

Title	子宮頸癌に対する腫瘍浸潤T細胞療法 (TIL療法) 実施にむけたTIL培養法の開発
Sub Title	Development of TIL culture method for tumor infiltrating T cell therapy for cervical cancer
Author	岩田, 卓(Iwata, Takashi) 大多, 茂樹(Ohta, Shigeki) 谷口, 智憲(Yaguchi, Tomonori)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	申請者が実施中の臨床試験「進行子宮頸癌に対する腫瘍浸潤リンパ球輸注療法」の、奏効率向上に向け、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 培養法の改善を実施した。まず、従来フラスコを用いて行っていたTIL培養を、より簡便かつ安全性の高いBAGによる培養が可能か検討し、2週間で1000倍の増殖が可能であることを示した。さらに、培養液にサイトカインであるIL-15を加えることで、疲弊の少ない、高品質のTILを得られることを示した。我々が新しい培養法で作製したTILは、自己腫瘍から作成したオルガノイドを傷害した。 In order to improve the response rate of the clinical trial "Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Infusion Therapy for Advanced Cervical Cancer" , the method of TIL culture was improved. First, we examined the possibility of culturing TILs in a BAG, which is simpler and safer than the conventional G-REX flask culture, and showed that a 1000-fold increase in growth was possible in 2 weeks. Furthermore, we showed that the addition of IL-15 to the culture medium can produce high quality TILs with less exhaustion. TILs produced by our new method injured organoids of autologous tumors.
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2019～2021 課題番号：19H03520 研究分野：婦人科腫瘍学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19H03520seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03520

研究課題名（和文）子宮頸癌に対する腫瘍浸潤T細胞療法（TIL療法）実施にむけたTIL培養法の開発

研究課題名（英文）Development of TIL culture method for tumor infiltrating T cell therapy for cervical cancer

研究代表者

岩田 卓（IWATA, Takashi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：30296652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者が実施中の臨床試験「進行子宮頸癌に対する腫瘍浸潤リンパ球輸注療法」の、奏効率向上に向け、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）培養法の改善を実施した。まず、従来フラスコを用いて行っていたTIL培養を、より簡便かつ安全性の高いBAGによる培養が可能か検討し、2週間で1000倍の増殖が可能であることを示した。さらに、培養液にサイトカインであるIL-15を加えることで、疲弊の少ない、高品質のTILを得られることを示した。我々が新しい培養法で作製したTILは、自己腫瘍から作成したオルガノイドを傷害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再発子宮頸癌は極めて難治性で、他癌の比べ治療薬の選択肢が極めて少ない。我々が実施中のTIL療法は、海外の治療成績から、進行子宮頸癌症例の20-30%の完治が期待できると期待できる。TIL療法での奏効率の改善は、難治性子宮頸がんの治療に大きく貢献する。本研究では、より簡便かつ安全なBAGでの治療法を開発するとともに、高品質のTIL製造の可能性を示した。子宮頸癌は若年発症の癌であり、35才以下の女性では最多である。新規治療による社会的意義は大きく、その経済利益も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to improve the response rate of the clinical trial "Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Infusion Therapy for Advanced Cervical Cancer", the method of TIL culture was improved. First, we examined the possibility of culturing TILs in a BAG, which is simpler and safer than the conventional G-REX flask culture, and showed that a 1000-fold increase in growth was possible in 2 weeks. Furthermore, we showed that the addition of IL-15 to the culture medium can produce high quality TILs with less exhaustion. TILs produced by our new method injured organoids of autologous tumors.

