

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：82713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15602

研究課題名(和文) 固形がんの末梢循環癌細胞を標的とした遺伝子改変T細胞移入療法の開発

研究課題名(英文) Development of genetically modified T cell transfer therapy targeting peripheral circulating cancer cells of solid tumor

研究代表者

和田 聡 (wada, satoshi)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・がんワクチンセンター・医長

研究者番号：30420102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：患者サンプルを用いたCTC解析ではこれまでに25名の患者において施行し、血中循環癌細胞濃縮回収装置を用いてCTCを確認する事ができた。免疫染色実験では、上皮性マーカー(カドヘリン)と造血系細胞マーカーCD45とを用いて染色し、カドヘリン(+)-CD45(-)細胞をCTCとした。PDXモデルでは、まずマウス血液と人膵がん細胞とを混合したサンプルを用いて条件検討を施行し、次に膵がんCell lineを用いたCDXモデルにおいて、CTC細胞(EGFP(-), mouse MHC(-), HLA(+))を同定した。これらの解析後、膵がんPDXを用いて同様の実験を行い、CTC細胞を同定する事に成功した。

研究成果の概要(英文)：CTC analysis using patient samples has been carried out in 25 patients and CTC could be confirmed using blood circulation cancer cell concentration device. In immunostaining experiments, staining was performed using epithelial marker (cadherin) and hematopoietic cell marker (CD45), and cadherin (+) CD45 (-) cells were counted as CTC (before treatment: 0-312 cells / 1 sample, after treatment: 0-150 cells / 1 sample). In the PDX model, conditions were examined using a sample in which mouse blood and human pancreatic cancer cells were mixed. Furthermore, in the CDX model using the pancreatic cancer cell line, peripheral blood was collected at the time when tumor volume reached 1500 mm³, and CTC cells (EGFP (-), mouse MHC (-), HLA (+)) were identified. After these fundamental analysis, we performed a similar experiment using pancreatic cancer PDX model and succeeded in identifying CTC cells.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 循環がん細胞 CTC pancreatic cancer

1. 研究開始当初の背景

近年 Immune Checkpoints に対する抗体薬とは機序を異にして免疫二大治療の一つとして定着しつつあるのが CAR-T 療法である。CAR-T 療法は血液がんに対して、特に ALL に対して奏効率約 80-90%と高い効果が認められる一方で、固形がんに対してはまだ明らかな効果が認められていない。固形がんに対する対策が急務であり、また on-target 効果により副作用も認められることから CAR-T 療法に特異的な抗原検索が求められている。

がんの浸潤・転移において上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transformation, EMT) が、重要な役割を担うことが知られている。また転移を起こした細胞が末梢血中に存在すること (循環癌細胞 (Circulating Tumor Cell, CTC)) が知られており、アメリカでは Cellsearch™ system (Veridex)がこの CTC を検出するために認可されていて、転移性乳癌・大腸癌・前立腺癌で利用されている。これは EpCAM を磁気ソートし、その後 triple stain procedure で CK+, DAPI+, CD45-の細胞をとって白血球と区別する方法である。この方法は 82%という高い回収率で特異度、再現性が高い。患者自身の体内での癌細胞生存の可否を直接的・定量的に評価できることから非常に有望な抗癌剤感受性マーカー・サロゲートマーカーになると期待されている。しかし、この方法を含めた既存の CTC 検出システムは上皮マーカー (EpCAM, サイトケラチン等) を利用しており、癌細胞の転移、浸潤において重要な EMT が誘導された癌細胞を検出することができない。EMT 誘導癌細胞は遊走能、浸潤能が高く、血液中でのアポトーシス抵抗性、抗癌剤抵抗性に関与すると考えられている。また腫瘍特異的マーカーとして HER-2, MUC1/2, CEA を用いることもあるが癌のヘテロ性の問題が報告されている (Ruiz-Garcia et al. 2008; Tewes, Aktas et al. 2009)。これらの問題点を克服するため本研究では、日本に二台しかない血中循環癌細胞濃縮回収装置 (Clear Cell FX システム) を使用して、マーカー非依存的に single CTC を捕捉して解析を行い、CTC 特異的な抗原を同定して CAR-T 療法の標的として利用する。このシステムの利点はマイクロ流路チップが組み込まれており、サイズの違いにより流体力学的に他の血球成分と CTC とが分離され

