

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09297

研究課題名(和文) 疲弊化を解除した自己腫瘍反応性T細胞による個別化免疫細胞療法の開発

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

研究代表者

吉川 聡明 (Yoshikawa, Toshiaki)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫応答研究分野・研究員

研究者番号：00625957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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の自己腫瘍反応性を検証し治療への応用方法を検討した。独自に見出した細胞表面マーカーを使用して自己腫瘍反応性を持つTILを早期に単離し、さらにTCR遺伝子をクローニングした。また、次世代シーケンサー解析により患者毎の腫瘍特異的な遺伝子変異を抽出し、TILの認識抗原を同定した。今後さらにTILを若返らせることで増殖能・長期生存能を亢進させ、持続的な抗腫瘍効果を高めた新たな個別化T細胞移入療法の開発をめざす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんは多くの遺伝子変異を有しており、さらにその多くは患者毎に異なる遺伝子変異であることが報告されている。そのため、これら遺伝子変異由来の抗原を標的とした個別化T細胞療法が実現すれば臨床における治療効果が期待できる。本研究で得られた成果から、TILの中の自己腫瘍反応性TILを効率よく同定、濃縮することが可能となった。今後これらの自己腫瘍反応性TILを若返らせて使用することができれば、根治を目標としたがん治療法として個別化T細胞移入療法を実現できると考えている。

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. In this study, to develop a personalized immunotherapy, we characterized the tumor reactive tumor infiltrating lymphocytes (TILs). Surgically resected tumor tissues were obtained from patients with lung cancer. We isolated tumor reactive TILs using proprietary cell surface markers and cloned the T cell receptor (TCR) gene. Patient derived xenografts (PDX) were generated from some primary tumor tissues, and, the reactivity of TILs against autologous PDX cancer cells was evaluated. Furthermore, we performed whole-exome sequencing on matched tumor and normal DNA. We identified the mutated antigens recognized by these TILs. In future, we will try to develop a novel personalized adoptive T cell therapy with enhanced sustained antitumor effect.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍浸潤リンパ球 個別化医療 ネオアンチゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんに対する細胞移入療法として、国外ではメラノーマなどに対して腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocyte: TIL) を体外で大量に増やして体内に戻す臨床試験が行われており、奏効率 70%以上という劇的な治療効果が報告されている。メラノーマで効果が得られた理由として、MART-1、gp100 などのがん抗原を高発現していることや、紫外線の影響で生じた多くの遺伝子変異に由来する抗原が提示されていることがあげられ、これらの免疫原性の高い抗原が T 細胞の標的になり、強力な免疫応答につながると考えられている。

喫煙者の肺がんには代表されるように、肺がんにおいても遺伝子変異の数が非常に多いことが知られている。さらに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、遺伝子変異由来抗原に特異的な TIL の潜在能力を示唆する結果も報告されている。一方では、遺伝子変異の種類や数は患者毎に大きく異なることも明らかになっている。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 を利用することが有効なのではないかと考えた。

一方、TIL を雑多な集団のまま体外で培養する場合、増殖しやすい T 細胞が優位になるため、必ずしも自己腫瘍を特異的に認識できる TIL を効率よく得られるとは限らない。また、増殖の過程で疲弊化が起こり、in vivo での抗腫瘍効果に繋がらない可能性もある。Heterogeneity を持ち、加えて変異を繰り返すがんを根治するためには、がんの様々な抗原を同時に標的とし、体内で持続的に抗腫瘍効果を発揮し続けることが重要であると考えている。そこで、TIL の培養過程での偏りをなくし様々な抗原に対応するために、自己腫瘍反応性を持つ TIL を培養前に濃縮して使用することや、若返らせることで増殖能・長期生存能を持たせることにより、従来よりも効果的な細胞療法を開発することにつながるのではないかと考え本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、TIL を雑多な集団のまま増やして使用するのではなく、腫瘍を認識できる TIL に着目し、さらに若返らせることで増殖能・長期生存能を亢進させ、持続的な抗腫瘍効果を高めた新たな個別化 T 細胞移入療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

患者ごとに手術で切除した肺がん組織から TIL、線維芽細胞、Patient derived xenograft (PDX) による腫瘍細胞株を増やし解析に用いた。

