

令和元年5月21日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07168

研究課題名(和文)新規免疫応答測定法を利用した複合療法開発への基盤研究

研究課題名(英文) Development of effective combined immunotherapies by using a novel immune response detection method

研究代表者

宮原 慶裕 (Miyahara, Yoshihiro)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10582083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腫瘍細胞株CMS7担癌マウスにおいて実際に免疫応答を惹起する変異抗原の同定のため、独自開発した免疫応答測定法を用いて高免疫原性変異抗原ペプチド(mSnd1)を同定した。また、新規開発の免疫応答測定法の従来法に対する優位性を確認するとともに、実際に同定した変異型Snd1ペプチドを用いたワクチンにより腫瘍治療効果が得られること、すなわちmSnd1に対する免疫応答が腫瘍退縮に寄与することを確認した。本研究開発で樹立したCMS7担癌マウスモデルと新規免疫応答測定法は今後の有効な複合免疫療法開発にとって重要な基盤となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究開発において樹立したマウス腫瘍細胞株CMS7担癌マウスにおける変異型Snd1ペプチドへの免疫応答モデルは、今後期待される治療効果の高い複合免疫療法開発への重要な基盤になると考えられ、学術的意義が高いと考えられる。また、今後益々、個別化がん治療が進展していくと考えられるが、その際には本研究開発で確立した迅速・鋭敏な免疫応答測定法が個々の患者の高免疫原性変異抗原の同定に役立つことも十分に予想され、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We successfully identified a mutated antigen (mutated Snd1 derived epitope peptide; YAPCRGEF) that actually elicits an robust immune response in CMS7 tumor-bearing mice by utilizing a newly developed immune response detection method. Furthermore, we confirmed not only the superiority of the newly developed immune response detection method to the conventional method but also mSnd1 long-peptide vaccination has a therapeutic effect, that is, the immune response to mSnd1 causes tumor regression. The CMS7 tumor-bearing mouse model and the novel immune response detection method established in this research are considered to be important bases for the development of effective combined immunotherapy in the future.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：変異抗原 複合免疫療法 免疫応答

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗チェックポイント抗体の臨床における有効性実証に始まる大きな医療変革の中で、抗チェックポイント抗体治療の有効性の中核となる、「治療効果に寄与する、抗チェックポイント抗体治療により活性化されるT細胞がどのような抗原を認識しているのか」の問いに対して、「腫瘍ゲノム変異に起因する腫瘍特異的な変異抗原を認識している可能性が高い」ことが明らかになってきた。しかし、このような理解の進展の一方で、効果の低い患者が相当数存在することが臨床的に明らかとなり、抗チェックポイント抗体治療の単剤での限界が明確となっていた。治療不応性の要因として、「CD8陽性T細胞が腫瘍局所に浸潤できていない」あるいは「腫瘍局所には多様な免疫抑制環境が存在する」こと等が報告され、それらの要因を打破しつつ変異抗原への免疫応答を増強し治療効果に結び付けるために、他の治療法との併用による複合免疫療法開発の必要性が強く示唆され始めていた。その候補として、放射線治療、化学療法剤・分子標的薬、阻害剤等の薬剤・アジュバント、あるいはがんワクチン等の治療法が提唱されていた。

上記の背景から、研究代表者らは有効な複合療法を開発するためには動物モデルの基盤整備が必要と考えた。複合療法間での比較解析の際には腫瘍増殖抑制効果と共に免疫応答の変動・増強を測定することが望まれるが、そのためには免疫原性が高く実際にマウスT細胞に認識されている変異抗原を同定すること必須となる。しかしながら、変異抗原は個々の腫瘍に特異的であり、且つ数的に非常に膨大であることが同定に向けての大きな課題であった。

### 2. 研究の目的

従来、IFN-g ELISPOT法あるいはテトラマー等の測定法が免疫応答解析に用いられてきたが、これら測定法には細胞分離・培養といった時間的・手技的な問題点があり、特に多数の抗原に対する免疫応答測定が必要になる場合にこれらの点が大きな障害となっていた。本研究では、この問題を解決するため、CXCR3リガンド(ケモカインCXCL9)を免疫応答の指標として使用し、さらに、逆転写定量PCR法(qRT-PCR)を用いることで、より迅速・鋭敏・網羅的な独自の免疫応答測定法の確立を目的とした。さらに、この手法を用いて、マウス腫瘍細胞株をモデルに免疫原性の高い変異抗原の同定を実際に進め、得られた成果を利用し応用することで有効な複合免疫療法の開発基盤を作製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 各種マウス腫瘍株のNGS解析(エクソーム/RNA-seq)を進める。得られた変異遺伝子情報から変異ペプチドのマウスMHCに対する親和性をIn silicoにおいて予測し、それらの結果を基にマウスT細胞に認識される候補変異抗原ペプチドを作製し、独自開発の免疫応答測定法を用いて実際に高免疫原性変異抗原を同定可能か検討する。