生細胞として捕捉でき、また selection がないため EMT 誘導 CTC の見逃しも避けることができる。

これまで CAR-T の固形癌への応用について、血液癌であれば CD19 という良い標的抗原があるが、heterogeneity の強い固形癌に対してどの抗原を標的とするか、固形癌の腫瘍組織へどのようにして CAR-T をたどり着かせるかという固形癌特有の問題に対して多くの研究者が研究を行っているが、本研究は発想を転換し、CAR-T が血液癌に効果を示すのであるならば固形癌を血液癌と同じような原理で効果を示せないだろうか考えた。すなわち固形癌における予後に関与する血液中の標的抗原を探すこととした。癌進展早期における血液循環中への occult metastasis の存在は固形癌進展の特質と考えられている。さらに転移癌が予後を規定していることが多数あり、その転移細胞に対する治療が行えれば予後の延長に期待できる。この血中の転移細胞こそが CTC であり、我々はこの細胞に着目した。CTC をコントロールできれば転移を抑制し、転移を抑制できれば予後に寄与できると考えた。すなわち、血液がんに対して高い効果が認められている CAR-T 細胞を使用して CTC 特異的な抗原に作用させれば、CAR-T 細胞が血液中で CTC を認識して攻撃することができ、転移を抑制し予後の延長が期待できる。CTC 抗原の同定には CTC 解析が必須であるが、最近のゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームとプロテオーム解析の進歩から単細胞の解析が可能となり、この方法を用いることにより CTC 特異的な抗原が同定できると考えられる。我々は本研究により固形癌のバイオマーカーの検索のみならず、治療標的を同定して CAR-T を固形癌治療へ応用させることを目的とし、今までの固形癌への治療アプローチとは異なる方法で、確実な長期生存に寄与できる方法を提案する。

2. 研究の目的

本研究は固形がんに対する CAR-T 療法の開発というまだ世界の誰も成しえていない治療法の開発を目的としており、固形がんの予後を規定する転移に直接関わる CTC をその標的とした斬新でチャレンジングな研究である。CTC の同定にはこれまでにあまり行われていないラベルフリー法を用いて行い

single CTC 採取を行う。CTC の解析にはがん患者末梢血検体を使用して次世代シーケンサー（NGS）及びプロテオーム解析を用いて行うが、同時にその患者由来のゼノグラフト（PDX）モデルを使用してがん患者末梢血検体と比較解析し、CTC 研究におけるヒト化マウスの有用性についても検証を行う。CTC 解析は乳癌・前立腺癌・大腸癌・肺癌・膀胱癌・腎癌・胃癌・肝癌について良く解析が行われているが、我々が今回目的としている膵癌・胆管癌・食道癌にはあまり報告がない。そういった意味でもこの研究はチャレンジングであり、また同一患者の CTC を患者検体及び PDX モデルを用いて同時に比較解析を行うのは他に類を見ず、CTC の今後の発展に寄与するものと考え。PDX モデルに用いるマウスは実験動物中央研究所から供与して頂いている NOG-EGFP を用いるため、マウスサンプルを除去して患者サンプルのみを抽出することが可能である。また我々の施設では PDX バンクを手掛けており、これまでに膵癌 PDX16 名分が作成検証済であり、現在他の 14 名分がその途中段階にある。また胆管癌 PDX は 6 名分が作成検証済であり、現在他の 6 名分が途中段階にある。他の癌腫についても現在 High volume center の利点を活かして作成を続けている。本研究は CAR-T の血液中での強い抗腫瘍効果の特性を活かすため、固形癌においても血液中に標的を絞り、特に転移に直接関与する CTC を新規標的抗原とした画期的な研究である。

