

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07330

研究課題名(和文) がん性胸腹膜炎の病態解明を基盤としたネオ抗原特異的がん免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of neoantigen-specific cancer immunotherapy based on the pathogenesis of cancerous cancer pleuroperitonitis

研究代表者

小屋 照継 (KOYA, Terutsugu)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：70807164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異で生じた新生抗原(ネオアンチゲン)を標的とするがん免疫療법은、有望ながん治療戦略として期待されるが、患者個別のネオアンチゲンの同定、ネオアンチゲン特異的T細胞の誘導技術、がん微小環境の改善は課題である。我々は、進行期膵がんに伴うがん性胸水の解析から、患者個別のSMAD4 P130Lネオアンチゲンを見出し、SMAD4 P130Lネオアンチゲン特異的CD8+T細胞を誘導する抗原提示細胞ワクチンを確立した。さらに、がん性胸水にCD14+CD68+CD163+TIM-3+マクロファージの存在を明らかにし、免疫抑制環境を改善させるために標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、患者個別のネオアンチゲンを *in silico* 予測し、優れた誘導能の証明されたネオアンチゲンワクチンを患者に投与することで、高い抗腫瘍作用の期待されるがんワクチン療法の確立に繋がると期待される。また、がん微小環境のマクロファージは、免疫抑制環境を改善させるために標的となる可能性が示唆された。マクロファージを標的とした免疫抑制の解除は、がんワクチンと相乗効果が期待される。本研究成果に基づいて、安全性を検証するネオアンチゲン-抗原提示細胞がんワクチン療法の安全性試験(jRCTc040210109)が進行中である。

研究成果の概要(英文)：Cancer immunotherapy targeting neoantigens derived from genetic mutations in cancer would be a promising strategy for individualized treatment. However, despite identifying cancer-specific neoantigens, neoantigen vaccination to induce neoantigen-specific T cells with an improvement of the immunosuppressive tumor microenvironment is still controversial. Herein, we identified cancer-specific SMAD4 P130L neoantigen in a patient with pancreatic cancer who developed pleural effusion during the progressive disease. Furthermore, neoantigen vaccines using dendritic cells harboring peptides compatible with the human leukocyte antigen could induce SMAD4 P130L neoantigen-specific CD8+ T cells. Furthermore, we could identify CD14+CD68+CD163+TIM-3+ macrophages in the pleural effusion, suggesting that these M2-type macrophages could be targeted to improve the immunosuppressive environment for the efficacy of neoantigen vaccines.

研究分野：再生医療

キーワード：がん性胸腹膜炎 ネオアンチゲン 樹状細胞 マクロファージ 抗原提示細胞 がんワクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オンコパネルを用いたがんゲノム診断では、遺伝子変異に対する分子標的薬の同定は 10%程度に過ぎない。がんゲノム診断の限界を改善する上で、個別の患者の遺伝子変異で生じた新生抗原(ネオアンチゲン)を標的とするがん免疫療法は有望と期待される。免疫抑制環境を解除する Programmed death receptor-1(PD-1), Programmed cell death ligand-1 (PD-L1)および Cytotoxic T lymphocytes-related protein-4 (CTLA-4)の免疫チェックポイント阻害薬療法は、遺伝子変異の頻度が高いがんほど有効性が期待され、遺伝子変異で生じたネオアンチゲンを介した抗腫瘍作用の関与が示唆される。しかしながら、免疫抑制のがん微小環境下のネオアンチゲン特異的がん免疫応答は未だ詳細に検証されていない。がん性胸腹水には、がん細胞、免疫細胞、ストローマ細胞が混在し、ネオアンチゲンを標的としたがん免疫の理解に有用な病態モデルと考えられる。ヒトのがん性胸腹膜炎のモデルは、患者個別のネオアンチゲン同定手法の確立、ネオアンチゲン特異的 T 細胞の解明に繋がる。さらに、がん微小環境を支えるストローマ細胞の解析から、どのような免疫抑制環境にあるのかを明らかにすることで、ネオアンチゲンと相乗効果を促す最適な補助薬の選定が可能である。

