

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591973

研究課題名(和文) CTLと制御性T細胞の同時機能調節と分化抑制による、癌特異的CTL細胞療法の樹立

研究課題名(英文) Establishment of cancer antigen-specific CTL therapy by a concomitant functional regulation of CTL and regulatory T cell and an inhibition of T cell differentiation

研究代表者

村田 聡 (Murata, Satoshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90239525

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)：がんだけを殺傷する患者リンパ球(がん特異的CTL)を効率よく体外で育て、体内へ戻すCTL細胞療法の開発研究を行った。

がん抗原と、リンパ球刺激作用のあるOX40によりT細胞を培養すると、がん特異的CTLが効率よく誘導できた。制御性T細胞抑制作用も併せ持つOX40を前投与した担癌マウスに、CTLを細胞移入すると、免疫抑制状態を打ち破り、CTLが長期間機能維持し、腫瘍拒絶した。がん特異的CTLの効率的な作成に、IL-21やB7-DCも有力候補だとわかった。ヒトリンパ球からも、抗原(HA)特異的CTLがOX40刺激により効率よく誘導できた。今後、がん患者に対するCTL細胞療法へ応用できると考えます。

研究成果の概要(英文)：We have done the research to develop the efficient cancer-specific CTL therapy, which was to generate CTLs ex vivo and to transfer them into patients.

Cancer-specific CTLs were efficiently generated when T cells were cultured with a cancer antigen and OX40 costimulation that could enhance the effector T cell function. When these cancer-specific CTLs were adoptively transferred into the tumor-bearing mice pretreated with OX40 costimulation that could also inhibit the regulatory T cell function, CTLs could overcome immune tolerance condition, maintain its function, and finally eliminate tumor. IL-2 and/or B7-DC proved to be important molecules that could contribute to the generation of effective CTLs.

Human lymphocytes from the volunteers could generate antigen (HA)-specific CTLs when cultured with an antigen and OX40 stimulation. From these findings, we believe that cancer-specific CTL therapy treated with costimulatory molecules can be applied in a clinical setting in future.

研究分野：外科腫瘍学、腫瘍免疫、

キーワード：腫瘍免疫 免疫治療 癌ワクチン T細胞補助刺激 細胞治療 養子免疫 CTL

1. 研究開始当初の背景

癌ワクチン療法や細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 療法などがヒト癌免疫治療に臨床応用されてきたが、未だ満足のいく臨床成果は得られていない。生体では癌抗原 (自己抗原) に対する免疫寛容 (トレランス) が働くために、ワクチンのみでは癌抗原特異的 CTL の誘導が難しく、多くの場合 CTL はアナジーに陥りアポトーシスを起こすと考えられる。また、*in vitro* で癌抗原特異的 CTL を作製し細胞移入しても、生体のトレランス機能に負け CTL 機能が抑制され抗腫瘍作用を失ってしまう。したがって、免疫トレランスを打ち破る方法の開発が、ヒト癌免疫治療を成功へと導く鍵となる。

CTL 細胞療法の場合、免疫トレランスを打破して抗腫瘍効果を増強するには、

1) 癌抗原に高い特異性をもつ CTL を樹立する事、

2) 細胞移入する CTL 機能を高めると同時に、移入された担癌生体内でも増殖できる能力を保持させる事、さらに、

3) 担癌生体の免疫トレランスを調節している制御性 T 細胞の機能を抑制する環境を作り出す事だと考えている。

我々は腫瘍抗原 (HER2/neu) に対する免疫トレランスが成立したマウスモデルにおいて、TNF Receptor Family の一つで T 細胞の補助刺激因子である OX40 (CD134) を介するシグナルを作用させると、CTL がトレランスに打ち勝って誘導され、アポトーシス抑制蛋白が増加しアポトーシスが抑制され、かつ、強い抗腫瘍効果を発揮することを示した (Murata S, et al. *J Immunol*, 2006)。

また、この OX40 シグナルは CD4⁺ ヘルパー T 細胞を介してだけでなく、CD8⁺ T 細胞 (CTL) にも直接作用し、CTL を直接的に機能増強することを見いだした (Murata S, et al. *J Immunol*, 2006)。

