

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19593

研究課題名(和文) 生体内がん排除システムに基づいたPD-1抗体治療感受性決定遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of PD-1 blocked responsive genes and functional analysis based on tumor eradication system in vivo.

研究代表者

茶本 健司 (Chamoto, Kenji)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：50447041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1抗体を介したがん免疫治療が劇的な抗腫瘍効果を示し、世界から注目を集めている。しかし、一定のがん患者には不応答性であり、その原因追求が急務である。患者間の腫瘍組織のゲノムシーケンスの比較や、がんの試験管内スクリーニング法を用いて、PD-1抗体治療感受性決定遺伝子の同定を試みられているが、いくつか困難な点がある。我々は、CRISPR技術を用いた同株由来細胞ライブラリーの作成と、それを生体内のがん排除免疫システムにセレクションさせる手法を考案した。その結果、PD-1抗体治療の効果を規定する遺伝子の同定に成功した。これらの成果はPD-1抗体治療不応答性のバイオマーカーとなり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-1抗体がん免疫治療はその治療効果が注目され様々ながん腫に適用されているが、その一方で不応答性の患者の多く存在する。PD-1抗体は高価な薬のため医療経済を圧迫する恐れもある。早急にPD-1抗体に対する有効性を判断するバイオマーカーとその分子のがん治療における意義を解明し、不応答性患者を救済する手段を考案する必要がある。我々はこれまでのスクリーニングシステムの問題を改善し、新しい遺伝子スクリーニングシステムを開発した。このシステムをマウスモデルに用い、PD-1抗体治療の治療効果を規定する複数の腫瘍由来遺伝子を同定した。これらの結果は、今後の不応答性原因の解明に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：PD-1 blockade cancer immunotherapy revolutionized the cancer treatment. However, there are still substantial population unresponsive to the therapy, and to elute the unresponsive mechanism is urgently necessary. Although many researchers try to identify the responsible genes through genome sequencing and/or in vitro screening using patients' samples, these studies are hampered by several reasons. We established a screening system of responsible genes by combining the CRISPR-based cell library derived from mono cell line and the selection system of tumors through anti-tumor immunity in vivo. Using this system, we identified several tumor genes associated with responsiveness to the PD-1 blockade immunotherapy.

研究分野：がん免疫学

キーワード：PD-1 がん免疫 CRISPR

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

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは PD-1 分子を同定し、PD-1 抗体治療の動物試験・臨床試験を世界に先駆け実行してきた。現在、PD-1 抗体治療ががん治療効果を劇的に向上させ、PD-1 抗体治療ががん治療における第 4 の治療法として確立しつつある。しかし、一定の割合で不応答性患者が存在するのも事実であり、その原因解明は急務である。現在、不応答性患者の原因の追求が世界中で行われているが、明確な成果はあまり得られていない。その原因は 2 つ挙げることができる：

- 1) 個体別の腫瘍を用いて比較するため、個体間の遺伝子背景の違いに埋没し、PD-1 抗体治療の応答性を規定する遺伝子からの抽出が極めて困難である。
- 2) 応答性決定遺伝子を抽出するためのスクリーニングが主に試験管内のシステムに依存しているため、生体内における高度で複雑なスクリーニング結果を反映した遺伝子を抽出することは極めて困難である。

これらの問題点をふまえ我々は、1) 同株腫瘍由来細胞ライブラリーを用いること、2) 生体内での高度な免疫複合システムに応答性決定遺伝子をスクリーニングさせる手法を考案した。

2. 研究の目的

近い将来、PD-1 抗体はさまざまながん種に承認されることは明らかである。PD-1 抗体による不応答性の原因を解明し、それらを取り除く方法を開発することは急務である。現在多くの研究者が腫瘍の違いに注目し、その原因を追究しているが、次の 2 つの理由により明確な成果は得られていない：(1) 個体別の腫瘍を用いて比較するため、個体間の遺伝子背景の違いに埋没し、PD-1 抗体治療の応答性決定遺伝子からの抽出が困難である。(2) 応答性遺伝子を抽出するためのスクリーニングが主に試験管内のシステムに依存している。それゆえ、生体内における高度で複雑なセレクション結果を反映した遺伝子を抽出することは極めて困難である。これらの問題点を克服するため、我々は、(1) CRISPR ライブラリーを用い、同株由来細胞ライブラリーを用いたスクリーニングシステムを開発する。これにより遺伝子背景の差を考慮することなく、PD-1 抗体治療の応答性を規定する遺伝子からの抽出が可能となる。また、(2) 生体内の腫瘍排除複合システムによる高度なスクリーニング法を開発し、試験管内の単純システムでは得られない真の応答性決定遺伝子の同定を目指す。生体内における抗腫瘍免疫反応は複雑であることから、同定された遺伝子は、免疫だけでなく代謝・血管・内分泌系等の多岐にわたる分野に関連する遺伝子が同定される可能性が高い。これらの観点から、本プロジェクトはこれまでの学術・研究体型を大きく変えうる革新的プロジェクトになると予想される。

