

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430173

研究課題名(和文) エフェクター制御性T細胞の統合的制御に基づく新たながん免疫治療法の確立

研究課題名(英文) Development of novel cancer immunotherapy based on comprehensive control of effector regulatory T-cells

研究代表者

鈴木 進 (Suzuki, Susumu)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70518422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：体外における実験においては、CCR4抗体による明確な制御性T細胞(Treg)の選択的除去が、確認でき、除去に伴う、免疫の活性化も部分的に明らかとなったが、マウスを用いた治療実験においては、マウスに発生させたヒト腫瘍内に、Tregが浸潤せず、予定していた成果にはつなげられなかった。ただ、ヒトT細胞の浸潤は顕著で、これに伴う腫瘍壊死が確認されたことから、今後、免疫チェックポイント阻害剤など、ヒトがん免疫治療マウスモデルへの展開が期待される。また、ヒト腫瘍内のCCR4+Tregサブセットの検討を行ったところ、病期、再発との関連性が見られ、CCR4を標的としたがん治療の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although elimination regulatory T-cell (Treg) by anti-CCR4 antibody was clearly observed, and the reactivation of immunity with the elimination of Tregs was partially clarified in in vitro experiment, the expected results could not be achieved because human Tregs were not almost infiltrated into cancer tissue generated in mouse. However, it is expected that the spread to mouse model for human cancer immunotherapy using immune checkpoint inhibitors etc. because human T-cells were remarkably infiltrated into the tissue and the cancer necrosis was observed. And, CCR4+Treg subset analysis in human cancer tissues was performed. it was observed that infiltration of CCR4+Treg subset is related with pathological stage and recurrence which suggest significance of cancer therapy targeting CCR4.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：エフェクター制御性T細胞 CCケモカイン受容体4(CCR4) 細胞傷害性T細胞 免疫不全マウス 腫瘍免疫
増強

1. 研究開始当初の背景

がん免疫抑制環境の形成ががんの発症、進展において重要な要因であることが明らかとなる中で、免疫チェックポイント分子を標的とした抗体治療薬 (anti-CTLA4/ipilimumab, anti-PD1/Nivolumab, anti-PDL1/BMS-936559) は、既存治療法で効果の見られなかった症例や、これまで免疫が効かないとされてきた肺癌に対しても、劇的な治療効果をもたらし、がん免疫治療の新たな方向性を切り開いた(1)。制御性 T 細胞(regulatory T-cell/Treg)も免疫チェックポイント分子と併せて、免疫抑制機構の一翼を担うことが明らかとされ、がん免疫治療開発における重要な標的となっている(1)。我々はホジキンリンパ腫を材料として、Treg の腫瘍内への浸潤には、C-C chemokine receptor type 4 (CCR4) による走化機序が重要であることを明らかにした(2)。また、CCR4 がエフェクター Treg (eTreg) に選択的に発現していることが、報告され、さらに、抗 CCR4 抗体医薬、モガムリズマブ治療を受けた成人 T 細胞白血病(ATL)患者において、eTreg が減少し、長期寛解が得られる一因となっていることが示唆された(3)。これらのことからモガムリズマブは ATL の治療薬としてのみならず、eTreg 除去により抗腫瘍免疫の増強を促し、固形がんの治療薬としても期待できるとの考えに至った。

2. 研究の目的

抗 CCR4 モノクローナル抗体、モガムリズマブの eTreg 選択的除去効果と、これに伴う、がん免疫増強効果について、*in vitro*、*in vivo* で評価し、eTreg 制御に基づく固形がんに対する新たな免疫治療法開発のための、基礎データを蓄積すること。

3. 研究の方法

(1) リンパ球における CCR4 の発現解析と、モガムリズマブの eTreg 除去効果

各 Treg サブセットにおける CCR4 の発現をフローサイトメトリーにて解析

in vitro において末梢血リンパ球中 eTreg の選択的除去について検討

(2) eTreg の抗原特異的 CTL 活性化に及ぼす影響

末梢血リンパ球から単離した Treg 分画を、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) と共培養し、CTL 活性化に及ぼす影響について検討。

