

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670467

研究課題名(和文) がんに対する抗体療法と細胞療法とのクロストーク治療法の開発

研究課題名(英文) Development of anti-cancer cross-talk therapy using antibody and cell therapy

研究代表者

安川 正貴 (Yasukawa, M)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60127917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんに対する抗体療法の抗腫瘍効果は抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性に依存している。ADCCは細胞表面に発現しているCD16を介してNK細胞が担っており、T細胞にはCD16発現が陰性であるのでADCC活性がない。本研究では、CD16-CD3zキメラ遺伝子を作製し、活性化CD8陽性T細胞に導入した。このCD16-CD3z-T細胞は抗体存在下で高いADCC活性を示すことがin vitroで明らかとなった。さらに、CD16-CD3z-T細胞と抗体併用療法は、ヒト腫瘍を移植した免疫不全マウスを用いたin vivo実験系でも高い抗腫瘍効果が示された。

研究成果の概要(英文)：The antibody therapy against malignancies depends on antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). ADCC is mediated by NK cells expressing CD16 on their cell surface; however, T cells cannot exert any ADCC activity, since they are negative for CD16 expression. In this study, we attempted to produce CD16-CD3z chimeric gene and to transduce it into activated CD8-positive T cells. CD16-CD3z T cells showed high ADCC activity in the presence of antibody in vitro. In addition, it was shown that the combination therapy of CD16-CD3z T cells and antibody against the cell surface molecule of malignant cells exerted anti-tumor activity in human tumor-transplanted immune-deficient mice.

研究分野：内科学、血液学、免疫学、感染症学

キーワード：がん免疫療法 細胞傷害性T細胞 ADCC活性 キメラ遺伝子 CD16

1. 研究開始当初の背景

がんに対する抗体療法は新規治療法として脚光を浴び、様々な新規薬剤が開発されている。抗体療法の殺細胞効果において、ADCCは重要である。ADCCは免疫グロブリンのFc部分に対するレセプターCD16(Fc RIII)を介して、エフェクター細胞が抗体結合細胞を特異的に認識して殺傷する。この役割を担っているのがNK細胞とマクロファージであり、CD4ならびにCD8陽性T細胞はCD16を発現しておらず、ADCCには全く関与していない。また、がん患者では化学療法などの影響でNK細胞が十分に機能しないことが多く、エフェクター細胞機能低下の克服が重要な課題である。このような学術的背景を踏まえ、本研究では、CD16を強制発現させたADCCを発揮できる人工エフェクターT細胞を作製し、その抗体投与時の抗腫瘍増強効果を *in vitro* ならびに *in vivo* で検証することを計画した。

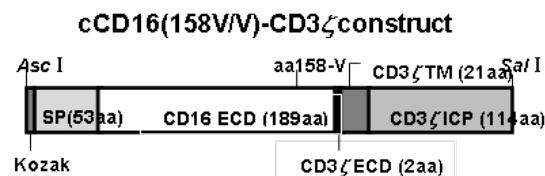
2. 研究の目的

現在、様々な悪性腫瘍に対する抗体療法が開発され、がんの治療成績向上に貢献している。抗体薬は大きく、補体依存性細胞傷害(Complement-Dependent Cytotoxicity: CDC)と抗体依存性細胞傷害(Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity: ADCC)活性の2つの機序で、標的細胞を排除する。最近、ADCC活性を増強させる技術開発によって、ADCCによる殺細胞効果の増強が図られている。しかし、ADCCを発揮できる細胞はNK細胞とマクロファージに限られており、いかに、これらの細胞をがん局所に集積させるかが、大きな課題となっている。本研究は、がん抗体療法におけるこの重要な課題を克服するため、ADCCを発揮でき、さらに腫瘍局所に集積できる人工エフェクターT細胞を作製し、その臨床効果を実験的に証明しようとするものである。