3. 研究の方法

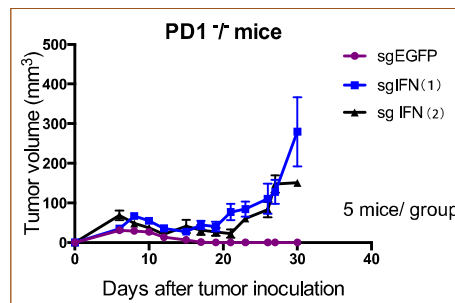
1) PD-1 抗体治療に対し半感受性のマウス腫瘍株に CRISPR ライブラリーを導入し、1 細胞あたり 1 遺伝子がランダムに欠損する細胞ライブラリーを作成する。この細胞ライブラリーをマウスに接種し、PD-1 阻害治療をおこなう。この時、生体内において試験管内では再現できない高度なスクリーニングが起こり、腫瘍がヒトの生体内で免疫複合システムにセレクションされる状態を再現できる。これらの生体内免疫セレクションにより、クロンレベルで増える細胞（抵抗性を獲得した細胞）と減る細胞（感受性を獲得した細胞）が出現すると予想される。

2) セレクション後に腫瘍塊から DNA を抽出し、DNA に挿入された CRISPR の guide RNA 配列を読み込む。それらの read 数を比較し、抵抗性と感受性を決定する遺伝子を同定する（詳細は研究計画を参照）。同定した遺伝子を親株に過剰発現もしくは欠損させ、本遺伝子が PD-1 抗体治療に対して正もしくは負に感受性を制御するか、PD-1 抗体治療系を用いて再確認する。さらにこれらの遺伝子過剰発現もしくは欠損させたがん細胞株を用いて、腫瘍拒絶メカニズム解明をおこなう。重要な点は、生体内における抗腫瘍免疫反応は非常に高度なシステムを有しており、腫瘍拒絶反応は免疫だけでなく、血管・代謝・内分泌系の多岐にわたる生体内恒常性システムの結果である。よって本研究から得られたがん由来決定遺伝子は、免疫だけでなく、他分野をもふくめた横断的な解析を行う。これらの解析は他分野を巻き込んだ新学術分野の発展に寄与する可能性がある。

4. 研究成果

CRISPR ライブラリーを用いて大腸がん MC38 をベースにした細胞ライブラリーを作成した。この細胞ライブラリーはおおよそ 1 細胞に 1 遺伝子変異起こすような確率で感染効率を調整した。このライブラリーを野生型マウスに接種し、腫瘍が大きくなったところで、PD-1 阻害抗体を約 1 週間ごとに 2 回投与した。本来であれば、MC38 は PD-1 阻害によって拒絶されるとこ

る、本細胞ライブラリーでは、PD-1 阻害後も腫瘍形成が見られた。そこで、腫瘍接種後約 2 週間で腫瘍を回収し、DNA を回収のち、PCR にて gRNA 配列部分を増やし 100 クローン以上、gRNA 配列を検討した。その結果、98 %以上のクローンが単一の Type-I IFN 関連の遺伝子であった。この遺伝子をノックアウトした MC38 株を PD-1 欠損マウスに投与したところ、右図に示すように PD-1 欠損マウスにおいても拒絶されることはなかった。このことは、MC38 は自ら Type-I IFN を産生するが、PD-1 阻害を行った際には免疫による腫瘍拒絶に重要であると考えられた。このことは拒絶される腫瘍の中にはこのように Type-I IFN を産生している細胞もあり、PD-1 抗体の有効性の決定に大きく関与していることを表している。本研究により発見されたメカニズムは、PD-1 抗体有効性の予測バイオマーカーになる可能性もあり、今後大いに期待できる結果である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1, Chowdhury PS*, **Chamoto K*** (*equally contributed), Kumar A, Honjo T. PPAR-induced fatty acid oxidation in T cells increases the number of tumor-reactive CD8+ T cells and facilitates anti-PD-1 therapy. (2018) *Cancer Immunol Res*, 6: 1375-1387.

