

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09158

研究課題名(和文)末梢血PD-1陽性腫瘍特異的Tリンパ球を用いた複合がん免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of comprehensive cancer immunotherapy using PD-1 positive tumor specific T lymphocytes

研究代表者

神垣 隆 (KAMIGAKI, Takashi)

順天堂大学・健康総合科学先端研究機構・特任教授

研究者番号：20372641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1+T細胞を末梢血より単離後、IL-2およびネオ抗原由来ペプチド感作樹状細胞(ネオ抗原DC)を用いて解糖系阻害薬2-デオキシグルコース(2-DG)を添加することにより、傷害活性の高いTリンパ球の選択が可能であった。2DG添加群では未添加群にくらべ、CD8+CM細胞の増加、Th1サイトカイン産生上昇、PD-1+T細胞における抗原特異的なIFN- $\gamma$ 産生能や細胞傷害活性の向上が示された。また、T細胞を含む末梢血単核球を同一プロトコールで培養し、PD1+T細胞と同等のネオ抗原特異的な免疫応答を示したことから、臨床研究に向けた末梢血単核球を用いたネオ抗原DC添加2-DG培養SOPを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、悪性腫瘍に対する免疫療法は飛躍的に進歩し、チェックポイント阻害薬(ICI)の出現によりさまざまな悪性腫瘍で良好な結果が得られている。一方、ICIが無効な例も未だ多く、そのような症例に対する有効な治療法の開発が望まれている。今回、PD-1陽性T細胞に注目し、ネオ抗原特異的に高い傷害性を有するT細胞の培養法を開発した。具体的には、末梢血単核球を解糖系阻害薬とネオ抗原由来ペプチド感作樹状細胞を用いて培養することにより、PD-1陽性T細胞と同等のネオ抗原特異的な傷害活性を誘導することが示された。また、この細胞療法とICIを併用することにより高い抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peripheral blood PD-1+ T cells cultured with IL-2, neoantigen-derived peptide pulsed dendritic cells (neoantigen DCs), and the glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose (2-DG) showed high neoantigen-specific cytotoxic activity. 2-DG-treated PD-1+ T cells showed increased CD8+ CM cells, Th1 cytokine production, neoantigen-specific IFN- $\gamma$  production, and cytotoxic activity compared to those without 2-DG. Peripheral blood mononuclear cells containing T cells cultured under the same protocol showed the similar neoantigen-specific immune response to PD1+ T cells. Finally, we prepared a culture SOP using peripheral blood mononuclear cells with neoantigen DC and 2-DG for clinical studies.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：PD-1 解糖系阻害薬 免疫チェックポイント Tリンパ球 免疫糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

変異抗原 (ネオアンチゲン) を認識する腫瘍変異抗原特異的 T リンパ球 (CTL) は免疫療法における抗腫瘍活性で最も重要な役割を果たす。また、PD-1 はネオアンチゲン特異的 CTL 同定に有用な分子の一つである。ネオアンチゲン特異的 CTL の取得には、細胞リソースとして担癌患者内に存在する T リンパ球から PD-1 を利用した単離が有用であり、そのための単離・培養技術の確立は急務である。PD-1 陽性 CTL に関する本研究は効率的な複合がん免疫療法の確立に直結すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 固形癌患者の末梢血という入手容易な細胞リソースを用い、PD-1 陽性 CTL を単離する技術の開発、(2) PD-1 陽性 CTL をネオアンチゲンペプチドにて選択的に拡大培養する技術の開発、(3) 臨床応用の報告がない末梢血 PD-1 陽性 CTL を用いた複合がん免疫療法の確立することにより、末梢血より PD-1 陽性 CTL を用いた、複合がん免疫療法の基盤技術を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) PD-1 陽性細胞を用いた疑似末梢血モデルでの単離条件の検討

