

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861133

研究課題名(和文) 肺がんの複雑な遺伝子変異を利用した腫瘍浸潤リンパ球療法の開発を目指した基礎的検討

研究課題名(英文) Development of adoptive T cell therapy for lung cancer that have complicated mutations

研究代表者

吉川 聡明 (Yoshikawa, Toshiaki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：00625957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌免疫療法の標的として癌の遺伝子変異に由来する抗原が注目されている。そこで、複雑な遺伝子変異を持つ肺がん患者に対して免疫療法を開発するために、患者個々で異なる遺伝子変異に由来する抗原を認識した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を使用することの有効性を調べることを目的とした。肺がん患者の手術切除組織からTILを培養する技術を確立した。また、同時にがん細胞株の樹立も試みており、今後TILの自己がん細胞に対する傷害性を確認していく。さらに次世代シーケンサー解析により遺伝子変異由来抗原の候補をあげ、TILの認識抗原を同定する。これらの解析により肺がん患者でのTILを使用した個別化細胞移入療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：Recent clinical data confirm the long-standing evidence from experimental cancer models. The antigens encoded by the tumor-specific somatic mutations are potentially best targets for adoptive T cell therapy. Tobacco smoke-associated lung cancers often carry 100-200 somatic mutations. In addition, the majority of all these mutations are individually specific. To develop cancer immunotherapy for lung cancer, we evaluated the potential of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) that recognize mutated antigens. We could expanded TILs and also tried to establish cancer cell lines from tumor tissues of lung cancer patients. Analysis of the cytotoxicity of TILs against autologous cancer cells is a future challenge. Furthermore, the next generation sequencing approach is carried out to identify the antigens recognized by TILs. This study may provide a personalized immunotherapy for lung cancer patients targeting autologous tumor-specific mutated antigens.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：肺がん 遺伝子変異由来抗原 腫瘍浸潤リンパ球

1. 研究開始当初の背景

がんの治療法として、外科療法、化学療法、放射線療法の3大療法に続く4番目の方法として大きな期待が寄せられているものに免疫療法がある。中でも強力な免疫療法として細胞移入療法が知られている。海外ではメラノーマを中心に進められており、化学療法やX線照射による体内のリンパ球除去と、体外で大量培養した腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating Lymphocytes: TIL) 移入を組み合わせることで70%以上の患者に有効であったことが報告されている。理由として、メラノーマでは紫外線の影響により遺伝子変異が多く生じていると言われており、実際に自己腫瘍を認識できるTILの認識抗原を調べてみると多くは遺伝子変異に由来するペプチドであることも近年報告されている。しかし、副作用の強さやTIL大量培養の困難さなどから、未だ多くのがん患者に行える治療法ではない。

肺がんにおいても喫煙者の肺がんには代表されるように多くの遺伝子変異が生じており、変異の種類や数は患者毎に大きく異なることが知られている。一方、腫瘍内にはTILが多く浸潤していることも確認できており、これらのTILが遺伝子変異に由来するペプチドを認識していることが予想される。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し標的を絞った治療を行うよりも、患者個々で異なる遺伝子変異に由来する様々な抗原を認識できるTILを使用することが有効な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、このような肺がん患者に対する免疫療法を開発するために、患者個々で異なる遺伝子変異に由来する抗原を認識したTILを使用することの有効性を調べることを目的とした。具体的には、肺がん組織からTILと腫瘍細胞を培養し、TILが自己腫瘍細胞を認識できるかどうかを確認するとともに、TILの認識抗原の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 抗原ペプチド同定法の検討

次世代シーケンサーにより同定したアミノ酸置換を伴う遺伝子変異に起因する抗原ペプチド候補の中から実際にTILが認識しているペプチドを同定するには、自己のターゲット細胞にペプチドを提示させ、TILとの反応性を調べる必要がある。当初は、オーバーラップペプチドを作製する計画であったが、候

補となる遺伝子変異一つに対して9種類のペプチドを作製する必要があるため、患者一人に100種類以上ある遺伝子変異々々に対してペプチドを用意することは非常に困難である。そのため、変異部位を含む長鎖ペプチド、あるいは長鎖ペプチドを発現するDNAまたはmRNAを細胞に導入し、ペプチドを提示させることとした。そこでまず自己のターゲット細胞にペプチドを提示させる方法として、抗原ペプチドを含む長鎖ペプチドをコードするmRNAをin vitro合成し、細胞に導入し発現させる方法を検討した。実験系構築のためのモデル抗原として細胞から内因性に提示されることが既に確認されているGlypican-3 (GPC3)を用い、CTLには我々が以前樹立したGPC3ペプチド特異的CTLクローンを使用した。