### 2. 研究の目的

本研究では、がんと免疫の本質的な病態のメカニズムの解明が期待できるがん性胸腹膜炎に注目した。患者個別のネオアンチゲンを同定し、ネオアンチゲン特異的 T 細胞の誘導を評価することで、免疫抑制のがん微小環境の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) がん性胸水細胞を用いた遺伝子変異の同定

進行期肺がん患者のがん性胸水検体から患者個別のネオアンチゲンを同定するために、がん性胸水細胞を用いたオンコパネル解析を行った。先行研究よりがん性胸水には、Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)<sup>+</sup>のがん細胞(腺癌)が確認されており、EpCAM 発現の有無で細胞をソーティングし、免疫染色およびシーケンス解析からネオアンチゲン発現を検証した。

#### (2) ネオアンチゲン-抗原提示細胞がんワクチンの確立

ネオアンチゲン特異的 T 細胞の誘導技術を確立するために、ヒト単球を原料として、interferon- $\alpha$ (IFN)および granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、human platelet lysate (HPL)を用いた抗原提示細胞(HPL-IFN-DC)を開発した(Watanabe *et al.*, Genes Cells, 2021; Kawaguchi *et al.*, Vaccines, 2021; Date *et al.*, Vaccines, 2021)。NetMHCpan version 3.4を用いた *in silico*解析から、患者保有の HLA に高い結合が予測されたネオアンチゲン候補ペプチドを選定し、HPL-IFN-DC に付加させた。がん性胸水由来の CD8<sup>+</sup>T 細胞とネオアンチゲンを搭載した抗原提示細胞を共培養し、ELISpot assay を用いた IFN- $\gamma$ 産生細胞の検出から、ネオアンチゲン特異的 T 細胞誘導を評価した。

#### (3) がん性胸水の細胞集団および免疫チェックポイント分子の検出

進行期肺がん患者のがん性胸水検体を用いたフローサイトメーター解析から、がん細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、マクロファージの免疫チェックポイント分子 PD-1, PD-L1 および TIM-3 発現を検証した。

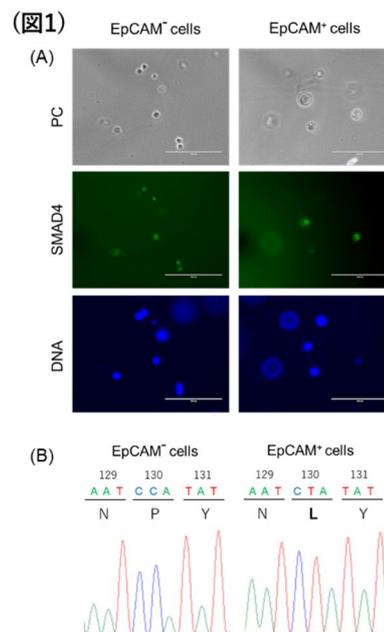
### 4. 研究成果

#### (1) がん性胸水の EpCAM<sup>+</sup>がん細胞の SMAD4 P130L 発現

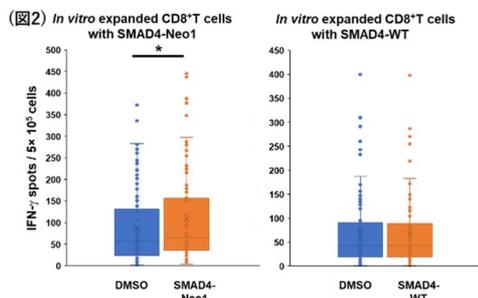
がん性胸水細胞を用いたオンコパネル解析の結果、SMAD4 P130L 遺伝子変異を見出した。パパニコロウ染色により EpCAM<sup>+</sup>細胞は腺癌と確認された。SMAD4 P130L 遺伝子変異ががん細胞で特異的に見られるのか検証を行った。蛍光免疫染色の結果、EpCAM 発現の有無に関わらずに SMAD4 のタンパク質発現が確認された(図 1A)。一方で、direct PCR シーケンス解析から、EpCAM<sup>+</sup>細胞では非検出であったが、EpCAM<sup>+</sup>がん細胞において SMAD4 P130L のホモジェナスな mRNA 発現が観察された(図 1B)。これらの結果より、がん性胸水に存在する EpCAM<sup>+</sup>がん細胞は、SMAD4<sup>P130L</sup> タンパク質を発現し、免疫原性を有するネオアンチゲンである可能性が示唆された。