(2) 様々な治療法・治療薬と抗チェックポイント抗体との複合療法において、変異抗原に対する免疫応答の広がり・強度の変化と治療効果との相関を検討し、最適の併用療法を探索する。

### 4. 研究成果

(1) マウス腫瘍細胞株CMS7(BALB/cマウス由来)担癌マウスでの変異抗原ペプチドに対する免疫応答の検出を新規免疫応答測定法を用いて試みた。CMS7腫瘍のNGS解析を行い、腫瘍特異的な遺伝子変異の同定を行った。次に、変異部位を含む配列からMHCクラスIに提示される可能性の高いエピトープ(8~10mer)をソフトウェア(IEDB; <http://www.iedb.org/>)を用いて選択し、さらにRNA転写数の多さを基準に上位約60種を選択しペプチド合成を行った。腫瘍接種後18日後の担癌マウス脾細胞 $1 \times 10^6$ 個に対し各ペプチドを添加3時間後にRNAを回収しCXCL9mRNA量の変動を測定した。陰性コントロールとしてDMSO投与群を使用している。結果、図1に示すように、抗チェックポイント抗体による治療を行った群において変異遺伝子Snd1に由来する変異ペプチド(mSnd1; YAPCRGEF)に対する著明な免疫応答が検出され、無治療群においてもmSnd1に対する免疫応答が検出された。また、この免疫応答は変異の無い野生型Snd1ペプチドに対しては検出されず、変異型ペプチド特異的な免疫応答であることを確認している。

無治療群での免疫応答検出は予想外であるとともに、抗チェックポイント抗体治療により、実際に変異抗原に対する免疫応答が増強されていることを明らかにすることができた。

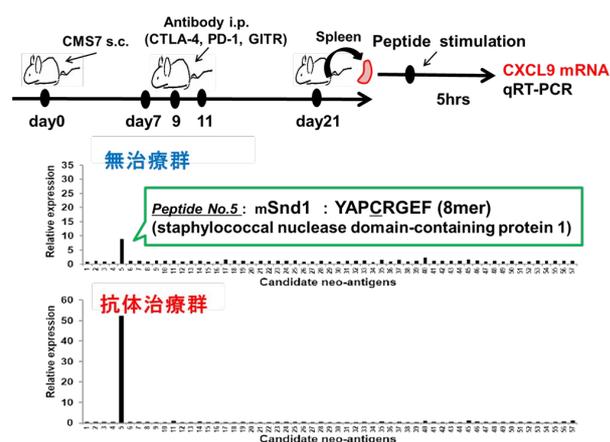


図1 新規免疫応答測定法による高免疫原性変異抗原の同定

(2) 上記の結果から、開発した新規免疫応答測定法は鋭敏な測定法であることが強く示唆されたため、従来法である IFN-g ICS (Intracellular Cytokine Staining) 法との検出感度の比較解析を実施した。CMS7 担癌マウスを用い、上記同様のスケジュールで IFN-g ICS 法での解析を行った。結果、図 2 に示すように、IFN-g ICS 法では、抗チェックポイント抗体治療群では mSnd1 に対する免疫応答が検出できるものの、無治療群、すなわち担癌のみの群では mSnd1 に対する免疫応答が検出できなかった。この結果は、独自開発の新規免疫応答測定法が鋭敏な検出法であることを明確に示すと考えられた。

