1), 2013, 26-33.

doi: 10.1016/j.clim.2012.10.007.

Onishi H, Koya N, Kiyota A, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, Morisaki T, A new method for rapid cytotoxic T-lymphocyte induction using a multiple cytokine cocktail.

Anticancer Res 査読有, 32(6), 2012, 2385-2390.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641679>

〔学会発表〕(計 6 件)

大西 秀哉, 森崎 隆, 梅林 雅代, 古屋 雄大, 田中 裕人, 清田 章文, 片野 光男. 個別化免疫細胞療法確立への試み、2014年5月22日、第35回癌免疫外科研究会、セラトロン都ホテル大阪(大阪府・大阪市)

森崎 隆, 清田 章文, 田中 裕人, 梅林 雅代, 古屋 雄大, 大西 秀哉, 片

野 光男. ジェムザール併用活性化リンパ球療法の臨床効果とそのメカニズムの検討, 2013年12月7日, 第17回バイオ治療法研究会学術集会, 福大メディカルホール(福岡県・福岡市)

田中 裕人, 梅林 雅代, 清田 章文, 古屋 雄大, 大西 秀哉, 片野 光男, 森崎 隆. Young 活性化リンパ球の腫瘍細胞傷害活性の検討, 2013年12月7日, 第17回バイオ治療法研究会学術集会, 福大メディカルホール(福岡県・福岡市)

大西 秀哉, 森崎 隆, 清田 章文, 梅林 雅代, 古屋 雄大, 田中 裕人, 片野 光男. Hedgehog シグナル阻害剤は活性化リンパ球療法の効果を減弱する, 2013年12月5日, 第26回日本バイオセラピー学会学術集会総会, いわて県民情報交流センター(岩手県・盛岡市)

大西 秀哉, 森崎 隆, 片野 光男. 制御性T細胞を標的としたテラーモード消化器癌免疫療法, 2013年7月19日, 第68回日本消化器外科学会総会, サンホテルフェニックス(宮崎県・宮崎市)

大西 秀哉, 森崎 隆, 梅林 雅代, 古屋 雄大, 田中 裕人, 清田 章文, 片野 光男. 免疫細胞療法テラーモード化確立への試み, 2013年6月6日, 第38回日本外科系連合学会学術集会, ハイアットリージェンシー東京(東京都・新宿区)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院 先端医療医学部門 腫瘍制御学分野

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 隆 (MORISAKI, Takashi)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号: 9 0 2 9 1 5 1 7

(2) 研究分担者

大西 秀哉 (ONISHI, Hideya)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 3 0 5 5 3 2 7 6

片野 光男 (KATANO, Mitsuo)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 1 0 1 4 5 2 0 3

今泉 晃 (IMAIZUMI, Akira)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号: 3 0 6 2 4 0 5 1