

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08751

研究課題名(和文) 腫瘍新規抗原特異的なT細胞レセプター遺伝子導入T細胞による養子免疫細胞療法の開発

研究課題名(英文) Adoptive CTL therapy using neo-antigen-specific TCR-gene induced T cells

研究代表者

村田 聡 (Murata, Satoshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90239525

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)：1)大腸癌、胃癌、乳癌手術摘出腫瘍の免疫不全マウス皮下移植によりPDXモデル作成に成功した。2)各癌患者からの摘出癌組織と正常組織のDNAのwhole exome sequenceにて癌組織の体細胞変異を同定。患者HLA-class Iに親和性の高い変異抗原ペプチドをNeo-Ag候補として多数同定。リンパ球高反応性のNeo-Agペプチドを質量分析により絞り込んだ。3)Flu特異的TCR cDNAをヒトCD8+ T細胞へ導入するモデル実験とTCR導入T細胞の表現型の評価を行った。このプラットフォームとPDXモデルの組み合わせは適応免疫療法の迅速開発に効果的なアプローチとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者腫瘍由来の高効率なNeo-Ag同定技術を基に、患者リンパ球由来のNeo-Ag特異的TCR導入CTLを樹立し、OX40刺激下培養によるメモリーCTL誘導技術、さらにICI治療を組み合わせ、独自性の高い高効率な養子免疫細胞療法の開発することにより、既存技術を超える新しいプラットフォームが構築でき、患者ネオ抗原を利用した個別化新規養子免疫細胞療法の臨床開発が可能になる。

研究成果の概要(英文)：We successfully created PDX (patient-derived xenograft) models by implanting surgically removed colon cancer, gastric cancer, and breast cancer tumors into immunodeficient mice. We identified somatic mutations in cancer tissues by sequencing DNA from both cancer and normal tissues of each patient. Through this, we found numerous mutant antigen peptides that have a high affinity to the patient's HLA-class I, making them Neo-Ag candidates. We further narrowed down these Neo-Ag peptides based on high lymphocyte reactivity using mass spectrometry. Additionally, we conducted an experiment where we introduced Flu-specific TCR cDNA into human CD8+ T cells and evaluated the phenotype of the TCR-introduced T cells. We believe that combining this platform with PDX models can be an effective approach for the rapid development of adaptive immunotherapy.

研究分野：がん免疫学 腫瘍外科学

キーワード：免疫細胞治療 補助刺激因子 TCR改変T細胞 腫瘍浸潤リンパ球 腫瘍ネオ抗原 免疫チェックポイント阻害剤 T細胞

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞が提示する抗原には、自己由来の共通自己抗原と、癌細胞の遺伝子不安定性により生じた遺伝子変異由来の新規抗原 (neo-antigens: Neo-Ag)がある。自己抗原に反応する T細胞は胸腺で大部分排除され末梢では免疫寛容のため腫瘍を傷害できない。Neo-Ag は癌細胞に特異的で後天的な抗原であり、Neo-Ag を異物と認識し反応する T細胞クローンは胸腺で排除されず生体内に存在する。実際この Neo-Ag 特異的な細胞傷害性 T細胞 (CTL) が患者末梢血から同定されている (*Nat Commun* 25:449, 2019)。よって Neo-Ag 特異的 CTL を癌患者に細胞移入する免疫細胞療法 (*Nature Med* 22:433-8, 2016.) の開発が期待できる。しかし、Neo-Ag 特異的 CTL は微量なため、生体から採取し単に培養増幅しても細胞療法への利用は難しい。

Neo-Ag に特異的な T細胞受容体 (T cell receptor: TCR) の遺伝子導入による改変 T細胞を用いる免疫細胞療法はその応用例の一つで、既に先行研究もあるが (*Cancer Immunol Res.* 4:734-743, 2016.)、臨床へ応用するためには以下の問題点を克服する必要がある。

