

## 16-18 各種がん免疫療法の開発と臨床的有効性の評価に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 若杉 尋

### 研究成果の要旨

1. ヒトおよびマウス NKT 細胞の効率的増殖法を開発した。2. NK 並びに NKT 細胞療法の臨床応用に向けた細胞培養条件の最適化を試みた。実現可能性の高い細胞培養施設運営マニュアルを作成し、より治験薬 GMP に近い培養体制を構築した。3. TRAIL 受容体(DR5)に対するアゴニスト抗体(MD5-1)が、TRAIL 感受性腫瘍の転移を抑制した。抗 CD40 抗体(FGK45)及び抗 4-1BB 抗体(3H3)と抗 DR5 抗体の三者を併用することにより相乗的な抗腫瘍効果が得られた。4. mHAg エピトープの同定を連鎖解析法にて成功し、新規マイナー組織適合抗原、Cathepsin H の同定も行った。5. BCG-CWS による TLR2/4 刺激は MyD88 アダプター経路を選択的に活性化し、CTL を誘導した。CTL 誘導に必要な樹状細胞 cross-priming に polyI:C 依存性の TLR3 経路が関与することを示した。肺癌切除後の症例と再発症例に対する BCG-CWS による免疫療法は予後を改善させることを示した。6. 抗 GITR 抗体(DT-1)の投与は腫瘍免疫を惹起した。制御性 T 細胞と活性化 T 細胞を区別できる単クローン抗体の作製を試み、抗体 TH6 を得た。

| 研究者名および所属施設                           | 分担研究課題                     |
|---------------------------------------|----------------------------|
| 研究者名 所属施設および職名<br>若杉 尋 国立がんセンター研究所 部長 | NK T細胞療法および有効なモニター法の開発     |
| 高上 洋一 国立がんセンター中央病院 部長                 | 細胞免疫療法の開発研究                |
| 八木田秀雄 順天堂大学医学部免疫学講座 助教授               | モノクローナル抗体による抗腫瘍免疫の誘導と増強    |
| 高橋利忠 愛知県がんセンター 総長                     | ヒトマイナー抗原の同定と養子免疫療法への応用     |
| 高見康二 大阪成人病センター呼吸器科 参事兼医長              | BCG-CWS による基本免疫療法の基礎的臨床的研究 |
| 坂口志文 京都大学再生医学研究所 生体機能調節学分野 教授         | 制御性 T 細胞の操作による腫瘍免疫の誘導の研究   |

## 総括研究報告

### 1 研究目的

Innate-acquired immunity システムを総合的に効率よく組織化した効果的な各種がん免疫療法の開発を行い、同時に臨床的有効性の評価法の確立を行うことを本研究の目的とする。

### 2 研究方法

本研究は、ヒトの生体試料の採取を伴う時、検体採取の行われる当該研究機関において、倫理審査委員会の承認のもと行われた。また実験動物を用いた研究は同様に当該機関における動物実験に関する指針に従って行われ、当該機関の動物実験倫理委員会規定に基づき、実験の種類毎に倫理委員会の許可の元に行われた。

### 3 研究成果

1. (若杉)  $\alpha$ -GalCer による  $V\alpha 24$  陽性細胞の増殖は、G-CSF 投与によって誘導された CD34 陽性幹細胞から分化してくるのではなく、もともと末梢血中に流れている循環血液中の  $V\alpha 24$  陽性細胞が増殖しているものと考えられた。CD56 陽性細胞を除去することで、 $V\alpha 24$  陽性 NKT 細胞の増殖効率の改善を認めた。また精製した  $V\alpha 24$  陽性細胞と、精製した CD14 陽性細胞とを共培養することで、 $V\alpha 24$  陽性 NKT 細胞の増殖効率は著明に改善した。マウス脾細胞を  $\alpha$ -GalCer および IL-2 の存在下で 4 日間培養することによってマウス  $V\alpha 14$  陽性 NKT 細胞は約 15 倍程度に増殖した。体外で増殖したマウス  $V\alpha 14$  陽性 NKT 細胞は NKT 細胞の典型的なマーカーの一つである NK1.1 の発現が認められなかった。NKT 細胞の特徴の一つである Th1 および Th2 サイトカインの両者の産生能は体外で増殖した  $V\alpha 14$  陽性 NKT 細胞においても認められた。また、Scid マウスに移植後、肝臓および脾臓などの末梢組織に移住した。 $\alpha$ -GalCer の投与によって Scid マウスに移住した NKT 細胞は速やかに大量の IFN- $\gamma$  および IL-4 を産生した。2. (高上) 担がん患者の末梢血を用いた場合には、NKT 細胞の増加率並びに絶対数は健常者細胞を用いた場合よりも低いことが明らかとなった。この担がん患者で NKT 細胞の培養効率が低い原因のひとつとして、以下に示すように単球上の CD1d の発現低下が挙げられた。今後、固層化 CD1d 分子を用いた培養など、新たな方法を検討する必要がある。NKT 細胞培養に適した培養液の開発研究では、異なる培地間での増殖効率の差が予想以上に大