3. 研究の方法

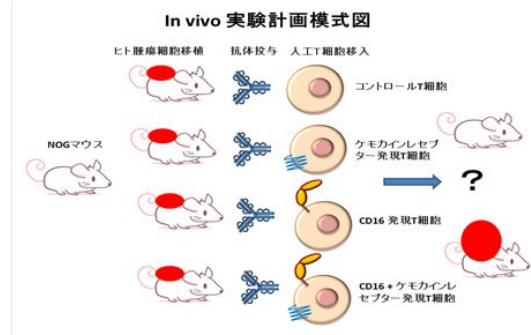
本研究計画・方法の骨子は以下のとおりである。

1. CD16(Fc RIII)とTCRシグナル伝達ドメイン融合タンパク質発現ベクターの構築: CD16(Fc RIII)とCD3 ζ との融合遺伝子(CD16-CD3 ζ)を構築し、そのレトロウイルス発現ベクターを作製する。



2. CD16-CD3 ζ 遺伝子改変T細胞のADCC機能獲得の検証: 種々の抗体添加、非添加時の細胞傷害活性増強効果を *in vitro* 実験系で比較検討する。

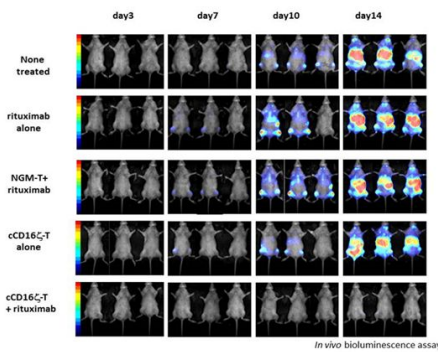
3. ヒト腫瘍移植免疫不全マウスを用いたCD16-CD3 ζ 遺伝子改変T細胞の *in vivo* 抗腫瘍効果の検証: B細胞性悪性リンパ腫抗CD20抗体(rituximab)、乳がん-抗HER2/neu抗体(trastuzumab)、成人T細胞性白血病抗CCR4抗体(mogamulizumab)の組み合わせで抗腫瘍効果を *in vivo* で検討する。



4. 研究成果

CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子発現ベクターを作製し、抗体療法とCD16-CD3 遺伝子改変人工T細胞輸注との併用による新規がん免疫細胞療法を開発する目的で研究を遂行し、下記の結果が得られた。まず、CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子発現レトロウイルスベクターを構築した。CD16-CD3 遺伝子発現レトロウイルスベクターをCD8陽性T細胞に遺伝子導入し、その機能を解析した。その結果、CD20陽性悪性リンパ腫細胞ならびにHer2/neu陽性乳がん細胞に対して、それぞれ rituximab および trastuzumab 添加時に高いADCC活性を呈することが *in vitro* ならびに *in vivo* 実験系で明らかとなった(図1)。さらに、成人T細胞白血病細胞に対するmogamulizumabの抗腫瘍効果の向上も確認できた。また、T細胞活性化シグナルドメインを組み込んだ第2世代ならびに第3世代ベクターの作製も完了し、第1世代ベクターに比べ機能的優位性が示された。これらの研究成果から、それぞれの抗体特異的なCAR遺伝子を作製することなく、すべての抗体療法にCD16-CD3 キメラレセプター遺伝子改変T細胞輸注療法を併用することにより、高い抗腫瘍効果が得られることが示された。

図1. CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子導入CD8陽性T細胞と抗CD20抗体同時投与による抗B細胞性悪性リンパ腫効果



従来のがん特異的 TCR 遺伝子治療の効果をさらに向上させる目的で、上記研究で作製した CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子と hTERT 特異的 TCR 遺伝子を同時発現させた CTL の抗腫瘍効果を検討した。多くの ATL 細胞は hTERT ならびに CCR4 を発現している。そこで、hTERT-TCR と CD16-CD3 同時発現 CTL の抗 CCR4 抗体 mogamulizumab 添加時の抗 ATL 効果をそれぞれ単独発現 CTL と比較検討した。その結果、hTERT-TCR と CD16-CD3 同時発現 CTL は mogamulizumab 添加時に hTERT-TCR、CD16-CD3 それぞれ単独発現 CTL に比べて極めて高い殺細胞効果を発揮した。この結果から、TCR-T と CAR-T 遺伝子治療の併用は、従来の単独治療と比較してより高い抗腫瘍効果が期待できることが示された。