さらに、免疫トレランスの維持に重要な働きを持つ制御性 T 細胞 (Treg) に OX40 シグナルが入ると、Treg の抑制作用に不可欠な転写因子 Foxp3 の発現が減弱し、Treg がその抑制機能を失い、その結果 CTL の抗腫瘍効果が増強することを *in vitro*, *in vivo* で初めて示した (Kitamura N, et al. *Int J Cancer*, 2009)。

また、腫瘍抗原ペプチドによる腫瘍抗原特異的 CTL を培養誘導する課程で、agonistic な作用を持つ anti-OX40 抗体を加えると、腫瘍抗原特異的 CTL 数が飛躍的に増加し、担癌マウスにこの CTL 細胞移入を行うと、OX40 刺激を受けた CTL は OX40 刺激を受けていない CTL に比べて、担癌マウス生体内で長期間抗腫瘍機能を維持し腫瘍を退縮させることを示した (Murata S. *AACR, 2010 in Washington*

D.C.)。

さらに、CTL 細胞移入を受ける前に、担癌マウスに anti-OX40 抗体を投与しておく、Treg 機能が抑制され、移入した CTL の抗腫瘍機能が増強維持されることも示した (Ueki T, et al. *Mol Med Rep*, 2009)。

今回、さらに強力な抗腫瘍効果をもつ CTL 細胞治療を開発するため、CD8⁺ T 細胞の分化に着目した。

IL-2 や IL-15, IL-21 のサイトカインは CD8⁺ T 細胞に作用し、その増殖を促進する。T 細胞の増殖の際に、IL-2 に比して、IL-15, IL-21 はより T 細胞の分化を抑えた状態で増殖を促進し、生体内投与において IL2 よりも IL21 で刺激した CD8⁺ T 細胞のほうが分裂能を保持し、より強い抗腫瘍効果を示すことが報告されている (Hinrichs CS, et al. *Blood* 111:5326-33,2008)。

IL-2 で刺激した T 細胞を生体内に移入しても、すでに十分に分化しているため、移入された生体内で T 細胞は分裂増殖できず、すみやかに apoptosis を生じると考えられる。

移入した担癌生体内でさらに分裂増殖し十分な抗腫瘍効果を得るための CTL は、より未分化な腫瘍抗原特異的 CD8⁺ T 細胞が適当であると考えられる

2. 研究の目的

これらの研究結果を踏まえ、OX40 補助刺激因子のもつ、**担癌生体の制御性 T 細胞の機能抑制作用と CTL 増殖作用とアポトーシス抑制作用**に着目し、さらに、IL-21 のもつ CD8⁺ T 細胞の分化抑制作用に着目した。

両者を利用することで癌抗原特異的 CTL が担癌生体内で免疫トレランスに打ち勝ち、抗腫瘍免疫機能を強く長く維持できる CTL 細胞治療法の樹立を**第 1 の目的**とする。

さらに、ヒト癌免疫細胞治療に応用するため、ヒト癌に特異的で免疫トレランスに打ち勝つ能力を備えたヒト癌抗原特異的 CTL を効果的に樹立したと考えている。大腸癌に特異的な 4 種類の癌抗原ペプチドワクチンを接種したヒト大腸癌患者末梢血から、その患者の癌抗原特異的 CTL を誘導したいと考えている。

抗腫瘍エフェクター T 細胞に対して機能増強作用をもち、かつ、T 細胞抑制機能を持つ制御性 T 細胞 (Treg) に対して機能抑制作用をもつ、極めて抗腫瘍免疫に都合良く、ユニークな働きのある OX40(CD134)を利用し、さらに CTL の分化を抑制する働きのある IL-21 を利用して、効果的にヒト大腸癌特異的 CTL 細胞を樹立することを研究の**第 2 の目的**とする。

3. 研究の方法

1) 癌抗原特異的 CTL が免疫トレランス状態の担癌生体内で長期間機能を維持できる細胞治療法を樹立するために、エフェクターT細胞機能を増強する一方、制御性T細胞の抑制機能を減弱する働きのあるOX40の補助刺激作用を利用する。

IL-21 のもつ T 細胞分化抑制作用も利用する。

担癌生体の制御性T細胞機能をOX40刺激で抑制した状態で、OX40刺激により機能増強しIL-21刺激により分化抑制されたCTLを細胞移入すると、CTLはアポトーシスが抑制され、分裂能が維持され、免疫トレランスを打ち破り抗腫瘍免疫効果が増強することを、免疫寛容マウスモデルで証明する。