3. 研究の方法

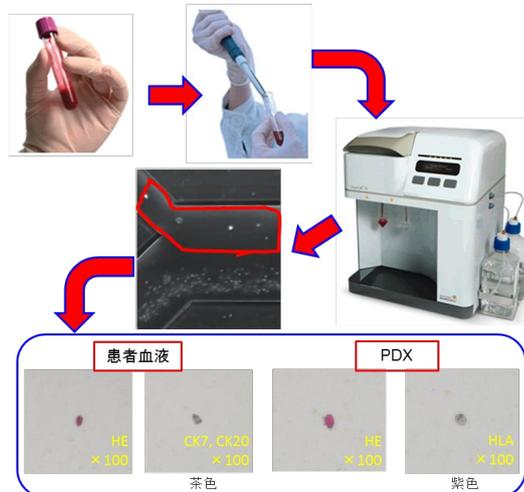
本研究は次の四つの方法を用いて研究を施行する。

(1) 難治性がん患者からの末梢血における CTC の捕捉及び解析。

1: これまでの予備実験で膵癌細胞・胆管癌細胞において Clear Cell FX を用いてがん細胞を捕捉できることを確認した。患者採血は術後転移を認めた患者で抗がん剤投与前、1 次治療不応後、二次治療不応後の計三回採取する。採取した血液から CTC を採取する方法を下図に示す。手術で得た原発巣からは Laser Microdissection(LMD)法を用いてがん細胞のみを採取する。

2: 得られた細胞から DNA, RNA, 膜蛋白を抽出してそれぞれ NGS 及びプロテオーム解析を行う。

Clear Cell FXシステムを用いたCTCの捕捉



(2) 難治性がん PDX モデルにおける CTC 解析。

1: NOG-EGFP マウスを用いて膵癌・胆管癌・食道癌 PDX を作成する。それぞれ 10 系統作成して解析を行う。原発巣は(1)と同様に LMD 法にてがん細胞のみ採取する。得られた細胞を基に NGS 及びプロテオーム解析を行う。また(1)の結果と比較検証してゼノグラフトの有用性を検証する。

(3) CTC 特異的抗原を同定し、CTC 特異的 CAR-T を作成する。

(1)・(2)から得られた結果を十分解析し、CTC に特異的な分子を幾つか特定する。特定した分子は Gene Cards gene database に照合させ、さらにバイオバンク又は Multiple Tissue Array を用いて多臓器正常組織との発現比較解析を行い正常細胞に発現の認めない分子を最終的に CTC 特異的分子とする。得られた分子に特異的な抗体を database から解析し市販の抗体が使用できればそれを使用する。市販交代がなければ慢性関節リウマチマウス (SKG マウス) を用いて抗体を採取し遺伝子解析を施行する。得られた遺伝子情報を既存の CAR-T construction に組み替えて CTC 特異的 CAR-T を作成する。

(4) 作成した CTC 特異的 CAR-T を用いた抗腫瘍効果を PDX モデルにて検証する。

先行研究にて CTC が得られると分かっている PDX モデルを使用し、(3)で作成した CAR-T を投与して抗腫瘍効果が得られるか検証を行う。

4. 研究成果

患者サンプルを用いた CTC 解析ではこれまでに 25 名の患者において施行し、血中循環

癌細胞濃縮回収装置 (Clear Cell FX) のダブルランにてそれなりの細胞数を得る事ができた (治療前: 13-235 個/1sample、4-78 個/1ml、治療後: 65-305 個/1sample、21-93 個/1ml)。がん細胞である事を証明するための免疫染色実験において、上皮性マーカー (カドヘリン) と造血系細胞マーカー CD45 とを用いて染色し、カドヘリン (+) CD45 (-) 細胞を CTC としてカウントした (治療前: 0-312 個/1sample、0-52 個/1ml、治療後: 0-150 個/1sample、0-25 個/1ml)。

