

令和元年5月17日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05472

研究課題名(和文) 婦人科がんの個別化腫瘍免疫療法を目指した腫瘍浸潤リンパ球の基礎的研究

研究課題名(英文) Analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in malignant gynecologic tumors for development of personalized tumor immunotherapy

研究代表者

吉川 史隆 (Kikkawa, Fumitaka)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40224985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)： 婦人科がんにおける患者由来腫瘍のin vivoモデル(Patient-derived xenograft: PDXモデル)の構築と腫瘍浸潤リンパ球(Tumor Infiltrating Lymphocytes: TIL)の基礎的検討を行った。

TIL培養に関しては、培養細胞数に幅はみられたものの97.6%で可能であった。PDXモデルに関しては、41%の症例で腫瘍生着および継代が可能であった。少数例ではあるが、次世代シーケンサー技術を用いて腫瘍特異的変異抗原候補を抽出し、同抗原の一部に関して同定でき、さらには同定した腫瘍特異的変異抗原を認識するCTLのTCR解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TILに由来する個別化療法は症例によっては根治につながる可能性がある。同治療法の出発点は臨床検体採取にあり、婦人科がん手術の適応判断を含めて実行するのは婦人科医であることから、今後も婦人科がんの特徴に合わせた複合的治療戦略やTIL選別・培養方法改良等の基礎的検討が重要であると考えられる。

また、本研究の副産物として構築されるPDX細胞株ライブラリーは、患者の細分化を行うと前向き臨床試験が計画しづらい症例数となってしまう婦人科領域においては、免疫療法開発に限定せずにPrecision Medicineの実践という局面での前臨床試験モデルとしての活用が期待される。

研究成果の概要(英文)： In order to develop personalized immunotherapy for malignant gynecologic tumors, we aimed to characterize tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and to clarify the mutated neoantigens of individual patients with malignant gynecologic tumors.

Although TIL yield varied between patient samples, we could expand the TILs from the small fragments of tumor in most cases (97.6%). A total of 14 patient derived xenografts (PDX) models were established. It could be confirmed that the reactive cells to autologous tumor cells were present in the expanded TILs. In two cases with ovarian cancer, we identified candidates of mutated neoantigens by the next generation sequencing combined with bioinformatics prediction and evaluated TILs from the same patients.

研究分野：産婦人科学

キーワード：婦人科がん 腫瘍免疫 腫瘍浸潤リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫療法はがんの“第4の治療法”として期待され国内外で研究がなされている。婦人科領域においても、がん免疫療法単独だけでなく、がん免疫療法同士や化学療法・分子標的薬等との併用療法の検討が繰り広げられているが、強力な免疫療法として開発が期待されているものに腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating Lymphocytes: TIL)、腫瘍抗原特異的 T 細胞受容体や Chimeric antigen receptor (CAR) 遺伝子を導入したリンパ球等を使用した細胞移入療法が挙げられる。

また、がん治療における最大の障壁は転移と薬剤耐性であり、その重大な要因として、がん進展機構における Heterogeneity が挙げられる。抗腫瘍治療法開発における前臨床試験として、培養細胞を用いた薬剤・抗腫瘍治療法への感受性試験は必須であるが、培養細胞での感受性は実際の患者における有効性とは必ずしも相関しない。がんの Heterogeneity をどう評価し克服していくかは重要な研究課題のひとつとなっており、今後の抗腫瘍治療法開発では、培養細胞と患者を結ぶ *in vivo* 感受性・耐性評価系が必要不可欠であり、そのモデルのひとつとして Patient-derived xenograft (PDX) モデルが注目されている。

2. 研究の目的

婦人科がん患者に対する TIL を用いた個別化腫瘍免疫療法を開発するために、婦人科がん切除検体中の TIL を分離・培養し、患者から樹立したがん細胞株 (PDX 細胞株) を標的とした抗腫瘍効果について検証するとともに、腫瘍特異的変異抗原を認識する TIL の臨床応用に向け検討することを目的とした。