2) 効果的にヒト癌特異的 CTL 細胞を樹立するために、

ボランティア末梢血からHA特異的ヒトCTLがOX40補助刺激とIL-21により効果的に誘導できることを確かめる。

大腸がん患者末梢血から大腸癌抗原特異的ヒトCTLを、癌特異性の高い癌抗原ペプチドとOX40補助刺激、IL-21を利用して、効果的に誘導する。

さらに、大腸がんペプチドワクチンを受けている大腸癌患者血液から、大腸癌特異的CTLが誘導できることを示す。

3) 研究の追加として、T細胞補助刺激さようのあるB7-familyのB7-DC(PD-L2)に着目し、CTL細胞治療への応用を計画した。

B7-DCはT細胞の補助刺激因子で、通常、樹状細胞などの抗原提示細胞上に発現し、T細胞上のレセプターと結合して、T細胞の活性化を補助する。

一方で、活性化したT細胞上には、program death 1(PD-1)レセプターが誘導され、B7-DCと結合することで、T細胞はアポトーシスへと誘導される。

このPD-1への結合能を減弱させ、T細胞を活性化する正の刺激のみの作用を意図したmutant-type B7-DCの作成を行った。

さらに抗原提示細胞上に提示されるようにhumanのFcを融合したfusion proteinを作成した。

Original B7-DCの塩基変異を行ったプラスミド作成し、CHO細胞を用いたmutant-type B7-DC-Fc fusion protein 安定産生株を樹立し、in vivo 実験ができる多量の蛋白を精製した。

このmutant-type B7-DC-Fc fusion protein を用いて、担癌マウスへのワクチン増強作用を確かめた。

さらに、Original B7-DCの免疫治療への応用の可能性を調べるため、Original B7-DC=Fc

の作成を行った。

mutant-typeと同様に、Original B7-DC-Fcのプラスミド作成し、CHO細胞を用いたoriginal-type B7-DC-Fc fusion protein 安定産生株を樹立し、in vivo 実験ができる多量の蛋白を精製した。

これらのfusion proteinを用いて、腫瘍抗原ワクチンの免疫作用増強作用と抗腫瘍効果増強作用の有無を確かめ、CTL細胞治療への応用へ利用できるかどうかを調べた。

4. 研究成果

1) 癌抗原特異的CTLが免疫トレランス状態の担癌生体内で長期間機能を維持できる細胞治療法を樹立するために、エフェクターT細胞機能を増強する一方、制御性T細胞の抑制機能を減弱する働きのあるOX40の補助刺激作用を利用した。

腫瘍抗原ペプチド(RNEU⁴²⁰⁻⁴²⁹)をT2Dq細胞(抗原提示細胞)にパルスし、HER2/neu発現NT腫瘍接種とHER2/neuワクチン接種を受けたマウス脾細胞よりNylon woolカラムで分離したT細胞と接触し2日間培養した。

RNEU⁴²⁰⁻⁴²⁹特異的CD8+T細胞を誘導し増殖させた後、CD8+T細胞を分離した。この分離CD8+T細胞中には、約3%のRNEU⁴²⁰⁻⁴²⁹特異的CD8+T細胞が産生されていることを、細胞内IFN-染色(ICS)にて確かめた。

この約3%のRNEU420-429特異的CD8+T細胞を含むCD8+T細胞を、NT腫瘍接種を受け担癌状態になったマウスに、 6×10^7 個を養子移入した。

養子移入6日目に、レシピエント脾臓中には0.5%のRNEU⁴²⁰⁻⁴²⁹特異的CD8+T細胞がICSにより検出可能であり、この実験系によりCTL細胞治療における移入CTLのレシピエント内での評価が可能であることがわかった。

このwild-typeマウスを用いた系で、担癌生体の制御性T細胞機能をOX40刺激で抑制した状態で、OX40刺激により機能増強したCTLを細胞移入すると、CTLはアポトーシスが抑制され、分裂能が維持され、抗腫瘍免疫効果が増強することを、非免疫寛容マウスモデルで証明した。