PDX モデルでは、まずマウス血液と人膵がん細胞 (MiaPaCa2 細胞) とを混合したサンプルを用いて Clear Cell FX の条件検討を施行した。次に膵がん Cell line を用いた CDX モデルにおいて、腫瘍移植後 tumor volume が 1500mm³ に達した時点で末梢血採血を行い、CTC 細胞 (EGFP (-), mouse MHC (-), HLA (+)) を同定した。これらの基礎的解析後、膵がん PDX を用いて同様の実験を行い、CTC 細胞 (EGFP (-), mouse MHC (-), HLA (+)) を同定する事に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Wada S, Yada E, Ohtake J, Sasada T. Personalized peptide vaccines for cancer therapy: current progress and state of the art. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development.* 2(6): 371-381. 2017 nov. doi.org/10.1080/23808993.2017.1403286.
2. Yada E, Wada S, Yoshida S, Sasada T. Use of patient-derived xenograft (PDX) mouse models in cancer research and treatment. *Future Sci OA.* 2017 Dec 7;4(3): FSO271. doi: 10.4155/fsoa-2017-0136.
3. Kamei R, Yoshimura K, Yoshino S, Inoue M, Asao T, Fuse M, Wada S, Kuramasu A, Kondo T, Oga A, Iizuka N MD, Suzuki N MD, Maeda N, Watanabe Y, Matsukuma S, Iida M, Takeda S, Ueno T, Sasaki H, Hazama S, Oka M, Nagano H. Expression levels of UL16 binding protein 1 and natural killer group 2 member D affect overall survival in patients with gastric cancer after gastrectomy. *Oncol Lett.* 15(1): 747-754. 2018 Jan. doi: 10.3892/ol.2017.7354.
4. Konagai A, Yoshimura K, Hazama S, Yamamoto N, Aoki K, Ueno T, Fujioka M, Iijima H, Kato M, Uchida M, Wada T, Inoue M, Asao T, Fuse M, Wada S, Kuramasu A, Kamei R, Takeda S, Yamamoto S, Yoshino S, Oka M, Nagano H. Correlation between NKG2DL expression and antitumor effect of protein-bound polysaccharide-k in tumor-bearing mouse models. *Anticancer Res.* 37(8): 4093-4101. 2017 Aug.
5. Wada S, Yada E, Ohtake J, Fujimoto Y, Uchiyama H, Yoshida S, Sasada T. Current status and future prospects of peptide-based cancer vaccines. *Immunotherapy.* 8(11):1321-1333. 2016 Nov.
6. Ohtake J, Wada S, Yada E, Fujimoto Y, Uchiyama H, Yoshida S, Itoh K, Sasada T. Personalized immunotherapy in colorectal cancer. *Expert Rev of Prec Med and Drug Develop.* 1(3):267-77. 2016.
7. Tsukagoshi M, Wada S, Yokobori T, Altan B, Ishii N, Watanabe A, Kubo N, Saito F, Araki K, Suzuki H, Hosouchi Y, Kuwano H. Overexpression of natural killer group 2 member D ligands predicts favorable prognosis in cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 107(2):116-22. 2016 Feb. doi: 10.1111/cas.12853.
8. 和田 聡, 吉村 清. 免疫チェックポイント阻害剤の現在と未来. *臨床免疫・アレルギー科*; Vol.69 No.6, 531-538. June 2018.
9. 和田 聡, 玉田耕治. 免疫チェックポイント阻害剤を理解するための免疫学 (Immunology to understand an Immune Checkpoint inhibitor). *腫瘍内科*; Vol.19 No.1, 6-12. Jan 2017.
10. 和田 聡, 吉村 清. 免疫療法の歴史と今後の展望と課題. *先端治療技術の実用化と開発戦略*; No.1888, 95-100. Apr

2017.