(1) 腫瘍を認識できる TIL の早期での単離

フローサイトメーターを使用し CD107a や PD-1 など TIL の細胞表面マーカーで単離し、増殖させた。培養の方法はこれまで我々が CTL クローンを多数樹立した方法を用いた。また、抗 CD3 抗体や抗 CD28 抗体、抗 PD-1 抗体などの使用により、フィーダーフリーで大量培養する方法も試みた。PDX で樹立した自己の腫瘍細胞をターゲットにし、それぞれのマーカーで単離した TIL が自己腫瘍を認識できるか IFN- γ 産生能や細胞傷害性試験などにより評価した。

(2) 自己腫瘍を認識できる TIL が実際に認識している抗原の同定

次世代シーケンサーを使用し、がん部と非がん部の比較により遺伝子変異由来抗原を同定した。候補となる抗原のロングペプチドをコードする mRNA を作製し自己の線維芽細胞に導入し抗原提示させ、TIL との反応性により認識抗原を同定した。

(3) 単離した TIL のがん抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) を人工的に発現する T 細胞の作製

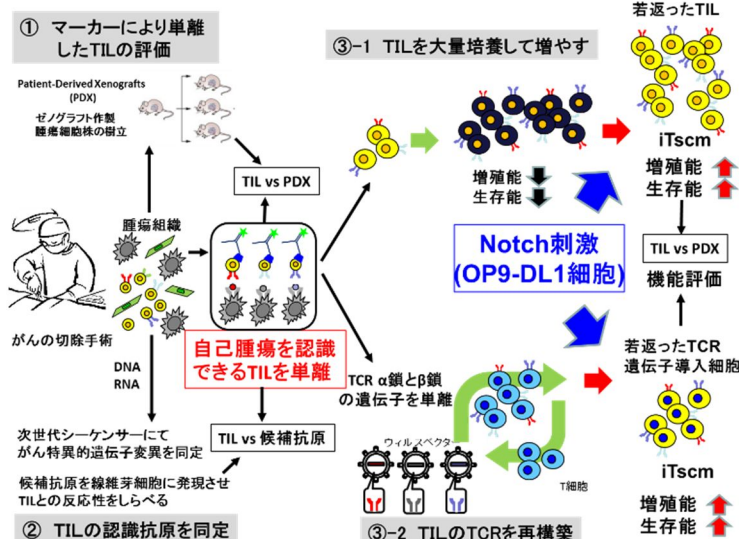
CD107a をマーカーとして自己腫瘍を認識できる TIL を単離し、10xGenomics を使用して、1 細胞単位で TCR の鎖、鎖の遺伝子配列を決定した。

(4) 若返らせることにより、体内に移入した後も増殖能・長期生存能を持つ細胞を作製する

単離した腫瘍反応性を持つ TIL に Notch リガンドを発現する OP9-DL1 細胞との共培養を行い刺激することで、iTscm に分化させた。若返らせた T 細胞の細胞表面マーカー、増殖能、生存能、自己腫瘍反応性を評価した。

4. 研究成果

(1) 肺がんの手術切除組織を使用して、細胞傷害性顆粒の放出を示す CD107a や免疫チェックポイント分子である PD-1 などをマーカーとして、腫瘍内に浸潤している様々な抗原を認識している TIL を単離して、濃縮し増殖させた。興味深いことに、PD-1 陽性 TIL のうち CD107a 陰性分画はほぼ全ての患者で増殖させることができたのに対し、CD107a 陽性分画は一部の患者でしか増殖させることができなかった。これは、自己腫瘍反応性 TIL は、腫瘍内でその増殖能が顕著に低下している可能性を示唆している。



(2) 組織の DNA, RNA を抽出し、次世代シーケンサーを使用し、がん部と非がん部の比較により遺伝子変異由来抗原を同定した。候補となる抗原のロングペプチドをコードする mRNA を作製し、自己繊維芽細胞に遺伝子導入して抗原提示させた。TIL との反応性を評価することにより、2 例においてそれぞれ 2 個と 3 個 TIL の認識抗原を同定した。これらの抗原は患者自身の HLA 型を持つ線維芽細胞に遺伝子導入して発現させていることから、今回同定された患者個々の遺伝子変異由来抗原は、細胞内でプロセッサされ内因性に提示され得る抗原であることを示している。