Treg により、不活性化した CTL がモガムリズマブによる Treg 除去によって、再活性化されるかどうか検討。

(3) ヒト腫瘍ゼノグラフト NOD/Shi-scid, IL-2R null (NOG)マウスを用いた、モガムリズマブによる治療実験

サイトメガロウイルス pp65 蛋白 (CMVpp65)を強制発現させたヒトがん由来細胞株を NOG マウスの鼠径部皮下に投与後、7 日後に健常人由来末梢血単核球 (PBMC) を腹腔内に投与の後 14 日後に腫瘍内の免疫組織学的解析を実施。

の検討で、腫瘍内において、ヒト腫瘍と比較して、同様の組織像(特に Treg の浸潤)が得られれば抗 CCR4 抗体投与による治療効果を見る。

(4) ヒトがん組織に浸潤している CCR4 陽性 Treg サブセットの免疫組織学的検討
ヒトがん組織パラフィン包埋標本を FOXP3/CCR4 で二重染色し、CCR4 陽性 Treg サブセットの浸潤と、病態との関係について評価する。

4. 研究成果

(1) CCR4 の eTreg での選択的発現

末梢血リンパ球を CD45RA, CD4, FOXP3, CCR4 の各抗体を用いて 4 重染色し、CD4 陽性細胞を宮良らの報告(4)に従い、CD45RA と FOXP3 で二重展開して得られた 5 分画 CD45RA+FOXP3+ (fraction I(fr.I)), CD45RA-FOXP3++ (fr.II), CD45RA-FOXP3+ (fr.III), CD45RA+FOXP3- (fr.IV), CD45RA-FOXP3- (fr.V) について、CCR4 の発現を検討した。eTreg 分画に対応する、fr.II において、CCR4 の発現が最も高く、次いで、fr.III, fr.V の順となった。Naïve Treg に対応する fr.I, 及び fr.IV では発現はみられなかった。このように CCR4 は eTreg 分画に選択的に発現することが確認された(図 1)。

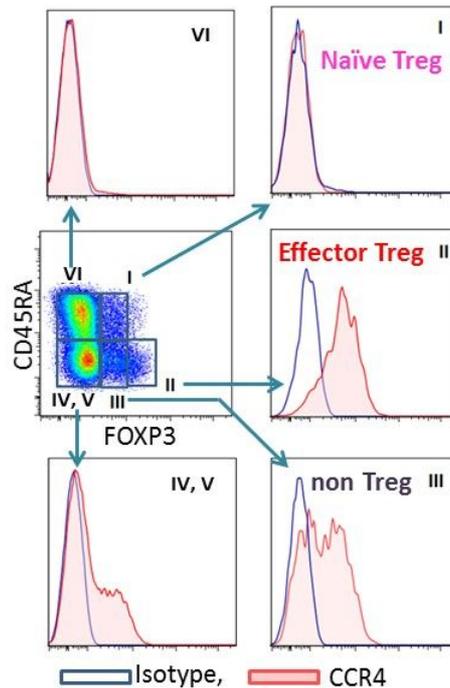


図1 CD45RA と FOXP3 で二次元に展開して得られた CD4+T 細胞亜分画における CCR4 の発現

(2) 抗 CCR4 抗体による eTreg の除去

末梢血リンパ球に、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を持つ抗 CCR4 抗体(KM2760)を加え、2 日間培養した後、eTreg 分画の比率を培養前後で比較検討したところ、fr. II (eTreg) において最も顕著に KM2760 濃度依存的な低下がみられた(図 2)。すなわち、抗 CCR4 抗体により、eTreg の選択的除去が可能であることが明らかとなった。