11. 和田 聡, 玉田耕治. 腫瘍免疫の基礎. 呼吸器内科; Vol.31 No.4, 289-297. Apr 2017.
 12. 和田 聡, 笹田哲朗. 免疫チェックポイント阻害剤使用におけるバイオマーカー開発とその評価. 疾患・病態検査・診断法の開発; No.1912, 172-180. Sep 2017.
 13. 和田 聡. がんワクチン療法の現状と展望 W'Waves. Vol.23 No.1, 26-31. May 2017.
 14. 和田 聡, 玉田耕治. 免疫チェックポイント阻害剤におけるバイオマーカー. Approach to Oncology; No.17, 10-11, Oct 2017.
 15. 笹田哲朗, 大竹淳矢, 内山秀美, 和田 聡, 矢田英理香, 藤本佑希, 吉田慎太郎. 遺伝子変異を標的としたがん免疫療法. BIO Clinica; Vol 31 No.1, 102-106. May 2016.
 16. 和田 聡, 玉田耕治. 免疫療法の組み合わせ治療 (combined immunotherapy). 肝胆膵; Vol.73 No.3, 337-346. Sep 2016.
 17. 大竹淳矢, 藤本佑希, 和田 聡, 矢田英理香, 内山秀美, 吉田慎太郎, 笹田哲朗. がん特異的遺伝子変異を標的とした個別化がん免疫療法. BIO Clinica; 31(8):111-115 Sep 2016.
- [学会発表](計 23 件)
1. Wada S Tsukagoshi M, Watanabe A, Kubo N, Araki K, Suzuki H, Kuwano H. Analysis of the newly defined immune checkpoints in pancreatic cancer. ASCO-SITC Clinical Immuno-Oncology Symposium, February/23-25/2017, Orlando, USA.
 2. Wada S, Kojima T, Nakatsura T, Bando H, Motohashi O, Shimomura M, Yoshikawa T, Kohashi K, Hori A, Ono H, Fukutani M, Wakabayashi M, Nomura S, Sato A, Sasada T, Ohtsu A. Phase 1 study of HSP105-derived peptide vaccine for patients with advanced esophageal cancer/ colo-rectal cancer. ESMO congress, September/08-12/2017, Madrid, Spain.
 3. 和田 聡. がん免疫療法における患者がん組織を用いたxenograftモデルの有用性の検討. 第72回日本消化器外科学会総会 2017年7月22日 金沢.
 4. Yada E, Ohtake J, Sasada T, Wada S. Next-generation sequencing analysis of gemcitabine (GEM) resistant mechanism using patient-derived xenograft (PDX) model in pancreatic cancer. 第46回日本免疫学会学術集会 2017年12月12日 仙台.
 5. 矢田英理香, 大竹 淳矢, 吉田慎太郎, 笹田哲朗, 和田 聡. 膵臓がんPDXモデルを用いた抗がん剤耐性メカニズムの解明及びがん免疫療法への応用性の検討. 第21回日本がん免疫学会総会 2017年6月29日 千葉.
 6. 大竹淳矢, 和田 聡, 笹田哲朗. 大腸癌手術検体の網羅的解析による各種免疫細胞の形質・機能の解析. 第30回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2017年11月30日 岐阜
 7. 小島隆嗣, 和田 聡, 中面哲也, 坂東英明, 本橋修, 下村真菜美, 吉川聡明, 孝橋賢一, 小野宏美, 福谷美紀, 若林将史, 野村尚吾, 佐藤暁洋, 笹田哲朗, 大津敦. 食道がん・大腸がん患者を対象としたHSP105由来ペプチドワクチンの第I相医師主導治験. 第55回日本癌治療学会学術集会 2017年10月21日 横浜
 8. 矢田英理香, 大竹 淳矢, 笹田哲朗, 和田 聡. 膵臓がんPDXモデルを用いた抗がん剤耐性メカニズムの解明. 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月28日 横浜.
 9. 勝田将裕, 宮澤基樹, 中森幹人, 中村公紀, 尾島敏康, 辻俊明, 早田啓治, 吉田和弘, 和田 聡, 山上裕機. 標準療法不応食道癌に対するHLA-A24/02拘束性新規ペプチドカクテルワクチン療法の第I相臨床試験. 第72回日本消化器外科学会総会 2017年7月21日 金沢.
 10. 大竹 淳矢, 里吉哲太, 和田 聡, 矢田英理香, 三神裕美, 吉田慎太郎, 塩澤学, 笹田哲朗. 大腸がんにおける免疫抑制機構の解明. 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月29日 横浜.
 11. Ohtake J, Satoyoshi T, Kazama K, Wada S, Yada E, Mikami H, Yoshida S,