#### (2) HLA-A\*11:01 拘束性 SMAD4<sup>P130L</sup> ネオアンチゲンに応答する CD8<sup>+</sup>T 細胞の検出

患者保有の HLA-Class I に対する SMAD4<sup>P130L</sup> の *in silico* 結合予測の結果、HLA-A\*11:01 (SMAD4-Neo1, -Neo2, -Neo3 と呼称)に対する高い結合親和性の予測されたネオアンチゲン候補ペプチドを抽出した。野生型と比較して、SMAD4-Neo1, Neo3 は高い結合親和性を示した (SMAD4-Neo1, Wild 332 nM, Missense 129 nM; SMAD4-Neo3, Wild 416 nM, Missense 193

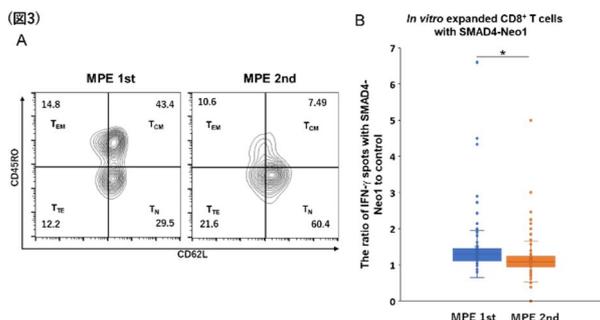


nM)。がん性胸水に存在する CD8<sup>+</sup>T 細胞と SMAD4-Neo 抗原パルス自己の抗原提示細胞 HPL-IFN-DC (HLA-A\*11:01, 24:02) を用いて *in vitro* 拡大誘導を行った。拡大培養後の ELISpot assay から、SMAD4-Neo1 ペプチド (8mer の SVCVNLHY) による IFN- $\gamma$  産生細胞の増加が認められた (図 2)。SMAD4-Neo1 ペプチドを野生型 (WT) に変換した場合 SMAD4-WT (SVCVNPYH)、IFN- $\gamma$  産生細胞の増加は見られなかったことから、SMAD4-Neo1 に対する特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の免疫応答が明らかになった。さらに、SMAD4-Neo1 と高い結合が予測された HLA-A\*11:01 拘束性を明らかにするために、SMAD4-WT または SMAD4-Neo1 ペプチドをパルスした HEV-0271 細胞株 (HLA-A\*11:01 をホモジェナスに有する抗原提示細胞) を用いた ELISpot assay を行った。SMAD4-Neo1 による特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞の増加が認められ、がん性胸水において、HLA-A\*11:01 拘束性の SMAD4<sup>P130L</sup> ネオアンチゲンに反応する CD8<sup>+</sup>T 細胞の潜在的な存在が確認された。我々が開発した抗原提示細胞 (HPL-IFN-DC) はネオアンチゲン特異的 T 細胞誘導能を有することが明らかになった (血小板溶解物を用いた樹状細胞の調製法: PCT/JP2021/040505 | 特願 2020-184317、クラスター制御培養による樹状細胞の調製法: 特願 2020-204084)。