(2) 肺がん患者組織検体を使用した解析

未治療の肺がん患者を対象とし、肺がん組織切除検体を使用する研究計画を立て、国立がん研究センター研究倫理審査委員会に申請し、研究許可を得た。

まず、肺がんの切除検体からTILを培養する技術を確認した。TILは高濃度IL-2を添加し培養した。手術切除検体を分散処理し、3つに分けそれぞれTIL、腫瘍細胞、線維芽細胞として増殖させた。腫瘍細胞はPatient-derived xenograft (PDX)として免疫不全マウスに移植し、がん細胞株の樹立を試みた。TILが自己の腫瘍に反応するかどうかを細胞傷害性試験とIFN- γ ELISPOTアッセイにより確認した。ネガティブコントロールの正常細胞として線維芽細胞を使用した。

腫瘍組織と正常組織の一部からDNAとRNAを抽出し、次世代シーケンサー解析によりアミノ酸置換を伴う遺伝子変異やがんを高発現している遺伝子を同定する。同定した候補ペプチドの中からTILとの反応性を調べることによりTILの認識抗原とそのエピトープペプチドを同定する。

4. 研究成果

(1) 抗原ペプチド同定法の検討

GPC3全長のmRNA、およびGPC3由来長鎖ペプチドのmRNAをin vitro合成した。合成したmRNAを導入したターゲット細胞とGPC3ペプチド特異的CTLクローンを共培養し、IFN- γ の産生をELISPOT解析にて調べた。その結果GPC3タンパクがターゲット細胞内で発現しプロセスされ、ペプチドがHLA分子に結合して提示され、CTLクローンによって認識されることが確認された。また、一過性の発現であることやタンパク発現と抗原提示の時間

差を考慮し mRNA 導入から CTL クローンと反応させるまでの時間を検討すると、CTL クローンの反応は大きく異なり、最適な時間の設定を行った。これらより次世代シーケンサー解析から選出した多数の遺伝子変異由来候補ペプチドの中から TIL が認識する抗原ペプチドを効率良くハイスループットに同定するための実験系を確立した。

(2) 肺がん患者組織検体を使用した解析

インフォームドコンセントにより同意が得られた肺がん患者の手術切除検体を使用し、TIL の培養を行った。2 週間以内に TIL の増殖が確認され、TIL 培養の技術を確立した。フローサイトメーターでの解析により、増殖した細胞は CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、NK 細胞を多く含むリンパ球であることを確認した。

正常組織を使用した培養からは、線維芽細胞を増殖させた。フローサイトメーターでの解析により、増殖した線維芽細胞は HLA-class I 分子を細胞表面に高発現していることが確認され、自己の HLA を持つ有用なターゲット細胞として使用できる見込みを得た。

また、Patient-derived xenograft (PDX) の技術によるがん細胞株の樹立も試みており、今後 TIL の自己がん細胞に対する傷害性を確認していく。また、次世代シーケンサー解析により遺伝子変異由来抗原の候補をあげ、TIL との反応性を調べることで TIL の認識抗原を同定する。これらの解析により肺がん患者での TIL を使用した個別化細胞移入療法の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Fujinami N, Yoshikawa T, Sawada Y, Shimomura M, Iwama T, Sugai S, Kitano S, Uemura Y, Nakatsura T. Enhancement of antitumor effect by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody: Study in a murine model. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 5 ; 482-491, 2016
2. Sugai S, Yoshikawa T, Iwama T, Tsuchiya N, Ueda N, Fujinami N, Shimomura M, Zhang R, Kaneko S, Uemura Y, Nakatsura T. Hepatocellular carcinoma cell sensitivity to V α 9V δ 2 T lymphocyte-mediated killing is increased by zoledronate. *Int. J. Oncol.* 48: 1794-1804, 2016
3. Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, Yoshimura M, Tsuchiya N, Takahashi M, Nobuoka D, Gotohda N, Takahashi S, Kato Y, Konishi M, Kinoshita T, Ikeda M, Nakachi K, Yamazaki N, Mizuno S, Takayama T, Yamao K, Uesaka K, Furuse J, Endo I, Nakatsura T. Phase II study of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients. *Oncol Immunology*. in press 2015
4. Iwama T, Uchida T, Sawada Y, Tsuchiya N, Sugai S, Shimomura M, Yoshikawa T, Zhang R, Uemura Y, Nakatsura T. Vaccination with liposome-coupled glypican-3-derived epitope peptide stimulates cytotoxic T lymphocytes and inhibits GPC3-expressing tumor growth in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 469(1):138-43. 2016 Jan
5. Mohammad A.S, Tomita Y, Yuno A, Hirayama M, Irie A, Tsukamoto H, Senju S, Yuba E, Yoshikawa T, Kono K, Nakatsura T, Nishimura Y. Identification of Glypican-3-Derived Long Peptides Activating both CD8+ and CD4+ T-cells; Prolonged Overall Survival in Cancer Patients with Th Cell Response. *Oncol Immunology*. 2015 Aug 31;5(1):e1062209. eCollection 2016.
6. Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y, Nakatsura T. A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 46:497-504, 2015 Feb
7. Sawada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Iwama T, Endo I, Nakatsura T. Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Oncol.* 46:28-36, 2015 Jan
8. Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Maekawa R, Nakatsura T. Large-scale expansion of T cells and peptide-specific cytotoxic T cells using zoledronate for adoptive immunotherapy. *Int. J. Oncol.* 45:1847-1856, 2014 Nov
9. Yabusaki M, Sato J, Kohyama A, Kojima T, Nobuoka D, Yoshikawa T, Sawada Y, Murakami K, Gohda K, Okegawa T, Nakamura M, Takamatsu K, Ito M, Kaneko K, Nakatsura T. Detection and preliminary evaluation of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with eight types of cancer using a telomerase-specific adenovirus. *Oncol. Rep.* 32:1772-1778, 2014 Nov