- Shiozawa M, Sasada T. Comprehensive analysis of immunological tumor environment in colorectal cancer. 第46回日本免疫学会学術集会 2017年12月12日 仙台.
12. 大竹 淳矢、里吉哲太、和田 聡、矢田英理香、三神裕美、吉田慎太郎、塩澤学、笹田哲朗. 大腸がんにおける免疫細胞の形質・機能の解析と免疫抑制機構の解明. 第21回日本がん免疫学会総会 2017年6月29日 千葉.
 13. Wada S. Preclinical analysis of combination therapy using radiation and cellular immunotherapy. AACR (American Association for Cancer Research) 107th Annual Meeting, April/16-20/2016, New Orleans, USA.
 14. Wada S. Development of combination therapy using radiation and cell-based immunotherapy. ASCO (American Society of Clinical Oncology) 52th Annual Meeting, June/3-7/2016, Chicago, USA.
 15. 和田 聡. 膵がんPDXモデルを用いた新規免疫治療法の開発. 第37回癌免疫外科研究会 2016年5月13日 川越
 16. Yada E, Ohtake J, Sasada T, Wada S. Establishment of pancreatic patient-derived xenograft (PDX). 第75回日本癌学会学術集会 2016年10月7日 横浜
 17. Ohtake J, Wada S, Yada E, Fujimoto Y, Uchiyama H, Yoshida S, Sasada T. Comprehensive analysis of T cell responses specific to neoantigens derived from gene mutations. 第75回日本癌学会学術集会 2016年10月6日 横浜
 18. 大竹淳矢、和田 聡、矢田英理香、藤本佑希、内山秀美、吉田慎太郎、笹田哲朗. 突然変異遺伝子に対する特異的 T 細胞反応の網羅的解析. 第20回日本がん免疫学会総会 2016年7月28日 大阪
 19. 矢田英理香、大竹淳矢、吉田慎太郎、藤本佑希、内山秀美、笹田哲朗、和田 聡. 膵臓がんゼノグラフトの有用性の検証 ~ 治療の新規標的分子の探索に向けて ~. 第20回日本がん免疫学会総会 2016年7月28日 大阪
 20. Ohtake J, Wada S, Yada E, Fujimoto Y, Uchiyama H, Yoshida S, Sasada T. High immunogenicity of neoantigens derived from tumor-specific gene mutations. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月6日 沖縄
 21. Yada E, Ohtake J, Sasada T, Wada S. Establishment and comparison of pancreatic cancer patient-derived xenograft (PDX) models. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月6日 沖縄
 22. 藤本佑希、笹田哲朗、和田 聡. 免疫チェックポイント阻害剤を用いた複合がん免疫療法の検討. 第29回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2016年12月1日 久留米
 23. 和田 聡, がん免疫療法の現状と将来展望. Educational Seminar in GUNMA, 2016年1月14日, 群馬
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
和田 聡 (WADA SATOSHI)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター (臨床研究所)
研究者番号 : 30420102
 - (2)研究分担者
矢田英理香 (YADA ERIKA)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター (臨床研究所)
研究者番号 : 30415567