

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20976

研究課題名(和文) 泌尿器がん個別化免疫療法の開発～遺伝子改変ネオアンチゲン特異的T細胞の作製～

研究課題名(英文) Development of personalized immunotherapy for urological cancer - generation of genetically engineered neoantigen-specific T cell.

研究代表者

奥田 洋平 (Okuda, Yohei)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10964372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ネオアンチゲンはおよそ8～11merの変異ペプチドから成る腫瘍特異的な抗原であり、がん細胞上のHLAに抗原提示される。ネオアンチゲンは免疫原性が高く、宿主のT細胞ががん細胞に対して強力な細胞傷害を惹起する。本研究では次世代シーケンサー技術を用いて、in-houseの腎細胞がん6症例の腎腫瘍検体から患者固有のネオアンチゲンの予測同定を行い、それらを標的とするネオアンチゲン特異的T細胞の誘導を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者固有のネオアンチゲンの予測同定を行い、それらを標的として特異的に認識するTCRを解析する事、そして、ネオアンチゲン特異的遺伝子改変T細胞を作成し、その腫瘍に対する細胞傷害性評価する事が本研究で確立できれば、将来的に、遺伝子改変ネオアンチゲン特異的T細胞をEx vivoで誘導し、患者個別の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事が実現可能となる。

研究成果の概要(英文)：Neoantigens are tumor-specific antigens consisting of mutant peptides of approximately 8-11 mer, which are antigen-presented on HLA on cancer cells. Neoantigens are highly immunogenic and induce potent cytotoxicity against cancer cells by host T cells. In this study, we used next-generation sequencing technology to predictively identify patient-specific neoantigens from renal tumor samples of six in-house renal cell carcinoma cases and to induce neoantigen-specific T cells to target them.

研究分野：泌尿器科

キーワード：ネオアンチゲン特異的T細胞 腎細胞癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

従来、泌尿器がん治療に対して手術・化学療法・放射線療法による集学的治療が行われてきたが、近年ではゲノム医療に基づく分子標的治療や免疫療法などの選択肢が加わっている。特に、腫瘍免疫学の進歩により開発された免疫チェックポイント阻害剤 (ICI: Immune checkpoint inhibitor) は泌尿器がん患者に大きな恩恵をもたらしており、今や進行がんの主要な治療法となっている。しかしながら、尿路上皮がんにおける奏効率は 20~30%、腎細胞がんにおける奏効率は 30~50%程度に限られており(2021年時点)、ICI を含めた薬物抵抗性がんに対する新たな免疫療法の開発が求められている。ネオアンチゲンはおよそ 8~11mer の変異ペプチドから成る腫瘍特異的な抗原であり、がん細胞上の HLA に抗原提示される(図 1)。ネオアンチゲンは免疫原性が高く、宿主の T 細胞ががん細胞に対して強力な細胞傷害を惹起すると考えられている。そのため、ICI 抵抗性がんにも効果的な T 細胞療法が期待されているが宿主の T 細胞が疲弊化を来している状況下では効果が減弱するという課題もある。そのため、ネオアンチゲンに対する特異的な T 細胞受容体 (TCR: T cell receptor) を遺伝子導入した遺伝子改変 T 細胞を健康人由来のリンパ球から体外で大量に作製することで、必要時に効果的な細胞製剤を患者毎に提供できる Off-the-shelf 製剤は真の個別化免疫療法と成り得るが、泌尿器がんにおいては遺伝子改変ネオアンチゲン特異的 T 細胞療法の開発は進んでいない。

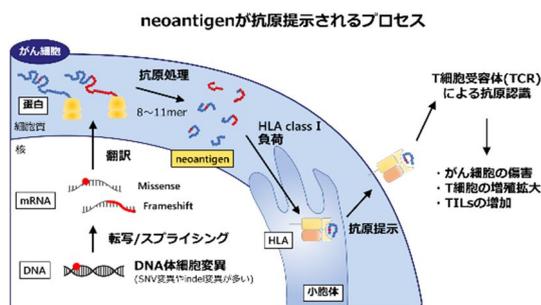


図1

### 2. 研究の目的

泌尿器がんの腫瘍組織に存在するネオアンチゲンに対する特異的 TCR のスクリーニングを行い、遺伝子改変ネオアンチゲン特異的 T 細胞を Ex vivo で誘導し、患者個別の 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事が最終的な目的であるが、それに先立ち、まずは hot tumor である腎細胞がんにおいて患者固有のネオアンチゲンの予測同定を行い、それらを標的として特異的に認識する TCR を解析する事、そして、ネオアンチゲン特異的遺伝子改変 T 細胞を作成し、その腫瘍に対する細胞傷害性評価を in vitro で行う事を本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 患者個別ネオアンチゲンの予測

In-house の腎細胞がん患者 6 例(日本人によく認められる HLA アレルである HLA-A\*24:02 や HLA-A\*02:01 を保有している症例を選定した)の腫瘍組織および末梢血 PBMC から DNA・RNA を抽出し、全エクソーム解析・トランスクリプトーム解析を行う。変異 RNA の発現している体細胞変異を抽出し得られたデータを基に、我々が既に報告している解析手法 (Kiyotani K, et al. J Hum Genet. 2021.)

