

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19990

研究課題名(和文) 腫瘍浸潤T細胞を投与する新たな肺がん個別化免疫細胞療法の開発

研究課題名(英文) Developing a personalized immunotherapy for lung cancer patients: Identification of tumor reactive CTLs

研究代表者

吉川 聡明 (Yoshikawa, Toshiaki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：00625957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺がんでは患者毎に異なる多くの遺伝子変異が生じており、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の多くは、これらの抗原を認識していることが予想される。本研究では、手術で切除された肺がん組織検体を使用し、TILの培養と免疫不全マウスを使用したがん細胞株の樹立を行い、TILの自己腫瘍反応性を検証した。また、次世代シーケンサー解析により腫瘍特異的な遺伝子変異を抽出し、患者ごとのHLAに結合しうるネオアンチゲンペプチドの候補をあげた。今後、TILの認識抗原を同定することや、早期に単離した自己腫瘍反応性TILのTCRをクローニングし再構築することにも取り組み、個々の患者に対応した細胞移入療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：The antigens encoded by the tumor-specific somatic mutations are potentially best targets for cancer immunotherapy. To develop a personalized immunotherapy for lung cancer, we characterized the tumor reactive tumor infiltrating lymphocytes (TILs). Surgically resected tumor tissues were obtained from 50 patients with lung cancer. We found the marker to isolate tumor reactive TILs ex vivo. Patient derived xenografts (PDX) were generated from some primary tumor tissues, and, the reactivity of TILs against autologous PDX cancer cells was evaluated. We performed whole-exome sequencing on matched tumor and normal DNA. The candidates of mutated epitopes were identified. We will identify the antigens recognized by these tumor-reactive TILs. Combined with bioinformatics prediction and the assay with ex vivo isolated TILs, we try to determine useful TCR, which recognize antigen for cancer immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：肺がん 遺伝子変異由来抗原 腫瘍浸潤リンパ球

1. 研究開始当初の背景

がんの治療法として、外科療法、化学療法、放射線療法の3大療法に続く4番目の方法として大きな期待が寄せられているものに免疫療法がある。中でも強力な免疫療法として細胞移入療法が知られている。海外ではメラノーマを中心に進められており、化学療法やX線照射による体内のリンパ球除去と、体外で大量培養した腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating Lymphocytes: TIL) 移入を組み合わせることで70%以上の患者に有効であったことが報告されている。理由として、メラノーマでは紫外線の影響により遺伝子変異が多く生じていることがあげられており、実際に自己腫瘍を認識できるTILの多くは遺伝子変異に由来するペプチドを認識していたことも近年報告されている。遺伝子変異に由来するペプチドは、非自己であるため免疫原性が高く、そのことがメラノーマでの好成績につながっていると考えられている。しかし、副作用の強さやCTL大量培養の困難さなどから、未だ多くのがん患者に行える治療法ではない。

肺がんにおいても喫煙者の肺がん代表されるように多くの遺伝子変異が生じており、変異の種類や数は患者毎に大きく異なる。TILの多くは、これらの抗原を認識していることが予想される。また、近年非小細胞肺がんにおいて免疫チェックポイント阻害抗体である抗PD-1抗体の治療効果は遺伝子変異の数と相関しており、遺伝子変異由来ペプチド特異的TILの潜在能力を示唆する結果も報告されている。これらより、肺がんに対して免疫療法を開発するためには、多くの患者に共通する腫瘍抗原を同定するよりも、患者個々で異なる抗原を認識したTILを使用することが有効なのではないかと考え本研究を計画した。

2. 研究の目的

肺がん患者に対する免疫療法を開発するために、TILを体外で増殖させ投与する新たな個別化免疫細胞療法モデルを樹立することを目的とした。具体的には、がん細胞株を樹立し、TILが自己のがん細胞を傷害できるかを確認するとともに、TILの認識抗原を同定することにより、多くの患者に共通する抗原ではなく患者個々で異なるペプチドを認識したTILを使用することの有用性を検証する。

3. 研究の方法

手術で切除された50例の肺がん患者組織検体を使用した。腫瘍組織と正常組織を以下の4つに分けて解析を行った。(1) 組織を分散処理し、ex vivoでTILの表面マーカーのFACS解析を行った。(2) 腫瘍組織からTILの培養