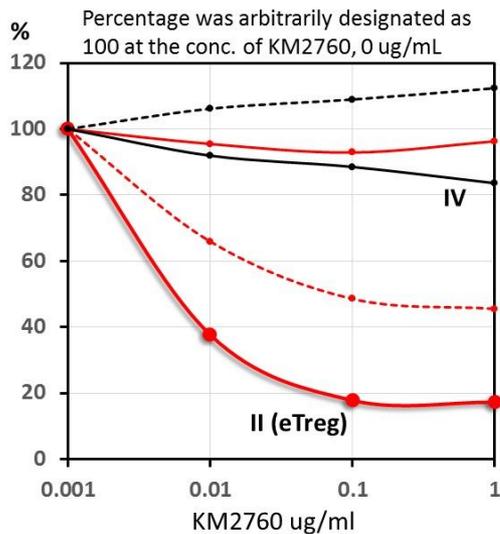


図 2 抗 CCR4 抗体(KM2760)の eTreg 分画に対する選択的除去効果

(3) Treg の抗原特異的 CTL 活性化に及ぼす影響

In vitro で調製した抗原特異的 CTL と、Treg を混合培養し、Treg の抗原特異的 CTL の増殖に及ぼす影響について検討した。サイトメガロウイルス pp65 抗原 (CMVpp65) に特異的な CTL (CMV-CTL) を pp65 抗原エトープペプチドで特異的に刺激した後、5 日後に、CMV-CTL の細胞数を計測したところ、Treg を加えた場合、加えない場合に比べて、著しく増殖が阻害されることが示された(図 3)。しかしながら、FOXP3- CD4+T 細胞を加えた場合も、CMV-CTL の増殖を抑制することがあり、in vitro での Treg 活性評価の困難さが伺えた。

Treg と CMV-CTL の混合培養により不活性化した CMV-CTL の活性が、CCR4 を標的とした Treg 除去によって再活性化が起こるかどうか IFN の産生能を指標として検討した。若干の再活性化がみられたが、不活性化前の活性までには回復せず、また、生存率も低下することから、一度不活性化した CTL の再活性化が、治療に結び付く可能性は低いのではないかと考えられた。

(4) ヒト腫瘍ゼノグラフト NOG マウス腫瘍内へのヒト免疫細胞の浸潤

生着させた腫瘍を摘出し、パラフィン包埋切片とした後、免疫組織化学的検討を行った。

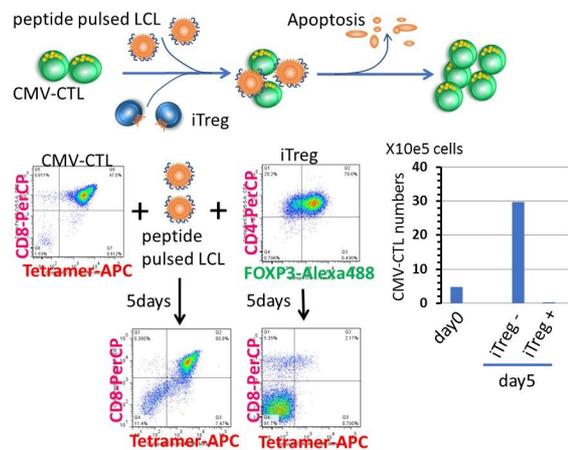


図 3 Treg による抗原特異的 CTL に対する増殖阻害

腫瘍内に、ヒト腫瘍で見られる浸潤と同程度のヒト T 細胞の浸潤を認めたが、FOXP3 陽性細胞、CCR4 陽性細胞の浸潤はほとんど認められなかった。また、ヒトマクロファージや、ヒト好中球の浸潤もほとんどみられず、ヒト腫瘍内を代替できるような免疫環境の構築とはならなかった。特に、CCR4、及び、FOXP3 陽性細胞の浸潤がみられないことから、抗 CCR4 抗体による、固形がん治療実験を行うことは困難と考えられた。しかしながら、pp65 抗原を強制発現した口腔がん由来細胞株 (HSC-3) を生着させた NOG マウス腫瘍内では、明らかな腫瘍壊死がみられ、CD8 陽性 T 細胞の浸潤が CD4 陽性 T 細胞に比べて顕著であり、CMV-CTL の組織内への浸潤と、それに伴う腫瘍細胞の抗原特異的な傷害が生じているものと考えられた。浸潤 CD8 陽性 T 細胞の多くが PD-1 陽性で、また、CD8 陽性 T 細胞が浸潤している腫瘍組織は PD-L1 の発現がみられた。今後、免疫チェックポイント阻害剤治療モデルとしての利用が期待できるかもしれない。

