

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18114

研究課題名(和文) 次世代フローサイトメーターを用いた膵癌特異的免疫応答の網羅的解析と臨床意義の検討

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of pancreatic cancer-associated antigen specific immune responses using high parameter flow cytometry and its clinical significance

研究代表者

東口 公哉 (Higashiguchi, Masaya)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80804450

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)：本研究では、57例の膵癌患者から術前治療前、術前治療後、術後の3点で採取した末梢血単核細胞を4種の膵癌抗原ペプチド(CEA、MUC1、TERT、WT1)で刺激した際に生じる抗原特異的CD8 T細胞反応を次世代型フローサイトメトリーにて解析し、その臨床学的意義を検討した。その結果、術前治療前のIFN-4-1BB double-positiveな膵癌関連抗原特異的CD8 T細胞の頻度が、術前治療に伴う血清CA19-9値の変化率と有意に逆相関した($R=-0.556$, $p=0.011$)。これにより、膵癌関連抗原特異的CD8 T細胞反応は術前治療の有効性に関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は手術以外に根治的な治療法が少ない難治性の悪性腫瘍であり、その予後改善のためには、化学療法や免疫療法などに対して治療抵抗性を示す膵癌の病態を詳細に解明することが重要である。本研究では、比較的簡便に採取可能な末梢血中のCD8 T細胞による腫瘍関連抗原(TAA)特異的免疫応答が術前治療の有効性に関連することを報告した。これは即ち、膵癌においても腫瘍微小環境内でTAA特異的CD8 T細胞が腫瘍抑制的に作用している可能性を示唆する貴重なデータである。また、実臨床においても、治療開始前の末梢血中に存在するTAA特異的CD8 T細胞の頻度が、術前治療の効果予測マーカーとなり得る点で有益である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed tumor-associated antigen-specific CD8 T cell responses induced when peripheral blood mononuclear cells collected from 57 pancreatic cancer patients at three time points (before neoadjuvant therapy, after neoadjuvant therapy (preoperative), and postoperative) were stimulated with four overlapping peptides, which are known as pancreatic cancer antigens (CEA, MUC1, TERT, and WT1) by high parameter flow cytometry and investigated their clinical significance. We found that frequency of IFN-4-1BB double-positive antigen-specific CD8 T cells before neoadjuvant therapy were inversely correlated with the rate of change in serum CA19-9 levels between before and after neoadjuvant therapy ($R = -0.556$, $p = 0.011$). This result suggests that tumor antigen-specific immune responses by CD8 T cells in the peripheral blood of pancreatic cancer patients may be related with the efficacy of neoadjuvant therapy.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 腫瘍免疫 抗原特異的CD8 T細胞 次世代型フローサイトメトリー 術前治療 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌診療の現在と課題

膵癌は、5年生存率が約10%と非常に予後不良な悪性腫瘍として知られるが(1)、その原因の一つとして、有効な治療法が少ないことが挙げられる。現在、唯一根治が期待できる治療法は手術であるが、診断の時点で切除可能と診断される症例は膵癌全体の20%程度であり、手術が可能であった症例においても、術後高確率に再発がみられる(2)。そこで、周術期に化学療法や放射線療法などを組み合わせた集学的治療の開発が進められているが(3)、これらの治療に抵抗性を有することも膵癌診療の課題となっている。従って、膵癌の治療成績を向上させるためには、その治療抵抗性に関わる病態を詳細に把握することが重要であると考えられる。

(2) 免疫療法の開発と腫瘍免疫学の発展

一方、他癌腫においては、様々な免疫療法が有効であるとの報告が増えており、近年では腫瘍免疫学に関する研究が盛んに行われるようになった。その免疫療法の代表格である免疫チェックポイント阻害剤は、悪性腫瘍の免疫逃避現象を抑制することによって抗腫瘍効果を示す。しかし、これらの免疫チェックポイント阻害剤も、腫瘍遺伝子変異量が多い悪性黒色腫や非小細胞肺癌などでは奏効率が30%程度と一定の有効性を示すものの、膵癌においては約3%にとどまるのが現状である。(4,5)

ここで、免疫療法が抗腫瘍効果を発揮する際に中心的な役割を果たすのが腫瘍浸潤リンパ球である。中でも腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞は、腫瘍組織内で直接腫瘍細胞に作用して細胞傷害活性を示すことが分かっている。即ち、治療経過中の腫瘍浸潤リンパ球の機能をモニタリングすることで、膵癌の治療抵抗性に関わる腫瘍免疫学的な病態が把握できると考えられる。

