

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19532

研究課題名（和文）ネオアンチゲン反応性リンパ球を用いた治療抵抗性乳癌治療法の開発

研究課題名（英文）Development of therapy-resistant breast cancer treatment using neoantigen-reactive lymphocytes

研究代表者

久保 真（KUBO, Makoto）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：60403961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞に特異的に生じる体細胞性遺伝子変異に由来するペプチドであるネオアンチゲンは、がん細胞特異的で、高い免疫原性を持っている。がん細胞HLA Class I/IIに親和性のあるネオアンチゲンペプチド、すなわちより強い抗原性を有したネオアンチゲンを予測し、樹状細胞にパルスし、腫瘍周囲、リンパ節、末梢血から採取した腫瘍浸潤リンパ球（TIL）より細胞傷害性リンパ球（CTL）誘導に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞から得られるネオアンチゲンは、精密に個別化された「情報」であるとともに「治療ターゲット」に他ならない。特に、免疫のメモリー機能に重要な役割を果たすHLA Class IIに親和性のあるネオアンチゲンは、免疫機能を強化する上に機能を持続する可能性があることを初めて証明した（Morisaki T, Kubo M, et al. Front Immunol, 2023）。臨床試験を経て承認される多くの薬剤は限りなく高騰し、個人の「経済毒性」のみならず、わが国においては輸入超過の原因ともなっている。現場で患者さんの個人的・社会的立場に寄り添える国産創薬への可能性を明らかにした。

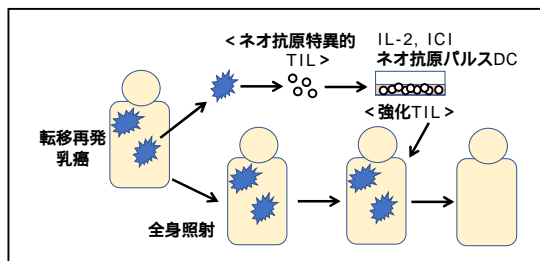
研究成果の概要（英文）：Neoantigens, which are peptides derived from somatic gene mutations that occur specifically in cancer cells, are cancer cell-specific and highly immunogenic. Neoantigen peptides with affinity for cancer cells MHC Class I/II, that is, neoantigens with stronger antigenicity are predicted, and pulsed to dendritic cells to generate tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) collected from surrounding tumors, lymph nodes, and peripheral blood. We succeeded in inducing cytotoxic lymphocytes (CTLs) from those TILs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ネオアンチゲン 体細胞性遺伝子変異 ペプチド TIL 細胞医薬

1. 研究開始当初の背景

それまでの研究で、がん細胞に特異的に生じる体細胞性遺伝子変異に由来するペプチドであるネオアンチゲンは、がん細胞特異的で、より高い免疫原性を持っていることを明らかにしてきた (Morisaki T, et al. Sci Rep 2018 (当時投稿中))。2018年、Rosenbergらは、腫瘍の遺伝子変異に特異的な腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を強化することにより、治療抵抗性乳癌を消滅させたと報告した (Nature Med, 右図はイメージ)。本研究では、ネオ抗原に対し生体内で実際に反応を示すリンパ球を選別し、「細胞医薬」として治療に応用することが目的である。



2. 研究の目的

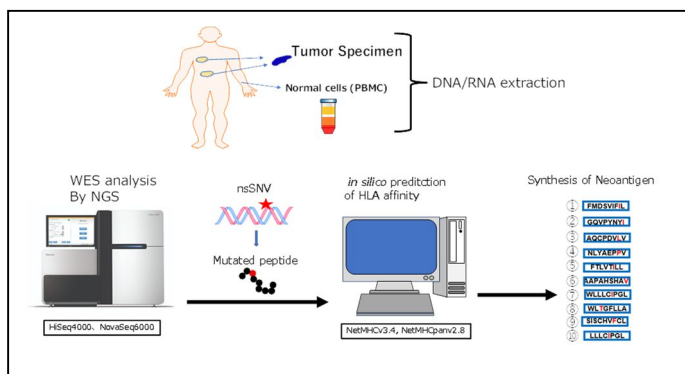
本研究では、ネオアンチゲンに対し生体内で実際に反応を示すリンパ球を選別し、「細胞医薬」として治療に応用することが目的である。具体的には、進行乳癌で手術時に切除する腫瘍に限らず、腋窩等のリンパ節のうち、実際に転移のあるリンパ節サンプルほか、末梢血リンパ球から腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を採取する。ネオ抗原を認識するエピトープを持つリンパ球を抽出し強化・増殖させる技術が可能となれば、その増殖させたリンパ球を体内に移入する TIL 療法が可能となり、高い抗腫瘍効果を発揮すると考えられる。本研究で、強化 TIL 療法への道筋が基本的に明らかとなれば、副作用は極めて少ない個別化精密医療が実現し、癌治療のパラダイムを大きく変える可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 乳癌のネオ抗原解析、ネオアンチゲンペプチドの作成