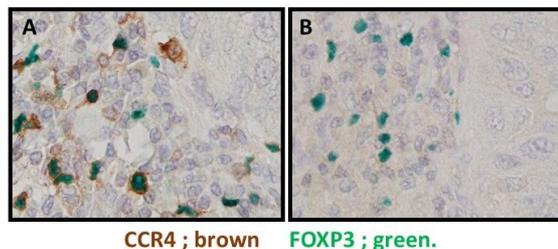


図 4 肺がん組織内への CCR4+Treg サブセットの浸潤。(A)CCR4 の発現が高い (B)CCR4 の発現が低い

(5) ヒトがん組織に浸潤している CCR4 陽性 Treg サブセットの免疫組織学的検討

ヒト腫瘍組織(肺がん、前立腺がん、胃がん、食道がん、口腔がん、リンパ腫)を用いて、CCR4 陽性 Treg サブセットの腫瘍内浸潤について検討した。浸潤している FOXP3 陽性

細胞における CCR4 の陽性率は、症例によって様々(10-90%)であった。FOXP3 陽性細胞における CCR4 陽性率と、病態との関係について現在解析中であるが、病期や組織型、再発との関連が示唆されている。今後、症例を増やして、関連性について明確なものにしていきたい。

<引用文献>

Suzuki S, Ishida T, Yoshikawa K and Ueda R. Current status of immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol*, 2016 Mar;46(3):191-203.

Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, et al Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* 2006 Jun 1;66(11):5716-22

Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, et al Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol.* 2012 Mar 10;30(8):837-42.

Miyara M1, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, et al Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009 Jun 19;30(6):899-911.

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7件)

Suzuki S, Ishida T, Yoshikawa K and Ueda R. Current status of immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol*, 2016 Mar;46(3):191-203. doi: 10.1093/jjco/hyv201

Kurose K, Suzuki S, Ueda R, Nakayama E, et al. Phase Ia Study of FoxP3+ CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2015 Oct 1;21(19):4327-36. doi: 10.1158/1078-0432.

Masaki A, Suzuki S, Ito A, Ueda R, et al. Utsunomiya A, Inagaki H, Iida S. Prognostic Significance of Tryptophan Catabolism in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2015 Jun 15;21(12):2830-9. doi: 10.1158/1078-0432

Narita T, Suzuki S, Ito A, Ueda R, et al. HTLV-1 bZIP Factor-Specific CD4 T Cell Responses in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunol.* 2014 Feb

1;192(3):940-7. doi: 10.4049/jimmunol.1301952

鈴木進, 吉川和宏, 上田龍三 抗腫瘍抗体 - がん細胞に対する抗体の現状と展望 実験医学 増刊 がん免疫療法 腫瘍免疫学の最新知見から治療法のアップデートまで Vol.34 No.12 2016 122-131

鈴木進, 中山睿一, 黒瀬浩史, 上田龍三 モガムリズマブの新しい展開 最新医学 2016年 71巻 1号 126-32

鈴木進, 石田高司, 吉川和宏, 上田龍三 モガムリズマブ The Frontiers in Life Sciences 生命科学から創薬へのイノベーション 2014年 186-195

[学会発表](計19件)

Ishida T, Ito A, Suzuki S, Ueda R, et al. T-cell receptor repertoire diversity in patients with ATL who received mogamulizumab. 18th International Conference of Human Retrovirology; HTLV March 7-10 2017 Tokyo, Japan

Saito M, Ito A, Suzuki S, Ueda R, et al. Monitoring of Adult T-cell Leukemia-Lymphoma (ATL) Cells in Patients Receiving Mogamulizumab, A Humanized Anti-CCR4 Monoclonal Antibody, by TCR Repertoire Analysis. 58th ASH Annual Meeting & Exposition December 3-6, 2016, USA

Kinoshita S, Suzuki S, Ueda R, Iida S, et al. CDK9 as target for treatment in EBV associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases. 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月 横浜

Masaki A, Ito A, Suzuki S, Ueda R, et al. Prognostic significance of tryptophan catabolism in newly diagnosed Hodgkin Lymphoma. 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月 横浜

