

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16278

研究課題名(和文)多発性骨髄腫に対するドナー由来ネオ抗原特異的TCR-Tの有効性の証明

研究課題名(英文) Donor derived neoantigens specific TCR-T therapy against multiple myeloma in preclinical model

研究代表者

岡田 匡央 (Okada, Masahiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：30749479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫の代替治療案の一つとして、ネオ抗原を標的とした免疫療法の有効性を免疫不全マウスを用いたXenograftモデルで検討した。ネオ抗原を標的とするTCR遺伝子を健康人由来末梢血より単離取得し、TCR遺伝子発現ベクターを構築し機能評価する一連のプロセスを確立した。恒常的ながん抗原刺激や造血障害により、多発性骨髄腫患者の免疫細胞のみでは、ネオ抗原の同定や免疫チェックポイント阻害剤を含めたネオ抗原を標的とする治療法は困難と予想される。健康人由来T細胞を用いることで、患者特異的な免疫原性の高いネオ抗原を効率的に同定し、ネオ抗原を認識するTCR遺伝子を発現させたTCR-T細胞の有効性を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は、現在まで多くの治療法が開発されてきたものの、未だに治療抵抗性と高い再発率を有する難治性の血液がんであり、新たな代替治療戦略の開発が期待されている。ネオ抗原を標的とするTCR-T細胞移入療法は、すい臓がんや乳がんが有効性が明らかとなりつつあり、更なる応用が期待されている。私たちの研究により、免疫細胞の数が少ないがん患者によらずに、健康人の末梢血細胞を用いることで、がん患者特異的なネオ抗原を探索することが可能であること、またそこで取得されたTCR遺伝子配列を用いた細胞移入療法は、がん増殖を抑制できることを、多発性骨髄腫のモデルを用いて実験室レベルで証明することができた。

研究成果の概要(英文)：We proposed neoantigen-specific TCR gene therapy as the alternative therapeutic candidates for multiple myeloma by using xenograft model. We established the series of procedures for isolating, cloning, validating TCR repertoires from healthy donor-derived PBMCs. Since patients with multiple myeloma suffers from immune disorders due to chronic antigen exposure or insufficient hematopoiesis, anti-myeloma T cells is exhausted and limited for using neoantigens detection or therapeutic application such as immune checkpoint blockage therapy. By utilizing healthy donor-derived T cells which presumably cover wide range of patient-specific antigens, we successfully detected mutant antigen and corresponding TCR repertoire. Healthy donor-derived mutant antigen-specific TCR gene transfer augmented anti-myeloma activity. TCR-T cell therapy suppressed proliferation of multiple myeloma in xenograft model.

研究分野：がん免疫

キーワード：neoantigens TCR-T single cell multiple myeloma

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんネオ抗原を標的とするがん免疫療法の有用性が提唱されている。一方で、がん患者では、恒常的ながん抗原の暴露・炎症・造血不全などから、ネオ抗原を含むがん抗原を認識する細胞傷害性 T 細胞の存在確率が低い可能性があり、免疫チェックポイント阻害剤やワクチン療法の不応答性に寄与していると考えられる。そこで、がん患者からではなく、健康人由来末梢血細胞を用いて、患者特異的なネオ抗原を探索すること、また実際にネオ抗原を標的とする T 細胞受容体遺伝子 (TCR) をクローニングし、患者 T 細胞に発現させる遺伝子治療が有効であると考えられている。実際に、健康人由来 TCR 配列を用いた自己 T (TCR-T) 細胞移入療法は、すい臓がんや乳がんでは実際にクリニカルトライアルが行われ、がん抑制効果が認められることが明らかとなりつつある。そのため、この治療手法の様々ながん種への拡大応用が期待される。

2. 研究の目的

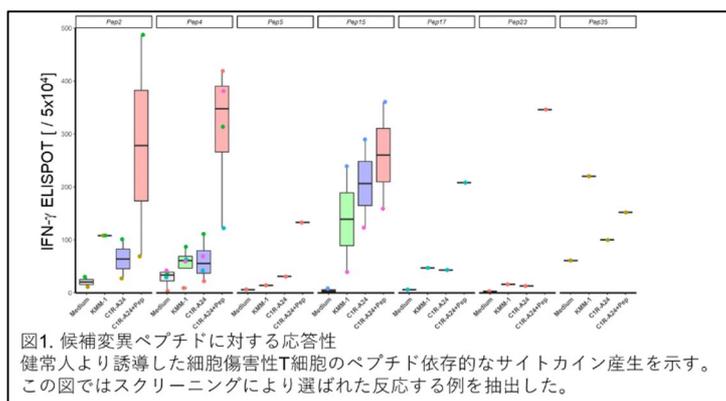
本研究の目的は、健康人に由来するネオ抗原特異的な TCR 配列を用いた遺伝子治療を、多発性骨髄腫の治療に応用するための基礎となる知見を実験室レベルで確認することである。

