

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860790

研究課題名(和文) 難治性小児急性骨髄性白血病に対するメソセリンを用いた新規細胞免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel mesothelin-specific immunotherapy for treating pediatric refractory acute myeloid leukemia

研究代表者

柳沢 龍 (YANAGISAWA, Ryu)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80532043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性骨髄性白血病に対する新規免疫療法の確立を目的としてメソセリンを標的とした細胞傷害性T細胞の樹立を試みた。末梢血単核球から得た単球をサイトカインの存在下にて1週間培養することで樹状細胞へと分化させた。さらに別のサイトカインカクテルとメソセリンペプチドによるStimulationを行うことで、メソセリン特異的細胞傷害性T細胞の誘導を試みた。本手法では効率的に細胞増殖を得ることは可能であったが、特異性については結果が一定しないことがあった。したがって高い特異性を安定して得るためには更なる工夫が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to generate mesothelin-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) for developing novel immunotherapy for treating refractory pediatric acute myeloid leukemia. We cultured monocytes from peripheral blood mononuclear cells in a cytokine mix for 1 week so that monocytes could differentiate into dendritic cells. Furthermore, we attempted to generate mesothelin-specific CTLs after stimulating T lymphocytes with mesothelin-peptide-pulsed dendritic cells and a cytokine mix. Although we were unable to effectively generate mesothelin-specific CTLs, we found variable specificity in the generated mesothelin-specific CTLs. We believe our method needs further improvements before it can be applied clinically.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：メソセリン 細胞傷害性T細胞 免疫療法 樹状細胞

### 1. 研究開始当初の背景

薬物療法の進歩により、小児急性リンパ性白血病(ALL)の5年生存率は90%に達しようとしているが、小児急性骨髄性白血病(AML)の5年生存率は60%前後と未だに十分な成績は得られてはいない。その原因は標準的な化学療法を行っているにもかかわらず治療抵抗性を示したり、一度は寛解に至ったにも関わらず再発するためである。こうした症例に対する造血幹細胞移植(HSCT)は現在、国内で標準的に実行可能な唯一有効性が証明された方法である。しかし、HSCTに伴う治療関連死や移植後再発が残された大きな課題である。一方、標準的治療(手術や抗がん剤、放射線)のみで治癒に至らないがん種に対して海外では様々な細胞免疫療法が施行されている。特に白血病領域で着目すべき治療は、再発 ALL に対して、ALL 細胞表面に発現する CD19 分子を標的とした人工 T 細胞受容体 (キメラ抗原受容体 chimeric antigen receptor; CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法である。AML に対しても、やや遅れて CD33 分子 (Dutour A, et al. 2012) や CD123 分子 (Tettamanti S, et al. 2013) を標的とした基礎的研究成果が相続して報告され、今後の臨床分野への応用が大変期待されている。こうした免疫療法の標的となる、がん抗原は実に様々なものが過去に報告されているが、近年、複数種のがんで過剰発現しているにも関わらず、正常細胞ではほとんど発現が認められていないメソセリンは新たながん抗原標的として特に注目されている (Moon EK et al. Clin Cancer Res. 2011, Lanitis et al. Mol Ther. 2012)。今まで主に膵臓がん、卵巣がん、肺がんなどを対象として基礎的な報告がなされるとともに、既に実際の臨床試験も行われている。成人領域で注目されているメソセリンは、小児 AML においても有用な標的となりうることでドイツのグループから報告された (Steinbach D, et al. 2007. Steinbach D, et al. 2006)。

### 2. 研究の目的

小児 AML に対して、メソセリンを標的として用い、国内で実施可能な手法で新規の免疫療法を確立しうるか検証する。

### 3. 研究の方法

通常の採血方法で得られた末梢血単核球から CD14 陽性細胞を磁気ビーズにて分離しサイトカインの存在下で樹状細胞に分化させた後、さらにサイトカインカクテル下のもと十分成熟させてからメソセリンペプチドとの反応を行う。その後、末梢血中リンパ球と別のサイトカインカクテル下で9日間の培養を行う。その後さらに1~2回の成熟樹状細胞とメソセリンペプチドによる刺激に加え、7日間の培養を行う。各がん抗原に対する特異性のスクリーニングはElispot法にて行うとともに、細胞内のIFN産生能をフローサ