TCR-T 療法や CAR-T 細胞療法の課題は、いかに輸注後の T 細胞疲弊を防止し、体内での生存期間を延長させるという事である。この課題を克服する目的で、輸注後に疲弊を来さない新規 T 細胞レセプター遺伝子改変 T 細胞療法の開発を行った。つまり、WT1-TCR 遺伝子をヒト CD34 陽性造血幹細胞に遺伝子導入し、HLA トランスジェニック NSG マウスに移植した。その結果、WT1 特異的 TCR 遺伝子をヒト造血幹細胞に遺伝子導入することで、WT1 特異的 HLA-A24 拘束性細胞傷害機能を有するヒト CTL がマウス体内で分化増殖することが示された。この CTL は HLA 拘束性にヒト白血病を殺傷することが示された。これらの成果から、Graft-versus-host disease (GVHD) に依存しなく Graft-versus-leukemia (GVL) 効果のみ期待できる新規造血幹細胞移植療法が可能であり、TCR-T 療法の課題である T 細胞疲弊を克服できる可能性が示された。

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 14 件)

1. Tanaka H, Fujiwara H, Ochi F, Tanimoto K, Casey N, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Sugiyama T, Barrett J, Yasukawa M.: Development of engineered T cells expressing a

chimeric CD16-CD3 receptor to improve the clinical efficacy of mogamulizumab therapy against adult T cell leukemia. *Clin Cancer Res.* 2016. in press. 査読有

2. Suzuki J, Maruyama S, Tamauchi H, Kuwahara M, Horiuchi M, Mizuki M, Ochi M, Sawazaki T, Zhu J, Yasukawa M, Yamashita M.: Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the Th1 program in activated CD4 T cells. *Immunology* 147:476-487, 2016. doi: 10.1111/imm.12580 査読有
3. Najima Y, Tomizawa-Murasawa M, Saito Y, Watanabe T, Ono R, Ochi T, Suzuki N, Fujiwara H, Ohara O, Shultz LD, Yasukawa M, and Ishikawa F.: Induction of WT1 specific human CD8+ T cells from human HSCs in HLA class I Tg NOD/SCID/IL2r γ KO mice. *Blood* 127:722-734, 2016. doi: 10.1182/blood-2014-10-604777 査読有
4. Yamanouchi J, Hato T, Kunishima S, Niiya T, Nakamura H, and Yasukawa M.: A novel MYH9 mutation in a patient with MYH9 disorders and platelet size-specific effect of romiplostim on macrothrombocytopenia. *Ann Hematol.* 94:1599-1600, 2015. doi: 10.1007/s00277-015-2416-x 査読有
5. Ochi T, Nakatsugawa M, Chamoto K, Tanaka S, Yamashita Y, Guo T, Fujiwara H, Yasukawa M, Butler MO, and Hirano N.: Optimization of T-cell reactivity by exploiting TCR chain centrality for the purpose of safe and effective antitumor TCR gene therapy. *Cancer Immunol Res.* 3:1070-1081, 2015. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0222 査読有
6. Fujiwara H, Ochi T, Ochi F, Miyazaki Y, Asai H, Narita M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, and Yasukawa M.: Antileukemia multifunctionality of CD4+ T cells genetically engineered by HLA class I-restricted and WT1-specific T-cell receptor gene transfer. *Leukemia* 29:2393-2401, 2015. doi: 10.1038/leu.2015.155. 査読有
7. Onishi S, Adnan E, Ishizaki J, Miyazaki T, Tanaka Y, Matsumoto T, Suemori K, Shudou M, Okura T, Takeda H, Sawasaki T, Yasukawa M, and Hasegawa H.: Novel autoantigens associated with lupus nephritis. *PLoS One* 10:e0126564, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0126564 査読有
8. Rowan AG, Suemori K, Fujiwara H, Yasukawa M, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham C.: Cytotoxic T lymphocyte

