

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09232

研究課題名（和文）オートファジー亢進型膵臓がんに対するがん免疫治療ターゲットの探索

研究課題名（英文）Investigation of CTL epitopes specific for autophagy-activated pancreatic cancer

研究代表者

岡村 文子（出町文子）（Demachi-Okamura, Ayako）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍免疫制御TR分野・主任研究員

研究者番号：10546948

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）：がんの特異的なCTLによる腫瘍退縮効果が明らかとなり有望な治療方法として注目を浴びている。一方で、膵臓がんでは有効性の高い変異に由来するエピトープペプチドが少ないと考えられ、新たなCTLターゲットの発見が必須である。申請者らは活性型K-RAS遺伝子変異を有する膵臓がんを誘導されるオートファジーを介在した場合にのみ生成されるCTLエピトープを同定した。この現象の普遍性を検討するために、治療ターゲットとなり得るオートファジー介在性CTLエピトープの探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一部のがんでは有効性が示されているがん免疫療法であるが、難治がんである膵臓がんに対するがん免疫療法を行うためのターゲットが非常に少ない。そこで独自に得た基礎的データからその普遍性を検討するために、より広くターゲットを探索する研究を行なった。3年間での結果では十分な結果は得られていない。今後も研究を続けることにより社会へ還元できる結果につなげていけるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Cancer-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are promising to treat cancer. Neoantigens are believed to be good targets for immune system because they are specific for cancers. While pancreatic cancers have less neoantigens, it is necessary to seek targets for CTLs. We reported previously that epitope liberation depends on constitutively active autophagy in pancreatic cancerous cells. To verify this universality for the antigen processing, a search for CTL epitopes processed via autophagy pathway was performed.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：オートファジー 膵臓がん CTL TCR

1. 研究開始当初の背景

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が認識するエピトープペプチドの生成過程の概略は以下の通りである。すなわち、抗原となる蛋白質が細胞質内でプロテアソームによって大まかに切断された後、トランスポーターを介して小胞体ないへ運ばれる。小胞体内へ輸送されたペプチド断片は酵素によってさらに短くなり、いくつかのシャペロンタンパク質の助けを借りて HLA との複合体を形成する。完成した HLA/ペプチド複合体はゴルジ装置を経由して細胞表面に提示される (Brodsky FM, et al. *Annu Rev Immunol*, 1991)。

この抗原提示システムは正常細胞とがん細胞において基本的に共通している一方で、がん細胞では免疫監視から逃避するために抗原提示機構に関わる遺伝子の異常が多いことも明らかになってきている (Patel SJ, et al. *Nature*, 2017)。つまり、CTL によって排除されるために必要な目印を作り出す抗原提示機構が、いかなる状態かはがん免疫療法を考える上で重要な情報である。申請者らは活性型 *K-RAS* 遺伝子変異が誘導する、膵臓がん細胞に特異的な恒常的オートファジーによって生成される CTL エピトープを見出した (Demachi-Okamura, et al. *PLoS ONE*, 2012)。

膵臓がんの腫瘍形成において高頻度に発生する *K-RAS* 遺伝子の活性型変異によって誘導された恒常的オートファジーは腫瘍への進展に必須であることがわかっている (Kim MJ, et al. *J Biol Chem*, 2011 & Perera RM, et al. *Nature* 2015)。一般的に、栄養飢餓状態の時に誘導されるオートファジーは自身を栄養源としてアミノ酸レベルに分解する生命を維持する機構である。*K-RAS* 遺伝子の活性型変異を有する膵臓がんにおいては、非常に高活性の恒常的オートファジーが働いて、ROS などの不要物を分解している。すなわち、膵臓がんの腫瘍形成に重要な機能である恒常的オートファジーが、結果として免疫監視機構の目印を作り出す抗原提示機構の一部として働いていることから、その産物はユニークながん特異的エピトープであると考えられる。さらに、この CTL はヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 を移植した超免疫不全マウスにおいて免疫療法を行うことで腫瘍の縮小効果を示した。加えて、この CTL が有する T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子を分取し、ヒト末梢血由来の新鮮な T 細胞に移入した TCR 移入 T 細胞は *in vitro* で CTL よりも強くがん細胞に反応した。これらのことから、膵臓がん特異的エピトープとして有効な治療となる可能性が示唆され、より多くのオートファジー介在性エピトープを探索する必要性があると考えた。

2. 研究の目的

CTL が認識する HLA 上のエピトープペプチドは、免疫療法への応用には必須の情報である。申請者らは活性型 *K-RAS* 遺伝子変異を有する膵臓がん誘導されている高活性かつ恒常的オートファジーを介在した場合にのみ生成される CTL エピトープを同定した。この一例の結果の普遍性を検討するために、広くオートファジー介在性エピトープを探索することを目的とする。さらに探索結果から膵臓がん特異性の評価やエピトープの局在性を明らかにすることで、治療への応用可能性を検討する。