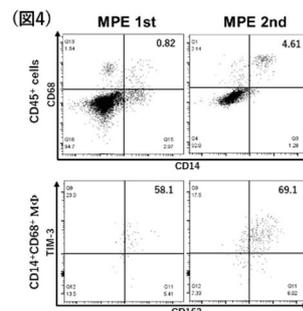
### (3) がん性胸水の CD8<sup>+</sup>T 細胞のメモリーサブセットと SMAD4<sup>P130L</sup> 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞誘導の検出

抗腫瘍免疫を記憶し、作用させるためには memory T 細胞が重要な役割を担っている (Li *et al.*, Front Oncol, 2021)。がん性胸水に存在する CD8<sup>+</sup>memory T 細胞サブセットの観点から、SMAD4<sup>P130L</sup> ネオアンチゲン特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞誘導を検証した。進行期のがん性胸水 Malignant pleura effusion, MPE 1st), 約 2 カ月後 MPE 2nd の CD8<sup>+</sup>T 細胞では central memory T (T<sub>CM</sub>) の顕著な減少が観察された (43.4% から 7.49%, 図 3A)。興味深い点に、MPE 1st と比較して、MPE 2nd では SMAD4<sup>P130L</sup> ネオアンチゲン特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導に低下が認められた (図 3B)。これらの結果より、がん性胸水の CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> は病勢により変動し、SMAD4<sup>P130L</sup> ネオアンチゲン特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導に参与する可能性が示唆された。



### (4) がん性胸水の CD14<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>マクロファージの TIM-3 発現

進行期肺癌患者のがん性胸水の細胞集団およびそれらの細胞集団の免疫チェックポイント分子の発現を検討した。がん性胸水 1 回目の提供 MPE 1st では、がん性胸水全細胞の 0.60%、約 2 カ月後の MPE 2nd には、1.28% のがん細胞マーカー EpCAM<sup>+</sup> 細胞が観察された。免疫チェックポイント分子の PD-L1 および T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (TIM-3) は EpCAM<sup>+</sup> がん細胞でほとんど発現を認めなかった。一方で、がん性胸水の CD8<sup>+</sup>T 細胞は (MPE 1st, 19.1%; MPE 2nd, 22.6%)、僅かに PD-1 および TIM-3 発現の増加が観察された (PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells: 0.51% から 2.79%; TIM-3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells: 3.26% から 5.24%)。がん性胸水中の CD45<sup>+</sup> 細胞には CD14<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>マクロファージが観察され増加を示した (CD45<sup>+</sup> 細胞中 0.82% から 4.61%, 図 4 上段)。CD14<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>マクロファージは PD-L1 発現を認めなかったが、CD163<sup>+</sup>TIM-3<sup>+</sup> 発現の増加が観察された (CD14<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>マクロファージの 58.1% から 69.1%, 図 4 下段)。