研究分野：婦人科腫瘍学

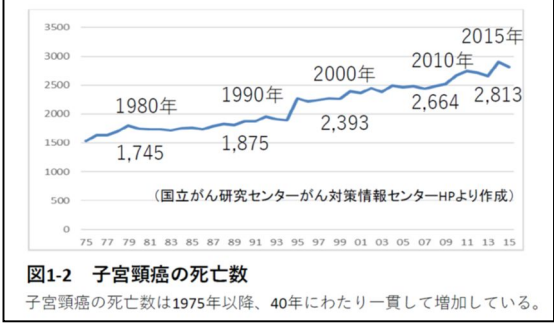
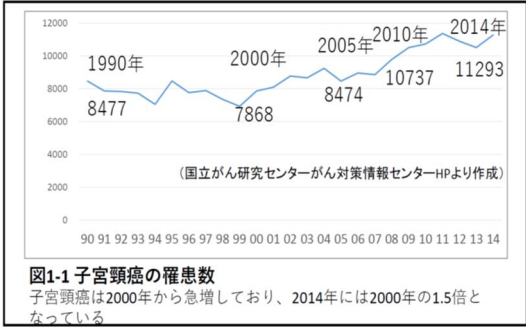
キーワード：子宮頸癌 腫瘍浸潤リンパ球輸注療法 養子免疫療法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の罹患数は2000年から2014年の間に約1.5倍に急増しており、年間約8000-10000人が罹患する（図1-1）。死亡数も1980以降、一貫して増加しており、現在、国内で患者数の多い悪性腫瘍のなかで、唯一、死亡数が増加している癌であるという現実がある（図1-2）。子宮頸癌の罹患ピークは、40歳前後で、固形がんとしては最も若年発症で、特に20～35才の若年女性では、乳癌を抜き、罹患数・死亡数が最も多いがんとなっている。このため、未婚女性や子育て中の母親が罹患するケースが多く、社会的な問題が極めて大きい。



再発子宮頸癌は極めて難治性で、他癌に比べ治療薬の選択肢が極めて少ない。再発後の平均生存期間は約1年、5年生存率は5%以下で極めて予後不良であり、再発子宮頸癌の治療法の開発は喫緊の課題である。

腫瘍浸潤T細胞療法（Tumor-Infiltrating Lymphocytes 療法：TIL 療法）はTILを患者腫瘍から大量に誘導して患者に輸注する免疫療法であり、現時点で最も効果が高い免疫療法と考えられている。このTIL療法は、主に悪性黒色腫に対して実施されてきた。転移性悪性黒色腫に施行されたTIL療法の報告では、奏効率（PR+CR）：56%、CR：22%と優れた成績が報告されている（Rosenberg SA et al, Science.2015;348:62-68）。TIL療法の特筆すべき特徴は完全奏効症例ではほとんどの症例で再発せず、完治が期待できるという点にある。この悪性黒色腫の報告ではCRとなった20例のうち19例がその後5年間に再発を認めていない。

Rosenbergらは多発転移を認める再発子宮頸癌の9例に対してTIL療法を実施し、奏効率33%（CR:2例、PR:1例）の成績を得ている（Stevanović et al, J Clin Oncol. 2015;33:1543）（表1）。さらにCRになった症例では長期生存が得られており、CRの2例中2例年以上、再発を認めず完全寛解が持続している。

再発子宮頸癌に対するTIL療法の効果					
症例	組織型	転移/再発部位	放射線既往	既往の化学療法	効果
1	腺癌	骨盤リンパ節・肺・後腹膜・複断端	あり	CDDP	PD
2	扁平上皮癌	骨・肝・肺・肺門部・骨盤	あり	CDDP,CBDC,PTX,Topo他	PR
3	扁平上皮癌	骨盤リンパ節・肺・肺門部・後腹膜	あり	CDDP,BLM,GEM,PTX,Topo	CR
4	扁平上皮癌	腋窩・胸壁・肝・大網・肋膜	あり	CDDP,CBDC,PTX,5-FU他	PD
5	扁平上皮癌	脳・肺門部・上咽頭	あり	CDDP	PD
6	腺癌	腹壁・肝・骨盤内・後腹膜	あり	CDDP	CR
7	腺癌	腹壁・肺	あり	CDDP,CBDC,PTX,Beva	PD
8	腺癌	骨盤内・肝	なし	CDDP,PTX	PD
9	腺癌	骨・肺・肺門部・骨盤内・後腹膜	あり	CDDP,CBDC,PTX,Ipi	PD

