

腫瘍浸潤B細胞を用いたヒト大腸癌特異的抗体開発

廣橋良彦 [札幌医科大学/准教授]
秦史壯 [札幌道都病院/理事長]
三浦秀元 [札幌道都病院/外科医長]
三浦りゅう [株式会社イーベック/取締役 研究本部長]

背景・目的

腫瘍微小環境は、腫瘍の進展を制御する。抗腫瘍に働く腫瘍微小環境因子として、CD8陽性細胞傷害性T細胞が知られている。腫瘍特異的CD8T細胞浸潤が多い症例では生命予後が良い。一方、近年の研究結果から、CD20陽性B細胞浸潤が多い癌症例で、生命予後が良い事が報告されている。しかしながら、CD20陽性B細胞は、腫瘍特異的反応を示すかどうか結論づけられていない。

本研究では、ヒト大腸癌症例に浸潤するCD20B細胞が腫瘍特異的であるか検証する事を目的とする。また、CD20陽性B細胞が腫瘍特異的である場合、腫瘍特異的抗体をエンジニアし、BiTE、CAR-T、ADCなどへの応用を目的とする。

内容・方法

本研究では、ヒト大腸癌組織から癌細胞、CD20陽性B細胞を精製する。まず、ヒト大腸癌組織をさまざまな酵素処理を行い、分散サンプルとした。分散サンプルから、培養癌細胞を樹立するため、コラーゲンゲルに埋め込み、オルガノイド培養を行った。

CD20陽性B細胞を精製するために、腫瘍分散サンプルから、CD20マイクロビーズにてCD20陽性B細胞を分離し、EBVを感染させ、不死化を行った。

オルガノイド培養として、約30例、CD20陽性B細胞不死化を2例検討した。

結果・成果

①オルガノイド培養

本研究では、大腸癌腫瘍分散サンプルからオルガノイド培養を行った。具体的に、分散サンプルをコラーゲンゲル内に播種した。培養液としてDMEM/F-12培養液に、

- Wnt3a conditioned medium
- R-spondin-1 conditioned medium
- Noggin conditioned medium
- EGF
- SB202190
- Y27632

を添加した培養液を用いた。約30症例のヒト大腸癌においてオルガノイド培養を行った結果、いくつかの症例では、初代オルガノイド形成を示す症例がみられた。しかしながら、オルガノイド成長により、継代を行った結果、2世代目のオルガノ

イド形成は不十分であり、安定したオルガノイド培養には至らなかった。

②不死化B細胞樹立

大腸癌症例2例分の分散サンプルからCD20マイクロビーズで、CD20陽性細胞を分離した。その結果、腫瘍分散サンプル内においてB細胞比率は2%-3%程度と極めて少なかった。また、検出した限りではすべてのCD20陽性B細胞は死細胞であった。同サンプルを用い、EBV感染実験を行ったものの、培養3週後での不死化B細胞増殖は明らかではなかった。不死化B細胞樹立が不調であったため、抗体解析には進めなかった。

今後の展望

①オルガノイド培養に関して

本研究内では、Wnt3a、Noggin、R-spondin-1は、conditioned mediumを用いた。同様の方法で成功したとの報告もみられるが、リコンビナントタンパクを用いるなど、方法論の最適化を行う予定である。

②不死化B細胞樹立に関して

本研究では、B細胞浸潤を比較的観察できる大腸癌症例を解析した。しかしながら、上記の通り、腫瘍浸潤B細胞のviabilityに問題がみられた。大腸癌は比較的、壊死が多い癌種であり、生体内においてB細胞のviabilityが良くない可能性が示唆される。大腸癌の中でも、壊死の少ない腫瘍辺縁部分からのサンプリングを心がけるなどの改善点が考えられる。また、大腸癌以外の癌種も検討すべきであると考えられた。