を行った。(3) 免疫不全マウスに腫瘍組織片を移植し、Patient Derived Xenograft (PDX)として患者の自己腫瘍株を作製した。さらに、(2)(3)で得られたTILとがん細胞を使用し、TILの自己腫瘍反応性を検証した。(4) DNAとRNAを抽出し、全エクソーム解析とRNAシーケンス解析により腫瘍特異的な遺伝子変異を同定した。

4. 研究成果

ex vivo FACS解析において、正常組織と比較し腫瘍組織内のCTLでは、細胞傷害性顆粒であるパーフォリン・グランザイムの放出を示すCD107aや、補助刺激分子であるPD-1、CD137、Tim-3の発現の上昇が見られた。このことは、腫瘍組織内には腫瘍細胞を認識して活性化したCTLが多く存在することを意味しており、このようなマーカーにより腫瘍反応性TILをex vivoで早期に単離できることが見込まれる。一方、50例の全例において腫瘍組織内のTILと正常組織内の線維芽細胞を培養により増殖させることができた。また、6例においてはPDXにより自己腫瘍細胞を維持できている。これらの症例において、増殖させたTILと自己のPDXがん細胞を使用しTILの自己腫瘍反応性をCD107a解析により評価したところ、TILの一部は自己腫瘍を認識した。さらに32例で行ったがん部・非がん部のペアの全エクソーム解析データから各患者のHLA型を同定し、がん特異的遺伝子変異を解析し、HLA-ペプチド結合予測アルゴリズムにより各患者のHLA型に結合しうるネオアンチゲンペプチドの候補を選定できるようになった。現在これらの変異を含むmini geneとそのmRNAを作製し、TILが認識している抗原の同定を行っている。これによりペプチド-HLA結合予測アルゴリズムでは予測できないような細胞内でのプロセッシングも反映した抗原の同定も見込まれる。今後は、これらの症例で肺がん患者のTILが遺伝子変異由来抗原を認識していることを証明するとともに、自己腫瘍を認識できるTILを早期に単離し増殖させることや、それらのTCR遺伝子をクローニング・再構築することで自己腫瘍反応性TILを使用した個別化細胞移入療法の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

1. Tsuchiya N*, Hosono A*, Yoshikawa T*, Shoda K, Nosaka K, Shimomura M, Hara J, Nitani C, Manabe A, Yoshihara H, Hosoya Y, Kaneda H, Kinoshita Y, Kohashi K, Yoshimura K, Fujinami N, Saito K,

- Mizuno S, Nakatsura T. Phase I study of glypican-3-derived peptide vaccine therapy for patients with refractory pediatric solid tumors. *Oncol Immunology*. Sep 27;7(1):e1377872. 2017 doi: 10.1080/2162402X.2017.1377872. (査読あり) *These authors contributed equally to this work.
2. Tsuchiya N*, Yoshikawa T*, Fujinami N*, Saito K, Mizuno S, Sawada Y, Endo I, Nakatsura T. Immunological efficacy of glypican-3 peptide vaccine in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncol Immunology*. Jul 11;6(10):e1346764, 2017 doi:10.1080/2162402X.2017.1346764. (査読あり) *These authors contributed equally to this work.
 3. Shimizu Y, Suzuki T, Yoshikawa T, Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Nakatsura T. Cancer Immunotherapy Targeted Glypican-3 or Neoantigens. *Cancer Sci*. 109(3):531-541, 2017 Mar (review) doi: 10.1111/cas.13485. (査読あり)
 4. Ofuji K, Saito K, Suzuki S, Shimomura M, Shirakawa H, Nobuoka D, Yawada Y, Yoshimura M, Tsuchiya N, Takahashi M, Yoshikawa T, Tada Y, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Nakamoto Y, Nakatsura T. Perioperative plasma glypican-3 level may enable prediction of the risk of recurrence after surgery in patients with stage I hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 8(23): 37835-44, 2016 Dec doi: 10.18632/oncotarget.14271. (査読あり)

〔学会発表〕(計 33 件)