- ① 既存技術を用い、バイオインフォマティクスにより同定された Neo-Ag 候補の中で、T細胞が抗原として認識し、真に免疫反応が証明される Neo-Ag は 0.5-1%と僅かであること。
- ② 遺伝子改変した T細胞を培養増幅して生体に移入した場合、既存技術ではメモリー T細胞への分化が弱く、生体内ではエフェクター機能を発揮できず短期間で消滅してしまうこと。
- ③ 腫瘍は CTL による攻撃から逃れる免疫逃避機構を、腫瘍局所で確立していること。

最近申請者らは、上記問題点を解決できる可能性をもつコアとなる手法を開発した。これらの技術を基に、次の様な新たな養子免疫細胞療法の開発へ展開していきたい。

① 我々は次世代シーケンサー (NGS) を利用した TCR  $\beta$  CDR3 配列頻度解析により、従来技術よりも飛躍的に高感度な Neo-Ag 同定技術を開発した (*J Immunol Methods.* 2019, 23:112679.)。ネオ抗原と同時に TCR  $\beta$  CDR3 配列同定が可能のため、マルチマー解析と組み合わせ、抗原特異的 T細胞クローンの同定から、抗原特異的 TCR の同定が可能となる。

② また、申請者らは T細胞を抗原ペプチド刺激と T細胞の補助刺激因子 OX40 (CD134) 刺激下に培養する事で、腫瘍抗原特異的メモリー CTL 誘導に成功した (*Int J Cancer,* 142:2335-43, 2018)。この CTL は抗アポトーシス蛋白が豊富で、移入後の担癌マウス生体内でも、分裂増殖可能で、長期間抗腫瘍 effector 機能が維持できる、メモリー T細胞であることがわかった。

これら高効率 Neo-Ag 同定法とメモリー CTL 誘導培養技術を組み合わせれば、担癌生体内で活性維持可能な Neo-Ag 特異的-TCR 遺伝子導入-CTL の樹立が可能かもしれない。

③ しかし、担癌生体内で抗腫瘍効果を得るためには、さらに腫瘍の免疫逃避機構の打破が必要である。活性化 CTL 表面には program death-1 (PD-1) が誘導される。腫瘍表面などに発現するそのリガンド PD-L1 と活性化 CTL の PD-1 とが結合すると、CTL はその機能抑制シグナルにより抗腫瘍活性を失う。抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は PD-1 と PD-L1 の結合を阻害し腫瘍免疫逃避機構を打ち破ると期待できる。しかし、ICI の効果には活性化抗腫瘍 CTL の存在が必須であるが、担癌生体内ではその様な CTL は誘導されにくい。

そこで、本研究で解決すべき問いとして 2 点あげられる。

- 1, Neo-Ag 特異的 TCR の高効率同定技術と OX40 刺激によるメモリー T細胞分化誘導技術を組み合わせることで、両者の特性を生かした新規養子免疫療法が成立するであろうか？
- 2, また、この養子免疫療法と抗 PD-1 抗体の併用により治療効果が増強するであろうか？

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、患者腫瘍由来の高効率な Neo-Ag 同定技術を基に、患者リンパ球由来の Neo-Ag 特異的 TCR 導入 CTL を樹立し、OX40 刺激下培養によるメモリー CTL 誘導技術、さらに ICI 治療を組み合わせることにより、独自性の高い高効率な養子免疫細胞療法の開発が可能かどうかを、患者がん組織を免疫不全マウスに移植し生着させた patient-derived xenograft (PDX) マウス前臨床試験モデルを用いて、誘導 CTL の抗腫瘍効果により検証することである。

本研究成果により、既存技術を超える新しいプラットフォームが構築でき、患者ネオ抗原を利用した個別化新規養子免疫細胞療法の臨床開発が可能になる。

## 3. 研究の方法

### 【方法の概要】

- ①患者癌組織を免疫不全 NOG マウスに移植し PDX マウスを作成。患者腫瘍の Neo-Ag 候補を同定する。
- ②PDX マウスの樹立可能症例に対し、候補 Neo-Ag と反応する T細胞クローンの TCR  $\alpha \beta$  を同定し TCR 遺伝子導入 T細胞を作成する。
- ③Neo-Ag 特異的-TCR 遺伝子導入 T細胞を OX40 刺激下に培養し Neo-Ag 特異的-メモリー CTL を誘導する。

