

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430178

研究課題名(和文) MHCダブルノックアウトNOGマウスを利用した自家免疫療法モデルの作製

研究課題名(英文) Anti-tumor immunotherapy in humanized the NOG-MHC double knockout mouse

研究代表者

飯塚 明 (Iizuka, Akira)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：00463183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、癌に対する免疫応答の存在が臨床的に実証されたが、前臨床の研究段階にあつては、人のエフェクターT細胞及びメモリーT細胞を移植し長期間維持可能な動物モデルが存在しなかったため、腫瘍に対する免疫関連薬剤の効果を体内で検討することは不可能であった。本研究では主要組織適合遺伝子(MHC)をノックアウトした超免疫不全NOGマウスを用いることにより、ヒト白血球型抗原(HLA-A)の一致した癌患者由来の末梢血単核球細胞とヒト腫瘍細胞の同時移植を可能とし、免疫チェックポイント阻害剤等の腫瘍細胞に対する効果をマウスの体内実験において評価することが可能なモデルを作製した。

研究成果の概要(英文)：With the recent success of immune checkpoint inhibitors, T cell dependent tumor immune responses have been demonstrated in clinical studies. But in preclinical studies, immuno-humanized mouse models are associated several limitations, such as long incubation time for hematopoietic stem cell engraftment and the development of xenograft versus host disease (GVHD) in mice injected with human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC), so immunological drugs for human tumors could not be evaluated in non-human in vivo models. In this study we had the severely immunodeficient mouse strain, MHC class I, class II-deficient NOD/Shi-scid-IL2r null (NOG), for build the immuno-humanized mouse model and enabled long term hPBMC and human tumor xenograftment without GVHD to evaluate the antitumor effect of immunomodulatory agent, such as anti-programmed death-1 (PD-1) antibody.

研究分野：癌免疫治療

キーワード：腫瘍免疫 グリオーマ マウスモデル 変異抗原

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマの中で膠芽腫の予後は、極めて悪性であり、2005年 temozolomide(TMZ)の臨床応用後、生存期間の延長は認めるものの2年以上生存する症例はほとんどない。また標準的治療である TMZ 併用放射線治療を施行後、大部分の症例で再発を起し、腫瘍のコントロールが困難となる。このため、腫瘍の再発を抑制し、生存期間の延長を期待できる次世代の新しいがんの維持療法が求められている。静岡がんセンターでは、再発悪性グリオーマ症例に対する腫瘍特異的な活性化型樹状細胞(dendritic cell; DC)ワクチン療法の臨床試験(第I相試験9症例)を施行しており(Akiyama et al, BMC Cancer 2012)、また TMZ 併用放射線治療を受けた新規症例にワクチン療法を行う第II相試験を予定している。こうした臨床的背景を受けて我々の研究グループでは、マルチオミクス解析技術を用いて悪性グリオーマに特異的に発現する腫瘍抗原の同定および免疫エピトープの探索研究を進めている。我々は、悪性グリオーマの腫瘍組織から17株の初代培養細胞株(14株が膠芽腫)を樹立している。これらは、ほとんどが標準治療後の再発症例であり、免疫不全マウスにて形成された移植腫瘍は、high-grade グリオーマの病理所見が確認されている。すでにリアルタイム PCR 法により、54種類の Cancer-testis (CT)抗原 (CT1~50)の発現解析がなされており、6種類のCT抗原遺伝子について、すべての培養株での発現が確認されている。

近年の免疫チェックポイント阻害薬の登場により、癌に対する免疫応答の存在が臨床的に実証されるとともに、癌治療研究の分野において大きな進展をもたらしている。腫瘍における遺伝子変異の蓄積量が多いほど、免疫チェックポイント阻害薬の効果が高いという研究結果が報告されており、癌に生成された遺伝子変異産物(癌変異抗原)が腫瘍に対する免疫応答の主な標的ではないかと考えられている。しかしながら、前臨床における動物を用いた研究段階にあっては、ヒト癌細胞とヒト免疫細胞、特に癌抗原を認識可能なエフェクターT細胞及びメモリーT細胞を同時に移植し長期維持可能なマウスモデルが存在しなかったために、実験的に腫瘍免疫関連薬剤の効果を検討することは困難であった。