1. 肺がんに対する個別化免疫療法の開発を目指した自己腫瘍反応性 TIL の解析、吉川聡明、野坂和外、鈴木利宙、鈴木穰、関真秀、坂本裕美、市川仁、青景圭樹、坪井正博、中面哲也、第 15 回日本免疫治療学研究会学術集会(東京)2018 年 2 月 17 日(ポスター)
2. ヒト健常人・がん患者血液を用いたヒト化抗 CD4 抗体による invitro での CD4 陽性細胞への作用の検討、下村真菜美、北野滋久、正田香世子、吉川聡明、横地祥司、伊藤哲、松島綱治、植村靖史、中面哲也、第 15 回日本免疫治療学研究会学術

- 集会(東京)2018 年 2 月 17 日(ポスター)
3. 肝細胞癌に対する術後補助療法としての glypican-3 ペプチドワクチン、谷口理丈、吉川聡明、鈴木利宙、赤澤悠、清水康博、土屋伸広、澤田雄、遠藤格、中面哲也、第 15 回日本免疫治療学研究会学術集会(東京)2018 年 2 月 17 日(ポスター)
 4. 婦人科がんにおける個別化免疫療法の開発、野坂和外、吉川聡明、鈴木利宙、齊藤桂吾、下村真菜美、水野正一、鈴木史朗、吉川史隆、中面哲也、第 15 回日本免疫治療学研究会学術集会(東京)2018 年 2 月 17 日(ポスター)
 5. 難治性小児固形腫瘍に対する GPC3 ペプチドワクチン療法の第 相試験、清水康博、細野亜古、土屋伸広、吉川聡明、藤浪紀洋、齊藤桂吾、水野正一、中面哲也、第 15 回日本免疫治療学研究会学術集会(東京)2018 年 2 月 17 日(ポスター)
 6. 進行肝細胞がん患者に対する Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン療法の免疫学的効果、土屋伸広、吉川聡明、藤浪紀洋、齊藤桂吾、下村真菜美、野坂和外、清水康博、澤田雄、遠藤格、中面哲也、第 15 回日本免疫治療学研究会学術集会(東京)2018 年 2 月 17 日(ポスター)
 7. 婦人科がんにおける複合免疫療法の開発、野坂和外、吉川聡明、鈴木利宙、齊藤桂吾、下村真菜美、水野正一、鈴木史朗、吉川史隆、中面哲也、第 30 回日本バイオセラピー学会学術集会総会(岐阜)2017 年 11 月 30 日~12 月 1 日(口頭)
 8. glypican-3 ペプチドワクチン療法の総括と展望、谷口理丈、吉川聡明、中面哲也、第 30 回日本バイオセラピー学会学術集会総会(岐阜)2017 年 11 月 30 日~12 月 1 日(口頭)
 9. 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 相医

