

学位論文題名

VLA-4またはVLA-5を介した刺激を加えた 癌特異的CD8陽性T細胞による輸注療法に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

癌特異的T細胞輸注療法は、癌特異的なT細胞を癌患者より採取・分離したり、あるいは癌細胞を特異的に認識するレセプター遺伝子を患者のポリクローナルなT細胞に導入し、これらのT細胞を体外で増殖・活性化させた後に患者に輸注する治療法であり、新規癌治療法として期待され、その有効性が研究されている。米国国立研究所のグループは、進行期悪性黒色腫患者を対象として、輸注細胞の増殖を促す為に患者を化学療法剤と放射線照射にて前処置をした後に癌浸潤リンパ球の輸注療法を行う臨床試験を行い、RECIST基準で52~72%という高い有効率を報告している。当研究室は、多くの癌種に腫瘍特異的T細胞輸注療法を可能とする一つの方法として、腫瘍抗原 Melanoma associated antigen-A4 (以下 MAGE-A4) を特異的に認識するT細胞レセプター (以下 TCR) 遺伝子を、レトロウイルスを用いてがん患者リンパ球に体外で導入した後に輸注する、遺伝子改変T細胞輸注療法の開発を行っている。

癌特異的T細胞輸注療法は、担癌宿主における免疫抑制環境下でのエフェクター細胞誘導の困難さや、抗腫瘍性エフェクター細胞数が腫瘍細胞数に比して少ないという癌免疫療法全般において頻繁に障害となるいくつかの問題の解決法となり得ると期待される。しかし一方で、体外で刺激し拡大培養したT細胞は、輸注後の生存、及び抗腫瘍効果が不十分と成り易いことが知られる。したがって、これらの問題を解決し、有効性を示すT細胞を体外で調整する技術の開発は今後の重要な課題である。本研究ではT細胞と細胞外マトリックスとの相互作用に関わり、細胞骨格や細胞内キナーゼを活性化することが知られるインテグリンを介したシグナルがT細胞の増殖、生存、エフェクター機能等に及ぼす影響を検討し、インテグリンを介した刺激を用いたT細胞の調整法を効果的な癌特異的T細胞輸注療法の開発に応用することを検討した。

【対象と方法】

同意を得た健常人由来の末梢血単核球 (以下 PBMC)、及びBALB/cマウス脾臓由来リンパ球を用いた。ヒトフィブロネクチン断片の組換えタンパク質であるCH-296(タカラバイオ社)を抗CD3抗体と共に培養プレートに固相化し、ヒト及びマウスリンパ球を刺激した。(1) T細胞の増殖を、トリパンブルー分染法と、CFSE標識した細胞のCFSEの希釈率分析により評価した。(2) T細胞のアポトーシスを、Annexin V、7-AADに対する抗体にて染色後陽性細胞率を分析することにより評価した。Annexin V(+) & 7-AAD(−)細胞を早期アポトーシス細胞、Annexin V(+) & 7-AAD(+)細胞を後期アポトーシス+ネクローシス細胞として評価した。(3) T細胞の再刺激時のエフェクター機能 [サイトカイン(IFN- γ 、TNF α)及びCD107a(細胞傷害性顆粒分泌マーカー)] の発現につき、細胞内サイトカイン染色の解析により評価した。単一細胞がこれら3つの機能のいくつを同時に発現するかで、T細胞のマルチファンクション性を評価した。(4) BALB/cマウス由来線維肉腫CMS5の腫瘍抗原(変異型ERK2)を認識するTCRトランスジェニック(以下 Tg)マウスであるDUC18 Tgマウス由来T細胞を用い、抗腫瘍効果を検討した。DUC18 Tgマウス由来T細胞をCMS5

担癌 3 日または 7 日後のマウスに輸注し、腫瘍径を経時に計測した。(5) 健常人 PBMC を抗 CD3 抗体刺激と共に CH-296 存在下または非存在下にて体外で 4 日間刺激培養し、MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入した。MAGE-A4 特異的 TCR 導入細胞を特異的テトラマーで検出し、テトラマー陽性細胞のアポトーシスを評価した。

