

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591664

研究課題名（和文）難治性癌に対する GITRL-Fc 融合蛋白発現腫瘍による新規腫瘍細胞ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of a novel cellular vaccine of GITRL-Fc expressing tumor cells for treatment of patients with advanced malignancy

研究代表者

池田 裕明（IKEDA HIROAKI）

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40374673

研究成果の概要（和文）：GITRL-Fc 遺伝子発現腫瘍細胞株を用いた腫瘍細胞ワクチン療法、GITRL-Fc 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを用いた遺伝子治療において、腫瘍局所の GITRL-Fc は抗腫瘍免疫を増強することを示した。ヒト腫瘍抗原 MAGE-A4 に特異的な T 細胞レセプター遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いてがん患者 T 細胞に体外で導入し患者に輸注する、進行期食道癌に対する遺伝子改変 T 細胞輸注療法臨床試験を開始した。インテグリン刺激と CD4 T 細胞のヘルプが、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞のマルチファンクション性獲得と生存性を向上させることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Tumor cell vaccine expressing GITRL-Fc and gene therapy with adenovirus encoding GITRL-Fc were found to be effective in cancer immunotherapy. We started a clinical trial with TCR-gene modified T cells that express MAGE-A4-specific TCR for patients with advanced esophageal cancer. Stimulation through integrin molecules and CD4 T cell-help were found to enhance multifunctionality and survival of tumor specific CD8+ T cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：GITRL、GITRL-Fc、抗腫瘍免疫、T 細胞マルチファンクション性、制御性 T 細胞、T 細胞移入療法、遺伝子療法、siTCR ベクター

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞自身が極めて有効な癌ワクチンそのものと成り得ることは腫瘍免疫学の発達に伴い強く認識されてきている。その最大の利点は、腫瘍由来の多数の抗原のソースとなることであり、それにより多層的な免疫反応

を誘導し腫瘍を攻撃・排除し、同時にエスケープ腫瘍の発生を抑制できる点である。また腫瘍抗原の同定も理論的には不要である。最近、破壊された腫瘍細胞は多くの腫瘍抗原を提供すると共に(Boon ら、Annu Rev Immunol 2006)、HMGB1 等腫瘍由来の内因性 toll-like

receptor リガンドを放出し、自然免疫系、獲得免疫系双方を刺激することが報告され注目されている (Apetoh ら、Nature Med 2007)。このことは、腫瘍細胞が単に多くの未同定腫瘍抗原のソースである以上に癌ワクチンとして優れた資材であることを示唆している。

しかし、腫瘍由来自己抗原は末梢におけるエフェクターT細胞の機能を強力に抑制する CD4⁺Foxp3⁺ Treg を誘導することが知られている (Sakaguchi ら、Immunol Rev 2001)。癌患者における腫瘍内の Treg 浸潤と患者の予後不良との相関は詳細に検討され (Curiel ら、Nature Med 2004)、応募者らは腫瘍内の Treg と CD8⁺T細胞の比が卵巣癌患者の予後と相関することを示した (Sato ら、PNAS 2005)。したがって、Treg のコントロールが有効な腫瘍細胞ワクチンの開発には必須であると考えられる。

以上の知見を踏まえ、応募者らはこれまでの研究により腫瘍内 Treg を阻害することが判明した GITR を介した刺激を付与した新規腫瘍細胞ワクチン開発の検討に着手した。