Stevanović S et al. J Clin Oncol. 2015 より改変

表1
再発子宮頸癌でのTIL療法の効果

TIL療法を施行した9例中、CR：2例、PR：1例で奏効率33%であった。また、CRの2例は治療後5年以上、再発していない

子宮頸癌は若年発症の癌であり、35才以下の女性では最多である。海外の治療成績から、本治療法によって、進行子宮頸癌症例の20-30%の完治が期待できると期待できるが、前述したように、患者の多くが若年者であること、また育児中の女性も多く含まれることから、新規治療による社会的意義は大きく、その経済利益も大きいと考えられる。

2．研究の目的

TIL 療法は投与前に非骨髄破壊の前処置、後に大量 IL-2 療法が行われ、高度な培養技術が求められる。このため世界でも 8 施設でのみ施行されるにとどまっているのが現状である。我々は我が国で初めて TIL 療法を子宮頸癌に実施している（AMED 再生医療実用化研究事業 課題番号 18bk0104007h0001）。TIL 療法における安全かつ高効率な TIL の培養法の確立のため、さらに改良すべき課題も多い。具体的な改良点として、TIL 培養の成功率の改善、高い腫瘍障害活性を有する TIL の作成、簡便かつ安全性の高い培養法の確立、が挙げられる。また、抗腫瘍効果を発揮する TIL の認識抗原解析が重要となる。申請者は、子宮頸癌に対する TIL 療法の実施を目指し、これらの改善点を中心に子宮頸癌組織を用いた TIL 大量培養法の開発を目指す。

3．研究の方法

(1) オルガノイドの作製

TIL の自己腫瘍反応性を検討するために、子宮頸癌組織を用いて、オルガノイドの作製を行った。

1. 子宮頸癌組織を採取し、細胞を分離する。2. 癌細胞 200 個を 20 μ L のマトリゲルで包埋する。
3. 幹細胞ニッチ因子を含む幹細胞培地で培養する。4. 子宮頸癌の細胞株であるか、P16 染色を行い、確認する。

(2) 閉鎖系培養法の確立

従来より TIL の培養は、G-REX フラスコによる開放系で行われてきた。この方法では、培地交換や、検査試料の採取時に、細菌感染の危険性が高まる。このため、より安全かつ効率的に TIL 培養を行うため、A 社より提供を受けたバックを用いて TIL 培養法の開発を行った。1. 1.6L の容量の Bag に 200ml の培地と、 5.0×10^6 個の TIL および 5.0×10^8 個の PBMC を入れ、培養を開始する。2. 培養 5 日目に 400ml、10 日目に 800ml を加え、培養を行う。3. 培養 14 日目に TIL を回収し、細胞数を測定する。

(3) TIL 培養法の改良

1. 患者検体から TIL を抽出し、IL-15 抗体を添加した培養液と添加しない培養液で 2 週間培養する。2. 末梢血単核球とともに TIL を 2 週間拡大培養し、増殖能、疲弊度をフローサイトメトリ（FACS）で検討する。

(4) オルガノイドを用いた TIL の自己腫瘍障害性の検討

1. IL-15 抗体を添加した培地で培養した TIL と、同一患者から作成したオルガノイドを共培養し、IFN- γ の産生能を ELISA 法で検討した。2. この際、TIL の癌細胞の認識が MHC-I を介するものか抗 MHC-I 抗体である W6/32 を用いて検討した。

4．研究成果

(1) オルガノイドの作製

46 症例でオルガノイド樹立を試み、30 例（65%）で腫瘍オルガノイド樹立に成功した

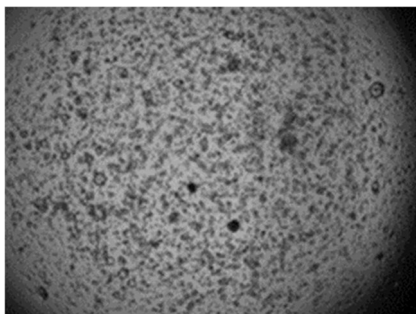


図 2 子宮頸癌から樹立したオルガノイド
樹立成功率は 65%であった

(2)閉鎖系培養法の確立

A 社製の浮遊細胞培養が可能な BAG を用いて、TIL の拡大培養を実施した。TIL 培養では、2 週間に約 1000 倍の増殖率の達成を目標とする。今回の検討では、同一患者由来で、IL2 および IL-15 存在下で初期培養した TIL を用いて拡大培養を実施した。その結果、それぞれ 980 倍および 1,166 倍に増殖し、閉鎖系培養が細胞数の上では、基準値を達成できることが示された(表 2)。