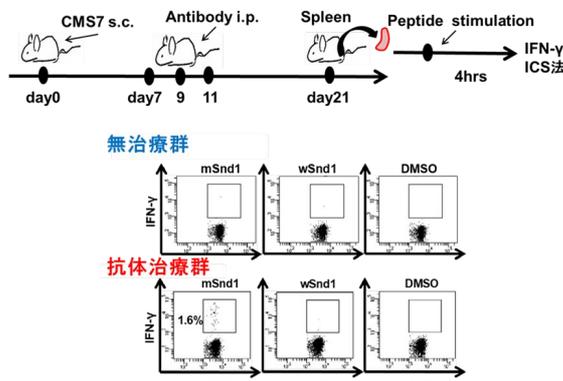


図2 従来のIFN-g ICS(細胞内サイトカイン染色)法では無治療群での免疫応答検出が困難

(3) 次に、担癌マウスで免疫応答が検出された mSnd1 ペプチド (8mer) が実際に高免疫原性ペプチドであるかを検討するため、mSnd1 ペプチドワクチン予防投与による腫瘍増殖抑制試験を行った。BALB/c マウスに1週間間隔で2回ワクチンを投与し、最終ワクチンの1週間後に CMS7 腫瘍の担癌を行った。アジュバントとして PolyIC を用いたが、アジュバント単独では抗腫瘍効果が認められず、その一方でワクチン投与群では明確な腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 3)。この結果により、CMS7 腫瘍細胞株で同定された mSnd1 ペプチドが免疫原性の高い変異抗原ペプチドであることが明らかとなった。

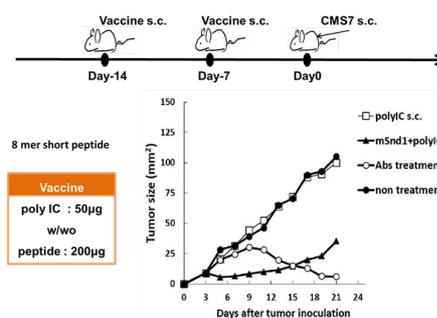


図3 同定した変異ペプチドワクチンによる腫瘍増殖抑制効果が認められた

(4) 次に、治療モデルでの変異抗原ペプチドワクチンの効果を検討した。使用したペプチドは 31mer のロングペプチド (中心に変異アミノ酸を置く) を使用した。CMS7 腫瘍細胞株担癌 3 日後にワクチン投与を 2 回行った。コントロールとして野生型ロングペプチドを使用した。結果、図 4 に示すように、野生型ロングペプチドワクチンでは治療効果が認められない一方で、変異型ロングペプチドでの治療により、抗腫瘍効果が明確に認められた。この結果は、mSnd1 に対する免疫応答が腫瘍退縮に明らかに関与することを示すと考えられた。このような結果から、本研究開発で樹立した CMS7 腫瘍担癌 BALB/c マウスモデル (変異 Snd1 モデル) は、今後の有効な複合免疫療法の開発基盤となると考えられる。本研究開発に引き続き、他の腫瘍細胞株にも同様の解析を行い、検討を続けていく予定である。

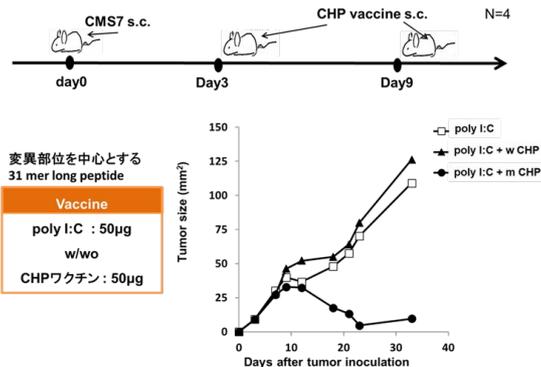


図4 変異ペプチドによる治療モデルでの腫瘍増殖抑制効果が認められた

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Oda H, Ishihara M, Miyahara Y, Nakamura J, Kozuka Y, Iwasa M, Tsunoda A, Yamashita Y, Saito K, Mizuno T, Shiku H, Katayama N. First Case of Cytokine Release Syndrome after Nivolumab for Gastric Cancer. Case Rep Oncol. 2019 Feb 8;12(1):147-156. doi: 10.1159/000496933. 査読有

Muraoka D, Seo N, Hayashi T, Tahara Y, Fujii K, Tawara I, Miyahara Y, Okamori K, Yagita H, Imoto S, Yamaguchi R, Komura M, Miyano S, Goto M, Sawada S, Asai A, Ikeda H, Akiyoshi K, Harada N, and Shiku H. Antigen Delivery Targeting Tumor-Associated Macrophages Overcomes Tumor Immune Resistance. J Clin Invest. 2019 Mar 1;129(3):1278-1294. doi: 10.1172/JCI97642. 査読有

Akahori Y, Wang L, Yoneyama M, Seo N, Okumura S, Miyahara Y, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Maki T, Fujiwara H, Akatsuka Y, Kato T, Shiku H. Antitumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination. *Blood*. 2018 Sep 13;132(11):1134-1145. doi: 10.1182/blood-2017-08-802926. 査読有