(3) Patient derived xenograft (PDX)により患者由来がん細胞株が樹立できた症例において、自己腫瘍反応性 TIL の T cell receptor (TCR)配列解析を行った。TIL とがん細胞の共培養において CD107a をマーカーとして自己腫瘍反応性 TIL を単離し、シングルセル TCR 解析により TCR 鎖鎖配列を同定したところ、複数種類の TCR が存在していた。一方で TCR レパトア解析により、使用した TIL 内での同定した TCR の頻度を調べたところ、一部の自己腫瘍反応性 TCR が TIL の中に高頻度に含まれていた。

(4) 単離し増殖させた自己腫瘍反応性 TIL を若返らせる目的で、OP9-DLL1 との共培養、または、ウィルスベクターによる Notch 受容体の転写活性ドメインや Notch 標的因子の強制発現により、自己腫瘍反応性 TIL の誘導性ステムセルメモリー T 細胞 (iTscm) への誘導を試みた。しかしながら、TIL の増殖能が低下していることから iTscm 誘導は困難であった。従来の方は末梢血活性化 T 細胞を使用して最適化された方法であったが、TIL は腫瘍内で疲弊化しているため十分な細胞増殖出来ず、iTscm 化が進行しないと考えられる。また Notch 受容体の転写活性ドメインや Notch の標的因子の cDNA をレトロウイルスを用いて TIL に導入する方法も検討したが、TIL は遺伝子導入効率も極めて低く遺伝子導入自体が困難であった。TIL は終末分化した細胞であるため、細胞増殖能力、細胞生存率が低く、またエピジェネティックに遺伝子発現が固定化されているため、iTscm への転換が困難であったと考えられる。そのため、TIL を増殖させ遺伝子導入効率を上げるために、最適な刺激方法・培養方法を現在検討しており、今後は自己腫瘍反応性 TIL の単離と、TIL に増殖能・長期生存能を持たせることを組み合わせることで、効果的な細胞移入療法の開発につなげる。一方で、増殖能を持たせる過程で一部の TIL に偏って絞られてしまうことが課題である。そのため、自己腫瘍反応性 TIL として単離した様々な抗原を認識している TIL のレパートリーをできる限り維持しつつ増殖させるための工夫も行っていく。

