

悪性腫瘍治療研究部

准教授：村橋 睦了 腫瘍免疫学, がん免疫療法
 講師：伊藤 正紀 腫瘍免疫学
 講師：鎌田 裕子 がんゲノム情報学

教育・研究概要

I. 膵癌における Patched 1 結合ペプチドによる線維化の抑制と免疫療法有効性の向上(村橋睦了)

膵癌は免疫治療抵抗性であり、その一因として膵癌が示す強い線維化が、膵癌組織への免疫細胞浸潤を阻害し免疫寛容を引き起こしている可能性がある。膵癌の線維化には Hedgehog (Hh) シグナル経路の関与が報告されており、Hh シグナル経路の抑制で膵癌の線維化を減少できれば、癌浸潤リンパ球が増加し、免疫治療効果が増強する可能性がある。そこで、Hh シグナル阻害剤 Patched 1 結合ペプチドの膵癌線維化、癌浸潤リンパ球、膵癌に対する免疫治療の効果に対する影響を検討した。まず、Patched 1 結合ペプチドが癌関連線維芽細胞 cancer-associated fibroblasts (CAFs) と膵癌細胞の増殖と遊走を阻害することを見出した。さらに同ペプチドは CAFs における細胞外マトリックスと TGF β 1 の産生を減少させ、膵癌細胞の HLA-ABC の発現とリンパ球における IFN γ 産生を誘導した。上記の膵癌細胞株 AsPC-1 および CAFs を混合し免疫不全マウスに皮下腫瘍を形成させ、ヒトリンパ球、抗 PD-1 抗体を腹腔内に投与、Patched 1 結合ペプチドを腫瘍局所に投与するマウス動物モデルを作製し、治療による腫瘍の抑制効果、線維化の程度、癌浸潤 CD3⁺リンパ球数を評価した。リンパ球輸注に Patched 1 結合ペプチドおよび抗 PD-1 抗体投与を併用した群において、有意な腫瘍体積の減少、癌浸潤 CD3⁺T リンパ球数増加を認め、患者由来標的癌細胞と自己リンパ球を用いた実験においても同様の結果が得られた。これらの結果は、Patched 1 結合ペプチドの直接的な抗腫瘍効果に加え、膵癌における線維化の減少により免疫細胞のリクルートを増大させ、結果として免疫療法の効果を向上させることを示している。

II. がん細胞における内因性抗原提示能の機能解析(伊藤正紀)

体細胞変異遺伝子由来ペプチド(ネオエピトープ)をヒト白血球抗原(Human Leukocyte Antigen: HLA)である主要組織適合性遺伝子複合体 class I

(MHC-I)上に抗原提示するがん細胞は、腫瘍発生の初期段階で免疫監視システムにより排除される。しかしながら、一部のがん細胞が免疫逃避能力を獲得し、その結果悪性のがんの発症に至る。我々のがんの免疫逃避メカニズムを調べるために、HLA-A*24分子に抗原提示される Wilms Tumor 1 (WT1) ペプチドエピトープを認識するレポーターT細胞を用いて、がん細胞の内因性抗原提示能力を機能的に解析した。MHC-IとWT1の両方を強く発現するMESO-4細胞(悪性中皮腫)は非常に高い内因性抗原提示能を示した。WT1発現量が低いSW480(大腸癌)とMIA Paca-2(膵癌)はインターフェロン γ 処理により内因性抗原提示が誘導された。NCI-H460(肺癌)とHep G2(肝癌)は、MHC-IとWT1を発現しているにも関わらず抗原提示がみられなかった。しかしながら、これらの細胞に外来性にWT1エピトープペプチドをパルスした場合には抗原提示が示された。この結果はNCI-H460細胞とHep G2細胞の内因性の抗原プロセッシング過程に何らかの異常があることを示唆する。内因性抗原提示を示さないこれらがん細胞の抗原プロセッシングパスウェイの詳細な解析は、がん細胞の免疫逃避メカニズムの解明に繋がる。