イトメトリー法でも確認する。

### 4. 研究成果

小児 AML に対する新規免疫療法の確立を目的としてメソセリンを標的とした細胞傷害性 T 細胞の樹立を試みた。末梢血由来の単核球から CD14 陽性細胞を磁気ビーズにてポジティブセレクションを行い単球を選択的に分離した後、サイトカインと1週間混合培養することで樹状細胞へと分化させた。さらに別のサイトカインカクテルとメソセリンペプチドによる Stimulation を2回継続することで、メソセリン特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導を試みた。メソセリンに対する特異性は Elispot を用いて確認することとした。本手法では初回 stimulation 後にはほとんど細胞増殖が得られていないにも関わらず、2回目 stimulation 後にはほぼ全例で効率的に細胞増殖を得ることは可能であった。その一方で特異性の得られ方はまちまちで、同一ドナーにおいても結果が一定しないことがあった。したがって高い特異性を安定して得るためには更なる工夫が必要と考えられた。小児 AML では必ずしもメソセリンが高率に発現しているとは限らないが、あらかじめ免疫染色やフローサイトメトリーを用いて的確な症例を見出せば将来的には免疫療法の新たな一つの手法となりうる可能性があると考えられた。したがって更なる検証を継続するとともに、将来の臨床応用への可能性についても評価を行う予定である。

### 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 12件)

柳沢 龍, 村田マサ子, 坂下一夫, 下平滋隆, 石井栄三郎. 小児同種骨髄移植後 possible TRALI. 日本輸血細胞治療学会誌, 査読有 2016 in press.

Yanagisawa R, Takeuchi K, Kurata T, Sakashita K, Shimodaira S, Ishii E. Transfusion-related acute lung injury in an infantile patient. *Pediatr Int*, 査読有 2016 in press.

Yanagisawa R, Ogiso Y, Miyairi Y, Sakashita K, Shigeta H. Multinucleated giant cells in Langerhans cell histiocytosis. *Br J Haematol*, 査読有 2016 in press.

Koike Y, Yanagisawa R, Ogiso Y, Cho Y, Minami K, Takeuchi K, Sakashita K, Higuchi T. Transient Deformation of Neutrophils in Kawasaki Disease. *J Pediatr*, 査読有 2016 Mar 30. pii: S0022-3476(16)00287-0. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.02.065.

Komori K, Yanagisawa R, Fujihara I, Kanai H, Sakashita K. Failure to Thrive and Bilateral Periorbital Ecchymosis. *J Pediatr*, 査読有 2016 May;172:215-215.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.01.048.

Yanagisawa R, Shimodaira S, Sakashita K, Hidaka Y, Kojima S, Nishijima F, Hidaka E, Shiohara M, Nakamura T. Factors related to allergic transfusion reactions and febrile non-haemolytic transfusion reactions in children. *Vox Sang*, 査読有 2016 Jan 25. doi: 10.1111/vox.12373.

Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Saito S, Tanaka M, Shiohara M, Shimodaira S, Koike K. Intrathecal donor lymphocyte infusion for isolated leukemia relapse in the central nervous system following allogeneic stem cell transplantation: a case report and literature review. *Int J Hematol*, 査読有 2016 Jan;103(1):107-11. doi: 10.1007/s12185-015-1902-1.

Yanagisawa R, Noguchi M, Fujita K, Sakashita K, Sano K, Ogiso Y, Katsuyama Y, Kondo Y, Komori K, Fujihara I, Kitamura R, Hiroma T, Nakamura T. Preoperative Treatment With Pazopanib in a Case of Chemotherapy-Resistant Infantile Fibrosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 査読有 2016 Feb;63(2):348-51. doi: 10.1002/pbc.25733.

Fujihara I, Yanagisawa R, Fukushima Y, Komori K, Ogiso Y, Sakashita K. Thrombocytosis in a newborn with Down syndrome and transient abnormal myelopoiesis. *Br J Haematol*, 査読有 2016 Feb;172(3):314. doi: 10.1111/bjh.13808.

Komori K, Yanagisawa R, Miyairi Y, Sakashita K, Shiohara M, Fujihara I, Morita D, Nakamura T, Ogiso Y, Sano K, Shirahata M, Fukuoka K, Ichimura K, Shigeta H. Temozolomide Treatment for Pediatric Refractory Anaplastic Ependymoma with Low MGMT Protein Expression. *Pediatr Blood Cancer*, 査読有 2016 Jan;63(1):152-5. doi: 10.1002/pbc.25696.

Yanagisawa R, Nakamura T, Ogiso Y, Hachiya A, Fujihara I, Morita D, Sakashita K, Kitamura M, Matsui H, Nishijima F, Hayashi H, Hidaka E, Sano K, Shiohara M, Yasukochi S. Interleukin-8-producing primary cardiac undifferentiated sarcoma in a child with sustained fever. *Pediatr Int*, 査読有 2015 Aug;57(4):742-5. doi:

10.1111/ped.12621. Epub 2015 Jun 4.