④誘導した Neo-Ag 特異的-TCR 遺伝子導入-メモリーCTL を PDX マウスに移植し抗腫瘍活性を証明する。

#### 【具体的な方法】

1) Neo-Ag 候補の同定；

食道癌、胃癌、膀胱癌、乳癌患者各 3 例ずつの癌組織および正常組織より抽出した DNA の whole exome sequence にて、癌組織での体細胞突然変異を同定する。アミノ酸変異を伴う変異に絞り、RNA transcriptome 解析で RNA 発現を示す変異遺伝子を同定する。

NetMHC を用い患者 HLA-class I に親和性の高い変異抗原ペプチドを Neo-Ag 候補として同定する。

2) Neo-Ag および Neo-Ag 反応性 TCR  $\beta$  の同定；

Neo-Ag 候補ペプチド(peptide)を合成し、in vitro で患者末梢血単核球(PBMC)を週 1 回繰り返し刺激。刺激前、後、d7, d14, d21 毎に CD8<sup>+</sup>T 細胞を sampling して RNA を抽出する。

RNA から NGS で網羅的に TCR  $\beta$  の CDR3 配列頻度を各タイムポイントで決定し、刺激毎に peptide 特異的に増加する T 細胞クローンを決定する。

3) 腫瘍組織浸潤性 T 細胞 (TIL) 内の同じ Neo-Ag 特異的 T 細胞クローンの存在確認；

腫瘍組織中の TIL から CD8<sup>+</sup>T 細胞を分離して TCR  $\beta$  NGS を行い、上記で同定した Neo-Ag 特異的 T 細胞と同一のクローン (TCR  $\beta$ ) が TIL にも存在することを確認する。

4) Neo-Ag 特異的 T 細胞クローンの TCR  $\alpha \beta$  遺伝子のクローニング；

上記で同定した Neo-Ag-peptide を利用しマルチマーを合成、患者 PBMC から Neo-Ag 特異的 T 細胞を single cell sorting により単一細胞レベルで cloning し、抽出 RNA から TCR  $\alpha \beta$  遺伝子を同定・cloning する。

5) Neo-Ag 特異的 TCR  $\alpha \beta$  遺伝子導入 T 細胞の作成；

上記同定 TCR  $\alpha \beta$  遺伝子配列を virus vector を用いて患者 T 細胞に遺伝子導入し Neo-Ag 特異的-TCR 遺伝子導入-T 細胞を作成する。

6) OX40 刺激による Neo-Ag 特異的メモリーT 細胞の誘導；

Neo-Ag 特異的-TCR 遺伝子導入-T 細胞を、Neo-Ag peptide 刺激と agonistic な抗 OX40 抗体を作用させ培養、Neo-Ag 特異的メモリーCTL を誘導する。

Neo-Ag 特異性を Neo-Ag peptide 刺激による CTL 細胞内 IFN- $\gamma$  染色にて確認する。

7) PDX モデルによる養子免疫療法の抗腫瘍活性の証明；

患者腫瘍が免疫不全マウスで生着した PDX マウスを作成する。

同一患者の Neo-Ag 特異的メモリーCTL を PDX マウスへ養子移入し抗腫瘍効果を観察する。

CTL 移入直前に抗 PD-1 抗体を CTL に直接作用させ、PDX 腫瘍と移入 CTL の PD-L1-PD-1 結合阻害による CTL の抗腫瘍効果増強を観察する。

## 4. 研究成果

1) PDX モデルの作成；

患者リンパ球由来の Neo-Ag 特異的 TCR 改変メモリーCTL が同一患者の腫瘍に対して生体で抗腫瘍機能を発揮することを確認するため、大腸癌手術患者 1 名、胃癌手術患者 1 名、乳癌手術患者 1 名から患者腫瘍を摘出 (F0 腫瘍) した。