【結果】

[ヒト T 細胞を用いた検討] 抗 CD3 抗体と CH-296 にて刺激した健常人 PBMC は、抗 CD3 抗体単独刺激に比較しより高い拡大増殖能が観察された。CH-296 による刺激は T 細胞のアポトーシスを抑え、細胞分裂能を高めていた。また、再刺激後のエフェクター機能について比較検討を行った結果、初期刺激時に CH-296 を付加し刺激した CD8⁺ T 細胞は再刺激時にマルチファンクション性が高い細胞の割合が増加していた。[マウス T 細胞を用いた検討] 抗 CD3 抗体と CH-296 にて刺激した BALB/c マウス脾臓由来リンパ球は、抗 CD3 抗体単独刺激に比べて T 細胞のアポトーシスが抑えられ、細胞分裂能が高まっていた。抗 CD3 抗体/CH-296 共刺激群によりマウス CD8⁺ T 細胞の細胞増殖や抗アポトーシス作用が高まる効果は、VLA-4 と VLA-5 に対する特異的ブロッキング抗体を添加することにより消失した。抗 CD3 抗体/CH-296 共刺激群に FAK 特異的リン酸化阻害剤 (PF-573228) を添加すると、CH-296 刺激による T 細胞の細胞分裂向上効果とアポトーシス抑制効果は消失した。担癌した BALB/c マウスに抗 CD3 抗体/CH-296 共刺激を用いて培養調整した DUC18 Tg マウス由来 T 細胞を輸注した結果、抗 CD3 抗体単独刺激を用いて培養調整した DUC18 Tg マウス由来 T 細胞を輸注した場合と比べ、より強い腫瘍増殖抑制効果を認めた。特に担癌 3 日目に輸注した場合では、抗 CD3 抗体/CH-296 共刺激を用いて培養調整した T 細胞を輸注したマウスでのみ、腫瘍増殖の完全な抑制が認められた。[癌特異的 TCR 遺伝子導入ヒト T 細胞を用いた検討] 抗 CD3 抗体/CH-296 共刺激調整された MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入ヒト T 細胞は、抗 CD3 抗体単独刺激にて調整された場合と比べてアポトーシスの誘導が抑えられていた。

【考察】

インテグリン分子群に属する VLA-4、VLA-5 を介した刺激を与えたヒト及びマウス CD8⁺ T 細胞で観察できた高い拡大増殖能は、本刺激が T 細胞のアポトーシスを抑えながら細胞分裂能を高めることによるものと推測された。VLA-4、VLA-5 を介した刺激を与えた DUC18 Tg マウス由来 CD8⁺ T 細胞は担癌生体に輸注された際に高い抗腫瘍効果を示したが、その機序としてはこれらの細胞が高い生存性とエフェクター機能を発現し得ること、特に腫瘍による免疫抑制環境を克服しうるマルチファンクション性を獲得したことによると推測された。本研究の臨床応用を考慮した場合に重要な点として、現在 T 細胞輸注療法の臨床研究ではほぼ必須と考えられているリンパ球を枯渇化させるような前処置を行わなくても、VLA-4、VLA-5 を介した刺激を加えた T 細胞を輸注した場合に腫瘍の退縮を認めたことが挙げられる。

【結論】

今回の研究で、腫瘍特異的 T 細胞の体外における初期培養調整時に VLA-4、VLA-5 を介した刺激を加えると、これらの T 細胞を担癌生体に輸注した場合の抗腫瘍効果を改善させることができた。我々はこれらの基礎データをもとに、将来的にはインテグリン刺激を用いて調整した T 紡錘形細胞を用いることにより癌患者に対するより有効な T 細胞輸注療法の開発につなげていきたいと考えている。

学位論文審査の要旨

主査 教授 今村 雅寛
副査 准教授 田中 淳司
副査 教授 清野 研一郎
副査 教授 平野 聰

学位論文題名

VLA-4またはVLA-5を介した刺激を加えた 癌特異的CD8陽性T細胞による輸注療法に関する研究

効果的な癌特異的T細胞輸注療法を行うには、細胞の数及び質(生存性や機能性)を保つことが必要と考えられている。十分な癌特異的T細胞数の確保には現状では体外における培養が必須であるが、体外での拡大培養、調製に伴いT細胞の質の低下が認められる。よって、有効なT細胞輸注療法を行うには細胞調製における細胞の質を決定する因子を解明し、その知見を利用した細胞調製法の改善が必要である。本研究ではインテグリンを介したシグナルがT細胞の増殖、生存、エフェクター機能に及ぼす影響を検討し、インテグリン刺激を用いてT細胞を調製することにより輸注後に効果的な抗腫瘍効果を示し得るかを検討した。インテグリン刺激にはヒト由来フィブロネクチン組み換え蛋白CH-296を使用した。