2, Chowdhury PS*, **Chamoto K*** (*equally contributed), Honjo T. Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: A new era in cancer immunotherapy. (2018) *J Intern Med*. 283:110-120.

〔学会発表〕(計 45 件)

1. **茶本健司** PD-1 阻害がん免疫治療法における免疫代謝の役割 北海道大学部局横断シンポジウム、札幌、2019 年 1 月 25 日
2. **Chamoto K**, Honjo T. PPAR-induced fatty acid oxidation in T cells ameliorates the antitumor activity of PD-L1 blockade. (2018) 第 77 回日本癌学会学術総会 シンポジウム S1、大阪、2018 年 9 月 27 日
3. **茶本健司** 代謝シグナル分子を標的とした腫瘍免疫学の新展開 (2018)ランチョンセミナー 2、岡山、2018年8月3日
4. **茶本健司** PD-1阻害がん免疫治療におけるT細胞脂質代謝の重要性 (2018)第22回日本がん免疫学会 シンポジウム4、岡山、2018年8月2日
5. **Chamoto K**. Energy metabolism regulation in T cells improves the efficacy of the PD-1 blockade cancer immunotherapy. (2018) Novartis Asian-Pacific Summit 2018, July 14th, Taipei.
6. **Chamoto K**. The role of fatty acid oxidation of T cells in the synergistic effect with PD-1 blockade (2018) The 6th JCA-AACR Special joint Conference, July 12th, Kyoto
7. **茶本健司** PD-1阻害がん免疫治療法の最前線 (2018)第120回兵庫県皮膚科医会、神戸、2018年6月30日
8. **茶本健司** 免疫チェックポイント阻害薬の臨床における問題点とその取り組み：基礎と臨床は如何にして融合すべきか？ (2018) 第6回日本臨床腫瘍学会近畿地区セミナー、2018年6月23日

9. **Chamoto K**, Honjo T. Modulation of fatty acid oxidation in T cells improves the PD-1 blockade therapy. (2018) 第45回内藤コンファレンス がん免疫治療法の免疫分子基盤-次世代のがん免疫療法をめざして、札幌 6月28日. __
10. **Chamoto K**, Honjo T. Mitochondrial manipulation improves PD-1 blockade immunotherapy. (2018) 2nd International NTNU Symposium on Current and Future Clinical Biomarkers of Cancer. June 14th-15th, Trondheim, Norway.
11. **茶本健司** 脂質代謝制御による PD-1 阻害がん免疫治療の増強効果とその機序解明 (2018) 第 55 回日本臨床分子医学会学術集会、京都 4 月 12 日.
12. **茶本健司** 免疫代謝促進による PD-1 阻害治療の増強効果とその作用機序解明、平成 29 年度がん研究シンポジウム:次世代免疫療法・ゲノム医療、東京、国立がん研究センター、2018 年 3 月 16 日.
13. **茶本健司** T 細胞の脂肪酸酸化を介した PD-1 阻がん免疫治療の増強とその機序解明、(2018) Japan/Joy of Fatty Acids Secrets/Society (JFAS)、東京アキバ、3 月 10 日.
14. **Chamoto K**. Regulation of immune metabolism improves the PD-1 blockade cancer immunotherapy. (2017)日本免疫学会ランチョンテクニカルセミナー、仙台 12 月 12 日.
15. **Chamoto K**. Mitochondrial manipulation improves PD-1 blockade immunotherapy. (2017) Yonsei University International Symposium, Yonsei, Korea. November 2nd.
16. **Chamoto K**. Energy metabolism improves the PD-1 blockade cancer immunotherapy. (2017) 日本癌学会奨励賞シンポジウム 第 76 回日本癌学会、横浜 9 月 16 日
17. **茶本健司** 免疫代謝制御によるがん免疫応答の増強 (2017) 第 45 回日本臨床免疫学会合同シンポジウム、東京 9 月 29 日.
18. **Chamoto K**. Mitochondrial manipulation improves PD-1 blockade immunotherapy. (2017) Peking University International Symposium. Shanghi, China. September 16th.
19. **Chamoto K**. Mitochondrial manipulation improves the PD-1 blockade cancer therapy. (2017) Leibniz-AMED Workshop on Immune Regulation of Diseases and Aging. Ettal, Germany. September 11th.
20. **Chamoto K**. Modulation of energy metabolism in T cells enhances the efficacy of PD-1 blockade immunotherapy. (2017) International Symposium 9, Japanese society of medical oncology (JASMO), Kobe, July 28th.
21. **Chamoto K**. Mitochondrial manipulation improves PD-1 blockade immunotherapy. (2017) The 36th Sapporo International Cancer Symposium. Sapporo, June 23rd.
22. **Chamoto K**. T cell energy metabolism regulates anti-tumor effect mediated by PD-1 blockade. (2017)日本がん免疫学会 シンポジウム 4 幕張 6 月 30 日
23. **Chamoto K**. T cell energy metabolism regulates PD-1 blockade-mediated anti-tumor effect. (2017) RIKEN IMS-JSI, International Conference Hall, Plaza Heisei, Tokyo June 22th.
24. **Chamoto K**. Mitochondrial manipulation improves PD-1 blockade immunotherapy. (2017) 第 36 回札幌がん国際シンポジウム、札幌、ロイトン札幌 6 月 23 日
25. **茶本健司** T 細胞のエネルギー代謝に注目した PD-1 阻害がん免疫治療の新しい展開 (2017) 第 48 回京都造血幹細胞移植研究会、特別講演、京都、ホテル日航プリンセス京都 5 月 12 日

招待講演、特別講義

26. **茶本健司** PD-1 阻害がん免疫治療法の最前線:T 細胞免疫代謝の重要性(2018 年 12 月 4 日) Scientific exchange meeting 大阪大学 熊ノ郷先生
27. **茶本健司** PD-1 阻害がん免疫治療法の最前線:基礎・臨床融合の重要性 (2018)第 4 回 Immuno-oncology conference,岐阜 2018 年 12 月 5 日
28. **茶本健司** PD-1 阻害がん免疫治療法の最前線:基礎・臨床融合の重要性 (2018) RCC Medical Seminar, 東京 2018 年 12 月 1 日
29. **茶本健司** PD-1 阻害がん免疫治療法の最前線:基礎・臨床融合の重要性 (2018) Scientific exchange meeting in 京滋.京都 2018 年 11 月 13 日
30. **茶本健司** 免疫代謝を介した PD-1 阻害がん免疫治療の増強効果 (2018 年 10 月 25 日)、東海リンパ腫瘍研究会、東海大学、幸谷愛先生
31. **茶本健司** 免疫代謝をベースにした PD-1 抗体癌免疫治療の新展開 (2018 年 10 月 16 日) 分子新血管セミナー、新潟大学、南野徹先生
32. **茶本健司** 免疫代謝による PD-1 阻害癌免疫治療の増強効果 (2018 年 10 月 3 日) 大学院セミナー、産業医科大学、田中良哉先生
33. **茶本健司** PD-1阻害がん免疫治療における免疫代謝解析とその意義 (2018) 第2回 gentleMACS Day. 大阪、2018年9月26日
34. **茶本健司** PD-1阻害がん免疫治療法の最前線:基礎・臨床融合の重要性 (2018) Scientific exchange meeting in 札幌 肺がん免疫治療の最前線、札幌、2018年8月24日
35. **茶本健司** T細胞免疫の代謝とがん免疫 (2018)大学院セミナー 8月10日、三重大学、珠玖洋先生.
36. **Chamoto K** “Standard” cancer immunotherapy based on PD-1 blockade. (2018) 大学院セミナー Cancer Course Meeting, July 19th. 京都大学 小川誠司先生
37. **茶本健司** 免疫代謝と PD-1 阻害がん免疫治療、第 3 回京都皮膚基礎研究会、(2018 年 3 月 30 日) 京都大学、京都大学大学病院 椛島先生
38. **茶本健司** 免疫代謝に着目した次世代がん免疫治療法と効果予測バイオマーカー、Lung Cancer expert seminar (2018 年 2 月 15 日) ウエスティン都ホテル、京都大学大学病院呼吸器内科 金先生
39. **茶本健司** 免疫代謝制御による PD-1 阻害がん免疫治療の増強効果、第 1 回京都大学腫瘍免疫勉強会 (2018 年 1 月 30 日) 京都大学、濱西潤三先生
40. **茶本健司** ミトコンドリア活性化剤による PD-1 阻害免疫治療の併用効果とその作用機序解明、九州肺がん治療懇話会 (2018 年 1 月 23 日) 九州大学医学部、岡本勇先生 (小野薬品・BMS)
41. **茶本健司** 日進月歩する PD-1 阻害がん免疫治療、東北 RCC セミナー (2017 年 12 月 16 日) 仙台、弘前大学 大山力先生、(ノバルティスファーマ株式会社)
42. **茶本健司** T細胞のエネルギー代謝に注目した PD-1 阻害がん免疫治療の新しい展開 (2017 年 8 月 9 日) 39 回文部科学省がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン 近畿大学医学部腫瘍内科 (中川和彦先生)
43. **茶本健司** 基礎腫瘍免疫学 (2017 年 8 月 9 日) 臨床各論 VIII 近畿大学医学部腫瘍内科 (中川和彦先生)
44. **茶本健司** T細胞のエネルギー代謝と PD-1 阻害がん免疫治療の増強効果 BD 学術セミナー 2017

(2017年7月26日)東京

45. **茶本健司** 免疫代謝制御による PD-1 阻害がん免疫治療の増強効果(2017年6月2日)第36回セルセラピーセミナー、(公立藤岡総合病院 外山耕太郎 先生、協和キリン発酵)

〔図書〕(計14件)

1. 波多江龍亮、**茶本健司** 祝 本庶佑ノーベル賞受賞記念特集号 がん免疫治療の新展開：免疫代謝とPD-1阻害剤 (2019) メディカル・サイエンス・ダイジェスト 45(2),95-98.
2. **茶本健司** 免疫の「ブレーキ」解除でがんをたたく (2018)日経サイエンス 12月号 監修者ノート 48(12),12-19.
3. 熱田雄、波多江龍亮、**茶本健司** がん免疫治療の効果増強法の開発：併用治療の現状と展望 (2018) がん分子標的治療 16(3),243-248.
4. 伊藤寿宏、**茶本健司** PD-1阻害による新たながん治療法の開発 (2018) 現代化学 (573),28-32.
5. 伊藤寿宏、**茶本健司** T細胞代謝のリプログラミングと抗腫瘍免疫 (2018)「免疫と炎症」先端医学社 27(1),7-13.
6. **茶本健司** がん免疫治療の現状と展望 (2018) コスモバイオニュース「がん免疫」.
7. 高塚奈津子、**茶本健司** がん局所の代謝改善による免疫抑制の解除 (2018) 実験医学 36 (9), 1468-1473.
8. 波多江龍亮、**茶本健司** 免疫代謝制御とPD-1阻害がん免疫治療 (2018) 臨床免疫・アレルギー科 69 (6), 546-551.
9. 仲島由佳、**茶本健司**「PD-1阻害がん免疫療法におけるミトコンドリアを介したエネルギー代謝の重要性」(2018) がん分子標的治療 16 (2),90-93.
10. **茶本健司** T細胞のエネルギー代謝とがん免疫 (2018) JSI Newsletter 26 (2), 8.
11. **茶本健司** 企画：特集がん免疫療法の展開、総論：抗PD-1抗体を用いたがん免疫治療の現状と進展 (2018) Vita 35 (1), 49-57.
12. 高塚奈津子、**茶本健司** Resident memory T細胞の長期生存を可能にするエネルギー代謝機構 (2017) News & Hot paper digest 実験医学 35 (18), 3101-3102.
13. 波多江龍亮、**茶本健司** 企画：序 ～PD-1阻害がん免疫治療の現状と今後の展望～ (2017) 血液フロンティア 27 (11), 17-22.
14. 仲島由佳、波多江龍亮、**茶本健司** PD-1シグナル阻害によるがん免疫治療 (2017) The Lung perspective, 25 (4), 14-18.

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/pd-1_project.html

6. 研究組織

(1)研究分担者、(2)研究協力者なし

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。