超免疫不全マウスであるNOGマウス、NSGマウスなどにヒトの造血幹細胞を移植することはすでに可能となっている。しかしながら、癌変異抗原及びそれを認識するエフェクターT細胞の組み合わせは患者ごとに異なるため、癌抗原に感作された患者末梢血免疫細胞を移植可能なモデルを必要としたが、ヒト末梢血免疫細胞をNOGマウスに移植すると移植片対宿主反応(GVHD)により1か月程度でマウスが全例死亡したため、実験を行うことが出来ず、マウスに対するGVHDを起

こさないモデルの作製が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍免疫治療薬を評価可能なマウス体内実験モデルを作成するため、実験動物中央研究所において新たに開発された免疫不全マウス、主要組織適合遺伝子(MHC)ロックアウトNOGマウスを用い、GVHDを起こさせることなく、ヒト白血球型抗原(HLA-A)の一致したヒト末梢血単核球細胞とヒト腫瘍細胞の同時移植モデルをまず作製し、さらにこのモデルを用いて腫瘍細胞に対する薬剤の効果をマウス体内実験において評価することを目的とする。

また、ペプチドワクチン等を中心とした免疫療法の開発においては、標的となる腫瘍抗原の同定および免疫(CTL)エピトープの探索に時間や労力がかかる上、実際に臨床試験を施行するまでその有用性は評価が難しい。我々は、この問題を解決するために、同一宿主(症例)の免疫系と腫瘍を生着させ、脳腫瘍の自家免疫療法マウスモデルを作成する。これによりペプチドワクチン開発の基礎研究から臨床応用までの過程を促進することを目的とする。

3. 研究の方法

1) ヒト免疫系とヒト腫瘍系を同時に移植したMHCロックアウトNOGマウスの作製: 実験動物中央研究所において開発されたMHCダブルロックアウトNOGマウス(NO-G-IA、2M double KO)は主要組織適合抗原(MHC)-class I、class II が欠損しており、移植したヒト末梢血中のキラーT細胞によるマウス細胞への攻撃がなく、これまでの検討によりヒト末梢血単核球細胞の移植においては最も生着効率の高いマウスと想定され、ヒト免疫細胞とヒト癌細胞の直接的な反応をIn Vivoで見えるためのヒト化マウスモデルの作製に用いた。マウスに2.5グレイ(Gy)のX線を照射後、ヒト抹消血単核球細胞を尾静脈より 1×10^7 個移植し、翌日腫瘍細胞を皮下に $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個移植した。

2) 免疫チェックポイント阻害抗体の投与: T細胞免疫応答抑制レセプターであるPD-1分子に対する阻害剤となる組換え抗体を作成、投与し、T細胞依存性の造腫瘍抑制が起きるかどうかの検討を行った。免疫組織染色により移植腫瘍内の浸潤リンパ球の変化を調べ、腫瘍組織での遺伝子発現の変化も併せて定量PCRにより検討した。

3) 悪性グリオーマ患者腫瘍およびグリオーマ細胞株の変異遺伝子の同定: 当センターの脳腫瘍患者から得られた癌組織及び末梢血細胞についてIonProtonシーケンサーを用いてエキソーム遺伝子変異解析を行い、遺伝子多型を排除した患者ごとの癌遺伝子変異を同定した。

