

令和元年6月3日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07192

研究課題名(和文) オートファジーによって生成されるエピトープによる抗腫瘍効果の解析

研究課題名(英文) Investigation of immunotherapy targeting an epitope generated through autophagy.

研究代表者

岡村 文子(出町文子)(DEMACHI-OKAMURA, Ayako)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫応答研究分野・主任研究員

研究者番号：10546948

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)：活性型K-ras変異遺伝子を有する膵臓がんにおける恒常的高活性オートファジーによって生成されるエピトープを認識する細胞傷害性T細胞(CTL)を利用した免疫療法が可能であるかどうかをマウスを用いて検討した。特異性を厳密に判定するためにCTLクローンをを用いたところ、弱いながらも腫瘍増殖抑制効果が観察された。CTLクローンは体内で一度働くと効果が無くなってしまいうために弱い効果であったことが考えられた。そのため次に治療方法の一つとして、本CTLクローンの特異性を担っているT細胞受容体(TCR)遺伝子を単離して、治療効果を判定した。CTLクローンと同等の、腫瘍に対する免疫反応性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノーベル賞受賞をきっかけに広くがんに対する免疫チェックポイント阻害剤療法が注目されて、免疫細胞によるがん治療に期待が寄せられている。一部のがんには有効ではあるが、より広く有効性を得るためにはその標的となるがん抗原の詳細な情報が必要である。そこで、膵臓がんを標的とした免疫治療の可能性を検討すべく、T細胞療法の検討を行った。マウスにおける効果を確認し、より効果の高い治療であるT細胞受容体移入療法の可能性を検討して、高い効果が期待できる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：To evaluate effect of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) that respond pancreatic cancer, adoptively transferred CTLs in a mouse xenograft model. The CTL clones could work weakly, and the pancreatic cancer cells showed slower growth than control mice. Although little effects were demonstrated in this model, stronger effects needed to treat the pancreatic cancers. To overcome this point, clinical application of t-cell receptor (TCR) gene therapy was tested. As a results, good effects were observed in vitro analyses.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：CTL オートファジー TCR K-ras

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は標的細胞の表面上にあるヒト主要組織適合抗原 (HLA) が提示するエピトープペプチドを認識する。この能力を活用してがんを免疫細胞、特に T 細胞で治療するがん免疫療法の効果が、免疫チェックポイント阻害剤を用いた臨床研究から注目されている。この治療ではがん細胞のみが持つ変異に由来する抗原 (ネオアンチゲン) が多いことが臨床効果に関連していることから、その標的としてネオアンチゲンの有効性に期待が寄せられている。しかしながら、実際にどのような抗原を標的とすることが最適であるのか、臨床効果をより出せるのかなどは明らかとなっていなかった。一方で、研究代表者は *K-ras* 遺伝子変異を有する膵臓がんを誘導される恒常的高活性オートファジーを介在した場合にのみ生成される CTL エピトープを同定した。外科的手術以外に有効な治療方法がない膵臓がんを対象とした免疫療法として、同定した抗原の有効性が示せれば治療の一つとして応用できる。

2. 研究の目的

膵臓がんに対する免疫療法として、同定したオートファジー介在性エピトープの有用性を評価するために、マウスを用いた *in vivo* での治療効果の検討、および T 細胞受容体 (T-cell receptor; TCR) を移入した TCR-T 療法への応用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスにおける *in vivo* での治療効果の検討

マウス自身の T 細胞、NK 細胞、B 細胞を持たず、ヒト血球系細胞の定着が良好である免疫不全マウス (NOG; NOD/SCID/IL-2R γ null) を用いた。まず、このマウスで治療効果を調べることができるかどうかを確認するために、活性型 *K-ras* 遺伝子変異を持ち、オートファジーが亢進している膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 細胞を CTL クローンと先に混ぜて腫瘍の増殖効果を調べる Win assay を行った。次に、皮下に MIA PaCa-2 細胞を接種して数日後に尾静脈から CTL クローンを投与した後、腫瘍径を経時的に測定し、マウスの生存曲線を作成して抗腫瘍効果を判定した。投与するタイミングや治療に要する CTL クローンの細胞数を検討した。

