

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640104

研究課題名(和文) 改変型Fc受容体を利用した新規がん免疫抗体療法の開発

研究課題名(英文) Novel cancer immunotherapy using gene-modification of Fc receptors

研究代表者

玉田 耕治 (TAMADA, Koji)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00615841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんに対する抗体療法の有効性を左右する因子の一つとして、免疫細胞上に発現するFc受容体の遺伝子多型による抗体親和性の違いが報告されている。そこで我々は免疫細胞、特にNK細胞に対してFc受容体を遺伝子導入することで抗体親和性を高め、腫瘍細胞に対する反応性を向上させるシステムの開発を試みた。その結果、高親和性Fc受容体の遺伝子導入により腫瘍細胞に対するNK細胞の抗体依存的反応性が亢進することが示された。このことから、低親和性Fc受容体を有するがん患者において、高親和性Fc受容体を遺伝子導入したNK細胞を作製し投与することで抗体医薬の治療効果が向上する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that therapeutic effects of anti-tumor antibodies are dependent on Fc receptor polymorphism that affects affinity between immune cells and antibodies. In this study, we explored novel approaches to genetically modify Fc receptor of NK cells, so as to increase affinity to antibodies and to improve anti-tumor potential of NK cells. Our studies demonstrated that genetic modification of NK cells to express high-affinity Fc receptor enhances their anti-tumor responses in the presence of antibodies. These findings suggest that therapeutic effects of anti-tumor effects in patients who express low-affinity Fc receptor could be improved by a transfer of gene-modified NK cells expressing high-affinity Fc receptor.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：がん免疫 抗体療法 免疫細胞療法 遺伝子改変技術

1. 研究開始当初の背景

がんに対する抗体療法として、大腸がんに対する cetuximab、乳がんに対する trastuzumab、非ホジキンリンパ腫に対する rituximab などが開発されている。これらの抗体療法は臨床的有効性を示す優れた治療法であるが、未だ多くの不奏功例や再発症例が認められる。その原因の一つとして、免疫細胞上に発現する FcR の遺伝子多型による抗体親和性の違いが報告されている。抗体療法においては免疫細胞、特に NK 細胞による ADCC 活性が腫瘍細胞傷害の重要な作用機序であり、ADCC 活性の強さは抗体と FcR の結合親和性に依存している。従って、低親和型の FcR を発現するがん患者では抗体療法の効果は弱く、逆に高親和型 FcR の患者では強力な効果を示すと考えられている。そこで、免疫細胞の FcR 親和性を高めることによりがんに対する抗体療法の治療効果を増強できることが期待されている。

2. 研究の目的

低親和型 FcR の遺伝子多型を有するヒトリンパ球に高親和型 FcR を遺伝子導入することにより、がんに対する抗体療法の効果を増強させることができるか、という点について検証する。その結果、がん患者の FcR 遺伝子多型情報に基づいて免疫細胞を遺伝子改変することで、現在の抗体療法の治療効果を増強することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高親和性 FcR を遺伝子導入するためのレトロウイルスベクターを作製する。当該ベクターは FcR 遺伝子多型の中で、高親和性を有する塩基配列をコードすると同時に、eGFP を発現するユニットを有するものを設計し、遺伝子導入細胞が eGFP 陽性細胞として分離できるようにする。コントロールとして低親和性 FcR と eGFP を発現するベクターも同様に作製する。

(2) 健常人ボランティア 20 例以上から末梢血単核球を採取して FcR 遺伝子多型を解析し、

低親和性 FcR を有するドナーを同定する。

(3) 低親和性 FcR を有するドナーの NK 細胞を分離、培養し、高親和性 FcR 発現ベクターを遺伝子導入する。コントロールとして低親和性 FcR 発現ベクターを導入する細胞群も作製する。遺伝子導入細胞を eGFP 陽性細胞としてセルソーターにて分離、採取し、それらの抗 CD20 抗体 (rituximab) に対する親和性を FACS にて検討する。

(4) 高親和性 FcR あるいは低親和性 FcR を遺伝子導入した NK 細胞を rituximab 存在下で CD20 陽性腫瘍細胞と共培養し、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性、および IFN- γ 産生能を検討する。