III. 悪性脳腫瘍の腫瘍変異抗原の探索(鎌田裕子, 武井 淳)

悪性腫瘍治療研究部と脳神経外科は共同で脳腫瘍に対する樹状細胞・腫瘍細胞融合ワクチン療法を行っている。この治療では樹状細胞と外科的に切除した腫瘍細胞を融合させこれをワクチンとして利用する。腫瘍免疫においては、腫瘍の遺伝子変異の結果生じる腫瘍変異抗原が腫瘍特異的な免疫反応において重要な役割を果たしていると考えられている。我々はこれまでも樹状細胞・腫瘍細胞融合ワクチン療法で使用した腫瘍細胞を対象に全エクソン解析と全トランスクリプトーム解析を行い腫瘍変異抗原の探索とその解析を行ってきた。腫瘍変異抗原はHLAのタイプによって異なるため、今年度はこれまでに得られた結果から日本人に多いHLA-A*24:02とHLA-A*02:01を対象に腫瘍変異抗原の解析を行った。対象は悪性脳腫瘍の9例で、うち1例は腫瘍の培養を通常の培養と腫瘍幹細胞への誘導培養の2種類の細胞を解析したため10サンプルであった。5サンプル以上で見つかった腫瘍変異抗原候補はHLA-A*24:02で46、HLA-A*02:01で54であった。これらの候補の遺伝子変異はサンガーシーケンシング法、候補ペプチドとHLAとの結合はT2細胞

を用いたアッセイで検証を進めている。これまでサンガーシーケンシング法でも変異が確認できた候補やHLAとの結合を認めた候補が見つかった。現在、さらに解析精度を向上させるために症例数を増やして探索を行っている。将来的には発見された腫瘍変異抗原に基づくペプチドワクチン療法の開発が期待される。

〔点検・評価〕

1. 膵癌の線維化に注目し、それを克服してがん免疫治療の有効性を向上させようという研究はこれまでもいくつかあり (Jiang H, et al. Nat Med 2016), 線維化が免疫細胞のリクルートを阻害しているという考えは支持されているようである。本研究のようにHhシグナルを阻害して膵癌の線維化を克服しようとする試みは以前からあったが (Olive KP, et al. Science 2009), 臨床応用に至ったものはまだなく、Hhシグナルを阻害するペプチドによる試みは本研究が初めてである。本研究での結果は今後の発展が期待できるが、ペプチドによる線維化阻害の有効性を向上させるため、Drug Delivery System (DDS) の工夫など、さらなる研究が必要である。また、本研究に並行して、患者由来がんモデルを用いたin vitro抗腫瘍効果評価系の作製に取り組んでいる。膵癌細胞株と比較し、患者がん組織をより模倣していると考えられる膵癌オルガノイドをエフェクター細胞と共培養し、その殺細胞効果を評価する。今後、新規治療の開発と同時にこのようながん免疫治療の効果を事前に予測するシステムの開発も必要とされている。

2. 腫瘍免疫は遺伝子変異により生じたネオアンチゲン (新生抗原) を認識し、がん細胞に対して細胞傷害性を発揮する。一方でがん細胞はHLAの発現低下や抑制性免疫チェックポイント分子 (PD-L1など) の発現を通して免疫逃避を起こす事が知られている。これまでにがん細胞内で起こるネオアンチゲンの抗原プロセッシングに着眼した研究はほとんど報告されていないのが現状であり、HLA-A*24分子に抗原提示されるWT1ペプチドエピトープを認識するレポーターT細胞を用いたがん細胞の内因性抗原提示能の機能的解析は、遺伝子発現解析では分からなかった新たながん免疫逃避メカニズムの解明に繋がる事が期待できる。

3. ネオアンチゲンを同定し、これを標的としてエフェクターを誘導しようとする試みは、現在のがん免疫療法の基本的な戦略の一つであり、昨今、この個別化免疫治療が実現しつつある。一方で、本邦

は島嶼国としての地理的特性からHLAハプロタイプが良好に保存されており、日本人に多く見られるHLAアレル拘束性の共通ネオアンチゲンを同定し、off-the-shelf化の可能性を検討することは重要である。今後、頻度の高いHLAに対応するネオアンチゲンカクテルの開発が期待される。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Sawada R, Arai Y, Sagawa Y, Nagata Y, Nishimura T, Noguchi M, Amano K, Arihiro S, Saruta M, Homma S. High blood levels of soluble OX40 (CD134), an immune costimulatory molecule, indicate reduced survival in patients with advanced colorectal cancer. *Oncol Rep* 2019; 42(5) : 2057-64.
- 2) Honda M, Kimura T, Kamata Y, Tashiro K, Kimura S, Koike Y, Sato S, Yorozu T, Furusato B, Takahashi H, Kiyota H, Egawa S. Differential expression of androgen receptor variants in hormone-sensitive prostate cancer xenografts, castration-resistant sublines, and patient specimens according to the treatment sequence. *Prostate* 2019; 79(9) : 1043-52.

