

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09343

研究課題名（和文）遺伝子改変ネオアンチゲン特異的T細胞による泌尿器癌個別化免疫療法の開発

研究課題名（英文）the development of personalized immunotherapy for urological cancers using engineered neoantigen-specific T cells

研究代表者

加藤 大悟（KATO, TAIGO）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70648021

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）：近年複数の癌種に対して免疫チェックポイント阻害剤（Immune checkpoint inhibitors, 以下ICI）が保険適応となった。しかし一定の奏効率が報告されているものの、治療抵抗性となる事が多く、ICIを含む薬物療法抵抗性癌に対して次なる免疫治療開発が急務である。我々は腫瘍微小環境におけるCD8+T細胞の細胞傷害性を強く惹起し得るネオアンチゲンに着目し、腫瘍組織より短期間で効率的にネオアンチゲン特異的T細胞をin vitroで誘導し、遺伝子改変ネオアンチゲン特異的T細胞を作製するプラットフォームを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本プラットフォームにより短期間で効率的に細胞傷害性を有する遺伝子改変ネオアンチゲン特異的T細胞を作製することが可能となった。今後は遺伝子改変ネオアンチゲン特異的T細胞を体外であらかじめ作成し、ICIなどの他剤抵抗性となった場合に備えるOff-the-shelf製剤として新たな治療選択肢となり得る。遺伝子改変ネオアンチゲン特異的T細胞輸注療法は、これまで分子標的薬の適用がなく、治療の選択肢がなかった多くの患者に対して適用可能なアプローチであり、社会への貢献度は非常に高いと考える。さらに本研究では、将来的には他癌種にも適用可能であり、今後の癌免疫療法の発展に大きく役立つものと思われる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, immune checkpoint inhibitors (ICIs) have become approved for insurance coverage for multiple cancer types. However, despite certain response rates of ICIs, a certain number of patients develop treatment resistance. Given these situation, the development of alternative immunotherapies for drug-resistant cancers are urgently needed. In the present project, we have developed a platform for producing engineered neoantigen-specific T cells by focusing on neoantigens capable of strongly inducing cytotoxicity in CD8+ T cells in the tumor microenvironment. We efficiently induce neoantigen-specific T cells from tumor tissues in vitro within a short period and manufacture engineered neoantigen-specific T cells.

研究分野：腎細胞癌

キーワード：ネオアンチゲン 免疫チェックポイント阻害薬 遺伝子改変T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年複数の癌種に対して免疫チェックポイント阻害剤(Immune checkpoint inhibitors, 以下 ICI)が保険適応となり、一部の癌種では他剤との併用療法などにより奏効率を高めるなど、一定の奏効率が報告されている。しかし奏効率は限定的であり、ICI を含む薬物療法抵抗性癌に対して次なる免疫治療開発が急務である。

ネオアンチゲンは腫瘍における体細胞変異によって生じる変異タンパクに由来するペプチドであり、腫瘍特異的な抗原である。ネオアンチゲンは強い免疫原性を有するため、腫瘍微小環境における CD8+T 細胞の細胞傷害性と強く相関することが示されており、ネオアンチゲン特異的 T 細胞を体外で作成し患者に輸注する遺伝子改変 T 細胞は ICI 抵抗性癌にも有効となる可能性が高い。しかしネオアンチゲン候補の予測、効率的なネオアンチゲン特異的 T 細胞の誘導に関してはまだまだ課題が多いことが問題であった。

2. 研究の目的

患者腫瘍組織より ネオアンチゲン特異的 T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) の効率的なスクリーニング及び 遺伝子改変ネオアンチゲン特異的 T 細胞による細胞傷害性検討という二つのステップを迅速に行うことにより、将来的に患者毎の Off-the-shelf 遺伝子改変ネオアンチゲン特異的 T 細胞療法を提供するためのプラットフォーム作成を目指した。

3. 研究の方法

(1) ネオアンチゲン特異的 T 細胞受容体の効率的なスクリーニング

腎細胞癌腫瘍組織 10 検体より DNA・RNA を抽出し、我々の開発したパイプラインを用いて患者毎の HLA およびネオアンチゲンを同定する。得られたネオアンチゲン候補ペプチドを用いてネオアンチゲン特異的 T 細胞の誘導を行い、ネオアンチゲン特異的 TCR の同定を行う。

