

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16301

研究課題名（和文）大腸癌浸潤T細胞の腫瘍反応性解析による新規遺伝子改変T細胞移入療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel gene-modified T cell transfer therapy by tumor reactivity analysis of colorectal cancer infiltrating T cells

研究代表者

祐川 健太（sukegawa, kenta）

富山大学・附属病院・診療助手

研究者番号：50816808

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がんや同時性の肝転移、重複がんの腫瘍浸潤リンパ球を解析することで、腫瘍浸潤リンパ球中にクローナルに増殖するTCRが存在していた。それらのPD-1の発現は一致する傾向にあり、PD-1陽性のものは陽性で、陰性のものは陰性に増殖していた。そのTCR中にCancer tissue-originated spheroid法を用いて培養した腫瘍に反応する特異的なTCRを見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法の1つであるTCR-T細胞療法は、がん特異的TCR遺伝子を用いた遺伝子改変T細胞移入療法であるが、この療法では患者のがん細胞に特異的なTCR遺伝子が必要である。従来の方法では、TCR遺伝子の取得に多大な労力と時間を必要としていたが、今回の研究成果により簡便・迅速ながん特異的TCR遺伝子を取得することができ、治療効果の高い個別化TCR-T療法の臨床応用が可能となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Analysis of tumor-infiltrating lymphocytes revealed that TCRs that proliferated clonally were present in the tumor-infiltrating lymphocytes. A specific TCR that responds to tumors cultured using the Cancer tissue-originated spheroid method could be found in the TCR.

研究分野：外科

キーワード：遺伝子改変T細胞移入療法 免疫療法 腫瘍浸潤リンパ球 がん特異的TCR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんの治療法として、これまで手術・化学療法・放射線療法が中心的役割を担ってきた。これらに加え、複合的に免疫治療を行なうことで、がんの治療効果の向上や再発の低減などが期待されている。これまでに非特異的免疫賦活薬、サイトカインを投与する治療法、養子免疫療法などさまざまな免疫療法が試みられてきたが、がんの標準治療として実施されるには至っていない。近年、がん細胞が免疫細胞にブレーキをかけていることが明らかとなり、そのブレーキを解除する、免疫チェックポイント阻害療法に注目が集まっている。本邦でも、悪性黒色腫や非小細胞肺癌、腎細胞がんといったがん種にヒト型抗ヒト PD-1 モノクローナル抗体が承認され、がんの標準治療として実施されている。また、米国では CAR-T 細胞療法が承認され、T 細胞を用いたがん免疫療法への期待が非常に高まっている。がん免疫療法の 1 つである TCR-T 細胞療法は、がん特異的 TCR 遺伝子を用いた遺伝子改変 T 細胞移入療法であるが、この療法では患者のがん細胞に特異的な TCR 遺伝子が必要である。しかし、従来の方法では、TCR 遺伝子の取得に多大な労力と時間を必要としており、より簡便・迅速ながん特異的 TCR 遺伝子を取得する方法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

大腸がん患者から迅速・簡便ながん特異的 TCR 遺伝子を取得する方法を開発し、その腫瘍反応性を解析して TCR-T 細胞療法を大腸がんに対する集学的治療の新たな柱として確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Cancer tissue-originated spheroid (CTOS)法によるがん細胞の培養

外科手術により摘出した大腸がん組織を適切な方法で機械的・化学的に分散し、500 $\mu$ m、250 $\mu$ m、100 $\mu$ m、40 $\mu$ m のセルトレーナーで濾過する。100 $\mu$ m、40 $\mu$ m のセルトレーナーで回収された細胞を CTOS として培養する。

#### (2) TCR 遺伝子の取得

上記セルトレーナーを通過した細胞を PD-1、CD137 の発現を指標に活性化 CD8<sup>+</sup>T 細胞をセルソーターにて 96well PCR プレートに単一ソートする。次に、申請者らの開発した TCR 遺伝子増幅法を用いて TCR cDNA を増幅する。cDNA の塩基配列はサンガー法およびキャピラリー DNA シーケンサーを用いて解析し、TCR 遺伝子の塩基配列を決定する。そして、TCR のクローン性を解析する。