ハイブリドーマ法にてマウス抗ヒト PD-1 抗体の作製を試みた。具体的には、PD-1/PD-L1 シグナル阻害活性を有する既存の抗ヒト PD-1 抗体、Nivolumab を用いて PD-1 陽性細胞に対するビオチン化抗体の至適反応条件を検討した。次に、疑似末梢血モデルとして、PD-1 Ba/F3 と陰性細胞 (Mock Baf/F3) を用いて、PD-1 陽性細胞率 5 および 15% に設定し、ビオチン化抗 PD-1 抗体とアビジン標識磁気ビーズを用いて陽性細胞の単離条件を検討した。

### (2) 固形癌患者末梢血を用いた PD-1 陽性 T リンパ球単離と培養条件の検討

固形癌患者 4 例の末梢血より PD-1 陽性 T リンパ球の単離を試み、IL-2 1000U/ml および腫瘍特異抗原ペプチドを用いて、単離された PD-1 陽性 T リンパ球の初期培養条件について検討した。

### (3) 解糖系阻害薬 2-デオキシグルコース (2-DG) による PD-1 陽性 T リンパ球の培養条件の最適化の検討

患者 PBMC を用いて、IL-2 および腫瘍特異抗原ペプチド刺激下で 2DG 添加が細胞増殖におよぼす影響についてスモールスケールで検討した。次に、その増殖データに基づきラージスケール培養を試みた。評価項目として、細胞増殖曲線と加工細胞のフェノタイプ解析、サイトカイン産生能、Elispot assay によるエフェクター機能の評価を行った。並行して、その条件下で PD-1 陽性 T リンパ球を単離培養し、フェノタイプ解析 (CD39/CD69、CD25/FoxP3、CD8/PD1、/CTLA4、/TIM3、/LAG3)、細胞傷害活性試験および ELISPOT アッセイによるエフェクター機能評価を PD-1 陰性 T リンパ球と比較検討した。

### (4) 固形がん患者末梢血を用いたネオ抗原 DC 刺激下に 2DG 添加培養法の樹立

固形がん患者の末梢血単核球を用いて、全 T リンパ球 (Bulk T) をネオ抗原 DC 刺激下で 2DG 添加培養し、Th1 サイトカイン発現と傷害活性について PD1 陽性 T リンパ球を細胞リソースとした場合と比較検討した。さらに臨床応用に向けたラージスケールでの培養法樹立と SOP 作成を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) PD-1 陽性細胞を用いた疑似末梢血モデルを用いたミニスケールでの単離条件の検討

ハイブリドーマ法にてマウス抗ヒト PD-1 抗体 3 クローンを選択した。ヒト PD-1 発現マウス Pro-B 細胞株 (PD-1 Ba/F3) を用いて検討し、至適な反応条件を抗体濃度  $0.1\mu\text{g} / 1 \times 10^6$  cells と定めた。PD-1 Ba/F3 による疑似 PD-1 陽性細胞の単離条件の検討では、ビオチン化抗 PD-1 抗体とアビジン標識磁気ビーズを用いて陽性細胞の単離を行ったところ、陽性率 5% では 86.3%、15% では 81.9% の回収効率で、かつ、いずれも 99% 以上の純度で、疑似末梢血モデル中の PD-1 陽性細胞を単離できた。

### (2) 固形癌患者末梢血を用いた PD-1 陽性 T リンパ球単離と培養条件の検討

4 例の固形癌患者末梢血を用いた PD-1 陽性 T リンパ球の単離でのフェノタイプ解析では、リンパ球で 10-30% 程度の PD-1 陽性を認め、アビジン磁気ビーズの反応条件も加味した最適条件のもと、全症例において 99% 以上の純度で PD-1 陽性 T リンパ球を得ることが可能であった。PD-1 陽性 T リンパを IL-2 1000U/ml および腫瘍特異抗原ペプチドを用いて培養し、その至適条件を検討したところ、刺激直後に一過性に増殖を認めたが、長期培養で