自己腫瘍反応性 TIL の単離とシングルセル解析により、1 細胞単位で TCR の鎖鎖の遺伝子配列を決定することができている。今後は同定した TCR 遺伝子を末梢血リンパ球に遺伝子導入する方法も進めていく。TCR 遺伝子導入した末梢血リンパ球においては、これまでの OP9-DLL1 との共培養による方法で iTscm を誘導し若返らせることも可能と思われる。これらの研究を通して、患者個々の様々ながん抗原を認識した複数の TIL や TIL の TCR 遺伝子を利用し、さらに細胞に増殖能・長期生存能を持たせることで、従来よりも効果的な細胞療法の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Oka M, Xu L, Suzuki T, Yoshikawa T, Sakamoto H, Uemura H, Yoshizawa AC, Suzuki Y, Nakatsura T, Ishihama Y, Suzuki A, Seki M	4. 巻 22(1):9
2. 論文標題 Aberrant splicing isoforms detected by full-length transcriptome sequencing as transcripts of potential neoantigens in non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Biol.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13059-020-02240-8.	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 Su Y, Yamazaki S, Morisue R, Suzuki J, Yoshikawa T, Nakatsura T, Tsuboi M, Ochiai A, Ishii G	4. 巻 1-10
2. 論文標題 Tumor-infiltrating T cells concurrently overexpress CD200R with immune checkpoints PD-1, CTLA-4 and TIM-3 in non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000511557.	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 Taniguchi M, Mizuno S, Yoshikawa T, Fujinami N, Sugimoto M, Kobayashi S, Takahashi S, Konishi M, Gotohda N, Nakatsura T	4. 巻 111(8)
2. 論文標題 Peptide vaccine as an adjuvant therapy for glypican-3 positive hepatocellular carcinoma induces peptide specific CTLs and improves long prognosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2747-2759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14497.	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 Akazawa Y, Saito Y, Yoshikawa T, saito K, Nosaka K, Shimomura M, Mizuno S, Nakamoto Y, Nakatsura T.	4. 巻 111(8)
2. 論文標題 Efficacy of immunotherapy targeting the neoantigen derived from EGFR T790M/C797S mutation in non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2736-2746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14451.	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 Akazawa Yu, Hosono Aiko, Yoshikawa Toshiaki, Kaneda Hide, Nitani Chika, Hara Junichi, Kinoshita Yoshiaki, Kohashi Kenichi, Manabe Atsushi, Fukutani Miki, Wakabayashi Masashi, Sato Akihiro, Shoda Kayoko, Shimomura Manami, Mizuno Shoichi, Nakamoto Yasunari, Nakatsura Tetsuya	4. 巻 110
2. 論文標題 Efficacy of the NCCV Cocktail 1 vaccine for refractory pediatric solid tumors: A phase I clinical trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3650 ~ 3662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14206	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 Shimizu Yasuhiro, Yoshikawa Toshiaki, Kojima Takashi, Shoda Kayoko, Nosaka Kazuto, Mizuno Shoichi, Wada Satoshi, Fujimoto Yuki, Sasada Tetsuro, Kohashi Kenichi, Bando Hideaki, Endo Itaru, Nakatsura Tetsuya	4. 巻 110
2. 論文標題 Heat shock protein 105 peptide vaccine could induce antitumor immune reactions in a phase I clinical trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3049 ~ 3060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14165	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤浪紀洋, 鈴木利宙, 下村真菜美, 中島裕理, 吉川聡明, 平糠和志, 山田崇, 中面哲也
2. 発表標題 ネオアンチゲンを標的とした完全個別化がんペプチドワクチンの開発 肝細胞がんにおけるネオアンチゲンの予測とその抗原性の評価に関して
3. 学会等名 第40回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡実穂, 鈴木利宙, 吉川聡明, 中面哲也, 鈴木絢子, 鈴木穰, 関真秀
2. 発表標題 ナノボアシックエンサーを用いた肺がんにおける異常アイソフォームとネオ抗原の同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口理文, 水野正一, 吉川聡明, 藤浪紀洋, 中面哲也
2. 発表標題 肝細胞がんや肝芽腫に対する術後補助療法としてGPC3ペプチドワクチンはペプチド特異的CTL を誘導し、長期予後の延長に有望である
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下村真菜美, 鈴木利宙, 藤浪紀洋, 平糠和志, 中島裕理, 吉川聡明, 佐々木諒子, 渡部典子, 山田崇, 松永宏美, 三嶋雄二, 中村徳弘, 中面哲也
2. 発表標題 完全個別化がんペプチドワクチンの開発のためのネオアンチゲンの予測とその抗原性の評価
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤澤悠, 信岡大輔, 高橋真理, 吉川聡明, 下村真菜美, 水野正一, 中本安成, 中面哲也
2. 発表標題 早期ステージ固形癌において細胞傷害性T細胞への高い反応性を導くHLA class Iの高発現の証明
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木利宙, 中島裕理, 下村真菜美, 吉川聡明, 平糠和志, 山田崇, 渡邊典子, 三嶋雄二, 中村徳弘, 中面哲也
2. 発表標題 ネオアンチゲンを標的とした完全個別化がんペプチドワクチンの開発 -ネオアンチゲンの予測とヒトHLA発現マウスを用いた抗原性の評価-
3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島裕理、鈴木利宙、下村真菜美、上田詩歩、佐々木諒子、吉川聡明、平糠和志、山田崇、中面哲也
2. 発表標題 ネオアンチゲンを標的とした完全個別化がんペプチドワクチンの開発 ネオアンチゲンの予測と患者末梢血を用いた抗原性の評価
3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水康博、吉川聡明、下村真菜美、水野正一、和田聡、藤本祐希、小島隆嗣、遠藤格、中面哲也
2. 発表標題 HSP105由来ペプチドワクチンは投与患者において抗腫瘍免疫応答を惹起する：臨床第 相試験の免疫モニタリング
3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------