2. 研究の目的

- (1) 我々の開発したマウスモデルを用いて、GITRL-Fc 遺伝子導入腫瘍細胞ワクチンの腫瘍治療における有用性を検討する。我々はすでに腫瘍特異的 T 細胞移入療法、抗原ペプチドワクチン療法、抗体による治療法等のモデルを持っており、GITRL-Fc 遺伝子導入腫瘍細胞ワクチン単独療法だけでなく、これら治療法との併用効果についても検討する。またその際の抗腫瘍性免疫応答を T 細胞のマルチファンクショナル性解析法を用いて詳細に解析する。
- (2) アデノウイルスを用いた腫瘍への GITRL-Fc 導入法を開発し、患者各人の腫瘍を用いたテラーメイド型腫瘍細胞ワクチンを目指したマウスモデルを作製すると共に、アデノウイルスによる担癌生体の腫瘍内への GITRL-Fc 遺伝子の直接導入効果について検討する。
- (3) 我々は重度免疫不全マウスである NOG マウスを用いて、腫瘍抗原特異的ヒト T 細胞の移入療法によるヒト腫瘍細胞の治療モデル系を樹立した。この系を用いて、GITRL-Fc 遺伝子導入ヒト腫瘍細胞ワクチン及びアデノウイルスによる GITRL-Fc 腫瘍内導入の有用性を検討する。
- (4) 腫瘍特異的 T 細胞輸注療法の効果を改善する方法を開発し、TCR 改変 T 細胞輸注療法の臨床試験にその知見を応用する。

3. 研究の方法

- (1) GITRL-Fc 遺伝子導入腫瘍細胞ワクチンの腫瘍治療における有用性について、腫瘍細胞ワクチン単独療法の効果検討より始め、腫瘍特異的 T 細胞移入療法、抗原ペプチドワクチン療法、抗体による治療法等との併用効果について検討する。遺伝子導入に用いた腫瘍と同一腫瘍に対する効果を検討

した後に、近交系マウス由来他の腫瘍や、アロマウス由来腫瘍に対する効果を検討する。抗腫瘍性免疫応答をエフェクターT細胞のマルチファンクショナル性と Treg の解析に焦点を当てながら包括的に行う。

- (2) GITRL-Fc 発現アデノウイルスベクターを作製する。マウスの新鮮原発腫瘍への GITRL-Fc 遺伝子導入を行い、将来の患者由来自己腫瘍細胞ワクチンを念頭においたマウスモデルを作製する。また、アデノウイルスによる担癌生体の腫瘍内への GITRL-Fc 遺伝子の直接導入による治療効果について検討する。
- (3) 我々の開発した NOG マウスを用いたヒト腫瘍細胞の in vivo 免疫治療モデル系を活用し、GITRL-Fc 遺伝子導入ヒト腫瘍細胞ワクチン及びアデノウイルスによる GITRL-Fc の in vivo 腫瘍内導入によるヒト腫瘍治療の有用性を検討する。
- (4) Tg マウスを用いた腫瘍特異的 T 細胞輸注療法モデルを用いて、T 細胞輸注療法の効果を改善する因子を解明し、その知見を TCR 改変 T 細胞輸注療法の臨床試験に応用する為にヒト T 細胞を用いて検証する。

4. 研究成果

- (1) GITRL-Fc 遺伝子発現腫瘍細胞株を用いた腫瘍細胞ワクチン療法、あるいは GITRL-Fc 遺伝子を組み込んだアデノウイルス用いた遺伝子治療において、腫瘍局所に発現させた GITRL-Fc は抗原特異的 T 細胞の誘導相とエフェクター相の両相に働き、抗腫瘍免疫を増強することをマウスモデルを用いて示した。GITRL-Fc を腫瘍局所に発現することにより、腫瘍内の Treg が減少し、抗腫瘍性キラー T 細胞の腫瘍浸潤が増加した。(第 16 回日本遺伝子治療学会 2010)。
- (2) 新規開発 STAT3 阻害剤を用いて、担癌生体における免疫抑制状態を解除し得ることを見出した。本 STAT3 阻害剤と腫瘍特異的 T 細胞輸注療法の併用により強力な抗腫瘍効果を導き得ることを示した (CRI symposium 2010)。
- (3) ヒト腫瘍抗原 MAGE-A4 に特異的な T 細胞レセプター遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いてがん患者 T 細胞に体外で導入し増殖させた後に患者に輸注する、進行期食道癌に対する遺伝子改変 T 細胞輸注療法の臨床試験を三重大学において開始した。後に患者に輸注する、進行期食道癌に対する遺伝子改変 T 細胞輸注療法の臨床試験を三重大学において継続実施した。本治療法を実施した患者において、輸注に起因する有害事象は認められなかった。輸注細胞が長期にわたり患者体内に存在し、機能を維持していることが確認された (Cancer Sci 2012, 第 70 回日本癌学会学術総会他)。
- (4) CD4 陽性ヘルパー T 細胞が、腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞のマルチファンクショナル性獲得と生存性を向上させることを見出し、T 細胞輸注療法の際に CD4 陽性 T 細胞を活用す