は細胞数は減少していくことが明らかとなった。

### (3) 2-DG による PD-1 陽性 T リンパ球の培養条件の最適化の検討

スモールスケールでの検討では、2DG 添加により濃度依存性に細胞増殖は抑制され、対数増殖期についても遅れる傾向にあった。播種細胞数による検討も行い、誘導期である播種後 3 日目では、細胞数は播種時の 43~82% まで減少したが、一定の播種細胞数を確保することが、誘導期での増殖抑制を回避には、一定の播種細胞数を確保することが重要であった。

ラージスケールでの検討では、PD-1 陽性 T リンパ球画分を含めた Bulk 末梢血単核球 (PBMC) を細胞リソースとして、施設内 CPC にて拡大培養を行ない、1~2 x 1E8 個の PBMC より培養開始し、4~6 x 1E10 個の活性化リンパ球を得ることが可能であった (表 1)。さらに、2-DG 添加により、得られた活性化リンパ球の PD1 発現率は、未添加に比して低い傾向にあることが明らかとなった。ラージスケール培養後の加工細胞フェノタイプ解析では、 $\alpha\beta$ T 細胞優位で、CD8/4 T 細胞比率はサンプルにより様々であったが、制御性 T 細胞はほとんど含まれていなかった。CXCR3 陽性の Th1 細胞比率が Th2 細胞に比べ高い傾向にあった。また、従来培養法に比べ、CD8 陽性 central memory T 細胞が高い傾向にあった。PD1 陽性比率は低く、TIM-3 陽性比率は高い傾向にあることを確認した (図 1)。サイトカイン産生能では、従来法に比べて 2DG 添加群では IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF といった Th1 系サイトカインの産生が高い傾向にあった。Elispot assay では PD1 陽性細胞において、2DG 非添加の従来法に比べ添加群で高い IFN- $\gamma$  産生能を示した。

表1ラージスケール培養結果

	播種数 (x10 <sup>8</sup> cells)	回収数 (x10 <sup>8</sup> cells)
cont	1.3	35.3
	2.0	51.0
2DG	1.3	28.0
	0.5	25.6
	0.4	27.8
	1.1 ± 0.8	32.5 ± 10.7

cont : n=1  
2DG : n=4

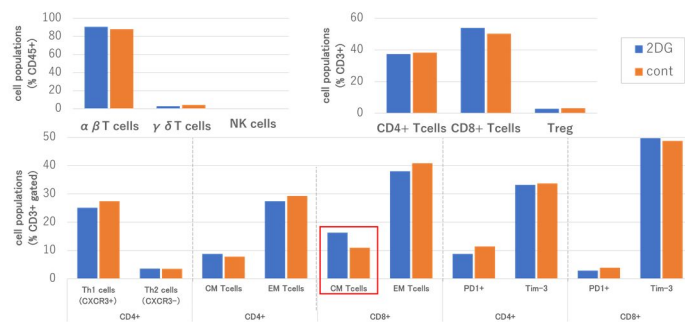


図1 2DG培養におけるフェノタイプ解析

PD1 陽性 T 細胞を単離して培養した際のエフェクター機能の評価では、PD1 陰性 T 細胞に比して、よりエフェクター活性の高いフェノタイプを有し、かつ、ネオアンチゲン特異的な抗腫瘍免疫応答を示した。具体的には、抗原刺激応答性の IFN $\gamma$  産生能の上昇 (図 2)、