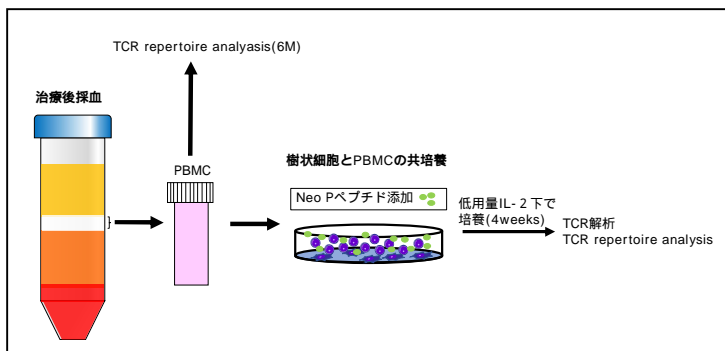
全エクソーム解析と RNA シークエンスを行い、非同義一塩基置換すなわちアミノ酸置換を伴う遺伝子変異数を算出、変異ペプチドに応じた RNA 発現と HLA に対する親和性をソフトウェアで解析してネオアンチゲンペプチドを予測した。オンコセラピーサイエンス社、Cancer Precision Medicine 社と共同研究は始まっており (Morisaki T, Kubo M, Immunol Invest. 13;1-18, 2020)、導入は順調であった。

右図の手順に従い、乳癌患者 30 人 (Luminal A 8 人、Luminal B 18 人、TNBC 4 人) から得られた乳癌組織および末梢血単核球を用いて、NGS による変異遺伝子解析および HLA タイピング、*in silico* による HLA Class I/II 拘束性のネオアンチゲン予測解析を行った。ネオアンチゲンペプチドの定義は、HLA に対する親和性が  $IC_{50} < 500nM$  とした。また、腫瘍組織の mRNA シーケンスにより変異遺伝子の発現解析を行った。(2024年7月日本乳癌学会で発表予定)



(2) 各種 TIL の機能解析

進行乳癌で手術時に腫瘍周囲組織、リンパ節、末梢血より TIL を保存する。MHC/ペプチド複合体を蛍光物質で標識し、4量体化したテトラマー試薬とフローサイトメトリーを用いて、ネオ抗原ペプチドのみを認識する T 細胞を特異的、定量的に測定する (MHC テトラマー解析)。さらに、TIL より抽出した RNA を用いて TCR/BCR レパートア解析を行い、次世代シーケンスにより定量的に TCR や BCR の遺伝子配列を決定し、TIL クローンの種類や頻度を解析する (右図)。



### (3) TIL療法強化におけるネオ抗原ペプチド樹状細胞ワクチンの機能解析

上記で予測されたネオ抗原ペプチドを自己PBMCから樹立した樹状細胞(DC)にパルスし、TILと共培養する。TILの強化において、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)やネオ抗原ペプチド樹状細胞ワクチンの意義をElispot試験、細胞障害試験、マウス移植・治療実験を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 乳癌のネオ抗原解析、ネオ抗原ペプチドの作成

遺伝子変異数の平均は79.4個(10-312)、非同義一塩基置換(nsSNV)数の平均は47.9個であった。HLA Class I拘束性ネオ抗原数の平均は123個(13-444)、HLA Class II拘束性ネオ抗原数の平均は2082(191-10414)であった。Luminal Aと比較して、Luminal BおよびTNBCは遺伝子変異数が多く、その影響でネオ抗原数も多かった(HLA class I: 46.6 vs 152, HLA class II: 711 vs 2404)。親和性IC50 < 50nMかつ変異遺伝子の一定の発現(RNAリード数5以上)と条件設定をした場合、予測されるClass I拘束性ネオ抗原数の平均は4.5個、Class II拘束性ネオ抗原数の平均は、10.2個となった。