3. 研究の方法

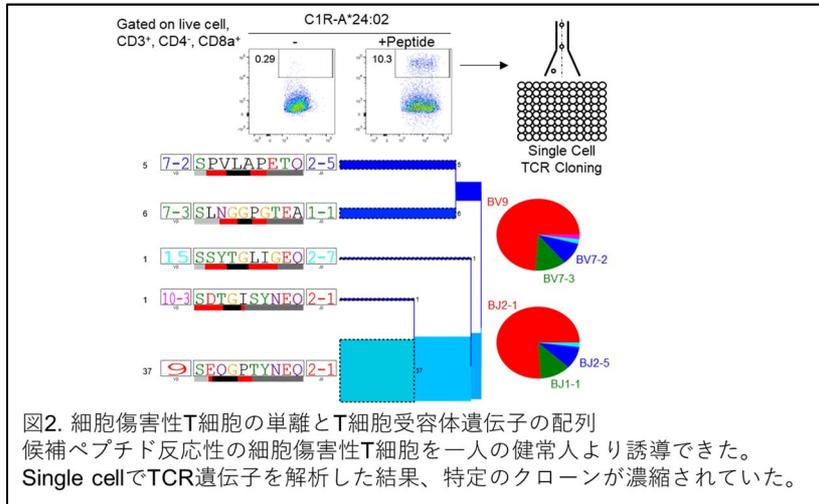
多発性骨髄腫の細胞株を用いて、遺伝子変異に由来する抗原をゲノム解析により選択した。これら変異抗原候補ペプチドに対して、健康人より細胞傷害性 T 細胞を誘導した。変異抗原反応性の T 細胞を単離し、その TCR 遺伝子配列を single cell 由来の cDNA より決定する。PCR 反応による増幅後、TCRA 遺伝子・TCRB 遺伝子をそれぞれクローニングし、発現ベクターを構築した。内在の TCR 発現を欠損した CD8A・CD8B 発現 T 細胞株 (SKW-3-hCD8AB) をモデルとして、TCR 遺伝子を過剰発現し再構築させた。この再構築した TCR の反応性を、変異抗原ペプチド、並びに遺伝子変異に基づく変異タンパク質に由来する内在性の変異抗原に対する応答性を、単一 MHC-I 発現細胞株、または元の多発性骨髄腫の細胞株、を用いて検証した。応答した TCR 遺伝子を用いて、末梢血由来細胞に過剰発現した TCR-T 細胞を作成した。作成した TCR-T 細胞が、多発性骨髄腫の細胞株を殺傷できるかどうかを *in vitro* で検証した。また免疫不全マウスに多発性骨髄腫細胞を移入して作成した xenograft モデルを用いて、TCR-T 細胞移入療法がマウス体内での多発性骨髄腫の増殖を抑制できるかどうかを *in vivo* で検証した。

4. 研究成果

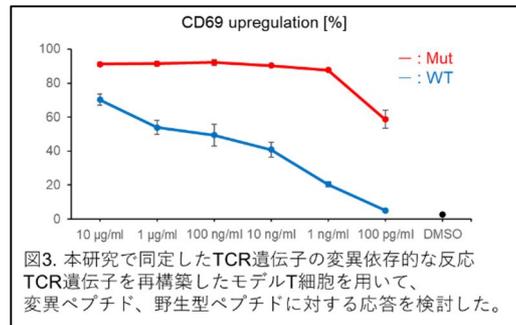
東アジアで多い HLA 型である HLA-A*24:02 に着目して、HLA-A*24:02 発現多発性骨髄腫細胞株を選択し、その遺伝子変異を次世代シーケンズデータより探索した。HLA-A*24:02 に対する親和性の高さを NetMHCpan のアルゴリズムを用いて予測し、より高親和性であると予測された 35 個のペプチドを選択した。健康人末梢血細胞より単離した CD8⁺ T 細胞と候補ペプチドを提示させた CD14⁺ 単球由来樹状細胞を共培養し、増殖してきた T 細胞のペプチド依存的な IFN- γ 産生、CD137 の発現上昇を指標としてスクリーニングを行った。その結果、7 人のドナーよりいくつかの候補ペプチドに対する細胞傷害性 T 細胞を樹立することができた (図 1)。



次に、CD107a 脱顆粒マーカーを指標として、再度ペプチド反応性の細胞傷害性 T 細胞を選択し、フローサイトメトリーを用いて、single cell で単離した。それぞれのウェルには、多様な種類の TCRA 遺伝子・TCRB 遺伝子を増幅できるように設計されたプライマー群、逆転写酵素、PCR 酵素が含まれており、single cell の mRNA より TCR 遺伝子を増幅できる。増幅した TCR 遺伝子の配列をサンガー法で確認すると、特定のクローンが濃縮されていることが明らかとなり、ペプチド刺激依存的に特定の T 細胞クローンが増殖していたことが推察される (図 2)。