(2) TCR 移入 T 細胞療法の有効性の検討

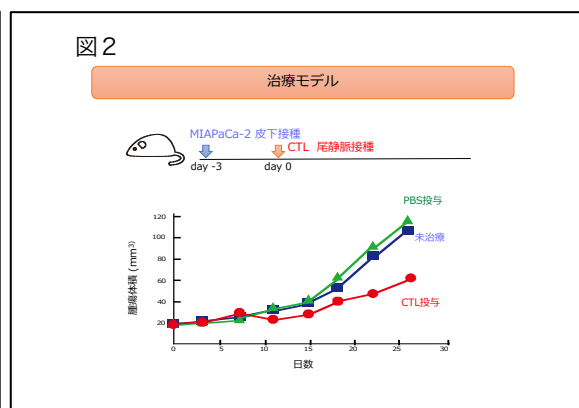
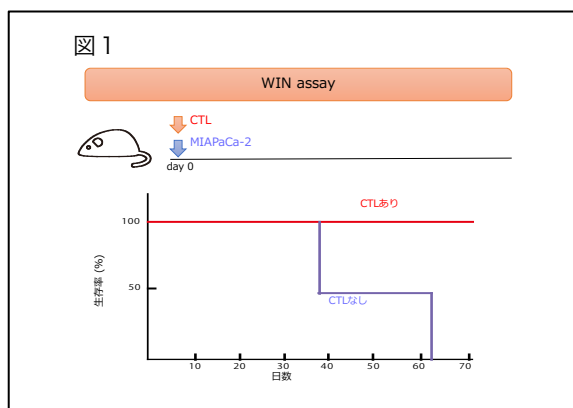
CTL クローンから完全長の TCR- α 鎖および TCR- β 鎖 cDNA を単離して同定した。TCR- α 鎖と TCR- β 鎖と一緒に発現するレトロウイルスベクターを構築した。*in vitro* における T 細胞の機能を解析するために、レトロウイルスベクターを用いてインターフェロン応答性 Jurkat 細胞に TCR を移入した。TCR 移入 Jurkat 細胞を用いて、HLA 拘束性および CTL エピトープペプチドへの反応性を検討するために、IFN- γ ELISA を行った。また、ヒト活性化 T 細胞における応答性を検討するために、健康人由来活性化 T 細胞に TCR 遺伝子を移入して、IFN- γ ELISA にて特異性を判定した。次に TCR 移入 T 細胞治療で問題となる導入した TCR と内在性 TCR のミスペアリング解消のために内在性 TCR 遺伝子の発現抑制ができるかどうかを shRNA-mir による効果を試みた。

4. 研究成果

(1) マウスにおける *in vivo* での治療効果の検討

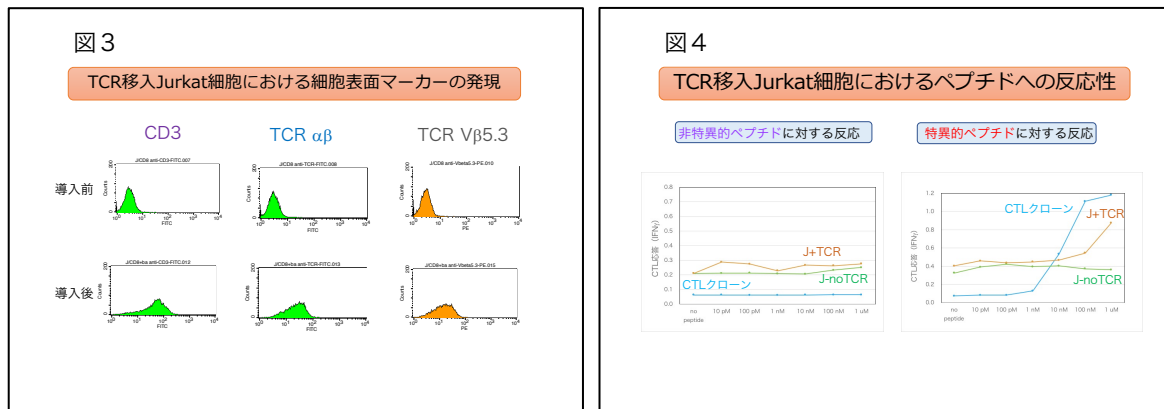
① NOG マウスにおいて、免疫療法の効果を調べることができるかどうかを Win assay にて調べた。結果、図 1 に示すように CTL と先混ぜすることで腫瘍はマウス体内で増殖することができないことが明らかとなった。