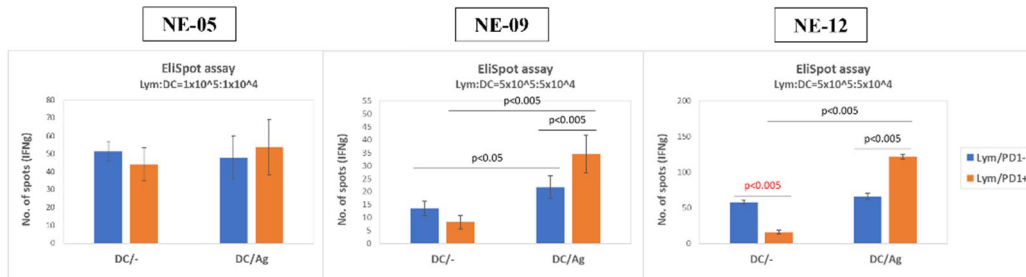


図2 PD-1陽性Tリンパ球の2DG培養におけるElispot assay

抗原提示細胞に対する細胞傷害活性の増加、チェックポイント分子 Lag3 の発現減少が明らかとなった。また、抗 PD1 抗体をアッセイ系に加えることにより、細胞傷害活性がより増強されることも示された (図 3)。ただし、PD1 陽性 T リンパ球は全 T リンパ球の数%しか存在せず、臨床応用に用いるためには大量の細胞リソースが必要であることも明らかになった。

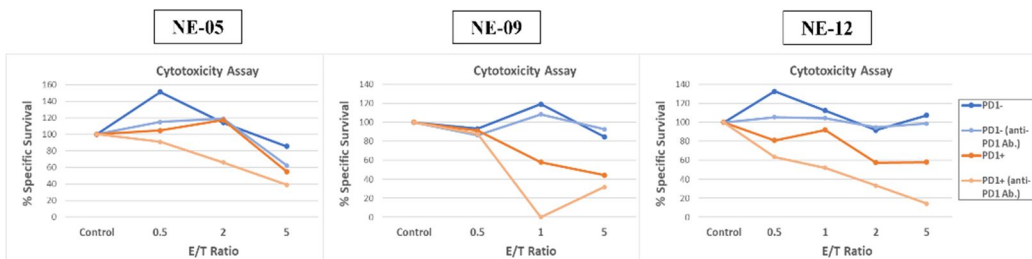


図3 PD-1陽性Tリンパ球の2DG培養における抗原特異的傷害活性

(4) 固形がん患者末梢血の Bulk T を用いたネオ抗原 DC 刺激 2DG 添加培養法の樹立

固形がん患者 3 例の末梢血を用いた Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  産生能の検討では、3 例中 2 例において、Bulk T では PD1 陽性 T リンパ球と同等の IFN- $\gamma$  産生能を示した。しかしながら、そのうち 1 例は細胞数依存性を認めず、2DG による非特異的 Th1 サイトカイン産生増強効果が影響したと考えられた。他の 1 例では PD1 陽性 T リンパ球がより高い IFN- $\gamma$  産生能を示した(図 4)。一方、特異的傷害活性の検討では、3 例中 2 例において、

