

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16866

研究課題名（和文）免疫チェックポイント阻害剤と他の癌治療を併用した際の細胞障害性T細胞活性の検証

研究課題名（英文）Validation of cytotoxic T cell activity when immune checkpoint inhibitors are combined with other cancer treatments

研究代表者

坂本 信二郎（Sakamoto, Shinjiro）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：30816541

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題の目標であった、がん治療における複合免疫療法など有用な併用療法の検証に関しては十分な成果が得られなかった。

抗PD-1抗体・抗CTLA-4抗体・がんペプチドにて刺激したリンパ球を腫瘍細胞と共培養し、細胞障害活性の評価を行い、各治療で細胞障害活性の上昇は認められた。しかし併用下での検証において、がんペプチドでの反応が非常に弱く評価が困難であり、免疫反応に関連する細胞表面マーカーやサイトカインにおいても差は見られなかった。生体反応と異なるリンパ球のみの刺激では免疫細胞同士の関係が希薄化してしまうことが原因と考え、リンパ球・単球を共培養し刺激する検証も行ったが十分な成果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんに対する免疫療法は長期の治療効果が得られる可能性があるが、免疫複合療法での免疫関連有害事象のような副作用問題や治療効果の予測因子が十分解明されていないことが現状の課題である。これらを解明するために、in vivoで多くの有用な報告がされているが、人への適応となると十分な効果が得られない。そのため人の細胞を使用し、in vitroで検証が可能となれば早期にこれらの課題が解明される可能性がある。本研究課題において十分な成果は得られなかったが、本検証内容をさらに発展させることで、生体内に近い反応をin vitroで検証できるようになる可能性があると考え。

研究成果の概要（英文）：Sufficient results could not be obtained regarding the verification of useful combination therapy such as combined immunotherapy in cancer treatment.

Lymphocytes stimulated with anti-PD-1 antibody, anti-CTLA-4 antibody, and cancer peptide were co-cultured with tumor cells and evaluated for cytotoxic activity. However, in the verification under combined use, the reaction with cancer peptide was very weak and difficult to evaluate. Moreover, there was no difference in cell surface markers and cytokines related to immune reaction. Stimulation of only lymphocytes, which is different from biological reactions, is thought to be due to weak relationships between immune cells. We also tried co-culturing and stimulating lymphocytes and monocytes, but we were not able to obtain sufficient results.

研究分野：がん免疫

キーワード：immunotherapy Cytotoxic T lymphocyte anti-PD-1 antibody anti-CTLA-4 antibody cancer peptide vaccine

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、進行癌に対する化学療法は免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor ; ICI) の出現により長期生存が得られる症例も確認されている。しかし、治療効果が得られる症例は限定的で、バイオマーカーの同定や、ICI と他治療の併用療法における治療効果を検証する研究が行われている。

がんペプチドワクチン療法は免疫療法の一つとして以前から研究が行われており、癌特異的な細胞障害性 T 細胞を誘導することにより、ペプチドワクチン療法もがん治療に有用となりうる可能性がある。

しかし、どのように免疫療法を組み合わせたり、併用したりすることでより良い抗腫瘍効果が得られるかは解明されておらず、バイオマーカーも解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、癌特異的な細胞障害性 T 細胞を誘導するペプチドワクチン療法とリンパ球活性の抑制系シグナル阻害剤である ICI を併用することで、強い抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え、それらを検証することが目的である。本研究の成果により、ペプチドワクチン療法が、ICI の併用薬となりうることを示唆されると期待する。さらには免疫活性が得られる状況で、細胞表面マーカーやサイトカインの検証を行うことで、免疫療法のバイオマーカーを検証する。

3. 研究の方法

1) 使用する免疫療法としては、抗 PD-1 抗体・抗 CTLA-4 抗体・がんペプチドであり、標的となる腫瘍細胞や使用するがんペプチド (右表) は HLA-A に拘束性であるため検体における HLA-A を測定し研究に使用可能であるか確認する。

2) 抗 PD-1 抗体・抗 CTLA-4 抗体に関しては、実臨床において使用されている Nivolumab や Ipilimumab を目安に刺激濃度を検証する

3) 末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMC) にリンパ球培養用サイトカインを添加し、抗 PD-1 抗体・抗 CTLA-4 抗体に関しては、2) で測定した濃度で 14 日間刺激を行い、がんペプチドに関しては既報に準じて 14 日間の間に 5 回刺激を行う。刺激した PBMC を標的細胞と一定の割合で共培養したのちに、細胞障害活性 (当初は CTL assay を予定していたが、LDH 細胞障害 assay を使用) や制御性 T 細胞割合 (FlowCytometry) などを測定する。同時に培養上清にてサイトカインの測定 (ELISA 法) を行う。