- lysis of HTLV-1 infected cells is limited by weak HBZ protein expression, but non-specifically enhanced on induction of Tax expression. *Retrovirology* 11:116, 2014. doi: 10.1186/s12977-014-0116-6 査読有
9. Ochi, F., Fujiwara, H., Tanimoto, K., Asai, H., Miyazaki, Y., Okamoto, S., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., Barrett, J., Ishii, E. and Yasukawa, M.: Gene-modified human α/β -T cells expressing a chimeric CD16-CD3 ζ receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy. *Cancer Immunol Res.* 2:249-262, 2014. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0099-T 査読有
 10. Ohkubo N, Matsubara E, Yamanouchi J, Akazawa R, Aoto M, Suzuki Y, Sakai I, Abe T, Kiyonari H, Matsuda S, Yasukawa M, Mitsuda N.: Abnormal behaviors and developmental disorder of hippocampus in zinc finger protein 521 (ZFP521) mutant mice. *PLoS One* 9:e92848, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0092848. 査読有
 11. Yamanouchi J, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M.: Dramatic and prompt efficacy of Helicobacter pylori eradication in the treatment of severe refractory iron deficiency anemia in adults. *Ann Hematol.* 93:1779-1780, 2014. doi: 10.1007/s00277-014-2052-x. 査読有
 12. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Sato Y, Onishi S, Yasukawa M.: Development of exogenous FVIII-specific inhibitor in a mild haemophilia patient with Glu272Lys mutation. *Haemophilia* 20:e179-182, 2014. 査読有
 13. 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 cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol.* 7:3, 2014. doi: 10.1186/1756-8722-7-3. 査読有
 14. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Azuma T, and Yasukawa M.: Severe immune thrombocytopenia secondary to Waldenström's macroglobulinemia with anti-GPIb/IX monoclonal IgM antibody. *Ann Hematol.* 93:711-712, 2014. doi: 10.1007/s00277-013-1857-3 査読有
- Kageyama, Tetsuya Nishida, Seitara Terakura, Makoto Murata, Hiroshi Fujiwara, Yoshiki Akatsuka, Hiroaki Ikeda, Yoshihiro Miyahara, Daisuke Tomura, Ikuei Nukaya, Kazutoh Takesako, Nobuhiko Emi, Masaki Yasukawa, Naoyuki Katayama, Hiroshi Shiku. Adoptive Transfer of WT1-Specific TCR Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. American Society of Hematology 2015 Annual Meeting. 2015, 12, 4 オーランド (アメリカ合衆国)
2. Hiroaki Ikeda, Yasushi Akahori, Motohiro Yoneyama, Yuki Orito, Yoshihiro Miyahara, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Fujiwara, Masaki Yasukawa, Hiroshi Shiku. Immunotherapy with Chimeric Antigen Receptor Targeting Intracellular WT1 Gene Product Complexed with HLA-A*24:02 Molecule. American Society of Hematology 2015 Annual Meeting. 2015, 12, 4 オーランド (アメリカ合衆国)
 3. Nicholas Casey, Hiroshi Fujiwara, Kazushi Tanimoto, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kiyotaka Kuzushima, Hiroshi Shiku, Masaki Yasukawa. Targeting Aurora Kinase with a Superior T-Cell Receptor Gene-Transfer Vector American Society of Hematology 2015 Annual Meeting. 2015, 12, 4 オーランド (アメリカ合衆国)
- [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://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.med1/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
安川 正貴 (Yasukawa, Masaki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60127917

[学会発表](計 3 件)

1. Isao Tawara, Masahiro Masuya, Shinichi