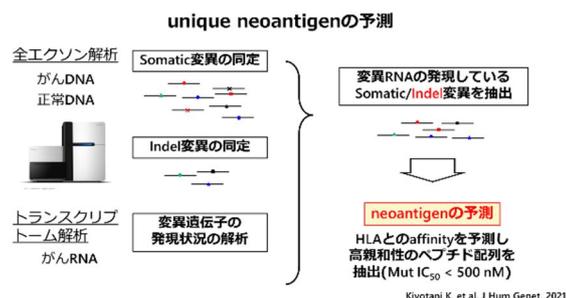


図2

(図 2)を用いて、患者の HLA と高親和性

(Mut IC50<50nM) の個別ネオアンチゲンを予測し、そのペプチドを合成する。

#### ネオアンチゲン特異的 T 細胞の誘導

健康人 PBMC より分離分化させた CD8 陽性 T 細胞から予測したネオアンチゲン特異的 T 細胞を誘導する。特異的 T 細胞の誘導のプロトコールの概略については図 3 に示す。CD8 陽性細胞が疲弊化していないであろう健康人ドナー PBMC から磁気ビーズ法で CD8 陽性 T 細胞と CD8 陰性細胞に分離する。CD8 陰性細胞をサイトカイン添加により未熟樹状細胞へ分化させた後に、予測ネオアンチゲンのペプチドに感作させ(ペプチドパルス)、成熟樹状細胞へと分化させた。成熟樹状細胞と CD8+ T 細胞の共培養を行い、ネオアンチゲン特異的 T 細胞を誘導する。

#### neoantigen特異的T細胞誘導パイプライン

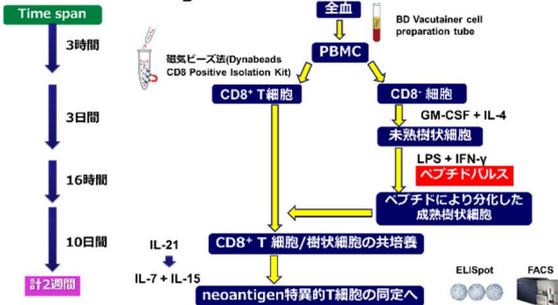


図3

陽性コントロールとしてはサイトメガロウイルス由来のペプチド(CMV pp65)を用いる(PBMC を用いた健康人ドナーは CMV 既感染であるため)。誘導の成否については、IFN- ELISPOT アッセ

イを用いて評価する。IFN- ELISPOT アッセイは T 細胞の細胞傷害性に伴い放出された IFN- 量をプレート底のスポット数として検出可能なアッセイである。抗 IFN- を固相化したメンブレンフィルターを仕込んだプレートに先程の T 細胞と標的細胞となる C1R 細胞(予めペプチドを負荷するとペプチドを HLA に抗原提示する細胞株で、HLA-A アレル毎に遺伝子組み換え済み)を共培養し、T 細胞の細胞傷害性を可視化する。

#### ネオアンチゲン特異的な TCR 配列の同定

IFN- ELISPOT アッセイで CD8 およびネオアンチゲンペプチド-HLA マルチマーの二重染色によりネオアンチゲン特異的な T 細胞を FACS で単離し RNA を抽出する。TCR 領域を PCR にて増幅し、次世代シーケンサーでネオアンチゲン特異的な TCR 配列を解析する。

#### TCR 遺伝子改変ネオアンチゲン特異的な T 細胞の作製

レンチウイルスベクターを用いて(Matsuda T, Clin. Cancer Res. 2018)、ネオアンチゲン特異的な TCR を健康人 CD8+T 細胞に導入し、遺伝子改変個別アンチゲン特異的な T 細胞を作製する。

#### TCR 遺伝子改変ネオアンチゲン特異的な T 細胞の細胞傷害性評価

十分な量の遺伝子改変ネオアンチゲン特異的な T 細胞を確保し、患者初代培養がん細胞との共培養を行い、IFN- ELISPOT アッセイにて細胞傷害活性を確認する。またネオアンチゲン関連遺伝子をノックアウトした標的細胞に交差反応性が無いかを検討する。

### 4. 研究成果

#### 患者個別ネオアンチゲンの予測

腎細胞がん患者 6 症例から HLA-A\*24:02 もしくは HLA-A\*02:01 に抗原提示されうる個別ネオアンチゲンとして 141 種のネオアンチゲンを予測同定した。これらの中で HLA に親和性のある (Mut IC50<500nM) 個別ネオアンチゲンとして 76 種類、さらに高親和性 (Mut IC50<50nM) なネオアンチゲンとして 20 種を予測同定した(図 4)。その高親和性な個別ネオアンチゲンの一覧を図 5 に示す。