4) 末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMC) にリンパ球培養用サイトカインを添加し、抗 PD-1 抗体 + 抗 CTLA-4 抗体・抗 PD-1 抗体 + がんペプチド・抗 CTLA-4 抗体 + がんペプチドで刺激する群に分けて、3) と同様のリンパ球刺激を行う刺激した PBMC を標的細胞と一定の割合で共培養したのちに、細胞障害活性 (当初は CTL assay を予定していたが、LDH 細胞障害 assay を使用) や制御性 T 細胞割合 (FlowCytometry) などを測定する。同時に培養上清にてサイトカインの測定 (ELISA 法) を行う。

5) 末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMC) にリンパ球培養用サイトカイン・マクロファージ培養サイトカイン・樹状細胞培養サイトカインを添加し培養することで、一定の細胞割合で培養可能か検証する

4. 研究成果

1) HLA-A の測定

HLA-A に関しては全血を用いて問題なく測定可能であった。HLA-A の頻度としては、既報の日本人における頻度と同様で HLA-A24 > HLA-A2 > HLA-A3 であった。

	Peptide 名	Sequence
HLA-A24 拘束性	Lck ₄₈₆₋₄₉₄	TFDYLRVSV
	SART3 ₁₀₉₋₁₁₈	VYDYNCHVD
HLA-A2 拘束性	Lck ₂₄₆₋₂₅₄	KLVERLGAA
	SART3 ₃₀₉₋₃₁₇	RLAEYQAYI
HLA-A3 拘束性	Lck ₉₀₋₉₉	I LEQSGEWWK
	SART3 ₅₁₁₋₅₁₉	WLEYYNLER

2) 抗 PD-1 抗体・抗 CTLA-4 抗体の至適濃度

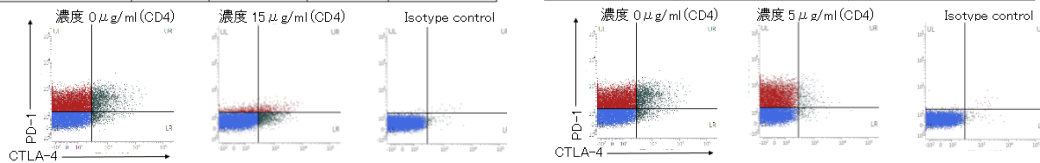
Nivolumab や Ipilimumab の体内濃度や既報を基準(抗 PD-1 60 μg/ml、抗 CTLA-4 20 μg/ml)として濃度調整を行ったところ、低濃度でも高濃度でも、それぞれのシグナルを抑制することが可能であった。さらに濃度調整を行っても、薬剤事態による細胞障害は細胞数や細胞形態からないと考えられた。以上から、刺激濃度は抗 PD-1 60 μg/ml、抗 CTLA-4 20 μg/ml とした。

抗PD-1抗体

濃度 (μg/ml)	CD4		CD8	
	PD-1 (%)	CTLA-4 (%)	PD-1 (%)	CTLA-4 (%)
0(コントロール)	54.6	13.1	6.13	1.89
7.5	4.22	13.0	0.47	1.37
15	6.16	10.2	0.56	2.62
30	4.26	14.1	0.35	2.54
60	4.18	9.59	0.12	0.89
120	2.99	5.78	0.43	1.94

抗CTLA-4抗体

濃度 (μg/ml)	CD4		CD8	
	PD-1 (%)	CTLA-4 (%)	PD-1 (%)	CTLA-4 (%)
0(コントロール)	54.6	13.1	6.13	1.89
2.5	59.2	3.81	3.91	0.37
5	47.4	2.61	4.64	0.50
10	54.9	4.16	6.80	1.21
20	43.8	3.42	4.23	0.26
40	44.3	3.44	1.32	0.20



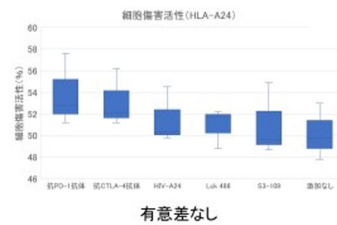
3) 抗 PD-1 抗体・抗 CTLA-4 抗体・がんペプチドによる P B M C 刺激

細胞障害活性に使用した LDH 細胞障害 assay に関しては共培養時の培養液のウシ胎児血清 (FBS) の濃度と Target 細胞 (腫瘍細胞) と Effector 細胞 (リンパ球) の比率 (E/F 比) より正確性が異なるため、それぞれの濃度・細胞比率の検証を行い、5%FBS の培養液にて、E/F 比 2:1 にて以降の検証を行った。