3. 研究の方法

婦人科がんにおける手術切除検体 (腫瘍および正常組織) を、TIL 解析、がん細胞株樹立、線維芽細胞培養およびゲノムシーケンス用に分取する。

(1) 婦人科がん患者の腫瘍から TIL を分離・培養する技術の確立

切除した腫瘍検体を採取後可及的速やかに細かく分散 (4-6mm³ 大) 処理し、高濃度 IL-2 およびヒト血清を添加した培養液にて約 2 週間培養する。培地交換は症例毎の細胞増殖程度に合わせて適宜行う。増殖が得られた症例については培養後、増殖効率の確認に加えフェノタイプ解析 (CD8, CD4, CD56 等) を FACS にて行う。

(2) 自己腫瘍反応性 T 細胞の選別マーカー探索

TIL 分離と同一患者の正常組織内リンパ球を併せて分離し、自己腫瘍反応性 T 細胞を早期に選別するための細胞表面マーカー (CD107a, CD137, PD-1, TIM3) について *ex vivo* FACS 解析する。

(3) 患者オリジナルのがん細胞株樹立 (PDX モデル)

婦人科がんにおける PDX モデルを構築するため、細断した腫瘍細胞塊を免疫不全マウス (NSG マウス) に皮下等に移植しがん細胞株の樹立を試みる。樹立された PDX 細胞株由来の腫瘍を、オリジナルの婦人科腫瘍標本と病理学的に比較し類似性および差異について評価する。必要に応じて HE 染色に加え、がん種・組織型ごとに免疫染色を施行する。

(4) 構築した患者由来がん細胞株を用いた TIL の抗腫瘍効果検証実験

(1) および (3) で得られた症例毎の TIL 中の CD8 陽性 T 細胞 (CTL) と PDX 腫瘍を共培養し、CD107a, PD-1 等を指標とした FACS 解析を行う。

(5) TIL が認識するの同定

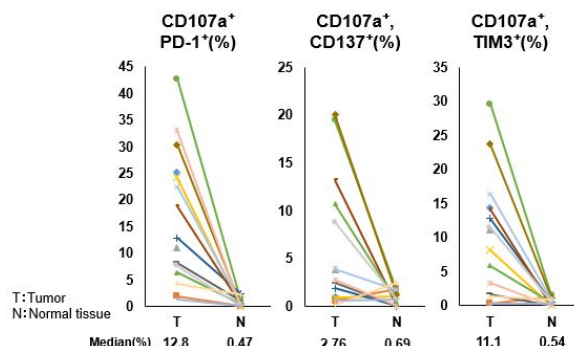
がん組織と非がん組織から各々 DNA および RNA を抽出する。同検体セットを次世代シーケンサーで解析 (全エクソームシーケンス・RNAseq) し、症例毎にアミノ酸置換を伴うがん特異的体細胞遺伝子変異の抽出と HLA タイプ腫瘍特異的変異抗原ングを行う。抽出された腫瘍特異的変異抗原候補が、実際に自己腫瘍反応性 TIL に認識されている抗原であるかどうか検証する。その方法として、まず同定した遺伝子変異抗原ペプチド候補全てに対して変異部位を含む長鎖ペプチドをコードする mRNA を合成する。続いて同 mRNA を自己の線維芽細胞に遺伝子導入して内因性に抗原提示させ、TIL の反応性を IFN- γ ELISPOT 解析で評価することで TIL の認識抗原を同定する。

4. 研究成果

(1) 婦人科がん患者の腫瘍から TIL を分離・培養する技術の確立

婦人科がん 41 例 (境界悪性腫瘍 3 例を含む卵巣がん 34 例・卵管がん 1 例・子宮がん 5 例・絨毛がん 1 例) の手術切除検体を用いて TIL 培養を行ったところ、卵巣線維肉腫 1 例を除く症例 (97.6%) で、約 2 週間の TIL 培養と回収が可能であった。24 穴プレート 1 枚あたり回収・保存できた細胞数 (中央値 5.4x10⁶ 個) には幅があり、培養前の TIL 数の多寡や