Tono Y, Ishihara M, Miyahara Y, Tamaru S, Oda H, Yamashita Y, Tawara I, Ikeda H, Shiku H, Mizuno T, Katayama N. Pertuzumab, trastuzumab and eribulin mesylate therapy for previously treated advanced HER2-positive breast cancer: a feasibility study with analysis of biomarkers. *Oncotarget*. 2018 Feb 16;9(19):14909-14921. doi: 10.18632/oncotarget.24504. 査読有

Wada M, Tsuchikawa T, Kyogoku N, Abiko T, Miyauchi K, Takeuchi S, Kuwatani T, Shichinohe T, Miyahara Y, Kageyama S, Ikeda H, Shiku H, Hirano S. Clinical Implications of CD4+CD25+Foxp3+Regulatory T Cell Frequencies After CHP-MAGE-A4 Cancer Vaccination. *Anticancer Res*. 2018 Mar;38(3):1435-1444. DOI: 10.21873/anticancerres.12368 査読有

Abiko T, Tsuchikawa T, Miyauchi K, Wada M, Kyogoku N, Shichinohe T, Miyahara Y, Kageyama S, Ikeda H, Shiku H, Hirano S. Serum immunoglobulin E response as a marker for unfavorable prognosis following cholesteryl pullulan-MAGE A4 vaccination. *Oncol Lett*. 2018 Mar;15(3):3703-3711. doi: 10.3892/ol.2018.7767. 査読有

Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, Fujiwara H, Nishida T, Akatsuka Y, Ikeda H, Tanimoto K, Terakura S, Murata M, Inaguma Y, Masuya M, Inoue N, Kidokoro T, Okamoto S, Tomura D, Chono H, Nukaya I, Mineno J, Naoe T, Emi N, Yasukawa M, Katayama N, Shiku H. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood*. 2017 Nov 2;130(18):1985-1994. doi: 10.1182/blood-2017-06-791202. 査読有

Fujii K, Miyahara Y, Harada N, Muraoka D, Komura M, Yamaguchi R, Yagita H, Nakamura J, Sugino S, Okumura S, Imoto S, Miyano S, Shiku H. Identification of an immunogenic neo-epitope encoded by mouse sarcoma using CXCR3 ligand mRNAs as sensors. *Oncoimmunology*. 2017 Mar 20;6(5):e1306617. doi: 10.1080/2162402X.2017.1306617. 査読有

[学会発表](計 22 件)

Novel DNA vaccination utilizing a newly developed pyro-drive jet injector (PJI) induced serological and cellular immune responses leading to in vivo suppression of tumor growth in a rat model.

Yoshihiro Miyahara, Kunihiro Yamashita, Hiroshi Miyazaki, Linan Wang, Junko Nakamura, Makiko Yamane, Katsuya Miki, Hiroshi Shiku

American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT) 2019年4月

腫瘍における NY-ESO-1 発現と抗体反応は MAGE-A4 ワクチン療法を受ける食道・頭頸部癌患者の予後不良を示す(NY-ESO-1 expression and antibody related to poor outcome in MAGE-A4-vaccinated esophageal and head/neck cancer patients)

上田 修吾, 宮原 慶裕, 永田 康浩, 佐藤 永一, 池田 裕明, 原田 直純, 珠玖 洋, 影山 慎一

日本癌学会総会 2018年9月

ヒト大腸がん組織に浸潤する腫瘍反応性 CD8 陽性 T 細胞の表現型および遺伝子解析 (Phenotypic and genetic characteristics of tumor-reactive CD8+ T cells existing in human colorectal tumor tissue)