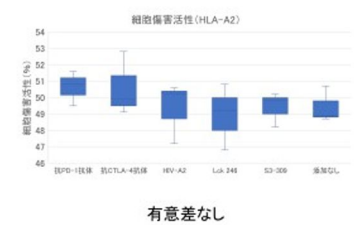
刺激終了時点でのリンパ球の細胞数変化 (右図下段) は刺激方法で大きな変化は認めなかったが、やや抗 CTLA-4 抗体で多い結果であった。

細胞障害活性に関しては、抗 PD-1 抗体 > 抗 CTLA-4 抗体 > がんペプチドの順に活性が強かった。

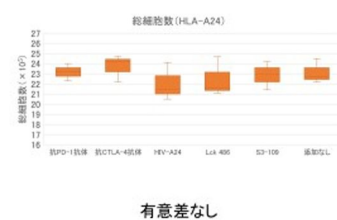
ペプチド単独やICI単剤投与時の検証



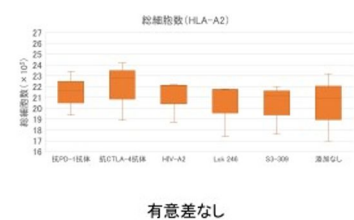
ペプチド単独やICI単剤投与時の検証



ペプチド単独やICI単剤投与時の検証



ペプチド単独やICI単剤投与時の検証



これらの結果は、抗 PD-1 抗体は腫瘍細胞とリンパ球との反応に影響するため、直接細胞障害活性に影響する一方で、抗 CTLA-4 抗体は免疫サイクルでプライミングに主に影響するため、リンパ球の増殖を行い抗腫瘍効果が得られるのかもしれないが、本検証では共培養する際に T/F 比を統一した影響と考えられた。がんペプチドに関しては、プライミングに影響が強いため細胞数増多を期待したが、あまり影響はなかった。しかし細胞障害活性の軽度上昇は得られていた。さらに抗 CTLA-4 抗体での制御性 T 細胞の抑制などによる治療効果増強の報告があることから制御性 T 細胞ややサイトカインの検証を行ったが、各刺激であきらかな差は認めなかった

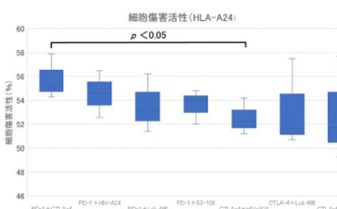
4) 抗 PD-1 抗体・抗 CTLA-4 抗体・がんペプチドの各併用による P B M C 刺激

3) と同様の実験手法で行った。

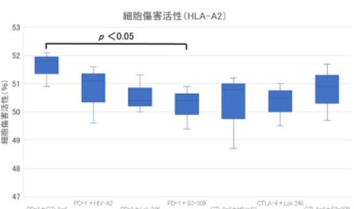
右図の通り、抗 PD-1 抗体 + 抗 CTLA-4 抗体での刺激において、細胞障害活性があきらかに強く、実臨床に一致する結果ではあったが、そのほかの併用刺激において 3) 以上に細胞障害活性が見られなかった

がんペプチドでの影響が少ない可能性は 3) の結果からは考慮されるが、抗 CTLA-4 と同等の結果となるはずの群においても、

ペプチドやICI併用時の検証



ペプチドやICI併用時の検証



細胞障害活性がほぼ見られない状況であった

これらの結果は、今回主にリンパ球のみを刺激する検証方法で行ったが、もともと各免疫チェックポイント阻害剤もがんペプチドも抗原提示細胞やマクロファージの存在も必要な治療である。そのため、リンパ球のみの活性状況で検証を行ったため、十分な結果が得られない可能性を考慮した。

- 5) 4)の結果を踏まえ、抗原提示細胞やマクロファージを存在する環境下で検証を行う必要があるが、これまでの既報ではそれぞれの細胞を単一で培養・刺激し、腫瘍細胞と共培養する際に、混合する手法が散見された。しかしこの方法も、ワクチン反応のメカニズムを考慮すると生体反応とは異なるため、PMBCを刺激する時点からリンパ球培養用サイトカイン・マクロファージ培養サイトカイン・樹状細胞培養サイトカインを添加し培養することでどのように培養されるか検証したが、同時期に同じ方法で培養した細胞集団でも、それぞれの細胞の存在が異なる状況であった。

以降も同時培養ができるようにサイトカインの投与タイミングの調整なども行ったが十分な結果が得られず、その後の抗 PD-1 抗体・抗 CTLA-4 抗体・がんペプチドでの刺激による反応の違いや、細胞障害活性の測定にまで至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------