4. 研究成果

(1) レトロウイルスベクターによる発現システムを用いて、高親和性 FcR 遺伝子をコードするプラスミドと低親和性 FcR 遺伝子をコードするプラスミドを作製した (図 1)。それぞれ、自己切断型リンカー配列である 2A ペプチドを介して eGFP 蛍光蛋白をコードし、FcR 遺伝子が導入された細胞では eGFP を発現するように設計した。



図 1. 作製した FcR 発現プラスミドの構造

(2) 健常人ボランティア 26 名から末梢血単核球を採取し、genomic DNA を分離した後に FcR 遺伝子の塩基配列をシーケンサーにて解析した。その結果、低親和性 FcR 遺伝子をホモ接合で有するものが 13 例 (50%)、高親和性 FcR 遺伝子をホモ接合で有するものが 2 例 (8%)、低親和性 FcR 遺伝子と抗親和性 FcR 遺伝子をヘテロで有するものが 11 例 (42%) であった。

(3) 低親和性 FcR を有するドナーの末梢血単核球から CD56 陽性 NK 細胞を分離し、膜型 IL-15 と 4-1BB ligand を発現する K562 細胞

と IL-2 存在下で共培養した。増殖した NK 細胞に高親和性 FcR 発現もしくは低親和性 FcR 発現レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、遺伝子発現細胞を eGFP 陽性細胞としてセルソーターにて採取した。遺伝子導入効率は約 60%、ソーティング後には 90% 以上が遺伝子導入細胞であった。高親和性 FcR を遺伝子導入された NK 細胞の rituximab に対する結合性は、低親和性 FcR を遺伝子導入された NK 細胞のそれよりも明らかに高いことが FACS 解析にて示された (図 2)。

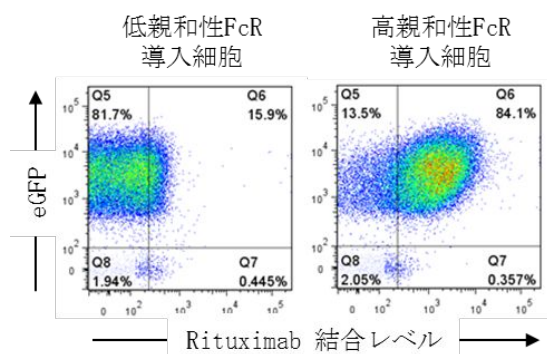


図 2 . FcR 導入NK細胞における抗体結合性

(4) 高親和性 FcR あるいは低親和性 FcR を遺伝子導入した NK 細胞を rituximab 存在下で CD20 陽性腫瘍細胞と共培養し、腫瘍細胞に対する傷害活性を ⁵¹Cr 放出試験により検討したところ、高親和性 FcR を発現する NK 細胞は低親和性 FcR を発現する NK 細胞より有意に高い傷害活性を示した。また、同様の条件において、培養上清中の IFN- γ 産生を検討したところ、高親和性 FcR 発現 NK 細胞で有意に高い産生が認められた (図 3)。

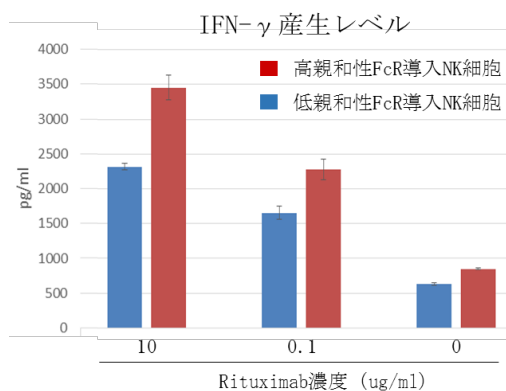


図 3 . FcR 導入NK細胞における IFN- γ 産生能

(5) まとめ : 以上の研究成果より、低親和性 FcR を発現する NK 細胞に高親和性 FcR を遺伝子導入することで、腫瘍細胞に対する抗体依存性の反応性が亢進することが示された。このことから、遺伝子多型により低親和性 FcR を有するがん患者において、高親和性 FcR を遺伝子導入したNK細胞を作製し投与することで抗体医薬の治療効果が向上する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Kano Y, Iguchi T, Matsui H, Adachi K, Sakoda Y, Miyakawa T, Doi S, Hazama S, Nagano H, Ueyama Y, Tamada K., Combined adjuvants of poly(I:C) plus LAG-3-Ig improve anti-tumor effects of tumor-specific T cells preventing their exhaustion., *Cancer Sci.*, 査読有、107(4)、2016、398-406
DOI:10.1111/cas.12861.