(2) 遺伝子改変ネオアンチゲン特異的 T 細胞の作成及び細胞傷害性検討

我々が共同研究者と開発したレンチウイルスベクターを用いて、ネオアンチゲン特異的 TCR を健常人 CD8+T 細胞に導入し、遺伝子改変ネオアンチゲン特異的 T 細胞を作製し、標的細胞に対する細胞傷害活性を検討する。

4. 研究成果

(1) ネオアンチゲン特異的 T 細胞受容体の効率的なスクリーニング

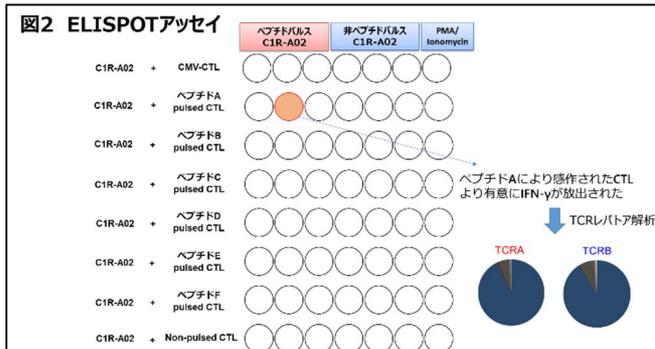
我々が開発した高精度ネオアンチゲン予測系 (Kiyotani K, Cancer Sci. 2018)を用いて、1 症例当たり X ~ X 個の HLA-A と高親和性 (Mut IC50 < 500nM) である有望なネオアンチゲンを同定した。さらに日本人に多い HLA-A 型である HLA-A24:02、HLA-A02:01 を有する 6 症例より Mut IC50 < 50nM である高親和性のネオアンチゲンを抽出し、ネオアンチゲンペプチドを作成した (図 1)。

症例	遺伝子	アミノ酸置換	ネオアンチゲンペプチド配列	Mut親和性 (nM)	HLA-A アレル
KD25	GPR126	G843R	SYIRCGISAIF	41	A24:02
KD26	KIAA1429	M1149I	KLWSTHLHV	8	A02:01
	S76GAL1	I330L	LMMTLCDQV	9	A02:01
	MCRS1	A463V	FLINQDLIVL	10	A02:01
	MCRS1	A463V	FLINQDLIV	12	A02:01
	S76GAL1	I330L	ILMMTLCDQV	15	A02:01
	MCRS1	A463V	FLINQDLIVLI	23	A02:01
KD58	DEGS1	L251I	YYGPLNLTIF	18	A24:02
	DEGS1	L251I	SYYGPLNLTIF	18	A24:02
	DEGS1	L251I	TYSYGPNLNI	47	A24:02
	STAMPB	S19Y	YQLGSAVEV	7	A02:01
KD67	SPAG17	Q1421E	LLSF ^E ATDPV	40	A02:01
KD85	CPEB4	I551V	YLCVSSPTV	9	A02:01
	NXPE3	T527N	YLVDAWEMNL	10	A02:01
KD99	WDR35	N941S	LYRKASVFF	30	A24:02

赤字は野生型と比較して置換されたアミノ酸

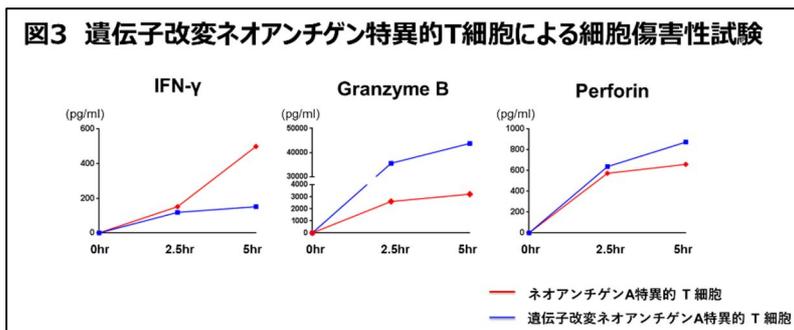
そこでまず HLA-A02:01 を有する健常人 PBMC を CD8+T 細胞および CD8-細胞に分離し、CD8-T 細胞より未熟樹状細胞を誘導し、ネオアンチゲンペプチドにより成熟樹状細胞に分化させ、CD8+T 細胞との共培養を行い、ネオアンチゲン特異的 T 細胞を誘導した。IFN- ELISPOT アッセイによりネオアンチゲン特異的 T 細胞のスクリーニングを行ったところ、ネオアンチゲンペプチド A に対して、有意に豊富な IFN- が放出されていることを確認した（図 2）。