図1 卵巣がん患者でのCTL表面マーカーの検討



組織型に左右されていると考えられた。培養後のフェノタイプ解析では CD8 陽性および CD4 陽性 T 細胞主体に培養がなされている結果となっていた。

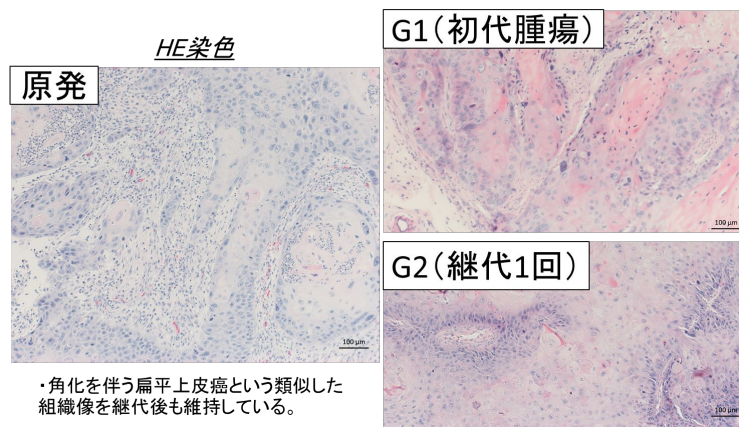
(2) 自己腫瘍反応性 T 細胞の選別マーカー探索

卵巣がん 15 例に関して *ex vivo* FACS 解析を施行した。腫瘍組織内の CTL では CD107a や補助刺激分子の発現が有意に上昇していることが確認され、さらに表面マーカーの組み合わせにより自己腫瘍反応性 T 細胞を効率よく選別できる可能性が示唆された (図 1)。

(3) 患者オリジナルのがん細胞株樹立 (PDX モデル)

婦人科がん 34 例について PDX 細胞株の樹立を試みて、うち 14 例 (41%) で腫瘍生着・継代に成功した (図 2)。継代を経るにつれ、腫瘍形成に要する期間が短縮する傾向が確認された。

図2 樹立された卵巣がんPDX細胞株例:成熟奇形腫に伴う悪性転化



(4) 構築した患者由来がん細胞株を用いた TIL の抗腫瘍効果検証実験

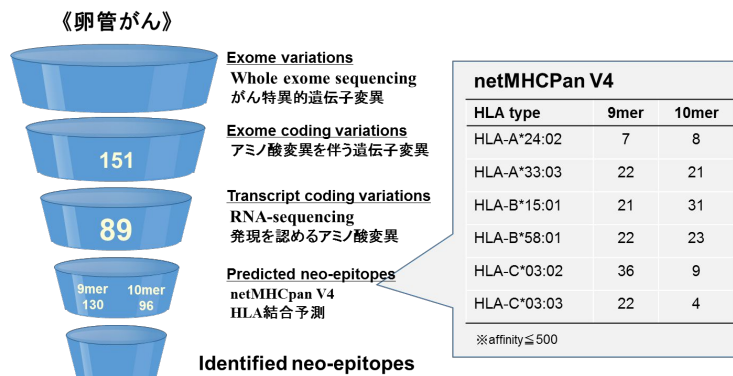
約 2 週間培養後の TIL をエフェクター細胞、分散処理した PDX 腫瘍細胞をターゲット細胞として用いて共培養後の FACS 解析にて、培養後の TIL 中にも腫瘍特異的の反応を示す CTL が存在することが確認された。指標として使用

した T 細胞表面マーカーは、自己腫瘍反応性 CTL を検出する有力なマーカー候補と考えられた。

(5) TIL が認識する腫瘍特異的の変異抗原の同定

PDX 細胞株が樹立されている卵巣がん 2 例について、全エクソーム解析を行い各々 89、80 個の腫瘍特異的の変異抗原を抽出した。また同定された HLA 型を基に、それぞれの HLA 型に結合するペプチド配列を netMHC 等のツールを用いて予測し、腫瘍特異的の変異抗原に由来する Neo-epitope 候補として各々 226、106 個を抽出した (図 3)。変異抗原ペプチドをコードする mRNA を導入した線維芽細胞を用いたスクリーニングにより TIL 中の CTL が認識する腫瘍特異的の変異抗原を同定することが可能であった。また 2 症例とも腫瘍特異的の変異抗原を標的とした腫瘍反応性 CTL の T 細胞受容体 (TCR) 同定が可能であった。