### 今後の展望、社会的普及性

本研究により、がん性胸水は、患者個別のネオアンチゲンの同定、ネオアンチゲン特異的免疫動態をモニタリング可能な有用な病態モデルであると明らかになった。がん性胸水の CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> は病勢により変動し、ネオアンチゲン特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導に参与する可能性が示唆された。さらに、進行期肺癌患者のがん性胸水では、免疫チェックポイント分子 TIM-3<sup>+</sup> の CD14<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>マクロファージが増加し、免疫抑制のがん微小環境を形成する可能性が示された。TIM-3 を標的とした今後の研究により、ネオアンチゲンと相乗効果の期待される免疫抑制環境を改善する新規免疫補助薬の開発に繋がると期待される。開発したネオアンチゲン抗原提示細胞ワクチンによるネオアンチゲン特異的 T 細胞誘導能を証明し、安全性を検証するネオアンチゲン-抗原提示細胞がんワクチン療法の臨床研究が進行中である (jRCTc040210109)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe Asuka, Koya Terutsugu, Togi Misa, Taniguchi Makoto, Sakamoto Takuya, Iwabuchi Kuniyoshi, Kato Tomohisa Jr., Shimodaira Shigetaka	4. 巻 ahead of print
2. 論文標題 Identification of CD56 dim subpopulation marked with high expression of GZMB/PRF1/PI 9 in CD56+ interferon induced dendritic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Date Ippei, Koya Terutsugu, Sakamoto Takuya, Togi Misa, Kawaguchi Haruhiko, Watanabe Asuka, Kato Tomohisa, Shimodaira Shigetaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Interferon- $\gamma$ -Induced Dendritic Cells Generated with Human Platelet Lysate Exhibit Elevated Antigen Presenting Ability to Cytotoxic T Lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 10~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines9010010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koya Terutsugu, Date Ippei, Kawaguchi Haruhiko, Watanabe Asuka, Sakamoto Takuya, Togi Misa, Kato Tomohisa, Yoshida Kenichi, Kojima Shunsuke, Yanagisawa Ryu, Koido Shigeo, Sugiyama Haruo, Shimodaira Shigetaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Dendritic Cells Pre-Pulsed with Wilms' Tumor 1 in Optimized Culture for Cancer Vaccination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 305~305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics12040305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Haruhiko, Sakamoto Takuya, Koya Terutsugu, Togi Misa, Date Ippei, Watanabe Asuka, Yoshida Kenichi, Kato Tomohisa, Nakamura Yuka, Ishigaki Yasuhito, Shimodaira Shigetaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Quality Verification with a Cluster-Controlled Manufacturing System to Generate Monocyte-Derived Dendritic Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 533~533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines9050533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shigetaka Shimodaira, Ryu Yanagisawa, Terutsugu Koya, Koichi Hirabayashi, Yumiko Higuchi, Takuya Sakamoto, Misa Togi, Tomohisa Kato Jr, Takashi Kobayashi, Tomonobu Koizumi, Shigeo Koido, Haruo Sugiyama	4. 巻 7
2. 論文標題 In Vivo Administration of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Increases the Immune Effectiveness of Dendritic Cell-Based Cancer Vaccination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 120 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines7030120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小屋照継, 伊達一平, 坂本卓弥, 川口治彦, 渡部明日香, 吉田健一, 硯美紗, 下平滋隆
2. 発表標題 無血清培地を用いたインターフェロン-誘導性樹状細胞の製造技術の確立と臨床応用 (口頭)
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本卓弥, 川口治彦, 小屋照継, 伊達一平, 吉田健一, 渡部明日香, 硯美紗, 下平滋隆
2. 発表標題 クラスター制御培養により機能が向上した樹状細胞ワクチンの作製法 (ポスター)
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小屋照継, 坂本卓弥, 硯美紗, 加藤友久, 下平滋隆
2. 発表標題 無血清培地を用いたInterferon-樹状細胞ワクチンの開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小屋照継, 坂本卓弥, 榎 美紗, 加藤友久, 下平滋隆
2. 発表標題 がん性胸腹膜炎の病態解明を基盤としたネオ抗原特異的がん免疫療法の開発
3. 学会等名 第8回日本免疫・細胞治療学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 血小板溶解物を用いた樹状細胞の調製法	発明者 下平滋隆, 小屋照継, 坂本卓弥, 榎美紗	権利者 金沢医科大学・ アルプ再生医療 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-184317	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 クラスター制御培養による樹状細胞の調製法	発明者 下平滋隆, 小屋照継, 坂本卓弥, 榎美紗	権利者 金沢医科大学・ アルプ再生医療 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-204084	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

金沢医科大学病院再生医療センター <a href="http://www.kanazawa-med.ac.jp/~regene/">http://www.kanazawa-med.ac.jp/~regene/</a>
---

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
研究 分 担 者	下平 滋隆  (SHIMODAIRA Shigetaka)  (80345751)	金沢医科大学・医学部・教授    (33303)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	石垣 靖人  (ISHIGAKI Yasuhiro)  (20232275)	金沢医科大学・総合医学研究所・教授    (33303)	

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