D0	D7		D11		D14		
(5×10^6)	Live cells (10^8)	viability (%)	Live cells (10^8)	viability (%)	Live cells (10^8)	viability (%)	Final Folds
IL-2 (6000IU/mL)	3.95	91%	24.4	98%	49	98%	980
IL-2 (6000IU/mL)+ IL-15 (5ng/mL)	8.53	96%	34.4	93%	58.3	96%	1166

表 2 閉鎖系 Bag を用いた TIL の高速拡大培養の結果

(3)TIL 培養法の改良

TIL 培養の初期培養において、サイトカイン IL-2 に加えて IL-15 を添加することで、疲弊細胞とされる Tem の割合が減少し、Tcm と Tte の割合が増加した(図 3)。IL-15 を添加することで、IL-2 の長時間培養による TILs の疲弊を抑制し、ミトコンドリアの増殖・分裂を促進することが示され、品質向上につながる可能性がある(図 4)。

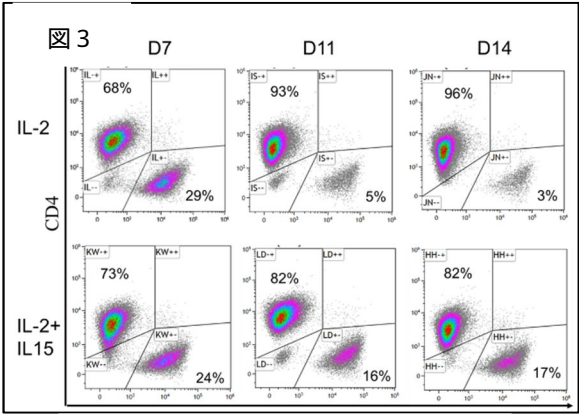


図 3
IL-15 添加により、CD8 の比率が
上昇した

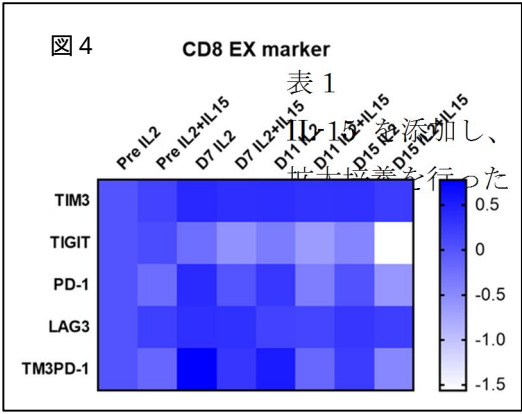


図 4
IL-15 添加により疲弊マーカーが
減少した

(4)オルガノイドを用いた TIL の自己腫瘍障害性の検討

TIL 製剤を作成した患者由来のオルガノイドを用いて TIL の腫瘍反応性を検討したところ、製造した TIL は、患者の子宮頸癌組織から作成した Organoid を MHC-I 拘束性に障害することが確認された(図 5)。

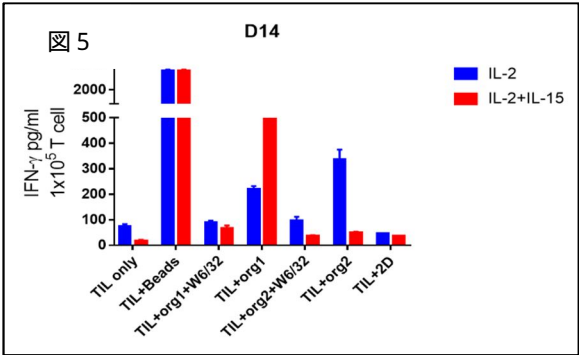


図 5 オルガノイドを用いた細胞傷害
性試験

IL-2 または IL-15 存在下で誘導した TIL は MHC-I 拘束性に Auto の系で腫瘍細胞を障害する

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大多 茂樹 (OHTA Shigeki) (20365406)	国際医療福祉大学・医学部・准教授 (32206)	
	谷口 智憲 (YAGUCHI Tomonori) (40424163)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------