#### (3) in vitro での TCR 遺伝子の腫瘍反応性の解析

(2) で取得した TCR 遺伝子よりクローナルに増殖されているものを数個ピックアップし、レトロウイルスベクターを用いて末梢血リンパ球に遺伝子導入する。これと(1)により調整した CTOS を共培養し、遺伝子導入したリンパ球が産生する IFN- $\gamma$  を測定することで、TCR の腫瘍反応性の解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) PD-1<sup>+</sup>および PD-1<sup>-</sup>TIL のレパトリー

2つのポピュレーションで TCR レパトリーを比較すると各ポピュレーションで発現している TCR の種類はほとんど一致しなかった。

#### (2) 大腸がん原発巣および肝転移巣における CD8<sup>+</sup>TIL の TCR レパトリー

同一 TCR を発現する T 細胞が原発巣だけでなく、転移巣においてもクローナルに増殖していた。さらに、原発巣で PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL クローンは転移巣においても PD-1 を発現しており、一方、原発巣においてクローナルに増殖している PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TIL クローンは転移巣においても PD-1 を発現しない傾向を示した。

### **( 3 ) 同時性重複がん(大腸がん・肝細胞がん(HCC))の TCR レポートリー**

同時性の重複がんでは両方の TIL で共通の TCR を発現しているものは少なかった。しかし、一部の TCR は共通しており、一方で PD-1+ であった場合は、他方でも PD-1 を発現しており、一方で PD-1- であった場合は他方でも PD-1 は発現していなかった。

### **( 4 ) クローナルに増殖した TIL 由来 TCR のがん細胞反応性の解析**

1つの腫瘍浸潤リンパ球由来の TCR を発現させた T 細胞が患者由来の CTOS と反応し、ネガティブコントロールと比較して有意に IFN- $\gamma$  を産生した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 祐川健太, 小林 栄治, 浜名 洋, 下岡 清美, 佐伯 しおり, 長田 拓哉, 村口 篤, 岸 裕幸, 藤井 努
2. 発表標題 大腸癌免疫療法の確立に向けた腫瘍浸潤リンパ球レパトリー解析と腫瘍反応性の解析
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祐川健太, 浜名 洋, 下岡 清美, 小林 栄治, 佐伯 しおり, 長田 拓哉, 村口 篤, 岸 裕幸, 藤井 努
2. 発表標題 大腸がんの腫瘍浸潤リンパ球のPD-1+およびPD-1-Tリンパ球集団のT細胞受容体レパトリー解析
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祐川健太, 浜名 洋, 小林 栄治, 下岡 清美, 佐伯 しおり, 長田 拓哉, 村口 篤, 岸 裕幸, 藤井 努
2. 発表標題 大腸がんおよび同時性肝転移の腫瘍浸潤リンパ球のT細胞受容体レパトリー解析
3. 学会等名 JDDW
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祐川健太, 佐伯 しおり, 下岡 清美, 浜名 洋, 宮原 慶裕, 小林 栄治, 長田 任一哉, 小澤 龍彦, 藤井 努, 珠玖 洋, 村口 篤, 岸 裕幸
2. 発表標題 腫瘍浸潤CD8+ T細胞におけるPD-1の発現はTCRレパトアに規定される
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祐川健太
2. 発表標題 Tumor infiltrating lymphocyte repertoire analysis for establishment of efficient colon cancer immunotherapy
3. 学会等名 消化器癌発生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 祐川健太 浜名 洋, 下岡 清美, 小林 栄治, 佐伯 しおり, 長田 拓哉, 藤井努, 村口 篤, 岸 裕幸
2. 発表標題 Tumor infiltrating lymphocyte repertoire analysis of colon cancer
3. 学会等名 免疫学会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------