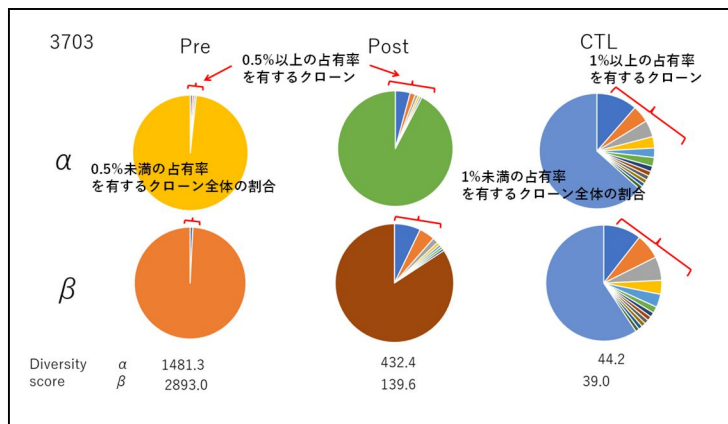
乳癌では、HLA Class II拘束性のネオ抗原数はHLA Class Iと比較して著明に多かった。Luminal Aと比較して、Luminal BおよびTNBCはネオ抗原数が多かった。実際の治療標的として絞り込むことを考え、より高精度な予測ツールの開発に向けて研究を進めている。

### (2) 各種TILの機能解析

HLA Class I/II拘束性ネオ抗原刺激樹状細胞ワクチン刺激前(Pre)と刺激後(Post)における末梢血単核球(Tリンパ球)のT細胞受容体レパトワ解析を施行した(樹状細胞成熟化については下(3)を参照)。3例の解析が終わり、症例3703についてデータを示す(未発表データ)。

用いたネオ抗原ペプチドの数は、HLA class I拘束性 short peptide 3個、HLA Class II拘束性 long peptide 1個である。下図円グラフの一つの区画が一つのクローンを示しており、0.5%以上の占有率を有するクローンのみそれぞれを一つの区画として表し、0.5%未満の占有率のクローンはまとめて一つの区画とした。また、TCRクローンの多様性指数(inverse Simpson's Diversity index; DI)を計算した(数値が高いほど多様性が高い。すなわち、特定のクローンが増えると多様性指数は減少する)。症例3703においては、0.5%以上の占有率を有するクローンの割合が増加し、DIも低下した。すなわち、ワクチンに伴い特異的なT細胞クローンが増加したことが示唆された。

次に、末梢血リンパ球および一つのHLA Class IIネオ抗原ペプチドを用いてネオ抗原ペプチド刺激樹状細胞を3週間程度共培養し、共培養後のTリンパ球(CTLと定義)のTCRレパトワ解析をおこなった。1%以上の占有率を有するクローンの割合が増加し、DIも顕著に低下した。それぞれの症例で、複数のクローンが増加しており、単一のHLA Class II拘束性ペプチドで複数の特異的なT細胞が刺激され増殖したことが示唆された。