3. 研究の方法

オートファジー亢進型膵臓がんに対するがん免疫治療ターゲットを網羅的に解析するために以下の 2 方法によって研究を進める。

がん細胞に提示されるエピトープ情報を取得する手法として、オートファジー活性化膵臓がん細胞株を 10^9 細胞分からタンパク質溶液を調製し、HLA 特異的抗体を用いて生化学的処理を行って HLA に結合しているエピトープペプチドを分離して、これをマスマスペクトロメーターによって解析する。得られた結果からペプチド候補を合成して、この配列に特異的な T 細胞を誘導して、最終的に得られた T 細胞の反応性からエピトープペプチドであるかどうかを検証する。

膵臓がん細胞で高頻度に遺伝子が変異している *KRAS* 遺伝子及び *TP53* 遺伝子に着目して、T 細胞のターゲットとなりうるのかを検討して、これらのネオアンチゲン由来エピトープペプチドの生成にオートファジーが必要であるのかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) マスマスペクトロメーターによるエピトープの解析

サンプル調製部分の条件検討を行なったところ、得られるタンパク質量が想定よりも少なかったが、日本人に比較的多い HLA-A2 及び HLA-A24 を対象として、その上に提示されているペプチドを分離して行うことができた。得られたペプチドをさらに生化学処理を行いマスマスペクトロメーターで測定を行なった。至適条件の選定が難しくなかなか好ましい結果が得られなかった。このため(2)に示す手法を新たに加えた。

(2) 共通ネオアンチゲン特異的 T 細胞の誘導

共通ネオアンチゲンがオートファジー亢進型膵臓がんにおいてもエピトープとして提示されているかどうかを検討するために、共通ネオアンチゲン特異的 T 細胞の誘導を行なった。非常に広いタイプのレパートリーに期待して健康人のタイプ CD8⁺T 細胞を用いて、樹状細胞に変異部分を含む短い遺伝子由来の *in vitro* 転写法にて作製した RNA を導入して抗原提示細胞として使用した。複数回刺激を行なった後、特異的 T 細胞を濃縮してセルソーターで 1 細胞ずつ回収した。各シングルセルから T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を取得した。それぞれ解析を行なって TCR 遺伝子の塩基配列を解析した。

TP53_V157F で誘導して得られた TCRbeta の配列を表 1 に示す。またそれらの割合を図 1 に

示す。

TRBV7-8	TRBV30	TRBV7-9	TRBV2	TRBV7-3
TRBV27	TRBV20-1	TRBV13	TRBV9	TRBV25-1
TRBV15	TRBV5-6	TRBV11-1	TRBV28	

表 1 TP53_V157F で誘導して得られた TCRbeta 配列

これらの抗原特異性を調べたところ、有望な TCR 遺伝子が含まれたため、詳細な解析を行なっている。
今後、これらの TCR 配列が認識するエピトープ及び拘束 HLA の同定を行なった後、本エピトープ生成においてオートファジーの関与を検討していく予定である。

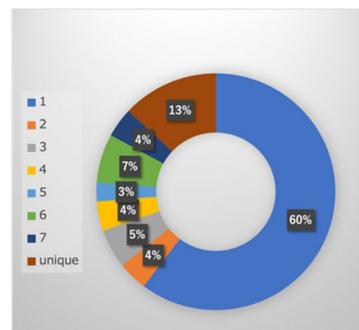


図 1 TP53_V157F で得られた TCR 配列の割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinohara S., Takahashi Y., Demachi-Okamura A., Matsuhita H.	4. 巻 61
2. 論文標題 Identification of neoantigens and development of antigen-specific immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 1433-1439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.1433	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 Kataoka K., Miyoshi H., --- Demachi-Okamura A. --- Ogawa S.	4. 巻 33
2. 論文標題 Frequent structural variations involving programmed death ligands in Epstein-Barr virus-associated lymphomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1687-1699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-019-0380-5	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 該当する

1. 著者名 松下博和、岡村文子、高橋祐介	4. 巻 46
2. 論文標題 ネオアンチゲンはがんに対するナチュラルに誘導されるあるいは治療により誘導される免疫応答の重要な標的である	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 癌と化学療法	6. 最初と最後の頁 1372-1376
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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋祐介、岡村文子、松下博和	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 267
3. 書名 がん免疫療法の個別化を支える新・腫瘍免疫学	

〔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
---------	---------