評価は腫瘍径の測定と、レシピエント脾臓細胞におけるRNEU420-429特異的CD8+T細胞を細胞内INF-染色(ICS)でおこなった。

次に、OX40補助刺激因子のもつ、担癌生体の制御性T細胞の機能抑制作用とCTL増殖作用とアポトーシス抑制作用に加え、IL-21のもつCD8+T細胞の分化抑制作用に着目し、両者を利用することで癌抗原特異的CTLが担癌生体内で免疫トレランスに打ち勝ち、抗腫瘍免疫機能を強く長く維持できるCTL細胞治療ができないかと考え、IL-21実験へと進んだ。

IL-21刺激下で腫瘍抗原特異的CTLを誘導

すると、長期間分裂能を維持した CTL が誘導された。

OX40 と IL-21 を併用して、腫瘍抗原特異的 CTL を誘導する際の、至適濃度調整を繰り返し施行しているところであるが、明確な結論は出ていない。

マウス (FVB/N) モデルで、腫瘍ペプチドと OX40 補助刺激と IL-21 刺激下で誘導された腫瘍抗原特異的 CTL が、OX40 補助刺激で制御性 T 細胞抑制処置されたレシピエント担癌マウスに細胞移入されると、アポトーシスが抑制され、かつ、分裂能を維持した CTL が、レシピエント内で長期間維持され、強い抗腫瘍効果を示すことを示す予定である。

さらに、腫瘍抗原 (HER2/neu) に対しての免疫寛容マウスモデル (HER2/neu transgenic mouse (neu-N)) を用いて行い、OX40 刺激と IL-21 刺激を受けた CTL が、腫瘍抗原に対する免疫寛容状態を打ち破ってその機能が維持され、抗腫瘍効果を発揮することを試みているが、至適条件を模索している段階である。

2) ヒト癌免疫細胞治療に応用するため、まず、ヒトインフルエンザウイルス抗原 (HA) 特異的 CTL を誘導する際に、OX40 補助刺激を加えた。

これにより、高頻度に HA 特異的 CTL が樹立できた。

さらに、IL-21 刺激を加えることにより、CTL の抗原刺激による分裂能が維持され、アポトーシス抑制タンパクが高発現することを確認しているところである。

この結果を受け、大腸癌特異的癌抗原ペプチドと OX40 補助刺激と IL-21 の使用により、ヒト大腸癌患者末梢血単核球から、生体内で長く機能を発揮できる、ヒト大腸癌抗原特異的 CTL の樹立を予定している。

3) 癌抗原ペプチドから癌抗原特異的 CTL の効果的な樹立を目指して、B7-DC の作用が利用できないかどうかを検証した。

CTL 細胞治療法に用いる T 細胞補助刺激因子として mutant-type B7-DC-Fc fusion protein を作成した。

B7-DC (PD-L2) は T 細胞の補助刺激因子で、通常、樹状細胞などの抗原提示細胞上に発現し、T 細胞上のレセプターと結合して、T 細胞の活性化を補助する。

一方で、活性化した T 細胞上には、program death 1 (PD-1) レセプターが誘導され、B7-DC と結合することで、T 細胞はアポトーシスへと誘導される。

mutant-type B7-DC-Fc は PD-1 との結合が抑制され、刺激作用のみが T 細胞へと届くように改変された B7-DC 変異分子に、human の Fc を融合した fusion protein である。

この T 細胞刺激因子の mutant-type B7-DC-Fc fusion protein による、ワクチン増強作用をマウスの in vitro と in vivo 実験で確認した。

1) 担癌 FVB マウスへの腫瘍抗原ワクチン接種に加え、mutant-B7-DC-Fc の T 細胞補助刺激因子を投与することにより、腫瘍は完全に拒絶され、ワクチンの抗腫瘍効果は増強した。

2) ワクチン + m-B7-DC-Fc 治療マウスの脾臓には、腫瘍抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) が増加していた。

3) さらに、ワクチン + m-B7-DC-Fc 治療を受けた担癌マウスの腫瘍局所にも、腫瘍抗原特異 CTL が増加していた。

4) ワクチン + m-B7-DC-Fc は、腫瘍局所の CD8T 細胞における PD1 発現を減弱させる作用があった。腫瘍局所における、疲弊 T 細胞の割合が少なくなると考えられた。

5) また、mutant-B7-DC-Fc は Th1 サイトカイン分泌を増強させることもわかった。

6) mutant-B7-DC-Fc は腫瘍抗原ワクチンの抗腫瘍免疫作用を増強し、腫瘍局所へ腫瘍抗原特異的 CTL を集積させて、抗腫瘍効果が得られることがわかった。