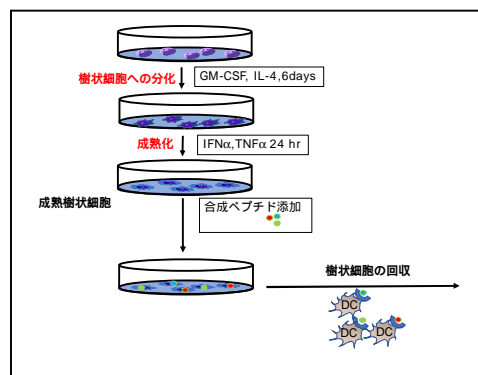


### (3) TIL療法強化におけるネオ抗原ペプチド樹状細胞ワクチンの機能解析

ネオ抗原ペプチド樹状細胞ワクチンの意義をElispot試験、細胞障害試験を用いて解析した症例3703についてデータを示す(未発表データ)。

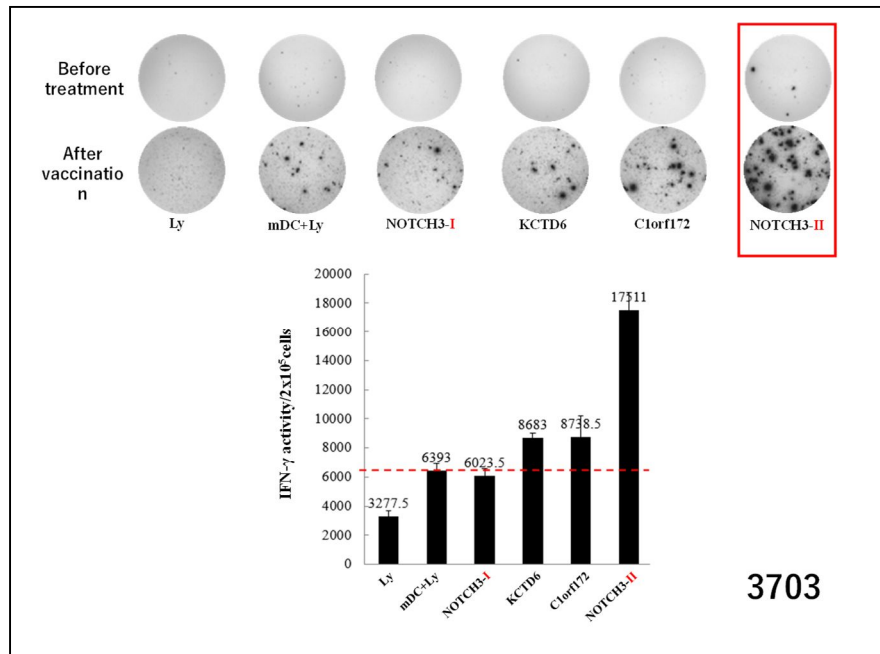
右に樹状細胞の成熟化と樹状細胞ワクチン作製の過程を示す。回収したネオ抗原ペプチド樹状細胞ワクチンを各種Tリンパ球と共培養した。

次に、ネオ抗原ペプチド樹状細胞ワクチンの評価をElispot試験、細胞障害試験で行った。その結果を下に示す。ネオ抗原ペプチドとしてNOTCH3-IIを用いた場合に、両試験において強い反応が誘導されており、強い免疫反応が誘導できているこ