4) 癌変異抗原(変異エピトープ)候補の同定: 癌抗原のアミノ酸配列よりHLA-A24拘束

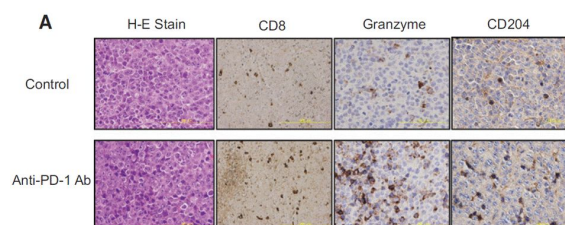
性ペプチド配列予測プログラムとして NetMHC4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) および in silico docking simulation assay を使用し候補となるエピトープをスクリーニングした。In silico docking simulation assay は、HLA-A24 タンパクの3次元構造データを基に構築した結合シミュレーションアッセイであり、我々の研究室にて開発した (Akiyama et al, Cancer Immunol Immunother 2012)。また並行して抗原の陽性コントロールとしてサイトメガロウイルス由来の HLA-A24 拘束性ペプチド (CMVpp65341-349 QYDPVAALF) と EB ウイルス由来の HLA-A24 拘束性ペプチドを使用した。

患者末梢血単核球の培養にて得られた活性型 DQ (alpha-type1; GM-CSF+IL4+TNF- +IL-1 +IFN +IFN +polyI/C 存在下に培養後、抗原ペプチドを 50 µg/ml で取り込ませた) を抗原提示細胞とし、患者末梢血 T 細胞との共培養下で上清に産生された IFN 量を ELISA 法で測定し、免疫原性のある変異抗原を同定した。

4. 研究成果

1) 高度免疫不全である MHC ノックアウト NOG マウスに悪性グリオーマ患者由来の癌細胞の移植を行った。初代培養細胞株 20 株については3か月以上を経過して腫瘍の増大を確認できた症例が存在しなかったが、無血清培地を用い誘導した3種のがん性幹細胞株 (GB-SCC010、GB-SCC026、GB-SCC028) については脳内移植による造腫瘍性が確認された。

2) MHC ダブルノックアウト NOG マウスに、ヒト白血球型抗原 (HLA-A) の一致した癌患者由来の末梢血単核球細胞とヒト腫瘍細胞株の同時移植を行った。ヒト悪性グリオーマ細胞 U87 株またはヒトリンパ腫細胞 SCC3 株を移植し、造腫瘍性があることを確認したのち、患者末梢血細胞と癌細胞の同時移植を行った。ヒトグリオーマ U87 細胞株と患者末梢血リンパ球の同時移植では腸間膜リンパ節の形成、及び脾臓の腫大が確認された。又、このモデルを用いることにより、免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-1 抗体) のリンパ腫細胞 (SCC-3 株)、グリオーマ腫瘍細胞 (U87 株) に対する効果をマウスのインビボ実験において評価することが可能であった。



3) 患者癌細胞の変異エピトープ解析に先立ち、7種の市販グリオーマ細胞株について Ion Proton シーケンサーを用いエキソーム解析をおこなった。細胞株遺伝子変異データベース COSMIC に登録された変異データとの比較では、平均で2倍弱ほどの体細胞変異が検出され、共通して検出された変異は全体の28%~66%程度であった。2株につき、がん関連遺伝子の変異に絞って細胞障害性T細胞のターゲットとなりうる変異エピトープを NetMHC 予測プログラムを用いて予測したところ、各々2つの候補エピトープを見つけることができた。

4) 当センターの脳腫瘍患者癌細胞遺伝子変異解析を行ったところ、悪性神経膠芽腫では PTEN の変異が最も多く、それ以外の脳腫瘍では IDH1 遺伝子の特徴的な点変異が従来の報告同様に高い頻度で検出され、脳腫瘍の標的抗原、標的変異としては最も有望な組織特異的変異であると思われた。