抗CD3抗体とCH-296にて刺激した健常人末梢血リンパ球は、抗CD3抗体単独刺激に比べ高い拡大増殖能が観察された。その理由としてCH-296による刺激はT細胞のアポトーシスを抑え、細胞分裂能を高めていることが明らかになった。また、再刺激後のエフェクター機能について検討を行った結果、初期刺激時にCH-296を付加したCD8⁺T細胞は再刺激時のマルチファンクション性が向上していた。次に、生体内における抗腫瘍効果検討のためマウスモデルを用いて初期刺激時にCH-296調製を受けたT細胞が輸注された場合の抗腫瘍効果を評価した。その前提としてヒト由来フィブロネクチン蛋白由来CH-296がヒト同様マウスT細胞に作用するかを、細胞増殖、アポトーシスにつき検討したところ、CH-296がマウスインテグリンにもヒト同様に作用することを確認した。また、VLA-4とVLA-5に対する特異的ブロッキング抗体とFocal Adhesion Kinase(FAK)特異的リン酸化阻害剤を用いてCH-296刺激がVLA-4、VLA-5を介して細胞内キナーゼFAKのリン酸化に関与していることを明らかにした。次に、BALB/cマウス由来線維肉腫CMS5の腫瘍抗原を認識するT細胞レセプター(TCR)トランスジェニック(Tg)マウス由来T細胞を用い、

それが示す抗原特異的反応と抗腫瘍効果を検討した。CH-296 を用いた初期刺激を加えた Tg マウス由来 CD8⁺T 細胞は CMS5 担癌 3 日または 7 日後のマウスに輸注された際、腫瘍径を経時的に計測した結果、CH-296 を用いずに調製した場合に比べ高い抗腫瘍効果を示した。最後に、CH-296 付加した初期刺激調製された癌精巣抗原 MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入ヒト T 細胞の培養 6 日目のアポトーシス検討を行ったところ、初期刺激に CH-296 による刺激を加えた群でアポトーシスが抑えられていた。

スライドを用いた口頭発表後、副査清野研一郎教授よりインテグリンが各種細胞に及ぼす作用に関する過去の論文等の知見について質問があった。また、刺激培養後のT細胞の分化について質問があった。次に、副査田中淳司准教授より高い抗腫瘍効果を示した抗CD3 + 抗CD28刺激群に関する解釈について質問があった。また、FAK阻害剤によって誘導された高いアポトーシスについて関与している可能性のあるFAK以外の経路について質問があった。続いて、副査平野 聰教授より輸注後のT細胞の生体内残存性の評価法について質問があった。また、担癌7日目のマウスマodelを用いた意義について質問があった。そして、CH-296が癌細胞の増殖能を向上させる可能性に鑑み、万が一CH-296が誤輸注される危険性とその対応策について質問があった。最後に、主査今村雅寛教授より今後CH-296初期刺激をヒトの臨床試験に応用する際にはエフェクター機能の向上によるサイトカインストーム等の重篤な副作用を起こす可能性について指摘があり、その際に考えられる対応策について質問があった。また、ヒトとマウスとのマルチファンクション性の程度が違う理由について質問があった。そして、VLA-5からの刺激が細胞増殖、抗アポトーシス作用に関与していない可能性について質問があった。

いずれの質問に対しても申請者は自らの研究内容やその過程で得られた知見、文献的考察を交えて概ね適切に回答した。

今回の研究で、VLA-4、VLA-5 を介した刺激が腫瘍特異的 T 細胞の増殖、生存、エフェクター機能、輸注による抗腫瘍効果を向上させることができたことが示された。また、この効果を T 細胞輸注療法の臨床試験に用いて、より効果的な治療法が開発される可能性が示唆された。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を授与されるのに充分な資格を有すると判定した。