In-houseの腎細胞癌検体から予測されたunique neoantigen

| 症例番号 | 全ネオアンチゲン数 | Mutペプチド親和性 (<500nM) | Mutペプチド親和性 (<50nM) | HLA              |
|------|-----------|---------------------|--------------------|------------------|
| KD25 | 7         | 5                   | 1                  | A*24:02, A*31:01 |
| KD26 | 32        | 18                  | 8                  | A*02:01, A*33:03 |
| KD58 | 16        | 9                   | 3                  | A*24:02, A*51:01 |
| KD67 | 35        | 16                  | 2                  | A*02:01, A*24:02 |
| KD85 | 32        | 16                  | 2                  | A*02:01, A*11:01 |
| KD99 | 19        | 12                  | 1                  | A*24:02, A*40:01 |

図4

#### 腎癌個別検体から予測した高親和性Unique neoantigen

| 症例   | 遺伝子      | アミノ酸置換 | neoantigenのペプチド配列 | Mut親和性 (nM) | HLA-A アレル |
|------|----------|--------|-------------------|-------------|-----------|
| KD25 | GPR126   | G843R  | SYRCGISAIF        | 41          | A24:02    |
| KD26 | KIAA1429 | M1149I | KLWSIHLHV         | 8           | A02:01    |
|      |          | I330L  | LMMTLCDQV         | 9           | A02:01    |
|      |          | A463V  | FLINQDLIVL        | 10          | A02:01    |
|      |          | A463V  | FLINQDLIV         | 12          | A02:01    |
| KD58 | MCR51    | A463V  | FLINQDLIV         | 15          | A02:01    |
|      |          | I330L  | ILMMTLCDQV        | 23          | A02:01    |
|      |          | A463V  | FLINQDLIVL        | 18          | A24:02    |
|      |          | L251I  | YVYPLNLTIF        | 18          | A24:02    |
| KD67 | DEG51    | L251I  | SYVYPLNLTIF       | 47          | A24:02    |
|      |          | L251I  | TSYVYPLNI         | 7           | A02:01    |
|      |          | S19Y   | YQLGSAVEV         | 40          | A02:01    |
|      |          | Q1421E | LLSFATDPV         | 9           | A02:01    |
| KD85 | CPEB4    | I551V  | YLCVSSPTV         | 10          | A02:01    |
|      |          | T527N  | YLVDAWEMNL        | 30          | A24:02    |
| KD99 | WDR35    | N941S  | LYRKASYFF         |             |           |

図5

#### ②ネオアンチゲン特異的な T 細胞の誘導

neoantigen A(詳細は未公表)をペプチドパルスした CD8 細胞において、C1R 細胞への neoantigen A の事前の負荷の有無でスポット数・強度に差があり(詳細データは未公表)、neoantigen A 特異的な T 細胞を誘導できた可能性があると考えられた(図 6)。

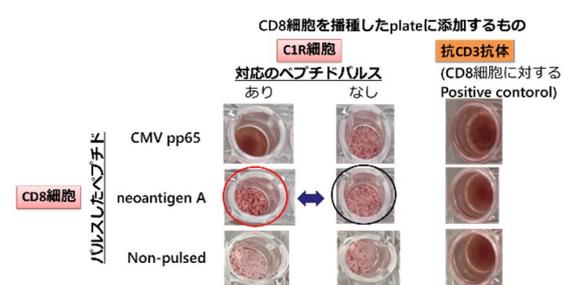


図6

#### ネオアンチゲン特異的な TCR 配列の同定

neoantigen A を感作させた CD8 陽性 T 細胞が neoantigen A 特異的な T 細胞であるかをフローサイトメトリーで検討した結果を図 7 に示す。

CMV pp65 を感作させた CD8 陽性 T 細胞には CMV pp65 特異的な T 細胞のポピュレーション形成が認められたが、neoantigen A 特異的な T 細胞のポピュレーションは認められなかった。

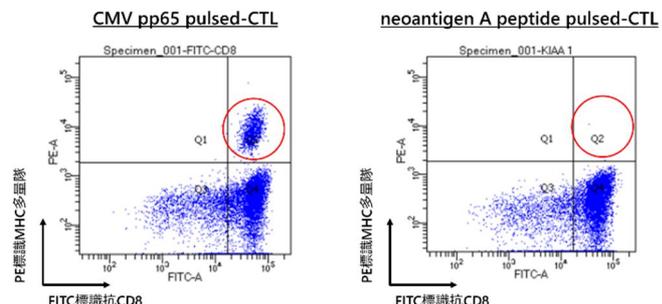


図7

ネオアンチゲン特異的な TCR 配列の同定、TCR 遺伝子改変ネオアンチゲン特異的な T 細胞の作製、TCR 遺伝子改変ネオアンチゲン特異的な T 細胞の細胞傷害性評価に関しては本研究では遂行できず今後の検討課題としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|