- 師主導治験 (Phase 1 study of HSP105-derived peptide vaccine for patients with advanced esophageal cancer/ colo- rectal cancer.) 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、第55回日本癌治療学会学術集会 (横浜) 2017年10月20日~22日 (口頭)
10. Identification and analysis of tumor-reactive CTLs in ovarian and cervical cancer tissues for developing a personalized immunotherapy. Nosaka K, Yoshikawa T, Suzuki T, Saito K, Shimomura M, Mizuno S, Suzuki S, Kikkawa F, Nakatsura T. Tumor Immunology and Immunotherapy (Boston, Massachusetts), Oct 1-4, 2017 *The AACR Special Conference
 11. Immunological efficacy of glypican-3 (GPC3) peptide vaccine in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Tsuchiya N, Yoshikawa T, Fujinami K, Saito K, Shimomura M, Suzuki T, Nosaka K, Shimizu Y, Akazawa Y, Charneau J, Sawada Y, Endo I, Nakatsura T. 第76回日本癌学会学術総会 (横浜) 2017年9月28~30日 (ポスター)
 12. 肺がんに対する個別化免疫療法の開発を目指した腫瘍反応性 CTL の解析、吉川聡明、野坂和外、鈴木利宙、齋藤桂吾、下村真菜美、水野正一、鈴木穰、関真秀、坂本裕美、青木一教、青景圭樹、坪井正博、中面哲也、第76回日本癌学会学術総会 (横浜) 2017年9月28~30日 (ポスター)
 13. 難治性小児固形腫瘍に対する GPC3 ペプチドワクチン療法の第 相試験、細野亜古、吉川聡明、藤浪紀洋、齋藤桂吾、水野正一、土屋伸広、木下義晶、孝橋賢一、中面哲也、第76回日本癌学会学術総会 (横浜) 2017年9月28~30日 (口頭)
 14. 肺がんに対する個別化免疫療法の開発を目指した腫瘍反応性 CTL の同定と解析、吉川聡明、野坂和外、鈴木利宙、齋藤桂吾、下村真菜美、水野正一、鈴木穰、関真秀、坂本裕美、市川仁、青影圭樹、坪井正博、中面哲也、第37回日本分子腫瘍マーカー研究会 (横浜) 2017年9月27日 (口頭)
 15. 進行肝細胞癌患者に対する Glypican-3(GPC3)ペプチドワクチン療法の免疫学的効果、谷口理文、土屋伸広、吉川聡明、藤浪紀洋、齋藤桂吾、水野正一、澤田雄、遠藤格、中面哲也、第37回日本分子腫瘍マーカー研究会 (横浜) 2017年9月27日 (口頭)
 16. Phase 1 study of HSP105 derived peptide vaccine for patients with advanced esophageal cancer/ colo rectal cancer. 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. The European Society for Medical Oncology (ESMO) 2017 Congress (Madrid,Spain), Sep 8-12, 2017 (ポスター)
 17. Phase I trial of glypican-3-derived peptide vaccine for refractory pediatric solid tumors. Hosono A, Yoshikawa T, Tsuchiya N, Fujinami N, Saito K, Mizuno S, Nakatsura T. The European Society for Medical Oncology (ESMO) 2017 Congress (Madrid,Spain), Sep 8-12, 2017 (ポスター)
 18. 肺がんに対する個別化腫瘍浸潤リンパ球療法の開発を目指した基礎検討、吉川聡明、野坂和外、鈴木利宙、齋藤桂吾、下村真菜美、水野正一、鈴木穰、関真秀、坂本裕美、吉田輝彦、青影圭樹、坪井正博、中面哲也、第21回日本がん免疫学会総会 (幕張) 2017年6月28~30日 (口頭)
 19. 進行肝細胞がん患者に対する Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン療法の免疫学的効果、土屋伸広、吉川聡明、藤浪紀洋、齋藤桂吾、下村真菜美、鈴木利宙、野坂和外、清水康博、赤澤悠、Charneau Jimmy、澤田雄、遠藤格、中面哲也、第21回日本がん免疫学会総会 (幕張) 2017年6月28~30日 (口頭)
 20. 難治性小児固形腫瘍に対する GPC3 ペプチドワクチン療法の第 I 相試験、細野亜