Yanagisawa R, Ishii E, Motoki N, Yamazaki S, Morita D, Sakashita K, Shiohara M, Tanaka M, Hidaka Y, Kubota N, Hidaka E, Ogiso Y, Nakamura T, Yasukochi S. Pretransplant-corrected QT dispersion as a predictor of pericardial effusion after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int*, 査読有 2015 May;28(5):565-74. doi: 10.1111/tri.12532. Epub 2015 Feb 27.

〔学会発表〕(計 11件)

小森 一寿,藤原 郁子,柳沢 龍,坂下 一夫,阿部 世紀,近藤 良明.自家末梢血幹細胞移植後に発症した idiopathic pneumonia syndrome の2小児例.第38回日本造血細胞移植学会総会.(2016年3月3日~2016年3月5日,名古屋,名古屋国際会議場)

藤原 郁子,小森 一寿,柳沢 龍,佐野 健司,勝山 善彦,小木曾 嘉文,坂下 一夫. Pazopanib の投与が有効であった治療抵抗性小児悪性軟部腫瘍の2例.第57回日本小児血液・がん学会学術集会.(2015年11月27日~2015年11月29日,甲府,甲府富士屋ホテル・常盤ホテル)

小森 一寿,宮入 洋祐,藤原 郁子,柳沢 龍,坂下 一夫,重田 裕明,小木曾 嘉文,中村 友彦,盛田 大介,佐野 健司,塩原 正明,白畑 充章,福岡 講平,市村 幸一.治療抵抗性退形成性上衣腫5例に対するテモゾロミドの治療経験.第57回日本小児血液・がん学会学術集会.(2015年11月27日~2015年11月29日,甲府,甲府富士屋ホテル・常盤ホテル)

Yanagisawa R, Shimodaira S, Sakashita K, Hidaka Y, Nishijima F, Kojima S, Hidaka E, Shiohara M, Nakamura T. Analysis of risk factors associated with allergic transfusion reactions and febrile nonhemolytic transfusion reactions in children. 26th Regional Congress of the ISBT. (Bali, Indonesia, November 14-16, 2015).

柳沢 龍,坂下 一夫,西島 史恵,下平 滋隆.小児輸血医療における輸血副反応頻度の検討.第63回日本輸血・細胞治療学会総会.(2015年5月28日~2015年5月30日,新宿,京王プラザホテル)

柳沢 龍,小森 一寿,藤原 郁子,坂下 一夫,中村 友彦,石井 栄三郎,長沼 邦明,久保 徹夫,塩原 正明.地域連携を通じた小児がん領域における終末期医療の実施.第118回日本小児科学会学術集会.(2015年4

月 17 日 ~ 2015 年 4 月 19 日 , 大阪、大阪国際  
会議場)

R. Yanagiaswa, E. Ishii, N. Motoki, S. Yamazaki, D. Morita, K. Sakashita, M. Shiohara, M. Tanaka, Y. Hidaka, N. Kubota, E. Hidaka, Y. Ogiso, T. Nakamura, S. Yasukochi. Pretransplant corrected QT dispersion as a predictor of pericardial effusion associated with thrombotic microangiopathy after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. 41st Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation . (Istanbul, Turkey, March 22 - 25, 2015)

柳沢 龍, 小森 一寿, 藤原 郁子, 坂下 一夫, 中村 友彦, 山崎 聖子, 安河内 聡, 盛田 大介, 元木 倫子, 塩原 正明, 石井 栄三郎. 小児 HSCT 後発症心嚢液貯留に対する QT dispersion の予測因子としての有用性の検討. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会 . (2015 年 3 月 5 日 ~ 2015 年 3 月 7 日, 神戸、神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル)

小森 一寿, 宮入 洋祐, 藤原 郁子, 盛田 大介, 倉田 敬, 柳沢 龍, 坂下 一夫, 塩原 正明, 重田 裕明. 治療抵抗性退形成性上衣腫 2 例に対するテモゾロミドによる治療経験. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 . (2014 年 11 月 28 日 ~ 2014 年 11 月 30 日, 岡山、岡山コンベンションセンター・岡山シティミュージアム)

藤原 郁子, 小森 一寿, 柳沢 龍, 坂下 一夫. ALL 治療終了後 5 ヶ月で t(7;11)(p15;p15)を有する AML を発症した 1 例. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 . (2014 年 11 月 28 日 ~ 2014 年 11 月 30 日, 岡山、岡山コンベンションセンター・岡山シティミュージアム)

Ryu Yanagisawa, Yozo Nakazawa, Kazuyuki Matsuda, Akira Morimoto, Eiichi Ishii. Significance of molecular monitoring in children with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. 30st Annual Meeting of the Histiocyte Society . (Toronto, Ontario, Canada, October 28-30, 2014)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

柳沢 龍 (YANAGISAWA, Ryu)

信州大学・医学部附属病院 . 特任研究員

研究者番号 : 80532043