図3 婦人科がん患者の腫瘍特異的の変異抗原候補の抽出例



今後、(2)で検証した各種選別マーカー陽性分画毎や培養後 TIL の TCR レパートア解析を追加し、腫瘍特異的の変異抗原を標的とした CTL の TCR 比率を比較することで選別マーカー候補の有用性検証が可能であると考えられた。

また、複合的がん免疫療法の開発段階に限らず、実際の患者に存在する Heterogeneity や新規治療法の有効性をより反映できる前臨床試験モデルの構築が求められている。本研究の副産物として構築される PDX 細胞株ライブラリーは、患者の細分化を行うと前向き臨床試験が計画しづらい症例数になってしまう婦人科領域においては、免疫療法開発に限定せずに Orphan Drug 開発・Precision Medicine の実践という局面での前臨床試験モデルとしての活用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Peng Y, Kajiyama H, Yuan H, Nakamura K, Yoshihara M, Yokoi A, Fujikake K, Yasui H, Yoshikawa N, Suzuki S, Senga T, Shibata K, Kikkawa F. PAI-1 secreted from metastatic ovarian cancer cells triggers the tumor-promoting role of the mesothelium in a feedback loop to accelerate peritoneal dissemination. *Cancer Lett.* 2019; 442:181-192. 査読有, doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.027.

Kawai Y, Shibata K, Sakata J, Suzuki S, Utsumi F, Niimi K, Sekiya R, Senga T, Kikkawa F, Kajiyama H. KIF20A expression as a prognostic indicator and its possible involvement in the proliferation of ovarian clear-cell carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2018; 40(1):195-205. 査読有, doi: 10.3892/or.2018.6401.

Shimizu Y, Suzuki T, Yoshikawa T, Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Nakatsura T. Cancer Immunotherapy Targeted Glypican-3 or Neoantigens. Cancer Sci. 2018; 109(3):531-541. 査読無, doi: 10.1111/cas.13485.

Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. Nat Commun. 2017; 8:14470. 査読有, doi: 10.1038/ncomms14470.

〔学会発表〕(計 8 件)

野坂和外, 吉川聡明, 鈴木利宙, 齋藤桂吾, 下村真菜美, 水野正一, 鈴木史朗, 吉川史隆, 中面哲也 婦人科がんの腫瘍浸潤リンパ球における腫瘍反応性 CTL の抽出法の開発とそれらが認識する抗原の同定 第 16 回日本免疫治療学会学術集会, 2019 年

野坂和外, 吉川聡明, 鈴木利宙, 齋藤桂吾, 下村真菜美, 水野正一, 鈴木史朗, 吉川史隆, 中面哲也 婦人科がんにおける個別化免疫療法の開発 第 15 回日本免疫治療学研究会学術集会, 2018 年

鈴木史朗, 玉内学志, 清水裕介, 吉原雅人, 中村謙一, 芳川修久, 梶山広明, 吉川史隆 ESTABLISHMENT AND CHARACTERISATION OF PATIENT-DERIVED XENOGRAFT MODELS FOR MALIGNANT GYNECOLOGIC TUMORS. 20th Biennial Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO 2017), 2017 年

鈴木史朗, 坂田純, 内海史, 関谷龍一郎, 梶山広明, 柴田清住, 吉川史隆 婦人科がん patient-derived xenograft モデルの構築 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2017 年

〔図書〕(計 2 件)

鈴木史朗 他 日本臨牀社 日本臨牀増刊号 婦人科がん (第 2 版) 最新の研究動向 2018 年, 676-682

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件), 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/research/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 梶山 広明

ローマ字氏名: (KAJIYAMA, hiroaki)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 医学系研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 00345886

研究分担者氏名: 鈴木 史朗

ローマ字氏名: (SUZUKI, shiro)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 20612758

研究分担者氏名: 中面 哲也

ローマ字氏名: (NAKATSURA, tetsuya)

所属研究機関名: 国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名: 先端医療開発センター

職名: 分野長

研究者番号 (8 桁): 30343354

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。