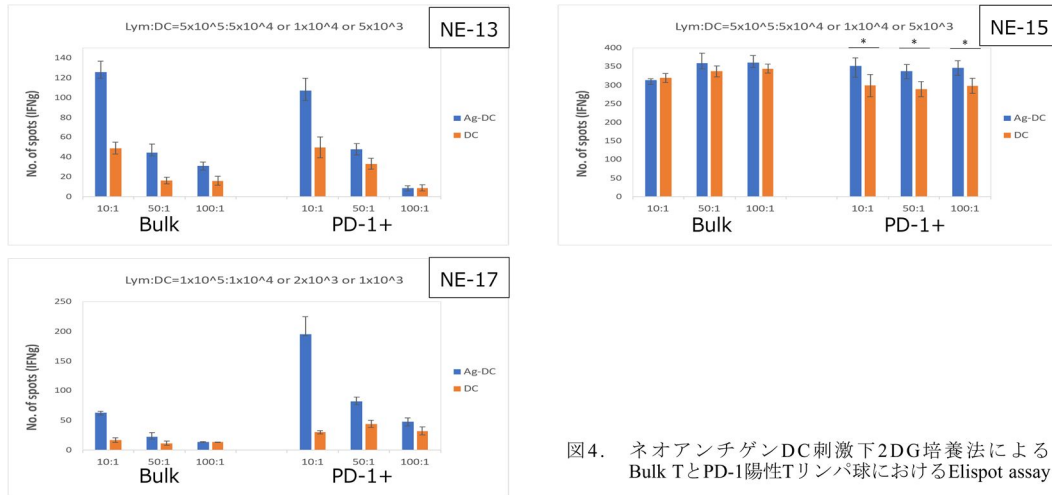


図4. ネオ抗原DC刺激下2DG培養法による Bulk T と PD-1 陽性 T リンパ球における Elispot assay

Bulk T では PD1 陽性 T リンパ球と同等の抗原特異的傷害活性を示した。また、そのうち 1 例では抗 PD-1 抗体の併用により強い傷害活性を示した(図 5)。別の固形がん患者 1 例の Bulk T を用いて、ラージスケールにてネオ抗原 DC 刺激下に 2DG 培養を行ったところ、同様の結果を得た。今回の培養法を用いた場合、PD1 + T に劣る場合はあるものの、同等の免疫応答を示すことがある Bulk T を細胞リソースとする活性化リンパ球療法の方が高い実用性を有すると考えられ、臨床研究に向け Bulk T を用いたネオ抗原 DC 刺激下 2DG 培養の SOP を作成した。