宮原 慶裕, 藤井 啓介, 問山 裕二, 北嶋 貴仁, 井上 靖浩, 浜名 洋, 遠藤 洋子, 楠

正人, 井上 正宏, 岸 裕幸, 珠玖 洋  
日本癌学会総会 2018年9月  
有望な遺伝子改変 T細胞を用いたがん免疫療法(Promising use of gene-modified T cells for Cancer Immunotherapy)  
奥村 悟司, 加藤 琢磨, Wang Yizheng, 林 妙, 白倉 和子, 池田 裕明, 王 立楠, 宮原 慶裕, 田中 義正, 珠玖 洋  
日本癌学会総会 2018年9月  
Cytokine Release Syndrome and Tumor Responses in a First-in-Man Trial of a Novel Affinity-Enhanced TCR-Gene Transduced T Cell Transfer Targeting NY-ESO-1 Antigen  
Kageyama Shinichi, Ishihara Mikiya, Kitano Shigehisa, Miyahara Yoshihiro, Kato Hidefumi, Mishima Hideyuki, Yamamoto Noboru, Hattori Hiroyoshi, Iwase Hiroaki, Funakoshi Takeru, Kojima Takashi, Inoue Naoki, Kidokoro Tomohide, Tomura Daisuke, Okamoto Sachiko, Chono Hideto, Nukaya Ikuei, Mineno Junichi, Ikeda Hiroaki, Watanabe Takashi, Shiku Hiroshi  
American Society of Hematology (ASH) 2017年12月  
A novel CAR-T therapy targeting MAGE-A4p230-239/HLA-A\*02:01 complex for solid tumors  
Yoshihiro Miyahara, Yasushi Akahori, Linan Wang, Chisaki Amaike, Yuya Kato, Takuma Kato, Hiroshi Shiku  
European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) 2017年10月  
「それぞれの癌」癌治療標的の同定と臨床応用を目指して TCR 遺伝子改変 T細胞療法の早期臨床試験 臨床反応と免疫関連有害事象  
北野 滋久, 石原 幹也, 宮原 慶裕, 影山 慎一, 加藤 栄史, 三嶋 秀行, 山本 昇, 岩瀬 弘明, 服部 浩佳, 舩越 建, 小島 隆嗣, 池田 裕明, 渡辺 隆, 珠玖 洋  
日本癌治療学会学術集会 2017年10月  
「それぞれの癌」がん治療にまつわる Update 現在の最先端免疫治療 がんの T細胞療法  
池田 裕明, 影山 慎一, 石原 幹也, 渡辺 隆, 宮原 慶裕, 北野 滋久, 加藤 栄史, 三嶋 秀行, 山本 昇, 岩瀬 弘明, 服部 浩佳, 舩越 建, 小島 隆嗣, 峰野 純一, 珠玖 洋  
日本癌治療学会学術集会 2017年10月  
NY-ESO-1 抗原特異的 TCR 遺伝子改変 T細胞輸注後の臨床反応とサイトカイン放出症候群  
石原 幹也, 北野 滋久, 宮原 慶裕, 影山 慎一, 加藤 栄史, 三嶋 秀行, 山本 昇, 岩瀬 弘明, 服部 浩佳, 舩越 建, 小島 隆嗣, 渡辺 隆, 珠玖 洋  
日本癌学会総会 2017年9月  
がん免疫療法の一段の進化へむけて MAGE-A4 及び NY-ESO-1 抗原特異的 TCR 遺伝子改変 T細胞輸注療法の臨床試験  
影山 慎一, 石原 幹也, 北野 滋久, 宮原 慶裕, 加藤 栄史, 三嶋 秀行, 山本 昇, 岩瀬 弘明, 服部 浩佳, 舩越 建, 小島 隆嗣, 渡辺 隆, 珠玖 洋  
日本癌学会総会 2017年9月  
がん精巢抗原 MAGE-A4 由来ペプチド p230-239 を HLA-A\*02:01 拘束性に認識する TCR 様抗体を使用した CAR によるがん抑制作用の検討  
赤堀 泰, 加藤 裕也, 宮原 慶裕, 天池 千咲, 王 立楠, 加藤 琢磨, 池田 裕明, 珠玖 洋  
日本癌学会総会 2017年9月  
ヒト大腸がんにおける腫瘍浸潤 CD8+T 細胞のクロナリティと腫瘍反応性の解析  
藤井 啓介, 宮原 慶裕, 問山 裕二, 井上 靖浩, 浜名 洋, 遠藤 洋子, 楠 正人, 井上 正宏, 岸 裕幸, 珠玖 洋  
日本癌学会総会 2017年9月  
ヒト大腸がんにおける腫瘍浸潤 CD8+T 細胞のクロナリティと腫瘍反応性の解析  
藤井 啓介, 宮原 慶裕, 問山 裕二, 井上 靖浩, 浜名 洋, 遠藤 洋子, 楠 正人, 井上 正宏, 岸 裕幸, 珠玖 洋  
日本がん免疫学会総会 2017年6月  
NY-ESO-1 を標的とする TCR 遺伝子改変 T細胞輸注療法における安全性の基礎的検討と輸注細胞動態及び血清学的解析  
宮原 慶裕, 北野 滋久, 石原 幹也, 影山 慎一, 加藤 栄史, 三嶋 秀行, 山本 昇, 岩瀬 弘明, 服部 浩佳, 舩越 建, 小島 隆嗣, 池田 裕明, 渡辺 隆, 珠玖 洋  
日本がん免疫学会総会 2017年6月  
がん精巢抗原 MAGE-A4 由来ペプチド p230-239 を HLA-A\*02:01 拘束性に認識する TCR 様抗体を使用した CAR によるがん抑制作用の検討  
赤堀 泰, 加藤 裕也, 宮原 慶裕, 天池 千咲, 王 立楠, 加藤 琢磨, 池田 裕明, 珠玖 洋  
日本がん免疫学会総会 2017年6月  
NY-ESO-1 TCR 遺伝子改変 T細胞輸注におけるサイトカイン放出症候群発症と臨床反応  
北野 滋久, 石原 幹也, 宮原 慶裕, 影山 慎一, 加藤 栄史, 三嶋 秀行, 山本 昇, 岩瀬 弘明, 服部 浩佳, 舩越 建, 小島 隆嗣, 池田 裕明, 渡辺 隆, 珠玖 洋