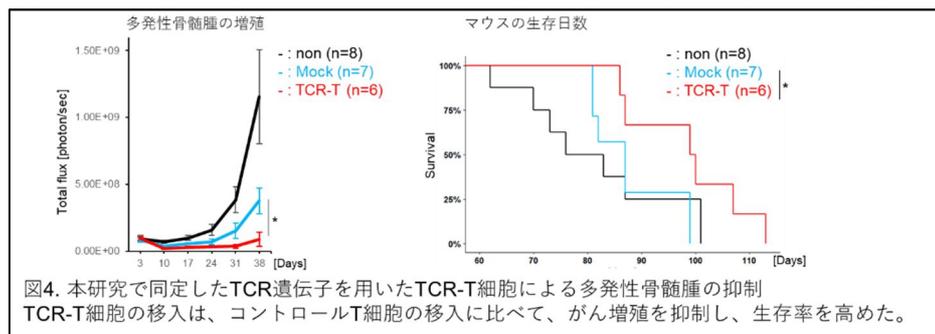


濃縮されていたクローンから TCRA 遺伝子・TCRB 遺伝子の組をクローニングし、SKW-3-hCD8AB 細胞に過剰発現し、その反応性を検証した結果、変異特異的な反応を示すことを明らかとした (図3)。

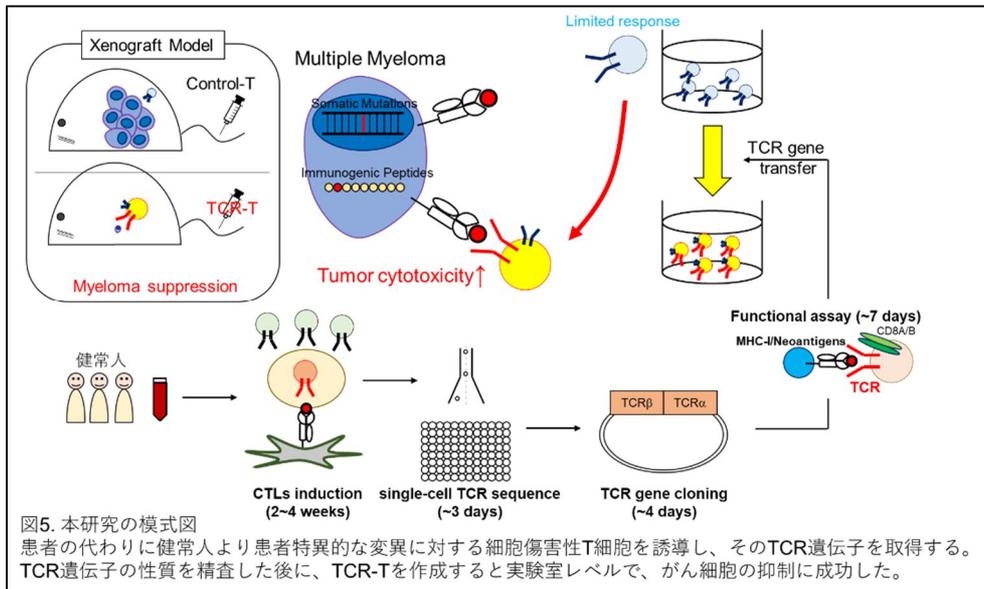


本研究により同定した TCR 配列を用いて、元の高発性骨髄腫細胞を殺傷することができるかどうかについて in vitro で検証した結果、TCR-T 細胞はコントロール T 細胞に比べて高い殺傷効果を発揮することが明らかとなった。そこで、xenograft モデルでの高発性骨髄腫抑制能について検討した。その結果、TCR-T 細胞の移入はコントロール T 細胞の移入に比べて、がんの増殖を抑制することが

明らかとなり、また生存率もわずかながらも上昇させることを明らかとした (図4)。



このことは、健康人より単離した、がん患者特異的な遺伝子変異に由来するがん抗原を認識する TCR 配列が、将来的な治療計画の一つとして有効であることを実験室レベルで示しており、多発性骨髄腫を標的とした点において、世界に先駆けての研究の一つであると言える (図5)。多発性骨髄腫は様々な治療法が開発されてはいるものの、未だ治療抵抗性、高い再発率を示す難治性の血液がんの一つであり、このような治療代替案の戦略の立案は重要な課題であり、本研究を基礎として更なる発展が期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okada Masahiro, Shimizu Kanako, Fujii Shin-ichiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification of Neoantigens in Cancer Cells as Targets for Immunotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2594 ~ 2594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052594	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 岡田匡央、伊豫田智典、清水佳奈子、藤井眞一郎	4. 巻 77(6)
2. 論文標題 ゲルソリンと腫瘍免疫	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 764-770
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 Shimizu Kanako, Iyoda Tomonori, Sanpei An, Nakazato Hiroshi, Okada Masahiro, Ueda Shogo, Kato-Murayama Miyuki, Murayama Kazutaka, Shirouzu Mikako, Harada Naoko, Hidaka Michihiro, Fujii Shin-ichiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Identification of TCR repertoires in functionally competent cytotoxic T cells cross-reactive to SARS-CoV-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02885-6	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masahiro Okada, Kanako Shimizu and Shin-ichiro Fujii
2. 発表標題 Chromatin remodeling complex curtails the efficacy of PD-1 blockade in anti-cancer drug-resistant tumor.
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田 匡央、清水 佳奈子、伊豫田 智典、藤井 眞一郎
2. 発表標題 腫瘍PD-L1の発現はネオ抗原反応性を決定する
3. 学会等名 第13回 日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------