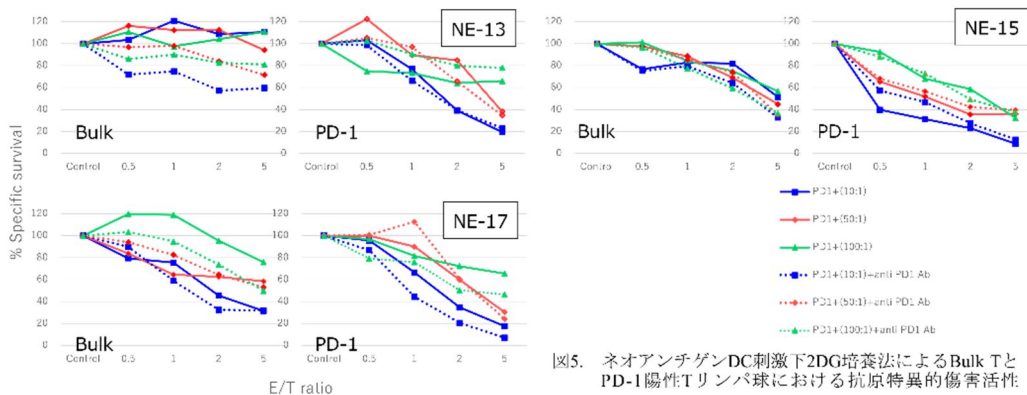


図5. ネオ抗原DC刺激下2DG培養法による Bulk T と PD-1 陽性 T リンパ球における抗原特異的傷害活性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TAKIMOTO RISHU, KAMIGAKI TAKASHI, OKADA SACHIKO, IBE HIROSHI, OGUMA ERI, GOTO SHIGENORI	4. 巻 41
2. 論文標題 Prognostic Factors for Advanced/Recurrent Breast Cancer Treated With Immune-cell Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4133 ~ 4141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15216	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 Takimoto Rishu, Kamigaki Takashi, Gotoda Takuji, Takahashi Toshimi, Okada Sachiko, Ibe Hiroshi, Oguma Eri, Goto Shigenori	4. 巻 15
2. 論文標題 Esophageal cancer responsive to the combination of immune cell therapy and low-dose nivolumab: two case reports	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Med Case Rep	6. 最初と最後の頁 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13256-020-02634-z	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 Takimoto R, Kamigaki T, Okada S, Ibe H, Oguma E, Naitoh K, Makita K, Yasumoto K, Goto S.	4. 巻 40(8)
2. 論文標題 Prognostic Factors for Endometrial and Cervical Cancers of Uterus Treated With Immune-cell Therapy: A Retrospective Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4729-4740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14474.	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 Takimoto R, Miyashita T, Mizukoshi E, Kamigaki T, Okada S, Ibe H, Oguma E, Naitoh K, Yasumoto K, Makita K, Tomita K, Goto S.	4. 巻 22(6)
2. 論文標題 Identification of prognostic factors for T cell immunotherapy in patients with solid tumor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 329-336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcyt.2020.02.008. Epub 2020 Apr 14.	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 Miura M, Mizukoshi E, Hashiba T, Kitahara M, Miyashita T, Mochizuki T, Goto S, Kamigaki T, Takimoto R, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Honda M, Kaneko S	4. 巻 9(14)
2. 論文標題 Effects of adaptive immune cell therapy on the immune cell profile in patients with advanced gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 4907-4917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3152. Epub 2020 Jun 11.	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 TAKIMOTO RISHU, KAMIGAKI TAKASHI, OKADA SACHIKO, MATSUDA ERIKO, IBE HIROSHI, OGUMA ERI, NAITOH KEIKO, MAKITA KAORI, GOTO SHIGENORI	4. 巻 39
2. 論文標題 Prognostic Factors for Colorectal Cancer Patients Treated With Combination of Immune-cell Therapy and First-line Chemotherapy: A Retrospective Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4525 ~ 4532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13629	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 TAKIMOTO RISHU, KAMIGAKI TAKASHI, OKADA SACHIKO, IBE HIROSHI, OGUMA ERI, GOTO SHIGENORI	4. 巻 42
2. 論文標題 Efficacy of Adjuvant Immune-cell Therapy Combined With Systemic Therapy for Solid Tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4179 ~ 4187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15918	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 才脇 晶子、山口 歩弥、瀧本 理修、後藤 重則、豊福 利彦、神垣 隆
2. 発表標題 PD-1陽性T細胞をターゲットにしたネオアンチゲン特異的免疫応答の誘導
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 歩弥、才脇 晶子、瀧本 理修、後藤 重則、豊福 利彦、神垣 隆
2. 発表標題 解糖系阻害を用いたT細胞の拡大培養法確立と特性解析
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡澤 裕、杉本 起一、神垣 隆、岡田 佐知子、井邊 寛、小熊 恵理、岩井 拓磨、松田 明久、山田 岳史、山田 哲平、吉田 陽一郎、長谷川 傑、後藤 重則、瀧本 理修、坂本 一博
2. 発表標題 進行直腸がんに対する術前複合的免疫細胞療法の安全性
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 歩弥、才脇 晶子、瀧本 理修、後藤 重則、井邊寛、小熊恵利、岡田佐知子、豊福 利彦、神垣 隆
2. 発表標題 解糖系阻害薬を用いたT細胞の拡大培養法確立と特性解析
3. 学会等名 第25回バイオ治療研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧本理修、神垣隆、岡田佐知子、井邊寛、小熊恵利、内藤恵子、牧田香理、安元公正、後藤重則
2. 発表標題 子宮癌に対する免疫細胞療法の予後規定因子に関する検討
3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧本理修、神垣隆、岡田佐知子、他
2. 発表標題 子宮癌に対する免疫細胞療法の子後規定因子に関する検討
3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡澤 裕、杉本 起一、岩井 拓磨、松田 明久、山田 岳史、山田 哲平、吉田 陽一郎、長谷川 傑、坂本 一博
2. 発表標題 進行直腸がんに対する術前複合的免疫細胞療法の安全性
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	瀧本 理修  (TAKIMOTO Rishu)  (10336399)	順天堂大学・大学院医学研究科・客員教授   (32620)	
研究分担者	杉本 起一  (SUGIMOTO Kiichi)  (30407275)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
研究分担者	近藤 聡英  (KONDO Akihide)  (70338359)	順天堂大学・医学部・教授   (32620)	

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