10. Ofuji K, Saito K, Yoshikawa T, Nakatsura T. Critical analysis of the potential of targeting GPC3 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. 1:35-42, 2014 May

〔学会発表〕(計 23 件)

1. HLA class I expression in a tumor is higher than that out of a tumor: Promising new findings for antigen-specific cancer immunotherapy. Nobuoka D, Takahashi M, Yoshikawa T, Yagi T, Fujiwara T, Nakatsura T. AACR 106th Annual Meeting 2015 (Philadelphia), April 18-22, 2015
2. Phase II study of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients. Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, Yoshimura M, Tsuchiya N, Takahashi M, Nobuoka D, Mizuno S, Endo I, Nakatsura T. AACR 106th Annual Meeting 2015 (Philadelphia), April 18-22, 2015
3. Efficient crosspresentation of oncofetal antigen (Glypican-3)-derived long peptides encompassing CTL and promiscuous Th cell epitopes using a novel liposome. Mohammad A.S, Tomita Y, Yuno A, Hirayama M, Irie A, Tsukamoto H, Senju S, Yuba E, Yoshikawa T, Kono K, Nakatsura T, Nishimura Y. AACR 106th Annual Meeting 2015 (Philadelphia), April 18-22, 2015
4. GPC3 expression could be the biomarker of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients: Results from phase II trial. Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, Yoshimura M, Tsuchiya N, Endo I, Nakatsura T. *がん免疫療法・マクロファージ国際会議 2015 (東京)*(第 19 回日本がん免疫学会総会と第 23 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウムの共同) 2015 年 7 月 9 日~11 日(口頭)
5. HLA class I expression in and out of a tumor: Promising new findings for antigen-specific cancer immunotherapy. Nobuoka D, Takahashi M, Yoshikawa T, Yagi T, Fujiwara T, Nakatsura T. *がん免疫療法・マクロファージ国際会議 2015 (東京)*(第 19 回日本がん免疫学会総会と第 23 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウムの共同) 2015 年 7 月 9 日~11 日
6. Phase I study of vaccine therapy with a cocktail of peptides for pediatric patients with refractory solid tumors. Hosono A, Kaneda H, Hara J, Nitani C, Kohashi K, Manabe A, Yoshikawa T, Nakatsura T. *がん免疫療法・マクロファージ国際会議 2015 (東京)*(第 19 回日本がん免疫学会総会と第 23 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウムの共同) 2015 年 7 月 9 日~11 日(口頭)
7. GPC3 ペプチドワクチンを用いた肝細胞がん根治的治療後補助療法の臨床第 II 相試験におけるバイオマーカー探索、中面哲也、澤田雄、吉川聡明、高橋真理、大藤和也、吉村麻友子、第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会(名古屋) 2015 年 10 月 7 日
8. ヒト健常人・がん患者血液を用いたヒト化抗 CD4 抗体 (IT1208) による invitro での CD4 陽性細胞除去の検証、下村真菜美、正田香世子、吉川聡明、須貝詩織、北野滋久、横地祥司、伊藤哲、松島綱治、植村靖史、中面哲也、第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会(名古屋) 2015 年 10 月 7 日
9. Phase II trial of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients. (肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する glypican-3 ペプチドワクチンの臨床第 2 相試験), Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, Yoshimura M, Tsuchiya N, Endo I, Nakatsura T. 第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015 年 10 月 8 日~10 日(口頭)
10. Phase I study of vaccine therapy with a cocktail of peptides for pediatric patients with refractory solid tumors. (難治性小児固形腫瘍に対するペプチドカクテルワクチン療法の第 I 相試験), Hosono A, Kaneda H, Hara J, Nitani C, Yoshikawa T, Kohashi K, Nakatsura T. 第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015 年 10 月 8 日~10 日(口頭)
11. Vaccination of GPC3-derived peptide-coupled liposome inhibits GPC3 expressing tumor growth. (GPC3 由来ペプチド結合リポソームワクチン投与により GPC3 発現がん細胞の成長を抑制する), Tsuchiya N, Iwama T, Uchida T, Shimomura M, Yoshikawa T, Fujinami N, Saito Y, Uemura Y, Nakatsura T. 第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015 年 10 月 8 日~10 日
12. Regulation of IL-12 family cytokine/Osteopontin balance in DCs by ligand activation of iNKT cells. (活性化 iNKT による IL-12 ファミリーサイトカイン/オステオポンチンのバランス制御), Iwama T, Suzuki M, Liu T, Zhang R, Yoshikawa T, Shimomura M, Nakatsura T, Kuzushima K, Uemura Y. 第 74 回日本