5) グリオーマ細胞株7種類を用いたエキソーム変異解析では 265~525 個の点変異が検出されたが、脳腫瘍患者検体では 100 個以上の点変異が検出されたのは 24 例中 4 例、悪性神経膠芽腫患者では非同義アミノ酸置換が 100 個以上あったのは 11 例中 1 例のみであった。TMZ 治療後のグリオーマでは体細胞変異の数が爆発的に増えることが 2014 年に報告されているが、患者の一次腫瘍においては細胞株ほどの変異の蓄積は認められなかった。患者の一次腫瘍をマウスに生着させることが出来なかったこともあり、グリオーマ患者を対象とした治療目的の癌変異エピトープ同定は困難であるとの結論に至った。現在は悪性黒色腫を対象として同様の研究を進めており、免疫原性を持った変異抗原の同定に成功している。

6) ヒト末梢血免疫細胞を移植し長期間維持可能なヒト化マウスモデルは本研究成果が初となるが、ジャクソン研究所において開発された類似の MHC KO NSG マウスが非公開ながら一部の製薬会社などに供与され使用されている。本研究で使用した MHC KO NOG マウスはオープンソースとなっていて、本施設においては他研究への使用拡大が既に行われており、癌免疫治療研究を行うための新たな手段を提供するものとなる。

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)

Akiyama Y, Komiyama M, Miyata H, Yagoto M, Ashizawa T, Iizuka A, Oshita C, Kume A, Nogami M, Ito I, Watanabe R, Sugino T, Mitsuya K, Hayashi N, Nakasu Y, Yamaguchi

K. Novel cancer-testis antigen expression on glioma cell lines derived from high-grade glioma patients. *Oncol Rep.* 31(4):1683-90. 査読あり, doi: 10.3892/or.2014.3049.

Inoue K, Saegusa N, Omiya M, Ashizawa T, Miyata H, Komiyama M, Iizuka A, Kume A, Sugino T, Yamaguchi K, Kiyohara Y, Nakagawa M, Akiyama Y. Immunologically augmented skin flap as a novel dendritic cell vaccine against head and neck cancer in a rat model. *Cancer Sci.* 106(2):143-50. 査読あり, doi: 10.1111/cas.12586.

Akiyama Y, Kondou R, Iizuka A, Ohshima K, Urakami K, Nagashima T, Shimoda Y, Tanabe T, Ohnami S, Ohnami S, Kusahara M, Mochizuki T, Yamaguchi K. Immune response-associated gene analysis of 1,000 cancer patients using whole-exome sequencing and gene expression profiling-Project HOPE. *Biomed Res.* 37(4):233-42. 査読あり, doi: 10.2220/biomedres.37.233.

Ashizawa T, Iizuka A, Nonomura C, Kondou R, Maeda C, Miyata H, Sugino T, Mitsuya K, Hayashi N, Nakasu Y, Maruyama K, Yamaguchi K, Katano I, Ito M, Akiyama Y. Antitumor Effect of Programmed Death-1 (PD-1) Blockade in Humanized the NOG-MHC Double Knockout Mouse. *Clin Cancer Res.* 23(1):149-158. 査読あり, doi: 10.1158/1078-0432.

〔学会発表〕(計2件)

秋山靖人、小宮山優、長嶋剛史、下田有事、田邊智絵、大浪澄子、大浪俊平、大島啓一、浦上研一、楠原正俊、望月徹、山口建
プロジェクト HOPE(マルチオミクス解析を用いたがん患者評価) - グリオブラストーマ細胞株における遺伝子解析
第73回日本癌学会学術総会(2014.9.26)

Tadashi Ashizawa, Akira Iizuka, Kouji Maruyama, Ken Yamaguchi, Yasuto Akiyama
Anti-PD-1 antibody therapy using humanized MHC-dKO NOG mouse
第74回日本癌学会学術総会(2015.10.9)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 明 (IIZUKA Akira)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・免疫治療研究部・研究員

研究者番号：00463183

(2) 研究分担者

秋山 靖人 (AKIYAMA Yasuto)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・免疫治療研究部・部長
研究者番号：70222552