② 次に、実際に治療する治療モデルとしての実験系で治療効果を判定した。図 2 に示す通り、MIA PaCa-2 細胞を治療の 3 日前に皮下に接種したのちに尾静脈に T 細胞を投与すると、投与後 5 日を経過した頃に腫瘍の増殖を抑制する効果が見られたもののその後腫瘍は増殖した。しかしながら、弱いながらも未治療群や PBS 投与群よりも治療効果が得られた。CTL クローンにより治療ではこれが限界であろうと考えて、TCR 遺伝子を単離して TCR-T 移入療法を行うための実験へ移行した。

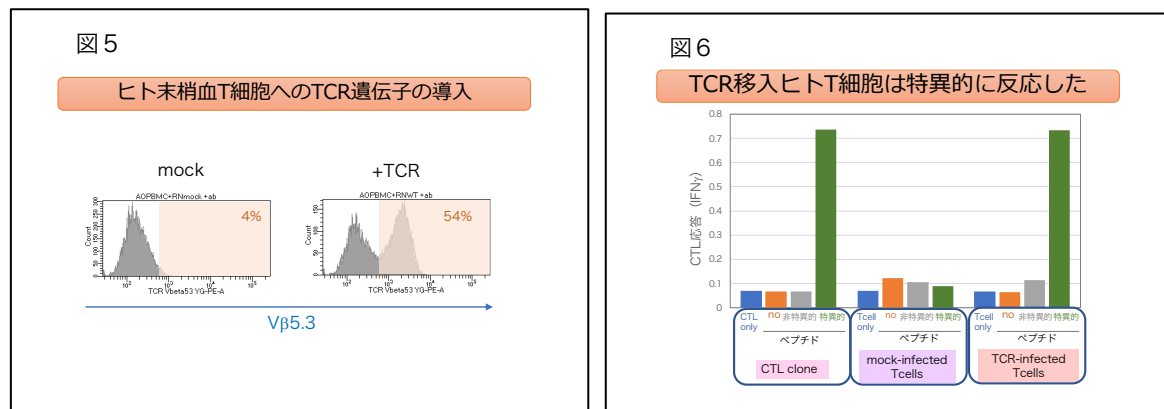


(2) TCR 移入 T 細胞療法の有効性の検討

① CTL クローンから完全長の TCR- α 鎖および TCR- β 鎖 cDNA を単離して解析したところ、V β 5.3 であることが明らかとなった。レトロウイルスベクターにてインターフェロン応答性 Jurkat 細胞に TCR- α 鎖と TCR- β 鎖を一緒に発現させた。細胞表面マーカーの解析から、図 3 に示す通り、レトロウイルスベクターで導入後 CD3、TCR $\alpha\beta$ 、TCRV β 5.3 の発現が増加しており、遺伝子を発現させることができた。この TCR 移入 Jurkat 細胞を用いて HLA 拘束性および CTL エピトープペプチドへの反応性を IFN- γ ELISA にて調べた。その結果、図 4 に示す通り、CTL クローンよりは感度は落ちるものの、特異的ペプチドにのみ反応することが明らかとなった。HLA-A2 などの HLA にペプチドをパルスしたときには反応せず、HLA-A24 拘束性であった。