ることの重要性とそのメカニズムを発見した。また、免疫療法を実施された患者体内のT細胞応答評価におけるマルチファンクション性の重要性を示した(第14回国際免疫学会 2010他)。

- (5) インテグリンVLA-4及び-5を介した刺激が腫瘍特異的CD8陽性T細胞の増殖、生存性、マルチファンクション性を向上し、輸注後の抗腫瘍効果を増強することを見出した(第70回日本癌学会学術総会他)。
- (6) 腫瘍特異的CD8陽性T細胞のPD-L1, -L2発現をsiRNAを用いて抑制することにより、T細胞の抗腫瘍効果を増強し得ることを示した(Gene Ther 2011)。
- (7) 腫瘍抗原に対する抗体を投与することにより、体内で抗原抗体複合体を形成し、抗腫瘍免疫応答を増強し得ることを示した(Cancer Res 2012)。

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 7 件)

1. Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H^{*}, Shiku H. T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gc^{null} mice. **Cancer Sci.** 103(1):17-25, 2012.査読有
2. Noguchi T, Kato T, Wang L, Maeda Y, Ikeda H, Sato E, Knuth A, Gnjjatic S, Ritter G, Sakaguchi S, Old LJ, Shiku H, Nishikawa H. Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy. **Cancer Res.** 72(7):1672-1682, 2012.査読有
3. Iwamura K, Kato T, Miyahara Y, Naota H, Mineno J, Ikeda H, Shiku H. siRNA-mediated silencing of PD-1 ligands enhances tumor-specific human T cell effector functions. **Gene Ther.** doi: 10.1038/gt.2011.185, 2011.査読有
4. Tsuchikawa, T, Ikeda H, Cho Y, Miyamoto M, Shichinohe, T, Hirano S, Kondo S. Association of CD8⁺ T cell infiltration in esophageal carcinoma lesions with HLA class I antigen expression and survival. **Clin**

Exp Immunol, 164(1):50-6, 2011.査読有

5. Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Kato I. Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by silencing of endogenous TCR. **Cancer Res.** 69(23):9003-11, 2009.査読有
6. Aoki M, Ueda S, Nishikawa H, Kitano S, Hirayama M, Ikeda H, Toyoda H, Tanaka K, Kanai M, Takabayashi A, Imai H, Shiraiishi T, Sato E, Wada H, Nakayama E, Takei Y, Katayama N, Shiku H, Kageyama S. Antibody responses against NY-ESO-1 and HER2 antigens in patients vaccinated with combinations of cholesteryl pullulan (CHP)-NY-ESO-1 and CHP-HER2 with OK-432. **Vaccine**, 7(49):6854-61, 2009.査読有
7. Imai N, Ikeda H, Tawara I, Wang L, Wang L, Nishikawa H, Kato T, Shiku H: GITR stimulation enhances multifunctionality of adoptively transferred tumor antigen-specific CD8⁺ T cells with tumor regression. **Cancer Sci.** 100 (7): 1317-1325, 2009.査読有

[学会発表] (計 17 件)

1. Hiroaki Ikeda, Naoko Imai, Hayato Hosoi, Makiko Yamane, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Shinichi Kageyama, Hiroshi Shiku: Gene-modified T cell therapy: Harnessing lymphocytes for effective cancer treatment. 第70回日本癌学会学術総会 招待講演 2011年10月3日 名古屋
2. Hiroaki Ikeda, Naoko Imai, Hayato Hosoi, Makiko Yamane, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Shinichi Kageyama, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku: ANTIGEN RECEPTOR GENE-MODIFIED LYMPHOCYTES: HARNESSING T CELLS FOR EFFECTIVE CANCER TREATMENT 第17回日本遺伝子治療