7) original-B7-DC-Fc は、T 細胞の活性化作用があるが、同時に、PD-1 とも結合し、T 細胞をアポトーシスへと導く作用があると考えられている。

B7-DC を IgG と結合させた分子は T 細胞を活性化させる作用が強いとの報告もある。変異のない original-B7-DC-Fc を作成するために、2 塩基の変異を戻したプラスミド作成し、CHO 細胞を用いた、original-B7-DC-Fc 産生安定株を作成し、original-B7-DC-Fc を抽出した。

癌抗原ワクチンとともに担癌マウスに投与すると、極めて強力な抗腫瘍効果とワクチン作用増強効果を認めた。

さらに、mutant-type B7-DC-Fc と original type との作用を比較し、腫瘍抗原特異的 CTL の効果的な樹立への応用を計画している。

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 2 件)

Surgery-Induced Peritoneal Cancer Cells in Patients Who Have Undergone Curative Gastrectomy for Gastric Cancer. Takebayashi K, Murata S, Yamamoto H, Ishida M, Yamaguchi T, Kojima M, Shimizu T, Shiomi H, Sonoda H, Naka S, Mekata E, Okabe H, Tani T.

Ann Surg Oncol. 21(6): 1991-7, 2014.
査読有り
DOI: 10.1245/s10434-014-3525-9.

Fusion protein of mutant B7-DC and Fc enhances the antitumor immune effect of GM-CSF-secreting Whole-cell vaccine.
Kojima M, Murata S, Mekata E, Takebayashi K, Jaffee EM, Tani T.
J Immunother 37 (3) : 147-154, 2014.
査読有り
DOI: 10.1097/CJI.0000000000000025

〔学会発表〕(計 5 件)

小島正継、村田聡、寺本和雄、目片英治、竹林克土、児玉泰一、PhamMinh Ngoc、小笠原一誠、谷 徹
Absorption removal of LAP positive cells from human ascites with cancer treatment column
第 69 回日本消化器外科学会
2014 年 7 月 16 日-2014 年 7 月 18 日
福島県郡山市

Satoshi Murata, Katsushi Takebayashi, Hiroshi Yamamoto, Mitsuaki Ishida, Tsuyoshi Yamaguchi, Sachiko Kaida, Tomoharu Shimizu, Hisanori Shiomi, Hiromichi Sonoda, Shigeyuki Naka, Hidetoshi Okabe, Tohru Tani
Curative surgery for gastric cancer induces peritoneal metastasis
第 73 回日本癌学会学術総会
2014 年 9 月 25 日-2014 年 9 月 27 日
横浜市

村田聡、竹林克土、塩見尚礼、仲成幸、赤堀浩也、山本寛、山口剛、貝田佐知子、清水智治、園田寛道、太田裕之、目片英治、石田光明、岡部英俊、谷 徹
The source of cancer cells in peritoneal metastasis after pancreatic surgery for pancreas cancer.
第 52 回日本癌治療学会
横浜市

小島正継、村田聡、竹林克土、三宅亨、北村直美、植木智之、目片英治、谷 徹
B7-DC 補助刺激を用いた抗腫瘍免疫治療に関する研究
日本癌免疫学会
2013 年 7 月 3 日-2013 年 7 月 5 日
宇部市

Masatsugu Kojima, Satoshi Murata, Eiji Mekata, Tohru Miyake, Hiromichi Sonoda, Tohru Tani.
Fusion protein of mutant B7-DC and Fc enhances the anti-tumor immune effect of GM-CSF secreting whole-cell vaccine.

第 72 回日本癌学会学術総会
2013 年 10 月 3 日-2013 年 10 月 5 日
横浜市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田 聡 (MURATA, Satoshi)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 90239525

(2)研究分担者

谷 徹 (TANI, Tohru)
滋賀医科大学・医学部・その他(特任教授)
研究者番号 : 20179823

来見 良誠 (KURUMI, Yoshimasa)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 70205219

清水 智治 (SHIMIZU, Tomoharu)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 70402708

三宅 亨 (MIYAKE, Tohru)
滋賀医科大学・医学部・その他(客員助教)
研究者番号 : 70581924