次に、NOG マウス (免疫不全マウス) の皮下に移植し、生着した腫瘍 (F1) を摘出した。

さらに NOG マウスに移植して生着した腫瘍 (F2) を摘出し、Neo-Ag 特異的 TCR 改変メモリーCTL の抗腫瘍効果評価実験まで凍結保存した。

各患者の Neo-Ag 特異的 TCR 改変 CTL 作成のためリンパ球は末梢血から分離後凍結保存した。

2) Neo-Ag 候補の同定；

大腸癌、胃癌、乳癌患者の手術摘出癌組織および正常組織より抽出した DNA の whole exome sequence にて、癌組織での体細胞突然変異を同定した。

アミノ酸変異を伴う変異に絞り、RNA transcriptome 解析で RNA 発現を示す変異遺伝子を同定し NetMHC を用い患者 HLA-class I に親和性の高い変異抗原ペプチドを Neo-Ag 候補として同定した。

多数の Neo-Ag 候補が同定されたため、リンパ球に反応性が高い Neo-Ag を絞り込む目的で、質量分析による抗原ペプチドの選別を行った。

3) インフルエンザ特異的 TCR  $\alpha \beta$  cDNA のヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞への導入モデル実験と TCR 導入 T 細胞の表現型の評価；

インフルエンザペプチド (Flu) 抗原をモデルとして、Neo-Ag 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた adaptive cancer immunotherapy のプラットフォームを作成した。

HLA-A\*02:01 拘束性インフルエンザ特異的 T 細胞クローンを単一細胞として選別し、各クローンの TCR  $\alpha$   $\beta$  cDNA を配列決定した。

83 の単一細胞選別 CD8<sup>+</sup> T 細胞クローンで TCR  $\alpha$  および  $\beta$  の配列を決定した。

そのうち、18 および 14 のクローンが同一であり、それらの TCR  $\beta$  CDR3 は NGS によって同定されたものと一致した。

次に、Flu-M1 特異的 TCR  $\alpha$   $\beta$  を発現する PiggyBac ベクターを構築し、Jurkat 細胞への導入に成功した。

この細胞はテトラマーアッセイにより Flu-M1 に対する特異性を示した (65.3%テトラマー陽性)。

また、インフルエンザ特異的 TCR  $\alpha$   $\beta$  cDNA 発現レトロウイルスベクターを構築した。

これにより TCR  $\alpha$   $\beta$  cDNA をヒト初代 CD8<sup>+</sup> T 細胞に安定的に導入でき、導入効率は  $46.1 \pm 15.0\%$ であった。

次に、導入された CD8<sup>+</sup> T 細胞の表現型をフローサイトメトリーで評価した。

CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Flu-Tetramer<sup>+</sup> T 細胞のうち、CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> central memory T 細胞は  $8.5 \pm 5.4\%$ であったのに対し、CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> ナイーブ T 細胞は  $6.2 \pm 4.5\%$ であった。