実際には、手術以外の過程で腫瘍浸潤リンパ球を直接評価することは困難であるが、肺癌などの他癌腫においては、末梢血中の CD8 T 細胞における effector memory 分画の割合や細胞障害活性が、腫瘍浸潤リンパ球による抗腫瘍効果と関連したとの報告もあり(6)、低侵襲な方法で採取可能な末梢血を対象とすることで、治療経過中の腫瘍浸潤リンパ球の機能を経時的に評価できる可能性が示唆されている。このような背景から、本研究では様々な治療経過における膵癌患者から採取した末梢血を用いて腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応を解析することとした。

(3) フローサイトメトリー技術の進歩

研究開始当初、この腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応を多元的に解析することは技術的に困難であったが、フローサイトメトリーの進歩に伴い、一度に多数の細胞表面マーカーや細胞内サイトカインの発現解析が可能となったことで、限られたサンプルから得られるデータは飛躍的に増加した。2018年6月に医薬基盤・健康・栄養研究所に導入された Becton, Dickinson and Company 社が開発した当時最新のフローサイトメトリーである FACSymphony A5 (BD Biosciences) は 31 種類のパラメータを同時に解析可能である(図1)。これを用いて末梢血中の腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞が呈する免疫反応を経時的に観察することによって、膵癌の腫瘍免疫学的な病態が詳細に把握可能となり、結果として膵癌の病状経過を予測するバイオマーカーの同定や新規治療戦略の開発につながる可能性が期待される。



図1 フローサイトメトリー技術の変遷

2. 研究の目的

実際に治療の経過中にある膵癌患者において、末梢血中の CD8 T 細胞による腫瘍関連抗原特異的免疫反応を経時的に解析することにより、早期診断や治療効果予測、予後予測などのマーカーとなり得る免疫反応を同定するとともに、免疫療法が有効な集団あるいは時期を検討し、膵癌に対する新規治療戦略の確立を見出す。

3. 研究の方法

(1) 末梢血単核細胞 (PBMC) の採取

2019年9月から2021年12月までに、術前治療を行ってから根治切除を受けた膵癌患者を対象とした。検体は、術前治療前、術前治療後(術前)、術後の3点で採取した(図2)。PBMCは、BD Vacutainer CPT (Becton, Dickinson and Company) を用いて、採血後6時間以内に遠心分離し、10%ジメチルスルホキシド (DMSO) を含むウシ胎児血清 (FBS) 中で凍結保存した。

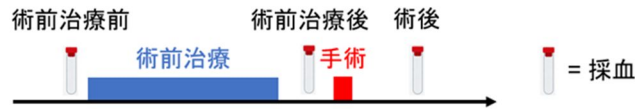


図2 膵癌の治療経過と血液サンプルの採取

(2) 膵癌関連抗原の選択

本研究では、膵癌関連抗原として CEA、MUC1、TERT、および WT1 の4つの overlapping peptide (いずれも JPT Peptide Technologies 製) を使用した。

(3) 腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞の *in vitro* 培養

本研究では、頻度の少ない腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞の解析を行うため、膵癌患者から採取した PBMC を *in vitro* で培養することにより、その頻度を増幅させた。凍結保存した PBMC を解凍し、そのうち20%に対して、各種腫瘍関連抗原 peptide で、1時間刺激した。その後、抗原刺激した PBMC を、残り80%の未刺激 PBMC と混合して、IL-2 の存在下で10日間共培養した。

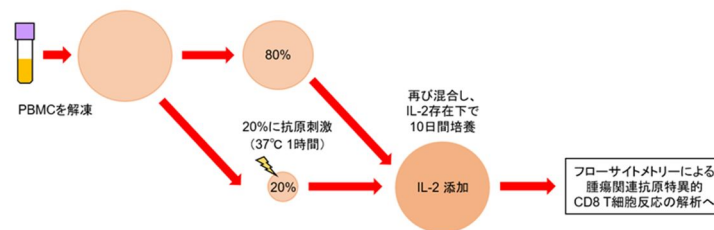


図3 腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞の *in vitro* 培養

(4) フローサイトメトリーによる腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応の解析

上記の protocol で10日間の培養した PBMC を、再び各種腫瘍関連抗原 peptide で30分刺激した。さらに、BD GolgiPlug (BD Biosciences) と BD GolgiStop (BD Biosciences) で処理を加えた後、5時間培養し、Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (L34957 Thermo Fisher Scientific) および、各表面マーカー染色・細胞内サイトカイン染色を行い、FACSymphony A5 を用いて解析した。

