

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 戦略的イノベーション創出推進プログラム  
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer: Strategic Promotion of Innovative Research and Development  
(S-Innovation)

研究開発課題名： (日本語) LAP 陽性制御性 T 細胞および TGF- $\beta$  に対する選択除去材の創製およびがんの革新的治療法への応用  
(英語) Development of the selective remover of LAP positive suppressive T cells and TGF- $\beta$  and the application to innovative cancer therapy

研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 滋賀医科大学 動物生命科学研究センター・センター長 小笠原 一誠  
(英語) Shiga University of Medical Science, Research Center for Animal Life Science, director, Kazumasa Ogasawara

実施期間： 平成 24 年 11 月 29 日 ～ 平成 32 年 3 月 31 日

分担研究 開発課題名： (日本語) 組合せ技術の開発  
(英語) Development of combination method for cancer therapy  
研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 小笠原 一誠  
(英語) Shiga University of Medical Science, Research Center for Animal Life Science, director, Kazumasa Ogasawara

分担研究 開発課題名： (日本語) カラム製造技術の開発  
(英語) Development of manufacturing technology for the column

研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 東レ株式会社 医療材事業部門 部門長補佐 金子正之  
(英語) Toray Industries, Inc. Medical Products Division, Assistant General Manager, Masayuki Kaneko

分担研究 (日本語) 組合せ技術の開発  
開発課題名: (英語) Development of combination method for cancer therapy  
研究開発分担者 (日本語) 上田 祐二  
所属 役職 氏名: (英語) Osaka General Hospital of West Japan Railway Company,  
Director, Yuji Ueda

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本開発カラムは、癌患者の治療に用いるための全血液還流デバイスであり、末梢血から免疫抑制性の LAP 陽性細胞を除く能力を有する。それ故、このカラムは癌患者の抗腫瘍性免疫を免疫抑制状態から回復させることが出来る。

担癌動物モデルとして、肝癌由来の KDH-V 細胞を MHC が同じ WKAH/Hkm ラットの皮下に接種して作成した担癌ラットを用いた。LAP 細胞選択除去カラムで 1 時間体外循環治療を行うと、体外循環終了後には血液中の CD4 陽性 T 細胞中の LAP 陽性率が体外循環前の約半分に低下し、この治療ラットの生存期間が無治療の担癌ラットに比較して有為に延長することが、統計学的に確認できた。

従って、このカラムの治療効果は LAP 細胞除去の効果と考えられるが、これを検証するために以下の実験を行った。即ち、進行癌ラットの脾臓から顆粒球を除去した脾細胞、B 細胞を除去した脾細胞、LAP 陽性細胞を除去した脾細胞を調整し、各々の腫瘍特異的キラー細胞 (CTL) 誘導活性を調べた。その結果、LAP 陽性細胞を除去した脾細胞の CTL 誘導活性がこれ等の中で最も高かったので、LAP 陽性細胞が最も強く抗腫瘍免疫を抑制していることが分かった。以上の結果は、本カラムで LAP 陽性細胞を除去標的とすることの妥当性を支持する。

また、腫瘍が縮小して完全治癒した例で 1 年後に脾細胞を採取して腫瘍特異的 IFN- $\gamma$  産生能を調べてみると、高い産生能が認められたことから、カラムの免疫向上効果は長期に維持されることが確認できた。

なお、当該カラムで担癌ラットを体外循環すると、末梢血液中の CD4 陽性 T 細胞中の LAP 陽性率が 50% 低下すると、同時に Treg も 50% 低下することが確認できた。

様々な癌患者からインフォームドコンセントを取得のもとで、約 4 mL の末梢血を取得した。9 人の胃癌、23 人の大腸癌、7 人の非小細胞肺癌、4 人の膵臓癌の患者から手術前に末梢血を採取した。末梢血中の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の LAP 陽性率を溶血処理や Ficoll 遠心分離処理を行わずに直接マルチカラーフローサイトメーターで測定した。また、血漿中の TGF- $\beta$  を ELISA 法で測定した。癌患者血液中の CD4 陽性細胞の LAP 陽性率は健常成人に比較して高いことが分かった。また、LAP 陽性率と TGF- $\beta$  濃度の間には正の相関性のあることが示唆された。

次に、LAP 陽性細胞除去カラムの工業生産のために大量生産に適した吸着材と生産プロセスを新しく開発した。試作したカラムは LAP 陽性細胞に対する良好な除去能力を示し、主要な物理化学的安全性項目および生物学的安全性項目に合格することを確認した。

Shiga University of Medical Science, Research Center for Animal Life Science, Director  
Kazumasa Ogasawara

The developing column concerned is a direct hemoperfusion tool for treatment of cancer patients, and has the capacity for removing immunosuppressive LAP positive cells from peripheral blood. Therefore, this column is possible to recover anti-cancer immunity of cancer patient from the immunosuppressive state.

As an animal cancer model for column evaluation, cancer rat was prepared by subcutaneous injection of KDH-V cells into the back of WKAH/Hkm rat (MHC of KDH-V cells is consistent with rat's one). When the cancer rat underwent hemoperfusion with the column concerned, LAP positive ratio in CD4 T cells (CD3+CD4+ cells) declined about fifty percent in peripheral blood, and the survival period of the column treated rats were significantly prolonged than that of non-treated one.

For verification of significance of removal of LAP positive cells, anti-cancer immunity of LAP positive cell-depleted splenocytes were prepared from tumor-bearing rats splenocytes and compared with granulocytes-depleted splenocytes, B cells-depleted splenocytes or the intact splenocytes from the same rat. As results it is found that LAP+ cells-depleted one shows the strongest CTL activity among these four splenocytes.

In addition, splenocytes of the cured rat secreted large amount of IFN- $\gamma$  responding to cancer cells as long as one year after column-treatment. Therefore, the high anti-cancer immunity persists for long time. And CD3+CD4+CD25+Foxp3+Treg decreased 50% with LAP+ CD3+CD4+ T cells, when the cancer rat underwent hemoperfusion with the column concerned.

Specimens of clinical blood were taken from various cancer patients under informed consent. The specimens were collected before operation from nine stomach cancer patients, 23 colorectal cancer patients, seven non-small-cell lung cancer patients and four pancreatic cancer patients. The LAP positive cell ratios in CD4 T cell and CD8 T cell were assayed by multicolor flow cytometer, and TGF- $\beta$  concentration in the plasma were assayed by ELISA method. The LAP positive ratios of T cells of cancer patient blood were observed to be higher than that of healthy adult persons. A positive correlation between LAP positive ratio in CD4 T cell and TGF- $\beta$  concentration in plasma was observed.

For industrialization of the LAP positive cell-removing column, the adsorbent and the process suitable for mass-production was newly developed. The trial product showed good removing capacity of LAP positive cells, and passed major physicochemical safety tests and biological evaluations.

### III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. TGF- $\beta$  および LAP 陽性 T 細胞に対する選択吸着カラムの癌治療への応用, 口頭, 寺本和雄, 遠藤善裕, 上田祐二, 小笠原一誠, 日本透析医学会学術集会, 2016/6/11, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願