日本がん免疫学会総会 2017年6月  
難治性尿路上皮がんおよび前立腺がんに対する CHP-NY-ESO-1 がんワクチンと MIS416 の併用療法の第Ⅰ相臨床試験

戸野 泰孝, 石原 幹也, 宮原 慶裕, 白石 泰三, 佐藤 永一, 影山 慎一, 片山 直之, 珠玖 洋, 杉村 芳樹

日本癌学会総会 2016年10月

CT26 腫瘍局所浸潤 CD8+T 細胞の TCR レパトア解析と認識エピトープの同定

藤井 啓介, 宮原 慶裕, 村岡 大輔, 下岡 清美, 浜名 洋, 岸 裕幸, 珠玖 洋

日本癌学会総会 2016年10月

腫瘍"mutanome"に対する CXCR3 リガンド mRNA をセンサーとして利用した CD8+ T 細胞免疫応答の同定(Determining CD8+ T cell immune responses against the tumor "mutanome" using CXCR3 ligand mRNAs as sensors)

宮原 慶裕, 藤井 啓介, 村岡 大輔, 上村 光弘, 山口 類, 井元 清哉, 宮野 悟, 珠玖 洋

日本がん免疫学会総会 2016年6月

WT1 ペプチド-HLA-A24 複合体を認識するヒト抗体の単離とそれを用いた CAR 治療法の開発

赤堀 泰, 米山 元裕, 池田 裕明, 宮原 慶裕, 織戸 由貴, 天石 泰典, 岡本 幸子, 峯野 純一, 竹迫 一任, 珠玖 洋, 安川 正貴, 藤原 弘

日本がん免疫学会総会 2016年6月

- ②1 CT26 腫瘍局所浸潤 CD8+T 細胞の TCR レパトア解析と認識エピトープの同定

藤井 啓介, 宮原 慶裕, 村岡 大輔, 下岡 清美, 浜名 洋, 岸 裕幸, 珠玖 洋  
日本がん免疫学会総会 2016年6月

- ②2 難治性尿路上皮がんおよび去勢抵抗性前立腺がんに対する CHP-NY-ESO-1 がんワクチンと MIS416 の併用療法 第Ⅰ相臨床試験の報告

神田 英輝, 石原 幹也, 佐々木 豪, 堀 靖英, 曾我 倫久人, 原田 直純, 宮原 慶裕, 影山 慎一, 珠玖 洋, 杉村 芳樹

日本泌尿器科学会総会 2016年4月

〔図書〕(計 3 件)

腫瘍反応性 T 細胞および変異抗原のがん治療への利用とその展望

宮原 慶裕

科学評論社 臨床免疫・アレルギー科 70(4) 422 (p378-382) 2018年10月

【がん免疫療法-What's now and what's next?-】(第4章)次世代がん免疫療法へのチャレンジ 細胞内がん抗原を標的とした CAR-T 細胞

宮原 慶裕

メディカルドゥ 遺伝子医学 MOOK (31) 292 (p222-226) 2017年7月

【免疫療法の進歩と問題点】 がん免疫療法の将来展望

宮原 慶裕

科学評論社 腫瘍内科 20(2) 179 (p90-94) 2017年8月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shikuken.jp/about/history/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 原田 直純

ローマ字氏名: (HARADA, Naozumi)

所属研究機関名: 三重大学

部局名: 医学系研究科

職名: 特任講師(研究担当)

研究者番号(8桁): 4052091