とが証明された。このことより、ネオアンチゲンペプチド樹状細胞ワクチンは強い免疫反応を誘導する可能性がある。

以上、すべての結果解析を待って、論文投稿準備中である。この結果を発展させ、臨床試験、臨床実装へ進むべく検討している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Arimura Akiko, Sakai Kazuko, Kaneshiro Kazuhisa, Morisaki Takafumi, Hayashi Saori, Mizoguchi Kimihisa, Yamada Mai, Kai Masaya, Ono Mayumi, Nishio Kazuto, Nakamura Masafumi, Kubo Makoto	4. 巻 16
2. 論文標題 TP53 and/or BRCA1 Mutations Based on CtDNA Analysis as Prognostic Biomarkers for Primary Triple-Negative Breast Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers16061184	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 Morisaki Shinji, Onishi Hideya, Morisaki Takafumi, Kubo Makoto, Umebayashi Masayo, Tanaka Hiroto, Koya Norihiro, Nakagawa Shinichiro, Tsujimura Kenta, Yoshimura Sachiko, Yew Poh Yin, Kiyotani Kazuma, Nakamura Yusuke, Nakamura Masafumi, Kitazono Takanari, Morisaki Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Immunological analysis of hybrid neoantigen peptide encompassing class I/II neopeptide-pulsed dendritic cell vaccine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1223331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1223331	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 Mizoguchi Kimihisa, Kawaji Hitomi, Kai Masaya, Morisaki Takafumi, Hayashi Saori, Takao Yuka, Yamada Mai, Shimazaki Akiko, Osako Tomofumi, Arima Nobuyuki, Okido Masayuki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi, Kubo Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Granzyme B Expression in the Tumor Microenvironment as a Prognostic Biomarker for Patients with Triple-Negative Breast Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15184456	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 Morisaki Takashi, Morisaki Takafumi, Kubo Makoto, Morisaki Shinji, Nakamura Yusuke, Onishi Hideya	4. 巻 14
2. 論文標題 Lymph Nodes as Anti-Tumor Immunotherapeutic Tools: Intranasal-Tumor-Specific Antigen-Pulsed Dendritic Cell Vaccine Immunotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14102438	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 SHIMAZAKI AKIKO, KUBO MAKOTO, KURATA KANAKO, TAKAO YUKA, HAYASHI SAORI, HARADA YURINA, KAWAJI HITOMI, KANESHIRO KAZUHISA, YAMADA MAI, KAI MASAYA, NAKAMURA MASAFUMI	4. 巻 42
2. 論文標題 CCND1 Copy Number Variation in Circulating Tumor DNA from Luminal B Breast Cancer Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4071 ~ 4077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15904	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 HAYASHI SAORI, KUBO MAKOTO, MATSUZAKI SAWAKO, KAI MASAYA, MORISAKI TAKAFUMI, YAMADA MAI, KANESHIRO KAZUHISA, TAKAO YUKA, SHIMAZAKI AKIKO, NAGAYOSHI KINUKO, MIZUUCHI YUSUKE, NAKAMURA MASAFUMI	4. 巻 42
2. 論文標題 Significance of the Multi-gene Panel myRisk in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4097 ~ 4102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15907	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 Hayashi Saori, Kubo Makoto, Kaneshiro Kazuhisa, Kai Masaya, Yamada Mai, Morisaki Takafumi, Takao Yuka, Shimazaki Akiko, Shikada Sawako, Nakamura Masafumi	4. 巻 29
2. 論文標題 Genetic medicine is accelerating in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 659 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-022-01342-4	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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 溝口公久, 森崎隆史, 甲斐昌也, 高尾由佳, 山田舞, 島崎亜希子, 林 早織, 茂地智子, 伊地知秀樹, 森崎隆, 吉住朋晴, 久保真, 中村雅史
2. 発表標題 乳癌患者とネオアンチゲン解析との関連性の検討
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久保真, 森崎隆史, 溝口公久, 中垣環, 馬場英司, 中村雅史
2. 発表標題 腫瘍遺伝子変異量(TMB):乳癌におけるバイオマーカーとしての意義
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田舞, 久保真, 甲斐昌也, 森崎隆史, 溝口公久, 高尾由佳, 林早織, 島崎亜希子, 古賀艶可, 落合百合菜, 茂地智子, 伊地知秀樹, 吉住朋晴, 中村雅史
2. 発表標題 日本人乳癌患者の腸内細菌叢解析についての検討
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 トリプルネガティブ乳癌の腫瘍微小環境におけるGranzyme Bのバイオマーカーとしての役割
2. 発表標題 溝口公久, 久保真, 高尾由佳, 島崎亜希子, 林早織, 山田舞, 森崎隆史, 甲斐昌也, 中村雅史
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久保 真
2. 発表標題 TN乳癌の治療戦略・DNA損傷と腫瘍免疫
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保 真, 鹿田 佐和子, 甲斐 昌也, 森崎 隆史, 木村 緑, 小川 昌宣, 加藤 聖子, 水内 祐介, 中村 雅史
2. 発表標題 HBOC診療の現状と課題
3. 学会等名 第28回日本遺伝性腫瘍学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 早織, 久保 真, 森 瞳美, 甲斐 昌也, 山田 舞, 金城 和寿, 森崎 隆史, 高尾 由佳, 島崎 亜希子, 中村 雅史
2. 発表標題 シングルセルRNA sequencingシーケンシングを用いたHER2陽性乳癌治療抵抗性の網羅的遺伝子解析
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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	甲斐 昌也 (KAI Masaya) (10755242)	九州大学・医学研究院・共同研究員  (17102)	
研究分担者	森 瞳美 (MORI Hitomi) (70795541)	九州大学・医学研究院・共同研究員  (17102)	
研究分担者	森崎 隆 (MORISAKI Takashi) (90291517)	九州大学・医学研究院・共同研究員  (17102)	



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
研究分担者	井手野 昇  (IDENO Noboru)  (90883421)	九州大学・医学研究院・助教    (17102)	

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