② ヒト活性化 T 細胞における応答性を検討するために、健康人由来活性化 T 細胞に TCR 遺伝子を移入した。図 5 に示す通り、Jurkat 細胞への導入に使用したレトロウイルスベクターによってセクションしていない状態で約半数の細胞に TCR 遺伝子を導入することができた。この未セクションの状態で、図 6 の実験を行った。その結果、非特異的ペプチドに反応することなく、特異的ペプチドに反応して、IFN- γ を産生した。TCR の陽性率は約半数であることから、CTL クローンと比べて、半数の数の細胞で CTL クローンと同等の効果が得られた。



③ ヒト活性化 T 細胞に導入したデータからは内在性 TCR とのミスペアリングが本 TCR 遺伝子では少ないように考えられたが、一般的に問題となる TCR 同士とのミスペアリングを解消するために、検討を行った。データは示さないが、これまでのところ、shRNA-mir を使用して複数の遺伝子抑制ターゲットを対象とした設計では発現抑制がうまくいかなかった。今後の課題として検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

①Kataoka K, Miyoshi H, Sakata S, Dobashi A, Couronné L, Kogure Y, Sato Y, Nishida K, Gion Y, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Watatani Y, Kakiuchi N, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Sanada M, Onozawa M, Teshima T, Yoshiki Y, Ishida T, Suzuki K, Shimada K, Tomita A, Kato M, Ota Y, Izutsu K, Demachi-Okamura A, Akatsuka Y, Miyano S, Yoshino T, Gaulard P, Hermine O, Takeuchi K, Ohshima K, Ogawa S.

Leukemia. 査読有 epub ahead of print, doi: 10.1038/s41375-019-0380-5

②Ohta R, Demachi-Okamura A, Akatsuka Y, Fujiwara H, Kuzushima K. Improving TCR affinity on 293T cells. J Immunol Methods. 査読有 466, 2019, 1-8. doi: 10.1016/j.jim.2018.11.010.

〔学会発表〕(計5件)

- ①太田里永子、岡村文子、赤塚美樹、葛島清隆 ヒト培養細胞を用いた TCR 親和性成熟システムの樹立 第22回日本がん免疫学会総会、2018年8月3日、岡山県岡山市 岡山コンベンションセンター
- ②片岡圭亮、三好寛明、岡村文子、坂田征士、木暮泰寛、土橋映仁、佐藤康晴、西田賢司、白石友一、田中洋子、千葉健一、綿谷陽作、塩澤裕介、吉田健一、真田昌、加藤元博、葛島清隆、宮野悟、大田泰徳、伊豆津宏二、吉野正、Olivier Hermine、竹内賢吾、赤塚美樹、大島孝一、小川誠司 Frequent somatic alterations involving programmed death ligands in EBV-related lymphomas 第79回日本血液学会総会、2017年10月20日、東京都千代田区 東京国際フォーラム
- ③赤塚美樹、岡本晃直、岡村文子、楫屋良子、稲熊容子、白石圭子、葛島清隆、恵美宣彦 再生不良貧血発症に関わる抗原遺伝子同定の試み 第9回血液疾患免疫療法学会、2017年9月30日 東京都千代田区 一橋大学一橋講堂
- ④岡村文子、赤塚美樹、葛島清隆 がん細胞では異常な TAP 分子によりエピトープを提示する 第8回血液疾患免疫療法学会、2016年9月3日 北海道札幌市 北海道大学医学部学友会館
- ⑤赤塚美樹、白石圭子、楫屋良子、岡村文子、太田里永子、藤原弘、葛島清隆、恵美宣彦 遺伝子導入 TCR/CAR への刺激でインターフェロンを産生する人工 T 細胞株の作成 第8回血液疾患免疫療法学会、2016年9月3日 北海道札幌市 北海道大学医学部学友会館

〔図書〕(計1件)

- ①岡村文子、葛島清隆、メディカルレビュー社、がん免疫療法、2018、128-129

〔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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※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、研究者個人に帰属されます。