Adachi K, Tamada K., Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy., *Cancer Sci.*, 査読無、106(8)、2015、945-50
DOI:10.1111/cas.12695.

[学会発表] (計 16 件)

玉田耕治、がん治療に向けた次世代型 CAR-T 細胞療法の開発、第 15 回日本再生医療学会総会、日本免疫治療学研究会ジョイントシンポジウム(招待講演) 2016 年 3 月 18 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

玉田耕治、腫瘍免疫と免疫チェックポイント阻害療法、第 28 回北海道癌治療研究会(招待講演) 2016 年 2 月 27 日、アスティ 45 (北海道札幌市)

玉田耕治、最新がん免疫療法の潮流と将来展望、第 103 回日本肺癌学会関西支部学術集会 (招待講演) 2016 年 2 月 20 日、薬業年金会館 (大阪府大阪市)

玉田耕治、造血器悪性腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の進展と将来展望、第 24 回広島悪性リンパ腫研究会 (招待講演) 2015 年 11 月 28 日、ホテルメルパルク広島 (広島県広島市)

玉田耕治、がん免疫療法の分子・細胞メカニズム解析:さらなる進展を目指して、第 44 回日本免疫学会学術集会 (招待講演) 2015 年 11 月 20 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

玉田耕治、造血器悪性腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の進展と将来展望、第 26 回山口血液疾患研究会 (招待講演) 2015 年 11 月 16 日、山口グランドホテル (山口県山口市)

玉田耕治、免疫チェックポイント阻害療法の基礎と臨床、第 76 回福岡がん化学療法研究会 (招待講演) 2015 年 11 月 11 日、福岡センタービル (福岡県福岡市)

玉田耕治、免疫療法が切り開くがん治療の新時代、第 1 回 Immuno-Oncology Forum (招待講演) 2015 年 8 月 22 日、第一ホテル東京 (東京都港区)

玉田耕治、Next generation CAR-T cells endowed with a superior survival and migration potential、第 21 回日本遺伝子治療学会 (招待講演) 2015 年 7 月 24 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

玉田耕治、Immune checkpoint mechanisms by PD-L1/PD-1 and its related molecular interactions、第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 ESMO/JSMO Joint Symposium (招待講演) 2015 年 7 月 17 日、ロイトン札幌 (北

海道札幌市)

玉田耕治、がん治療に向けた次世代型 CAR-T 細胞療法の開発、第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 CAT-T cell therapy seminar (招待講演) 2015 年 7 月 17 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)

玉田耕治、Novel technology to advance chimeric antigen receptor T cells for cancer immunotherapy、がん免疫療法・マクロファージ国際会議 2015 (国際学会) 2015 年 7 月 10 日、東京大学 伊藤謝恩ホール (東京都文京区)

玉田耕治、がん免疫療法の最前線 - 抗 PD-1 抗体を中心に -、第 19 回日本がん分子標的治療学会 (招待講演) 2015 年 6 月 12 日、松山全日空ホテル (愛媛県松山市)

玉田耕治、がん免疫療法の進歩 - 基礎的分野から -、第 114 回日本皮膚科学会学術総会 (招待講演) 2015 年 5 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

玉田耕治、がん免疫チェックポイント阻害療法、そしてその先へ、第 36 回癌免疫外科研究会 (招待講演) 2015 年 5 月 15 日、奄美観光ホテル (鹿児島県奄美市)

玉田耕治、がん免疫療法の最新研究 - 抗体療法と細胞療法 -、第 55 回日本呼吸器学会 (招待講演) 2015 年 4 月 18 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

[図書] (計 0 件)

[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://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 耕治 (TAMADA, Koji)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00615841

(2) 研究分担者

岡 正朗 (OKA, Masaaki)

山口大学・学長

研究者番号：70144946

佐古田 幸美 (SAKODA, Yukimi)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30629754

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし