

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07729

研究課題名(和文) 多次元的解析手法によるがん免疫エフェクター細胞の分子細胞学的解明と新規治療開発

研究課題名(英文) Cellular and Molecular analyses of cancer-associated antigen-specific cytotoxic T cells by multidimensional methods and development of novel cancer immunotherapy

研究代表者

西田 純幸(Nishida, Sumiyuki)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00403189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：WT1は有望ながん関連抗原である。進行膵がんに対する抗ガン剤とWT1がんワクチン併用治療の経過で誘導されるWT1に対する細胞傷害性T細胞，WT1-CTLの質的・機能的変化を評価した。治療後に誘導されるWT1-CTLの働きとしてエフェクター機能の獲得だけでなく、記憶細胞に分化して抗腫瘍免疫作用を長期に維持することが、結果、長期の臨床効果に重要であった。臨床効果のあった患者間で共有されるWT1-CTLのT細胞受容体，TCRクローンが存在することを明らかにした。今後これらのTCRを免疫担当細胞に導入する新たながん免疫療法の開発につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果はWT1を標的としたがん免疫療法(細胞療法)の開発につながる。個々の患者のがん特異的なネオ抗原に対するT細胞受容体の同定が個別化医療となることに対して、汎腫瘍抗原であるWT1に特異的なキラーT細胞が持つT細胞受容体を同定することは、膵癌のみならずWT1を発現するがんを患った患者に応用が可能であることを意味する。免疫チェックポイント阻害薬の効果が乏しいとされる、いわゆる“cold”ながんに対する治療戦略を将来発展させうる1つの成果である。

研究成果の概要(英文)：WT1 is a promising cancer-associated antigen. We, here, evaluated the qualitative and functional changes in WT1-specific cytotoxic T cells, WT1-CTLs, induced during the combination therapy with cytotoxic drug and WT1 cancer vaccine for advanced pancreatic cancer patients.

It was essential for long-term clinical efficacy that WT1-CTLs, induced after treatment, obtained a memory function to maintain their antitumor immunity. Further, we found that some TCR clones of WT1-CTLs were shared among patients who had exhibited clinical efficacy. We will link these TCRs to the future development of new cancer immunotherapies.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：がん免疫療法 がんワクチン WT1 T細胞受容体 膵臓がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) GEM 併用 WT1 ペプチドワクチン療法が進行膵臓がん患者の無増悪生存期間を延長：我々は、有望ながん関連抗原である WT1 を標的としたがん免疫療法 (WT1 ペプチドワクチン療法) の免疫学的基盤研究から臨床研究に至るまで独自に取り組んできた。その中で、極めて難治な進行膵臓がんに対し標準治療抗がん剤ゲムシタピンと WT1 ワクチンを併用した治療法

(GEM+WT1) と GEM 単独療法を比較するランダム化臨床試験を実施し、GEM+WT1 療法が進行膵臓がんの無増悪生存期間 (PFS) の延長に寄与することを明らかにした (参考文献 1)。特に WT1 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (WT1-CTLs) の誘導が著明だった症例で、臨床効果は顕著であった。一方、GEM+WT1 療法を行ったとしても WT1-CTLs の誘導を認めない、または誘導が極めて乏しい症例の PFS は GEM 単独群と同様の臨床結果であった。このことは、WT1-CTLs と GEM との相乗効果によって進行膵臓癌患者の予後改善に寄与できる可能性を示唆する。

(2) GEM+WT1 療法で WT1-CTLs の誘導を規定している免疫学的因子は何か？：上述した臨床試験では、GEM+WT1 療法を受けた症例の約半数で WT1-CTLs の誘導を認めた。ワクチンによる抗腫瘍免疫誘導の有無は、様々な患者背景因子に左右されると推測されるが、特にその免疫学的因子は何か？どのような WT1-CTLs の質的・機能的な違いが臨床効果の持続に関係するのか？これらの「疑問」を解決することが、本治療法の臨床効果を更に改善することにつながる。

2. 研究の目的

本研究では、進行膵臓がんを対象に実施した GEM+WT1 療法の臨床試験で得られた臨床検体 (血液サンプル) を用いて、特に治療効果発現の中心となる effector 免疫担当細胞の WT1-CTLs について、免疫学的・分子細胞学的な解析を行い、以下の事柄を明らかにする。

(1) WT1-CTLs の分化成熟度や抑制性分子発現など「質的評価」または、細胞傷害活性の「機能的評価」を経時的に解析し、臨床効果と関連する特徴的变化を明らかにする。

(2) WT1-CTLs の遺伝子発現について、分子生物学的手法を用いた網羅的遺伝子発現解析を 1 細胞レベルで行い、質的・機能的解析結果との関連性を明らかにする。

(3) WT1-CTLs の clonality を解析し、長期に臨床効果を認めた症例間に共通して維持される TCR レパトアが存在するかどうかを明らかにする。

更に、以上の結果を基にして「がん関連抗原」かつ「汎腫瘍抗原」である WT1 を標的としたがん免疫療法の更なる発展に応用できる知見を得ることが目的である。

3. 研究の方法

(1) GEM 併用 WT1 ワクチン療法のスケジュールとサンプル採取

転移性または局所進行性膵臓がん患者に対する GEM+WT1 療法のスケジュールは以下の通り。

ゲムシタピン 1,000mg/m², day 1, 8, 15 静注 28 日周期

WT1 ペプチドワクチン (HLA 拘束性ペプチド 3mg/body + Montanamide) day 1, 15 皮内投与
末梢血を各コース day1 の治療薬投与前に採取し、末梢血単核球 (PBMC) を回収、凍結保存。

(2) がん関連抗原 WT1 特異的免疫担当細胞 (細胞傷害性 T 細胞; WT1-CTLs) の FACS 解析

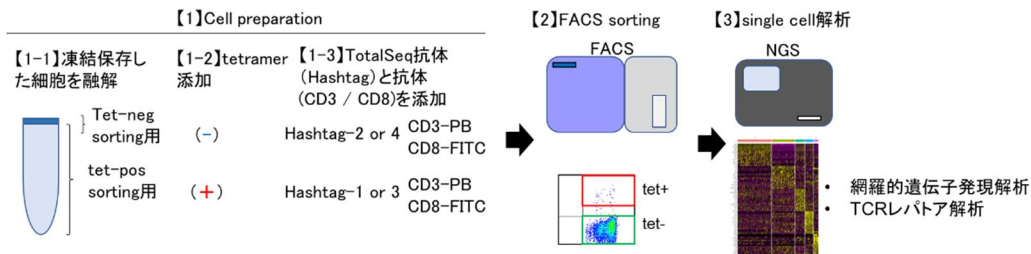
末梢血中に誘導される WT1-CTLs の評価は、テトラマー法を用いて FACS 解析を行った (WT1-CTL 細胞; CD3+, CD8+, WT1₁₂₆ tet+または WT1₂₃₅ tet+)。WT1-CTLs の免疫学的成熟分化表現型について抗 CD45RA 抗体と抗 CCR7 抗体を用いた多重染色で FACS 解析した。表現型の定義：CD45RA+/CCR7+, naïve; CD45RA-/CCR7+, central memory; CD45RA-/CCR7-, effector memory;

CD45RA+/CCR7-, effector

(3) WT1-CTLsのsingle cell RNA-seq (scRNA-seq)による網羅的遺伝子発現解析

PBMCに抗体とtetramerの他にscRNA-seq用標識抗体を反応させ、目的とする細胞集団をFACS sortingし、次世代シーケンサーを用いてscRNA-seqを実施した(図1)。

図1 WT1特異的CTLsのscRNA-seq: cell preparationからanalysisまで



(4) WT1-CTLsのT細胞受容体(TCR)レパトワ解析

上述した網羅的遺伝子発現解析と同時にTCRレパトア解析を実施した(図1)。

(5) 誘導されたWT1-CTLsからhigh-avidity T細胞受容体(TCR)の単離

PBMCにWT1ペプチド刺激を加え、反応し増幅するWT1-CTLsをsingle cell sortingし、多くのWT1-CTLクローンを樹立し、それぞれのTCRを単離した。

4. 研究成果

(1) WT1-CTLsの免疫学的表現型の変化: 治療有効例では、治療初期はEffector型WT1-CTLsが誘導され、その後、Memory型WT1-CTLsの割合が増加する

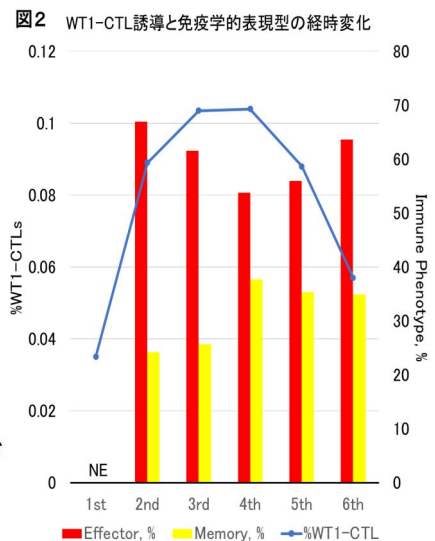
既報の通り、GEM+WT1治療後にペプチドに対する遅延型皮膚反応(DTH)陽性群、またはWT1-CTLsが5倍以上に増加した群では、その陰性例または5倍未満の群やGEM治療群に比べてPFSが有意に延長した(参考文献1)。今回、誘導されたWT1-CTLsの「質」が経時的にどう変化するかを評価した。評価対象は、WT1-CTLsが十分に誘導できFACS解析で一定数以上のWT1-CTLsが検出され、継続して評価できた症例に限定した(n=13)。

治療前のCD8陽性T細胞中のWT1-CTLsの割合(%WT1-CTLs)の中間値は0.035% [範囲:0.004 - 0.125]だった。治療後%WT1-CTLsは増加し3-4コースでピークに達した(3コース目:中間値0.104% [0.039 - 0.527]) (図2)。

誘導されたWT1-CTLsの免疫学的表現型は治療経過とともに変化した。治療初期(2-3コース)にはWT1-CTLsの誘導・増加とともにそのeffector phenotypeが主として誘導された(effector 2コース目:中間値66.9% [20.0 - 92.1]) (図2)。%WT1-CTLsのピークを越える4-5コース目あたりからmemory phenotypeの割合が増加した(memory 4コース目:中間値37.7% [8.3 - 68.5]) (図2)。

GEM+WT1療法で誘導されるWT1-CTLsの質は治療経過とともに変化していた。治療初期には細胞傷害性作用を発揮するeffector WT1-CTLsが強力に誘導され、その後memory WT1-CTLsが誘導され、抗腫瘍免疫の強化と維持が得られた結果、臨床効果の持続(PFS延長)につながったと推測された。

尚、WT1-CTLsのペプチド刺激によるサイトカイン放出刺激試験を含む「機能的評価」を計画したが、後述する評価系で多くのサンプルが必要で今回の研究課題では実施を見送った。



(2) WT1-CTLs の 1 細胞解析：誘導される WT1-CTLs はその他の CD8+T 細胞と区別される

治療で誘導される WT1-CTLs が抗腫瘍効果を発揮すると思われるが、その他の CD8+T 細胞と遺伝子発現から見る機能的な違いを評価するため scRNA-seq を実施した。今回は、PFS が長く HLA-A*02:01 を有する症例で、GEM + WT1 療法後の WT1-CTLs 誘導が顕著で、その後も維持されていた 1 例のサンプルを用いて実施した。第 2 コース day1 と第 3 コース day1 のサンプルで事前に評価した %WT1-CTLs はそれぞれ 0.26%、0.06% だった。今回 FACS sorting する tetramer-high の集団はそれぞれ 0.19%、0.02% だった。

Totalseq-Hashtag 抗体標識した tetramer-high の集団と tetramer 陰性の集団を FACS sorting し scRNA-seq を行った。FACS sorting できた第 2 コース (Hashtag-1) または第 3 コース (Hashtag-3) の tetramer 陽性総細胞数は 499 細胞、第 2 コース (Hashtag-2) または第 3 コース (Hashtag-4) tetramer 陰性細胞数はそれぞれ 3085 細胞、1819 細胞で、総数 5403 細胞数だった (図 3-1)。検出細胞の quality control を行い、最終的に Hashtag-1, -2, -3, -4 の評価可能細胞数は、それぞれ 40, 240, 11, 178 個だった。UMAP を作成し細胞のアノテーションを行うと、5 つのクラスターに分離できた (図 3-2)。特に tetramer 陽性細胞はクラスター 3 に局在し tetramer 陰性細胞と区別された (図 3-2)。クラスター 3 は、遺伝子発現様式から effector T 細胞と memory T 細胞に分かれた。クラスターの変動遺伝子について Heat Map で確認したところ、tetramer 陽性細胞を含むクラスター 3 には、Granzyme A や Granzyme K の発現が高く活性化した effector T 細胞であることや、CD27 発現が高く長期維持する memory T 細胞の存在を裏付ける結果であった。一方で疲弊マーカー (CTLA4、PDCD1) の発現も一部含まれていた。次に Pathway 解析を行って tetramer 陽性細胞と tetramer 陰性細胞が分離した理由を探索した。クラスター 3 で enrich した pathway には、ユビキチン介在タンパク分解、細胞接着などの他に、TCR signaling pathway といった抗原刺激に関する pathway が enrich していた (図 3-3)。

以上より、GEM + WT1 治療で誘導される WT1-CTLs は WT1 ペプチド抗原刺激によって活性化した抗原特異的な effector T 細胞と memory T 細胞であり、その機能はその他の CD8+T 細胞と区別されることが明らかになった。尚、評価できた tetramer 陽性細胞数が少なく経時的な変化をとらえることはできなかった。

図3-1 scRNA-seq解析用の細胞調整からFACS sortingまで

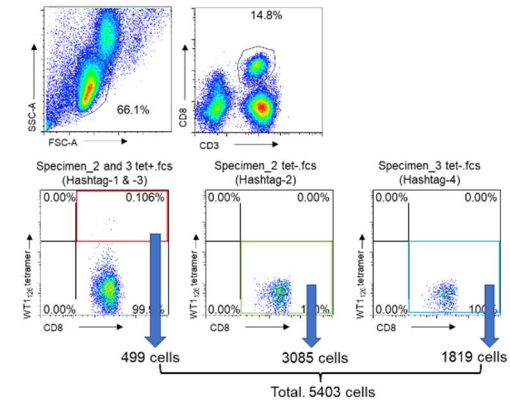


図3-2 UMAPと細胞アノテーション

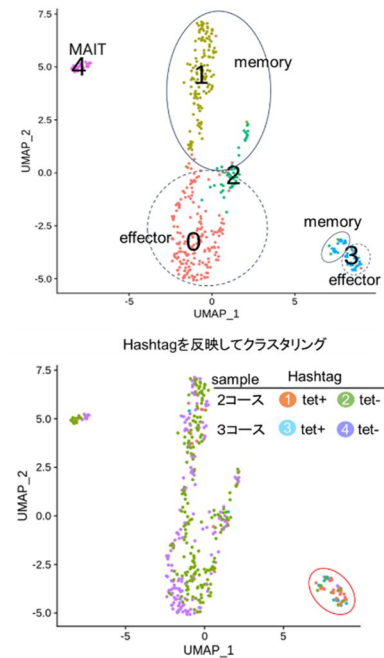
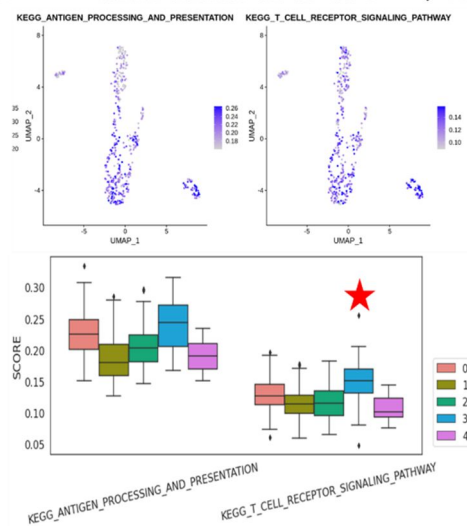


図3-3 Tetramer陽性細胞と陰性細胞間の抗原刺激に関するPathwayの差異

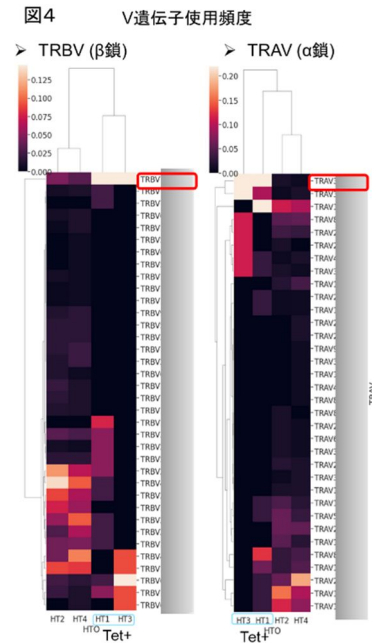


(3) WT1-CTLs の 1 細胞解析：誘導される WT1-CTL s は oligoclonal に expand する

T 細胞の scRNA-seq では、TCR の V 遺伝子の違いも解析可能である。同じ症例のサンプルで、tetramer 陽性細胞と tetramer 陰性細胞でそれぞれ使っている V 遺伝子の違いをみる TCR レパトア解析を行った。

heat map で tetramer 陽性細胞と tetramer 陰性細胞の top5 クローンと比較したところ、両者に共通して使われる V 遺伝子はなかった(図 4)。次に WT1-CTLs である tetramer 陽性細胞に限ってみると、治療第 2 コースから第 3 コースにかけて末梢血中で検出される TCR クローンでは、TCR 鎖の TRAVab と TCR 鎖の TRBVx-z が高頻度で使用されていた(論文作成までそれぞれの V 遺伝子は略記とする)。

以上より、GEM + WT1 治療で誘導される WT1-CTLs は TCR クローンとしてその他の CD8+ T 細胞と区別され、治療経過の中で oligoclonal に expand することが明らかになった。



(4) WT1-CTLs の WT126 ペプチド特異的 T 細胞受容体の単離 (preliminary)

患者間で共有される TCR クローンが明らかになれば、その TCR を用いた養子免疫療法等への臨床応用が可能となる。そこで、GEM + WT1 治療で誘導される WT1-CTL s のうち、WT126 ペプチド特異的な high avidity TCR の単離を試みた。同じく GEM+WT1 治療のランダム化試験に参加し HLA-A*02:01 を有する症例より採取した PBMC から、候補となる High-avidity WT1-CTLs clone がいくつか選別できた。特記すべきことは、異なる症例であるにも関わらず(3)で単離された TCR 鎖の TRBVx-z 遺伝子を持つ TCR が含まれていたことである。今後は単離されたそれぞれの TCR を評価し、臨床で用いられる TCR であるかどうかを証明していく。

(5) その他、本研究課題に関連した研究の成果

進行卵巣がんに対する WT1 ワクチン療法で得られた血液サンプルを用い、WT1- CTL と抗 WT1 ペプチド抗体(WT1-IgG)の経時的な評価を行った。WT1 ワクチンによって WT1-CTL または WT1-IgG が誘導されることと PFS 延長といった臨床効果との間に関連性があることを証明した。様々な背景因子(慢性炎症、がん性異栄養症)がこれらの免疫誘導に対して負に作用することを明らかにした。

TCR 発現 T 細胞の機能を反映する TCR avidity を正確かつ簡便に評価できるように、HLA class I 分子拘束性 WT1 ペプチド特異的 TCR と HLA class II 分子拘束性 WT1 ペプチド特異的 TCR の functional avidity をそれぞれ評価できる platform 細胞の作製を行った。

< 引用文献 >

Nishida S, Ishikawa T, Egawa S, Koido S, et al. Combination Gemcitabine and WT1 Peptide Vaccination Improves Progression-Free Survival in Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase II Randomized Study. *Cancer Immunol Res.* 2018; 6: 320-331.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujiki F, Tsuboi A, Morimoto S, Hashimoto N, Inatome M, Nakajima H, Nakata J, Nishida S, Hasegawa K, Hosen N, Oka Y, Oji Y, Sogo S, Sugiyama H.	4. 巻 70
2. 論文標題 Identification of two distinct populations of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes in co-vaccination of WT1 killer and helper peptides.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 253-263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02675-9	査読の有無 有
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 Nishida S, Tsuboi A, Tanemura A, Ito T, Nakajima H, Shirakata T, Morimoto S, Fujiki F, Hosen N, Oji Y, Kumanogoh A, Kawase I, Oka Y, Azuma I, Morita S, Sugiyama H.	4. 巻 98
2. 論文標題 Immune adjuvant therapy using Bacillus Calmette-Guérin cell wall skeleton (BCG-CWS) in advanced malignancies: A phase 1 study of safety and immunogenicity assessments.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e16771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000016771.	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 -

1. 著者名 Nishida S, Morimoto S, Oji Y, Morita S, Shirakata T, Enomoto T, Tsuboi A, Ueda Y, Yoshino K, Shouq A, Kanegae M, Ohno S, Fujiki F, Nakajima H, Nakae Y, Nakata J, Hosen N, Kumanogoh A, Oka Y, Kimura T, Sugiyama H.	4. 巻 45
2. 論文標題 Cellular and Humoral Immune Responses Induced by an HLA Class I-restricted Peptide Cancer Vaccine Targeting WT1 Are Associated With Favorable Clinical Outcomes in Advanced Ovarian Cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Immunother.	6. 最初と最後の頁 56-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/CJI.0000000000000405.	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 -

1. 著者名 Alzaaqi S, Naka N, Hamada K, Hosen N, Kanegae M, Outani H, Adachi M, Imanishi R, Morii E, Iwai M, Nakata J, Fujiki F, Morimoto S, Nakajima H, Nishida S, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H, Oji Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 WT1 epitope-specific IgG and IgM antibodies for immune-monitoring in patients with advanced sarcoma treated with a WT1 peptide cancer vaccine.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13184.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田 純幸, 白方 俊章, 森本 創世子, 榎本 隆之, 吉野 潔, 富松 拓治, 藤木 文博, 尾路 祐介, 上田 豊, 坪井 昭博, 森田 智視, 岡 芳弘, 熊ノ郷 淳, 木村 正, 杉山 治夫
2. 発表標題 進行卵巣癌に対するWT1を標的とした癌ワクチンに関する臨床研究(Clinical Study of the Cancer Vaccine targeting WT1 for Advanced Ovarian Cancer)
3. 学会等名 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 倫之, 西田 純幸, 濱口 眞成, 柴原 理志, 白山 敬之, 川合 祥子, 木村 恵子, 平田 陽彦, 木田 博, 石井 健, 熊ノ郷 淳
2. 発表標題 進行肺癌に対するCpG ODN(K3)皮下注射による自然免疫の活性化(Activation of innate immunity in patients with advanced lung cancer following subcutaneous injection of CpG ODN(K3))
3. 学会等名 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田 純幸
2. 発表標題 WT1遺伝子産物を標的にしたがんワクチン療法の将来展望：がん治療からがん発症予防へ
3. 学会等名 日本がん予防医学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	森本 創世子	大阪大学	
	(Morimoto Soyoko)	(14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	藤木 文博 (Fujiki Fumihiro)	大阪大学 (14401)	

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