(5) データ解析

フローサイトメトリーで取得したデータは FlowJo (version 10.8.1; Becton, Dickinson and Company) を用いて解析した。統計解析には R/Bioconductor (R version 4.2.1) もしくは GraphPad Prism (version 9.0.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。

(6) 倫理申請

本研究は、大阪大学医学部附属病院、大阪国際がんセンター、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所(大阪)の倫理委員会によって承認され、全ての研究対象者から書面による同意を得た。

4. 研究成果

(1) 腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応解析系の確立

PBMC 由来の腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応をフローサイトメトリーで解析するにあたり、まず、様々な治療過程にある膵癌患者25例から採取した PBMC を使用し、それらを既

報の膵癌関連抗原である CEA、MUC1、TERT、WT1 の 4 つの overlapping peptide で刺激することで腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応が観察可能か検討した。ここで、腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞は非常に頻度の低い細胞集団であると想定されたことから、前述の方法で腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞を *in vitro* で培養することにより、その検出感度を上昇させて解析を行った。なお、本研究では、抗原特異的 CD8 T 細胞反応陽性の指標として、その評価に広く使用されてきた IFN γ と活性化 T 細胞に発現するとされる 4-1BB の 2 つを採用し、これらの発現の組み合わせで、IFN γ + and/or 4-1BB+、IFN γ +、4-1BB+、IFN γ + and 4-1BB+ (double positive) の 4 つの判定基準を設定した。その結果、各種膵癌関連抗原に対して抗原特異的 CD8 T 細胞反応陽性を示す responder が同定された (図 4-A)。さらに、これら 4 つの膵癌関連抗原いずれか 1 つでも反応した responder の頻度は 4 つの判定基準それぞれで、92%、80%、76%、44%であった (図 4-B)。

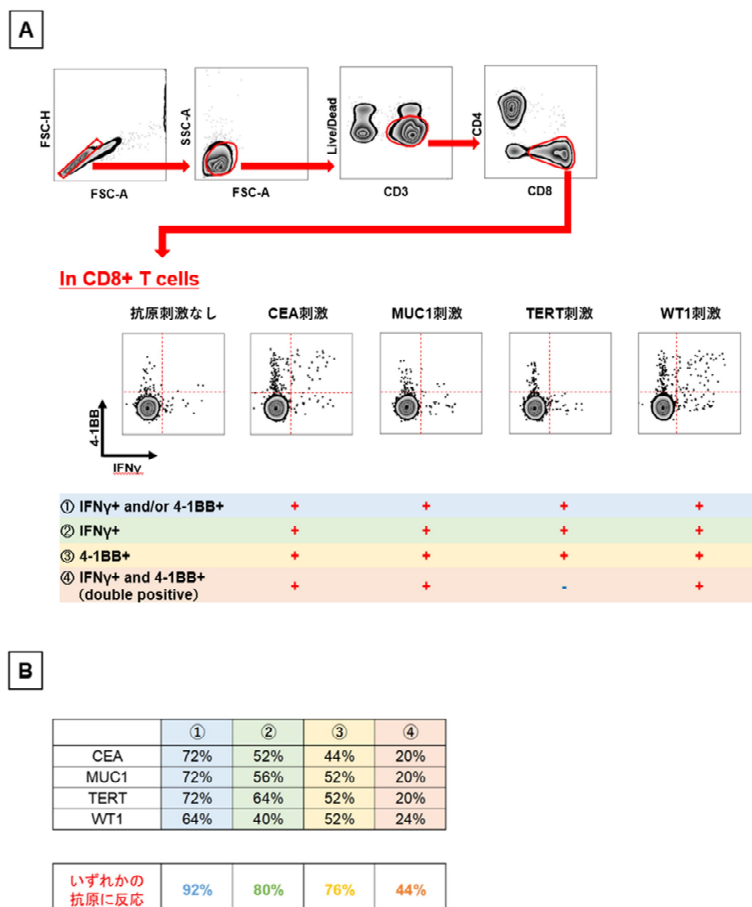


図 4 腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応解析系の確立

(A) 腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応の解析と 4 つの陽性判定基準

(C) 各判定基準による各種抗原特異的 CD8 T 細胞反応陽性者の割合 (N = 25)

一方、それぞれの膵癌関連抗原で responder の割合が異なるかをカイ二乗検定で検討したところ、有意差は認めなかったことに加え、各膵癌関連抗原に対する抗原特異的 CD8 T 細胞の頻度も、前述の 4 つの判定基準全てで有意差がなかったことから、4 つの膵癌関連抗原に対する抗原特異的 CD8 T 細胞反応の質的な違いはないと判断した。そこで以降の実験では、さらに膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応の検出感度を上昇させる目的で、今回使用した 4 つの膵癌抗原 peptide を混合して PBMC を刺激することとした。