- 古、土屋伸広、吉川聡明、藤浪紀洋、齊藤桂吾、水野正一、原純一、二谷千賀、真部淳、吉原宏樹、細谷要介、金田英秀、木下義晶、孝橋賢一、吉村健一、中面哲也、第21回日本がん免疫学会総会(幕張)2017年6月28~30日(口頭)
21. Identification and analysis of tumor reactive CTLs in lung cancer tissues for developing a personalized immunotherapy. Yoshikawa T, nosaka K, Suzuki T, Saito K, Shimomura M, Mizuno S, Suzuki Y, Seki M, Sakamoto H, Aoki K, Aokage K, Tsuboi M, Nakatsura T. The 36th Sapporo International Cancer Symposium (第36回札幌国際がんシンポジウム)(札幌)2017年6月22日~24日(ポスター)
22. Immunological efficacy of glypican-3 (GPC3) peptide vaccine in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). Tsuchiya N, Yoshikawa T, Fujinami N, Saito K, Shimomura M, Suzuki T, Nosaka K, Shimizu Y, Akazawa Y, Charneau J, Sawada Y, Endo I, Nakatsura T. The 36th Sapporo International Cancer Symposium (第36回札幌国際がんシンポジウム)(札幌)2017年6月22日~24日(ポスター)
23. Phase I trial of glypican-3-derived peptide vaccine for refractory pediatric solid tumors. Hosono A, Yoshikawa T, Fujinami N, Saito K, Mizuno S, Tsuchiya N, Hara J, Nitani C, Manabe A, Yoshihara H, Hosoya Y, Kaneda H, Kinoshita Y, Kohashi K, Yoshimura K, Nakatsura T. The 36th Sapporo International Cancer Symposium (第36回札幌国際がんシンポジウム)(札幌)2017年6月22日~24日(ポスター)
24. インターフェロン を産生する iPS 細胞由来増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法の開発、土屋伸広、岩間達章、張エイ、得光友美、吉川聡明、澤田雄、田久保圭誉、遠藤格、中面哲也、植村靖史、第16回日本再生医療学会総会(仙台)2017年3月7日~9日
25. In vitro でのヒト化抗 CD4 抗体(IT1028)によるヒト血液検体中の CD4 陽性細胞除去効果の検討、下村真菜美、北野滋久、正田香世子、吉川聡明、横地祥司、伊藤哲、松島綱治、植村靖史、中面哲也、第14回日本免疫治療学研究会学術集会(東京)2017年2月11日
26. IFN を産生する iPSC 由来増殖性ミエロイド細胞のがん治療への応用(iPSC-pMCs genetically engineered to express IFN as a potential cell medicine for cancer) Tsuchiya N, Uemura Y, Iwama T, Zhang R, Suzuki T, Yoshikawa T, Sawada Y, Takubo K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Endo I, Nakatsura T. 第75回日本癌学会学術総会(横浜)2016年10月6日~8日
27. In vitro におけるヒト化抗 CD4 抗体による末梢血中の CD4 陽性細胞除去効果の検討(Investigation of peripheral blood CD4+ cells depletion using humanized anti-human CD4 antibody in vitro.) Shimomura M, Kitano S, Syoda K, Iwakami C, Saito Y, Nosaka K, Mizuno S, Yoshikawa T, Yokochi S, Matsushima K, Uemura Y, Nakatsura T. 第75回日本癌学会学術総会(横浜)2016年10月6日~8日
28. 選択的スプライシングによって生成する分泌型Glypican-3 アイソフォームの同定(Alternative splicing generates the soluble isoform of glypican-3 in HCC and melanoma cell lines.) Saito K, Yoshikawa T, Saito Y, Fujinami N, Suzuki T, Jimmy C, Nakatsura T. 第75回日本癌学会学術総会(横浜)2016年10月6日~8日
29. ヒト血液検体を用いたヒト化抗 CD4 抗体(IT1208)による in vitro での CD4 陽性細胞除去の検討、下村真菜美、北野滋久、正田香世子、吉川聡明、横地祥司、伊藤哲、松島綱治、植村靖史、中面哲也、第36回日本分子腫瘍マーカー研究会(横浜)2016年10月5日(口頭)
30. インターフェロン を産生する iPS 細胞由来増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法、土屋伸広、植村靖史、岩間達章、張エイ、得光友美、鈴木利宙、吉川聡明、澤田雄、田久保圭誉、阪上-沢野朝

- 子、宮脇敦史、千住覚、遠藤格、中面哲也、第20回日本がん免疫学会総会(大阪)2016年7月27日~29日(口頭)
31. 抗CD4抗体併用によるがんペプチドワクチン療法の効果増強に関する前臨床的検討、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、水野正一、北野滋久、植村靖史、中面哲也、第20回日本がん免疫学会総会(大阪)2016年7月27日~29日(口頭)
32. ヒト血液検体を用いたヒト化抗CD4抗体によるIn VitroでのCD4陽性細胞除去効果の検討、下村真菜美、吉川聡明、正田香世子、岩上千鶴、齋藤友貴、野坂和外、水野正一、北野滋久、横地祥司、伊藤哲、松島綱治、植村靖史、中面哲也、第20回日本がん免疫学会総会(大阪)2016年7月27日~29日(口頭)
33. 癌部および非癌部におけるHLA class発現強度の検討、信岡大輔、高橋真理、吉川聡明、八木孝仁、藤原俊義、中面哲也、第116回日本外科学会的学術集会(大阪)2016年4月16日,(口頭)

研究者番号：
(3)連携研究者 ()

研究者番号：
(4)研究協力者 ()

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 聡明 (Yoshikawa Toshiaki)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
先端医療開発センター・研究員
研究者番号：00625957

(2)研究分担者

()