Ishida T, Ito A, Suzuki S, Ueda R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 as a novel molecular target in adult T-cell leukemia/lymphoma. 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月 横浜

Suzuki S, Nishio M, Yoshikawa K, Ueda R, et al. 5-FU (fluorouracil) sensitizes oral squamous cell carcinoma (OSCC) to cytotoxic T-lymphocyte (CTL). 第75回日本癌学会総会 2016年10月 横浜

Kinoshita S, Ito A, Suzuki S, Ueda R, et al. CDK9 as target for treatment in EBV associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases. 第75回日本癌学会総会 2016年10月 横浜

Masaki A, Ito A, Suzuki S, Ueda R, et al. Prognostic significance of tryptophan catabolism in newly diagnosed Hodgkin Lymphoma. 第75回日本癌学会総会 2016年10月 横浜

Ishida T, Ito A, Suzuki S, Ueda R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 as a novel molecular target in adult T-cell leukemia/lymphoma. 第75回 日本癌学会総会 2016年 10月 横浜

Watanabe M, Suzuki S, Yoshikawa K, Ueda R, et al. C-C chemokine receptor 4 positive regulatory T cells increased in biopsy specimens of poorly prognostic prostate cancer. 第75回 日本癌学会総会 2016年 10月 横浜

Masaki A, Suzuki S, Ito A, Ueda R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 as a novel molecular target in adult T-cell leukemia/lymphoma. 第77回 日本血液学会 学術集会 2015年 10月 金沢

Narita T, Ito A, Suzuki S, Ueda R, et al. Potential treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma by a novel P-TEFb/CDK9 inhibitor BAY1143572 第77回 日本血液学会 学術集会 2015年 10月 金沢

Suzuki S, Oka M, Nakayama E, Ueda R, et al. Immunotherapy for solid tumors based on regulation of regulatory T lymphocyte. 第74回 日本癌学会総会 2015年 10月 名古屋

Kurose K, Suzuki S, Ueda R, Nakayama E, et al. Phase Ia study of FoxP3+ CD4 Treg depletion by infusion of a humanized anti-CCR4 antibody, KW-0761, in cancer patients 第74回 日本癌学会総会 2015年 10月 名古屋

Masaki A, Suzuki S, Ito A, Ueda R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 as a novel molecular target in adult T-cell leukemia/lymphoma. 第74回 日本癌学会総会 2015年 10月 名古屋

Kurose K, Suzuki S, Ueda R, Nakayama E, et al. Phase Ia study of FoxP3+ CD4 Treg depletion by infusion of a humanized anti-CCR4 antibody, KW-0761, in cancer patients. 第19回 日本がん免疫学会総会 2015年 7月 東京

Ishida T, Suzuki S, Ueda R. Antibody cancer therapy. 第73回 日本癌学会総会 2014年 10月 横浜

Nishio M, Suzuki S, Yoshikawa K, Ueda R. Influence of chemotherapeutic drugs frequently used for oral cancer on growth activity and antigen response of cytotoxic T-lymphocytes. 第73回 日本癌学会総会 2014年 10月 横浜

Nishio M, Suzuki S, Yoshikawa K, Ueda R, et al. 22th Annual Cancer Research Institute International Symposium. 2014, October, New York

〔図書〕(計1件)

Suzuki S, Ishida T, Yoshikawa K, and Ueda R. Progress in clinical use of CCR4

antibody for regulatory T cell suppression. Inflammation and Immunity in Cancer. Springer, 207-227, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 進 (Suzuki, Susumu)

愛知医科大学 医学部 腫瘍免疫寄附講座・准教授

研究者番号：70518422

(2) 研究分担者

吉川 和宏 (Yoshikawa Kazuhiro)

愛知医科大学 医学部 高度研究機器部門・教授

研究者番号：60109759

伊藤 旭 (Ito Asahi)

名古屋市立大学, 医学研究科・助教

研究者番号：00571762

(3) 連携研究者

上田 龍三 (Ueda Ryuzo)

愛知医科大学 医学部 腫瘍免疫寄附講座・教授

研究者番号：20142169

(4) 研究協力者

なし