(2) 膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応の経時的解析と臨床学的因子との検討

続いて、膵癌治療過程における腫瘍関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応の経時的変化を観察すべく、さらに 57 例の膵癌患者から術前治療前、術前治療後、術後の 3 点で採取した PBMC を、4 つの膵癌抗原 peptide を混合したもので刺激して解析を行った。まず、術前治療前のサンプルを用いて解析を行ったところ、術前治療前 (未治療状態) に膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応陽性であった responder の割合は、4 つの判定基準でそれぞれ、74%、60%、65%、37%であっ

た(図 5-A)。しかし、術前治療前の時点で観察された膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応に関するデータは、年齢、血算、生化学検査などといった臨床学的因子との相関は示さなかった。そこで、術前治療後、術後のサンプルに対しても同様の解析を追加し、膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応の経時的変化と臨床学的因子との関連をさらに詳細に検討した。特に、術前治療や手術の前後では CA19-9 や DUPAN-2 といった膵癌診療で広く使用される腫瘍マーカーや造影 CT 画像による腫瘍径の変化なども解析の対象としたが、その結果、術前治療前の IFN γ 4-1BB double-positive な膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞の頻度が、術前治療に伴う血清 CA19-9 値の変化率と有意に逆相関することが判明した ($r=-0.556, p=0.011$) (図 5-B)。術前治療前後での血清 CA19-9 値の変化は予後を反映すると報告されており、これは即ち、膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応は術前治療の効果に関連している可能性が示唆された。

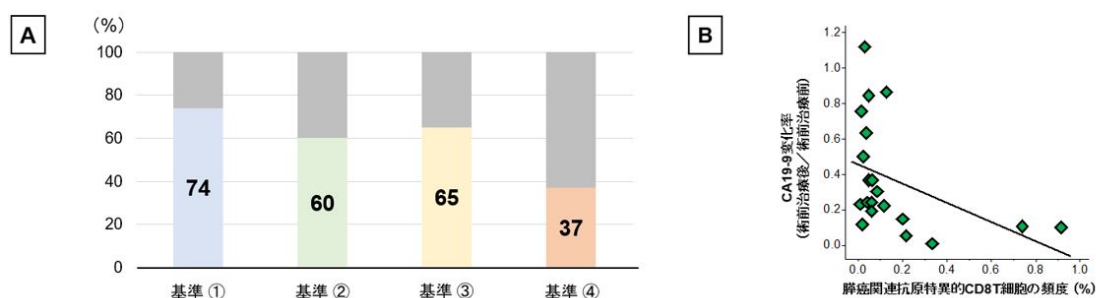


図 5 膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞反応の解析と臨床学的因子との検討
 (A) 混合膵癌抗原に対する抗原特異的 CD8 T 細胞反応陽性率 (術前治療前 N = 57)
 (B) 術前治療前の IFN γ + 4-1BB $^{+}$ 膵癌関連抗原特異的 CD8 T 細胞の頻度と CA19-9 変化率 (術前治療後 / 術前治療前) との相関

引用文献

1. Rebecca L Siegel, Kimberly D Miller and Ahmedin Jemal. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69(1):7-34.
2. Quisette P Janssen, Eileen M O'Reilly, Casper H J van Eijck and Bas Groot Koerkamp. Neoadjuvant Treatment in Patients With Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer. Front Oncol. 2020 Jan 31;10:41.
3. Syed A Ahmad 1, Mai Duong 2, Davendra P S Sohal 1, Namita S Gandhi 3, Muhammad Shaalan Beg, et al. Surgical Outcome Results From SWOG S1505: A Randomized Clinical Trial of mFOLFIRINOX Versus Gemcitabine/Nab-paclitaxel for Perioperative Treatment of Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Ann Surg. 2020;272(3):481-6.
4. Ton N Schumacher and Robert D Schreiber. Neoantigens in cancer immunotherapy. Science. 2015 Apr 3;348(6230):69-74.
5. O'Reilly EM, Oh DY, Dhani N, Renouf DJ, Lee MA, et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. JAMA oncology. 2019;5(10):1431-8.
6. Iwahori K, Shintani Y, Funaki S, Yamamoto Y, Matsumoto M, et al. Peripheral T cell cytotoxicity predicts T cell function in the tumor microenvironment. Scientific reports. 2019;9(1):2636.

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
研究協力者	山本 拓也 (YAMAMOTO TAKUYA)		
研究協力者	秋田 裕史 (AKITA HIROFUMI)		

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