きいことが明らかとなった。細胞調整室の管理マニュアルを作成し、それに基づいた作業環境改善効果を評価した。マニュアル導入前と比べ、細胞調整室のクリーン度並びに作業手順の質が格段に向上した。3. (八木田) 新たに作製したマウス TRAIL 受容体 (DR5) に対するアゴニスト抗体 (MD5-1) が、毒性を示すことなく、TRAIL 感受性腫瘍の転移を抑制し、また、一過性に皮下腫瘍の退縮を引き起こすのみならず、Fc 部位を介した宿主抗原提示細胞の動員により二次的に腫瘍特異的な CTL を誘導して、TRAIL 抵抗性変異体をも排除しうることを見出した。宿主の抗原提示細胞を活性化する抗 CD40 抗体 (FGK45) 及び CD8 陽性 CTL の活性化を増強する抗 4-1BB 抗体 (3H3) と抗 DR5 抗体の三者を併用することにより相乗的な抗腫瘍効果が得られ、各抗体単独では不可能であった巨大な皮下腫瘍塊の完全退縮が可能であることが明らかとなった。また、乳がん細胞株 (4T1) の同所移植後の多臓器自然転移モデルにおいても三者併用によって完全寛解が認められた。さらに、methylcholanthrene で誘発した原発腫瘍に対しても CTL の誘導と完全退縮が可能であることが明らかとなった。4. (高橋) HLA-A24 および B44 拘束性 mHA<sub>g</sub> エピトープ (ACC-1, ACC-2) の同定を世界で初めて連鎖解析法にて成功した。両エピトープはともに抗アポトーシス作用を持つ BCL2A1 産物上に存在しており、異なるアミノ酸多型部位 (ACC-1 は 19 番目、また ACC-2 は 82 番目) に位置していた。女性ドナーから男性患者への移植においては H-Y 抗原を標的としたアロ反応が惹起される。これまでに同定された mHA の約半数は H-Y 抗原であり、これらは全て open reading frame (ORF) 上にコードされている。今回我々は、TMSB4Y の 5'非翻訳領域 (UTR) 上にコードされる新規 H-Y 抗原遺伝子として TMSB4Y 同定した。HLA-A\*3303 および HLA-A\*3101 拘束性の新規マイナー組織適合抗原、Cathepsin H を同定した。5. (瀬谷、研究協力者) BCG-CWS による TLR2/4 刺激は MyD88 アダプター経路を選択的に活性化し、CTL を誘導した。MyD88 KO マウスで抗がん CTL は誘導されなかった。一方、polyI:C による TLR3 刺激は TICAM-1 (TRIF) アダプター経路を活性化し、CTL を誘導した。TICAM-1 KO マウスで抗がん CTL は誘導されなかった。この結果と樹状細胞の刺激実験から、CTL 誘導に必要な樹状細胞 cross-priming には上記 2 つ以上 (複数) の TLR 経路が関与することが判明した。NK 活性化も樹状細胞の TLR を介して誘導される。移植がん退縮に関与するアダプター分子は MyD88 ではなく TICAM-1 であった。(高見) 肺癌切除後の BCG-CWS による補助免疫療法と

、肺癌術後のリンパ節再発症例に対する BCG-CWS の有効性に関して検討した。肺癌治癒切除後の患者 89 例 (IA:25, IB:12, IIA:8, IIB:14, IIIA:27, IIIB:3) を対象とし BCG-CWS 免疫療法を行い、比較対象として同時期の大阪府立成人病センター肺癌治癒切除症例 614 例 (IA:275, IB:149, IIA:18, IIB:72, IIIA:75, IIIB:22, IV:3) を用いた。StageIB, IIA, IIIA では BCG-CWS の有効性は明らかでなかったが、StageIA では、BCG-CWS 施行群で予後良好である結果が得られ、StageIIB でも同様の傾向であった。IIIA 期で免疫療法群の 2-3 年目の生存がコントロール群を上回り、進行肺癌での QOL の向上に寄与している可能性が示された。肺癌治癒切除後の BCG-CWS による補助免疫療法は予後を改善させる可能性があると考えられた。次に肺癌手術後再発例に対する検討を行い、肺癌切除後の鎖骨上窩リンパ節再発症例に対する放射線 and/or 化学療法後の維持療法としての BCG-CWS による免疫療法は予後を改善させる可能性があることを見いだした。6. 抗 GITR 抗体の抗腫瘍効果を検討した。制御性 T 細胞に高発現する GITR 分子を ligation すると、抑制が解除される。またこの抗体は、エフェクター T 細胞の活性も増強する。実際 DTA-1 抗体の投与は、腫瘍接種後でも腫瘍免疫を惹起するのに有効であった。制御性 T 細胞に高発現する GITR のリガンドである GITR-L について、その機能を解析した。GITR-L をレトロウイルスベクターにより腫瘍に発現させたところ、有効な腫瘍免疫応答を惹起できた。制御性 T 細胞と活性化 T 細胞を区別できる単クローン抗体の作製を試み、マウス制御性 T 細胞に対してそのような特異性を持つ抗体 TH6 を得た。TH6 の投与により、マウスの進行癌に対し有効な腫瘍免疫応答を惹起できた。さらに、担癌マウスより調整した T 細胞を試験管内で腫瘍細胞により刺激・活性化し、TH6 陽性 T 細胞を除去の後担癌マウスに移入すると、除去しない群に比較して、高率に腫瘍の拒絶、縮小が見られた。TH6 抗体の認識する分子として 4 型葉酸受容体を同定した。

#### 4 倫理面への配慮

研究方法の項に同じ。個人情報および診療情報の保護については匿名化の後、各当該機関の個人情報管理者により厳重に保管される。

#### 研究成果の刊行発表

別紙研究成果の刊行に関する一覧表を参照のこと。