- 学会 2011 年次学術集会 招待講演 7 月 15-17 日 福岡
3. 池田裕明、今井奈緒子、細井勇人、山根真妃子、岡本幸子、峰野純一、竹迫一任、影山慎一、珠玖洋：「遺伝子改変 T 細胞輸注療法」 第 15 回日本がん免疫学会総会 招待講演 2011 年 6 月 30-7 月 1 日 大阪
 4. 池田裕明、今井奈緒子、王立楠、細井勇人、岡本幸子、峰野純一、影山慎一、珠玖洋：がん特異的 T 細胞輸注療法の新展開 第 31 回日本臨床薬理学会年会 招待講演 2010 年 12 月 1-3 日 京都
 5. Ikeda H, Okamoto S, Mineno J, Imai N, Kageyama S, Ito M, Yasukawa M, Takesako K, Shiku H: Gene-Modified Lymphocytes: Harnessing T Cells for Effective Cancer Treatment. International Society for Cell Therapy, 1st Asia-Pacific Regional Meeting, 招待講演 October 17-October 20, 2010, Miyazaki, Japan
 6. Hosoi H, Ikeda H, Hyuga C, Orito Y, Nukaya I, Enoki R, Mineno J, Takesako K, Kondo S, Shiku H: Interaction with fibronectin fragment (RetroNectin) on TCR stimulation enhances proliferation and survival of human peripheral T cells. CRI symposium 2010, October 6-October 8, 2010, NY, USA
 7. Ikeda H, Sugiyama D, Muraoka D, Imai N, Harada N, Akiyama Y, Asai A, Shiku H: A novel STAT3 inhibitor reverses tumor-associated immunosuppression and enhances the efficacy of adoptive T cell therapy of cancer. International Society of Biological Therapy of Cancer, Annual Meeting 2010, October 2-October 4, 2010, Washington D. C., USA
 8. Imai N, Ikeda H, Tawara I, Mori K, Yamane M, Wang L, Shiku H CD4⁺ T cell help on the induction of functional tumor-specific CD8⁺ T cells with survival marker. 14th International Congress of Immunology, August 23, 2010, Kobe, Japan
 9. Ikeda H, Okamoto S, Mineno J, Imai N, Kageyama S, Ito M, Yasukawa M, Takesako K, Shiku H: GENE-MODIFIED LYMPHOCYTES: A TRANSLATIONAL BRIDGE TO EFFECTIVE T CELL THERAPY OF CANCER 第 16 回日本遺伝子治療学会総会 招待講演 2010 年 7 月 1-3 日 宇都宮
 10. 池田裕明、今井奈緒子、岡本幸子、峰野純一、影山慎一、珠玖洋：CD8⁺細胞傷害性 T 細胞の制御によるがん免疫療法 第 20 回日本サイトメトリー学会学術集会 招待講演 2010 年 6 月 26 日~27 日 東京
 11. Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Kato I: Specific silencing of endogenous TCR with siRNAs in human lymphocytes improved

expression and anti-tumor reactivity of transduced tumor-specific TCRs. 24th Annual Meeting of iSBTc, October 29-31, 2009, Washington, D.C., USA

12. Ikeda H, Okamoto S, Mineno J, Imai N, Ito M, Yasukawa M, Takesako K, Shiku H: Adoptive immunotherapy for cancer with genetically engineered T cells 「遺伝子改変 T 細胞移入療法」第 71 回日本血液学会学術集会 招待講演 2009 年 10 月 23-25 日 京都
13. Mitsui J, Ikeda H, Hosoi H, Mineno J, Kato I, Kondo S, Shiku H: Multistage activation of tumor-specific CD8⁺ T cells by intratumor secretion of GITRL-Fc 「GITRL-Fc 分泌型融合蛋白の腫瘍内発現による腫瘍特異的 T 細胞の多層的活性化機構」第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 日 横浜
14. Imai N, Ikeda H, Tawara I, Mori K, Yamane M, Wang L, Shiku H: CD4⁺ T cells play a critical role in the induction of multifunctionality of tumor-specific CD8⁺ T cells resulting in effective tumor eradication. CRI symposium 2009, September 30-October 2, 2009, NY, USA
15. Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Kato I: Improved expression and anti-tumor reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of