次にネオアンチゲン A 特異的 T 細胞より RNA を抽出し、TCR レパトア解析を行ったところ、Dominant な TCR 鎖、鎖 CDR3 配列（相補性決定領域）を得た（図 2）。これまでの過程は約 2 週間で完了し、かつ約 20%の確率でネオアンチゲン特異的 T 細胞を誘導できるため、効率的なプロトコールと考えられた。



(2) 遺伝子改変ネオアンチゲン特異的 T 細胞の作成及び細胞傷害性検討

次にレンチウィルスベクターを用いて遺伝子改変ネオアンチゲン A 特異的 T 細胞の作成を行った。遺伝子改変ネオアンチゲン A 特異的 T 細胞と標的細胞（ネオアンチゲン A を負荷した C1R 細胞）を共培養し、細胞傷害性試験を行った。上清中の細胞傷害性サイトカインである IFN-、Granzyme B、Perforin を測定したところ、前ステップで誘導し得たネオアンチゲン A 特異的 T 細胞と比較して、遺伝子改変ネオアンチゲン A 特異的 T 細胞も 50-75%の細胞傷害性を維持することが分かった（図 3）。



この様に一連のスクリーニング法により確かに、標的細胞を攻撃し得る遺伝子改変ネオアンチゲン A 特異的 T 細胞を作製するプラットフォームを確立したため、今後は患者ごとの遺伝子改変ネオアンチゲン特異的 T 細胞をあらかじめ準備する Off-the-shelf 製剤として進行癌に対しても迅速に治療が提供できるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 加藤大悟、野々村祝夫	4. 巻 32
2. 論文標題 【免疫チェックポイント阻害薬:State of the artにおける位置づけと今後の方向性】泌尿器がんにおける免疫チェックポイント阻害薬	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 38-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 加藤大悟、野々村祝夫	4. 巻 32
2. 論文標題 【各臓器がんに対する周術期(手術・放射線治療)薬物療法のState of the art】泌尿器がん 腎細胞がん	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 288-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taigo Kato, Kazuma Kiyotani, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Motohide Uemura, Norio Nonomura
2. 発表標題 Identification of predictive biomarker for immune checkpoint inhibitors by immunogenomics approach in cancer patients
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taigo Kato
2. 発表標題 Control the power of the immune system in tumor and transplant immunology-two sides of the same coin-
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤大悟, 野々村祝夫
2. 発表標題 腎癌免疫療法の最前線 ~ 次世代治療を見極める ~
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taigo Kato, Akihiro Yoshimura, Kensaku Nemoto, Yohei Okuda, Akinaru Yamamoto, Toshihiro Uemura, Gaku Yamamichi, Yu Ishizuya, Yoshiyuki Yamamoto, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Kazuma Kiyotani, Norio Nonomura1
2. 発表標題 T-cell/ B-cell repertoire analysis predict immune-related adverse events following immune checkpoint inhibitors in advanced renal cell carcinoma
3. 学会等名 第111回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Taigo Kato
2. 発表標題 Connecting the dots -what starts here change our field-
3. 学会等名 第111回日本泌尿器科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加藤大悟、清谷一馬、野々村祝夫
2. 発表標題 Immunogenomicsによる免疫チェックポイント阻害剤の奏効予測バイオマーカーの同定
3. 学会等名 第36回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤大悟、清谷一馬、野々村祝夫
2. 発表標題 泌尿器癌免疫チェックポイント阻害剤治療の最前線～奏効予測マーカーを中心に～
3. 学会等名 第36回日本バイオセラピー学会学術集会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 TTaigo Kato, Akira Nagahara, Norihiko Kawamura, Wataru Nakata, Tetsuji Soda, Kyosuke Matsuzaki, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Ryoichi Imamura, Kensaku Nishimura, Shingo Takada, Masao Tsujihata, Seiji Yamaguchi, Tetsuya Takao, Kazuo Nishimura, Norio Nonomura, Motohide Uemura
2. 発表標題 Correlation between immune-related adverse events and clinical outcome in metastatic renal cell carcinoma patients treated with nivolumab: a real-world multi-institutional retrospective study
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taigo Kato, Kazuma Kiyotani, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Norio Nonomura
2. 発表標題 T Cell and B Cell Receptor Sequencing Reveals anti-cancer immune response associated with immune-related adverse events in advanced renal cell carcinoma patients treated with immune checkpoint inhibitors
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023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	清谷 一馬 (KIYOTANI KAZUMA) (30433642)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難病・免疫ゲノム研究センター・副センター長 (84420)	

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