III. 学会発表

- 1) 大山康博, 大西秀哉, 一宮 脩, 中山和典, 藤村晶子, 川元 真, 山崎章生, 村橋睦了, 中村雅史. (口頭) Ptch 1 結合ペプチドによる膵癌免疫治療奏効率向上の可能性. 第119回日本外科学会定期学術集会. 大阪, 4月.
- 2) Ogata H, Wang B, Miyamoto S, Takishima Y, Sagara M, Murahashi M, Onishi H, Tani K. Coxsackievirus A11 as a novel oncolytic viral therapy for human colorectal cancer. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2019. Atlanta, Apr. [Cancer Res 2019; 79(13 Suppl.) : 4779]
- 3) 村橋睦了, 大山康博, 大西秀哉, 一宮 脩, 中山和典, 藤村晶子, 川元 真, 山崎章生, 中村雅史. (ポスター) Possibility for augmentation of responses by anti-PD-1 antibody against pancreatic cancer using Ptch1-binding peptide. 第11回日本血液疾患免疫療法学会学術集会. 東京, 10月.
- 4) 赤崎安晴, 武井 淳, 鎌田裕子, 山本洋平, 森 良介, 田中俊英, 柳澤隆昭, 村山雄一. (口頭) Lower grade glioma に対する樹状細胞免疫療法の有用性. 日本脳神経外科学会第78回学術総会. 大阪, 10月.
- 5) Akasaki Y, Takei J, Kamata Y, Yamamoto Y, Mori R, Tanaka T, Yanagisawa T, Murayama Y. (Oral) Therapeutic effect against lower grade glioma in-

duced by dendritic cell based immunotherapy. 第37回日本脳腫瘍学会学術集会. 七尾, 12月.

- 6) 伊藤正紀, 小井戸薫雄, 芝 清隆. (ポスター) 人工抗原ワクチンを用いた Wilms tumor 1 (WT1) 特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導. 第78回日本癌学会学術集会. 京都, 9月.

分子遺伝学 研究部

教授: 玉利真由美 分子遺伝学, アレルギー学
講師: 廣田 朝光 分子遺伝学, アレルギー学

教育・研究概要

I. 免疫アレルギー疾患の分子遺伝学的研究

近年のヒトゲノム情報基盤の整備と配列解析技術の向上により, 様々な疾患や関連形質においてゲノムワイド関連解析 (GWAS) が行われ, 関連遺伝子が多数同定されている。GWASで得られた知見の臨床への応用には, ゲノム多様性の機能に及ぼす影響の解析は必須である。我々はゲノム解析を行い, 疾患に関連する遺伝子, パスウェイを同定し, それらの機能解析を通して, 疾患発症や重症化のメカニズムの解明を目指している。

TSLP の遺伝バリエーションと慢性副鼻腔炎, 鼻ポリープ, アスピリン喘息との関連, 及び *TSLP* 遺伝バリエーションの機能解析の結果を論文にまとめ国際雑誌に投稿した。これまで気管支喘息やアレルギー関連疾患の GWAS で GWAS 水準を満たす関連が報告されていた rs1837253 と鼻ポリープ合併慢性副鼻腔炎, 及びアスピリン喘息との有意な関連を認めた。関連の方向性も一致していた。また rs1837253 のリスクバリエーションと鼻ポリープ内の好酸球数との正の相関を認めた。また鼻線維芽細胞の核タンパクを用いた機能解析により rs1837253 のバリエーションは転写因子 USF1/2 との結合を変化させる可能性が示唆された。

加水分解コムギによる経皮感作のアレルギー, 旧茶のしずく石鹼使用後の小麦アレルギーについて GWAS (464 症例 vs. 3,099 コントロール) を行い HLA-DQ 領域と *RBFOX1* 領域に強い関連を認めた。これらの結果を国際雑誌に報告した。

乾癬については $TNF\alpha$ のパスウェイに関連する遺伝子に注目し, それらの遺伝バリエーションのタイピングを行い, 臨床情報との関連や治療応答性との関連について解析している。乾癬の生物製剤投与の応答性と関連するようなバイオマーカーの同定を試みている。生物製剤投与前後での血清を収集し, その前後で変化があるような代謝物質についてのメタボロミクス解析を行っている。2019年度は *TNFA*, *TNFRSF1B*, *TNFAIP3* の遺伝バリエーションと乾癬における抗 $TNF\alpha$ 抗体治療への応答性に有意な関連が認められなかったことを報告した。

今後も, 多因子疾患の遺伝要因の探索及び遺伝子