endogenous TCR. CRI symposium 2009, September 30-October 2, 2009, NY, USA

16. Mizuno Y, Ikeda H, Shirakura Y, Hiasa A, Hyuga C, Wang L, Imai N, Sato E, Ito M, Yu S, Mineno J, Kato I, Shiku H: A critical role for the multifunctionality of anti-tumor human T cells in TCR gene therapy evaluated in an *in vivo* model utilizing NOG mice. CRI symposium 2009, September 30-October 2, 2009, NY, USA
17. 池田裕明、三井 潤、峰野純一、加藤郁之進、珠玖 洋: GITRL-Fc 分泌型融合蛋白の腫瘍内発現による腫瘍抗原特異的 T 細胞の活性化機構. 第 13 回日本がん免疫学会総会 2009 年 6 月 24-25 日 小倉

[図書] (計 12 件)

1. Ikeda H. Gene-modified lymphocytes: from caution to promise for effective cancer immunotherapy. **Immunotherapy**. 4(3):4 pages:241-4, 2012
2. 珠玖洋、原田直純、池田裕明: 複合的がん免疫療法 ドラッグデリバリーシステムの**新展開II**: 128-135 シーエムシー出版 2012
3. Ikeda H, Shiku H. Antigen-receptor gene-modified T cells for treatment of glioma. **Glioma: Immunotherapeutic approaches**. Chapter 17:1-14, <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/5299/> 2011

4. 今井奈緒子、池田裕明、珠玖洋：がん抗原 **がん生物学イラストレイテッド** 第6章がんと免疫:260-268 羊土社 2011
5. 池田裕明、珠玖洋：がんワクチン療法 **日本臨床** 69(9):1530-1533, 2011
6. 池田裕明：がん特異的 T 細胞輸注療法の新展開 **臨床薬理** 42(3):135-136, 2011
7. 池田裕明：遺伝子改変 T 細胞療法 -CTL- **がん免疫療法 —実用化へのチャレンジ—** シーエムシー出版 第 10 章 11 ページ：104-114, 2010
8. 池田裕明、今井奈緒子、珠玖洋：遺伝子改変 T 細胞・DNA ワクチンによるがん治療 **日本臨床増刊号 遺伝子診断学 (第 2 版)** 68 巻増刊号 8:634-640, 2010
9. 今井奈緒子、池田裕明、岡本幸子、峰野純一、珠玖洋：CD8⁺細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の制御によるがん免疫療法 —T 細胞輸注療法を中心に— **SURGERY FRONTIER** 17(3)：65-70, 2010
10. 池田裕明、珠玖洋：内科学総論 病因・病態 感染、免疫、アレルギー、「免疫異常」 内科学書 改訂第 7 版 6 ページ 中山書店 2009 年発行
11. 池田裕明：がんワクチンの展望 細胞移入療法とがんワクチン —効果的な複合的免疫両方の開発— **最新医学** 2009 年 11 月号 Vol. 64, No. 11: 2420-2427.

12. 池田裕明、珠玖洋：がん免疫応答の分子機構 CD8⁺細胞障害性 T 細胞の制御による抗腫瘍免疫増強 (養子免疫療法・蛋白ワクチン) **実験医学** 2009 年 9 月号 Vol. 27, No. 14: 2176-2184.

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 1 件)

名称：T 細胞の機能増強方法
発明者：珠玖洋、池田裕明、岩村康一、峰野純一、加藤郁之進、
権利者：国立大学法人三重大学、タカラバイオ株式会社
種類：PTC 特許
番号：PCT/JP2010/053666
出願年月日：2010 年 3 月 6 日
国内外の別：国際 (日本、米国、EP、中国)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.shikuken.jp/>

6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
池田 裕明 (Ikeda Hiroaki)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40374673
 - (2) 研究分担者
西川 博嘉 (Nishikawa Hiroyoshi)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・准教授
研究者番号：10444431