- 癌学会学術総会(名古屋)2015年10月8日~10日
13. マウスモデルを用いた抗 CD4 抗体併用によるがんペプチドワクチン療法の効果増強の検討、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、植村靖史、中面哲也、第 43 回日本臨床免疫学会総会(神戸)2015年10月22日~24日
 14. The enhancement of the antitumor effect by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody: Study in murine model:, Fujinami N, Yoshikawa T, Sawada Y, Shimomura M, Uemura Y, Nakatsura T. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会)札幌コンベンションセンター(札幌市)2015年11月18日~20日
 15. マウスモデルを用いた抗 CD4 抗体投与併用によるがんペプチドワクチン療法の効果増強の検討、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、植村靖史、中面哲也、第 28 回日本バイオセラピー学会(川越)2015年12月3日~4日(口頭)
 16. Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、吉原宏樹、上野浩生、真部淳、細野亜古、植村靖史、中面哲也、第 18 回日本がん免疫学会総会(松山)2014年7月30日~8月1日
 17. Glypican-3由来エピトープペプチド結合リポソームの CTL 誘導能の評価、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、第 18 回日本がん免疫学会総会(松山)2014年7月30日~8月1日
 18. がんペプチドワクチン後予後予測マーカーとしての治療前血中 IL6・IL8 の意義、藤田知信、野路しのぶ、南雲春奈、岡本正人、桜井敏晴、澤田雄、吉川聡明、下村真菜美、中面哲也、野口正典、松枝智子、伊東恭悟、碓彰一、竹之内寛子、岡正典、河上裕、第 18 回日本がん免疫学会総会(松山)2014年7月30日~8月1日
 19. Analysis of glypican-3 specific CTLs in the tumor tissue and vaccination site after administration of GPC3 peptide.(Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析) 吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会(横浜)2014年9月25日~27日
 20. Evaluation of peptide-specific CTL-inducibility of glypican-3-derived peptide-coupled liposome vaccine. (Glypican-3 由来ペプチドを結合したリポソームワクチンのペプチド特異的 CTL 誘導能評価) 岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会(横浜)2014年9月25日~27日
 21. The enhancement of the CTL induction by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody (抗 CD4 抗体の併用投与は抗腫瘍ペプチドワクチン療法の CTL プライミング効率を高める) 藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会(横浜)2014年9月25日~27日
 22. EGFR T790M mutation-derived antigen provides the immunogenicity in NSCLC patients.(非小細胞肺癌における EGFR T790M 変異由来抗原は免疫原性を与える) 大藤和也、吉川聡明、多田好孝、吉村麻友子、下村真菜美、中本安成、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会(横浜)2014年9月25日~27日
 23. Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、植村靖史、中面哲也、第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会(東京)2015年2月28日

〔図書〕(計2件)

1. Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, Sakai M, Nakatsura T. CHAPTER 12 Cancer Vaccines: Current Status and Future Perspectives. *Frontiers in Cancer Immunology*, 2015, 236-258
2. Yoshikawa T, Sawada Y, Sakai M, Ofuji K, Nakatsura T. Chapter11 Development of glypican-3-targeted cancer immunotherapy. In: Seya T, Udaka K, Matsumoto M, Sato N.(eds), *Inflammation and Immunity in Cancer*, Springer, Germany, 133-143,2015 Feb ISBN 978-4-431-55327-4

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 聡明 (Yoshikawa Toshiaki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・
先端医療開発センター・研究員

研究者番号：00625957

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：