このプラットフォームと PDX モデルを組み合わせることで、ヒトの癌に対する適応免疫療法を迅速に開発するための効果的なアプローチとなる可能性があることがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Andreas Michael Sihombing <sup>1</sup> , Satoshi Murata <sup>1,2</sup> , Miyuki Shimoji <sup>1</sup> , Sakura Nakao <sup>1</sup> , Katsushi Takebayashi <sup>1</sup> , Hirokazu Kodama <sup>1</sup> , Masatsugu Kojima <sup>1</sup> , Tomoyuki Ueki <sup>1</sup> , Naomi Kitamura <sup>3</sup> , Mina Kitamura <sup>1</sup> , Aya Tokuda <sup>1</sup> , Toru Miyake <sup>1</sup> , Eiji Mekata <sup>3</sup> , Masaji Tani <sup>1</sup>
2 . 発表標題 CD44+ cancer cells in the free peritoneal cavity and surgical manipulation as the cause of gastric cancer-derived peritoneal metastasis
3 . 学会等名 JCA-AACR (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Miyuki Shimoji 1), Satoshi Murata 2), Masatsugu Kojima 1), Mina Kitamura 1), Andreas Michael Sihombing 1), Sakura Nakao 1), Naomi Kitamura 3), Tomoyuki Ueki 1), Katsushi Takebayashi 1), Hirokazu Kodama 1), Aya Tokuda 1), Toru Miyake 1), Eiji Mekata 3), Masaji Tani 1)
2 . 発表標題 Characterization of Tumor-associated lymphocytes (TAL) in malignant ascites of immune-tolerant mice
3 . 学会等名 JCA-AACR (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Satoshi Murata, Miyuki Shimoji, Masatsugu Kojima, Mina Kitamura, Andreas Michael Sihombing, Sakura Nakao, Naomi Kitamura, Tomoyuki Ueki, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Aya Tokuda, Toru Miyake, Eiji Mekata, Masaji Tani
2 . 発表標題 Induction of tumor Ag-specific CTL using tumor-associated lymphocytes (TAL) in malignant ascites of immune-tolerant mice
3 . 学会等名 第80回日本癌学会
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Miyuki Shimoji <sup>1</sup> , Satoshi Murata <sup>1,2</sup> , Andreas Michael Sihombing <sup>1</sup> , Sakura Nakao <sup>1</sup> , Katsushi Takebayashi <sup>1</sup> , Hirokazu Kodama <sup>1</sup> , Masatsugu Kojima <sup>1</sup> , Tomoyuki Ueki <sup>1</sup> , Naomi Kitamura <sup>3</sup> , Mina Kitamura <sup>1</sup> , Aya Tokuda <sup>1</sup> , Toru Miyake <sup>1</sup> , Eiji Mekata <sup>3</sup> , Masaji Tani <sup>1</sup>
2 . 発表標題 Crosstalk of microsomal glutathione transferase 1 (MGST1) and CD44 in T3M4 human pancreatic cancer cells on hyperthermic model
3 . 学会等名 第80回日本癌学会
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名	Andreas Michael Sihombing <sup>1</sup> , Satoshi Murata <sup>1,2</sup> , Miyuki Shimoji <sup>1</sup> , Sakura Nakao <sup>1</sup> , Katsushi Takebayashi <sup>1</sup> , Hirokazu Kodama <sup>1</sup> , Masatsugu Kojima <sup>1</sup> , Tomoyuki Ueki <sup>1</sup> , Naomi Kitamura <sup>3</sup> , Mina Kitamura <sup>1</sup> , Aya Tokuda <sup>1</sup> , Toru Miyake <sup>1</sup> , Eiji Mekata <sup>3</sup> , Masaji Tani <sup>1</sup>
2. 発表標題	Relationship between CD44-positive cancer stem-like cells and gastric cancer-derived peritoneal metastasis
3. 学会等名	第80回日本癌学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Sakura Nakao, Satoshi Murata, Miyuki Shimoji, Masatsugu Kojima, Mina Kitamura, Andreas Michael Sihombing, Naomi Kitamura, Tomoyuki Ueki, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Aya Tokuda, Toru Miyake, Eiji Mekata, Masaji Tani
2. 発表標題	Overcoming immune tolerance to tumor antigens and inducing tumor antigen-specific CTLs by combined immunotherapy
3. 学会等名	第80回日本癌学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Hidetoshi Sumimoto, Koji Terada, Yasutoshi Agata, Satoshi Murata, Yataro Daigo
2. 発表標題	NGS-based identification of NeoAgs with their corresponding TCR and its application to adaptive cancer immunotherapy
3. 学会等名	第27回日本がん免疫学会総会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Hidetoshi Sumimoto, Koji Terada, Yasutoshi Agata, Satoshi Murata, Yataro Daigo
2. 発表標題	Development of adaptive cancer immunotherapy by NGS-based identification of neoantigen-specific T cell receptor genes
3. 学会等名	第82回日本癌学会
4. 発表年	2023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 分担者	住本 秀敏  (Sumimoto Hidetoshi)  (00306838)	滋賀医科大学・医学部・特任講師   (14202)	
研究 分担者	下地 みゆき  (Shimoji Miyuki)  (50796448)	滋賀医科大学・医学部・技術補佐員   (14202)	
研究 分担者	谷 眞至  (Tani Masaji)  (60236677)	滋賀医科大学・医学部・教授   (14202)	

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