

Title	インシリコ遺伝子スクリーニングを用いた難治がんに対する新規複合免疫療法の開発
Sub Title	Development of novel combined immunotherapy using in silico screening system
Author	松下, 麻衣子(Matsushita, Maiko) 服部, 豊(Hattori, Yutaka) 河上, 裕(Kawakami, Yutaka)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では、免疫チェックポイント阻害薬の効果が乏しい多発性骨髄腫などの難治がんに対する効果的な複合免疫療法の開発のために免疫増強薬の同定および細胞療法の確立を試みた。その結果、プロテアソーム阻害薬が免疫学的細胞死 (ICD) を強く誘導することを見出した。本薬剤で処理した骨髄腫細胞は樹状細胞の成熟化およびT細胞の増殖を促進した。さらに、膵臓がんや骨髄腫に高発現する新規がん抗原に特異的なT細胞を分離しT細胞受容体 (TCR) 遺伝子のクローニングを行い、このTCR 遺伝子を導入したヒトT細胞の作成に成功した。今後、これらの薬剤とT細胞療法の併用による真に有効な治療法の開発が期待される。</p> <p>In this study, we tried to identify immunomodulatory drugs for effective combined immunotherapy against myeloma and other cancers, which are poorly responsive to immune-checkpoint inhibitors. We found that proteasome inhibitors could highly induce immunogenic cell death (ICD) in myeloma cells in vitro. Myeloma cells treated with these drugs could enhance maturation of dendritic cells and expansion of T cells. In addition, we isolated cytotoxic T cells against a novel tumor antigen expressed in various cancers, including myeloma or pancreatic cancer. We successfully cloned T cell receptor genes and generated human T cell lines transduced with these TCR genes. Combination therapy of proteasome inhibitors and the antigen-specific TCR-transduced T cell transfusion would be expected in the future.</p>
Notes	<p>研究種目：基盤研究 (C) (一般)</p> <p>研究期間：2018～2020</p> <p>課題番号：18K07331</p> <p>研究分野：腫瘍免疫学</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K07331seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07331

研究課題名（和文）インシリコ遺伝子スクリーニングを用いた難治がんに対する新規複合免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel combined immunotherapy using in silico screening system

研究代表者

松下 麻衣子（Matsushita, Maiko）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・准教授

研究者番号：10327520

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫チェックポイント阻害薬の効果が乏しい多発性骨髄腫などの難治がんに対する効果的な複合免疫療法の開発のために免疫増強薬の同定および細胞療法の確立を試みた。その結果、プロテアソーム阻害薬が免疫学的細胞死（ICD）を強く誘導することを見出した。本薬剤で処理した骨髄腫細胞は樹状細胞の成熟化およびT細胞の増殖を促進した。さらに、膵臓がんや骨髄腫に高発現する新規がん抗原に特異的なT細胞を分離しT細胞受容体（TCR）遺伝子のクローニングを行い、このTCR 遺伝子を導入したヒトT細胞の作成に成功した。今後、これらの薬剤とT細胞療法の併用による真に有効な治療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在使用されている分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬は多くのがんで有効である一方、生物学的製剤であるため薬価が高く国庫を圧迫することが大きな問題になっている。しかし、本研究で免疫増強作用を見出したプロテアソーム阻害薬は低分子化合物であり、医療経済的にも測り知れない有用性がある。また、本研究で樹立したTCR遺伝子導入T細胞が認識する抗原は、骨髄腫のみならず、膵臓がんなど複数の難治がんを高発現している。以上より、本研究の結果より提案されるプロテアソーム阻害薬と遺伝子改変T細胞療法の併用療法により複数の難治がんの治療効果が得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to identify immunomodulatory drugs for effective combined immunotherapy against myeloma and other cancers, which are poorly responsive to immune-checkpoint inhibitors. We found that proteasome inhibitors could highly induce immunogenic cell death (ICD) in myeloma cells in vitro. Myeloma cells treated with these drugs could enhance maturation of dendritic cells and expansion of T cells. In addition, we isolated cytotoxic T cells against a novel tumor antigen expressed in various cancers, including myeloma or pancreatic cancer. We successfully cloned T cell receptor genes and generated human T cell lines transduced with these TCR genes. Combination therapy of proteasome inhibitors and the antigen-specific TCR-transduced T cell transfusion would be expected in the future.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：多発性骨髄腫 免疫学的細胞死 複合免疫療法

1．研究開始当初の背景

近年、我が国においては人口の高齢化とともにがん患者数は増加の一途をたどっている。なかでも、形質細胞のがんである多発性骨髄腫や脾臓がんは、種々の新規薬剤の登場にも関わらず未だ根治が困難な「難治がん」であり、新規治療法の開発が急務である。

免疫チェックポイント阻害療法を含む免疫療法はこれらの難治がんに対する効果が期待されているが、実際に長期生存が得られる症例は半数にも満たないことが問題となっている。この問題を解決するには、従来の免疫療法にさらなる免疫増強法を組み合わせた複合的で強力な治療戦略が必要である。

一方、申請者らはこれまでに、新規がん抗原 CXorf48 が白血病幹細胞に高発現し、免疫療法のターゲットとして有用であることを明らかにした（Matsushita et al. Blood Cancer J. 2017）。CXorf48 抗原は白血病のみならず、多発性骨髄腫細胞や脾臓がん細胞にも高発現している。そこで、既存の治療法が効き難い多発性骨髄腫や脾臓がんに対して、CXorf48 抗原を標的とした T 細胞療法などの免疫治療法が有用である可能性があるが、上記の通り、真に有効な治療効果を得るには何らかの免疫増強法が必要である。

2．研究の目的

本研究では、がん細胞に直接作用してがん細胞が免疫細胞に攻撃され易くする薬剤を広く既存の低分子化合物の中から明らかにし、この薬剤と CXorf48 特異的免疫療法を併用するという、新たな治療法の開発に向けた基礎的な検討を行うことを目的とする。

とくに、一部の抗がん剤が大腸がん細胞などに引き起こすと考えられている免疫学的細胞死（immunogenic cell death；ICD）に着目し、ICD 誘導効果を持つ低分子化合物を既存薬剤の中から明らかにする。さらに同定した薬剤による CXorf48 に対する免疫反応増強効果を評価する。最終的に難治がんの根治を目指した複合的な免疫治療プロトコルを創出することを本研究の目的とする。

3．研究の方法

（1）既存治療薬における ICD 誘導能の検討

既存化合物を骨髄腫細胞に添加し ICD による免疫増強効果を検討する。候補薬剤を申請者らが樹立した TP53 異常を有するハイリスク骨髄腫細胞株 MUM24 に添加し、細胞表面上の CRT 発現量および培養上清中の HMGB1 量をフローサイトメトリーおよびウエスタンブロット法で検出する。その結果、最も CRT 発現や HMGB1 放出をもたらし化合物を選別する。

（2）候補薬剤による抗がん免疫増強作用の検討

GFP でラベルした骨髄腫細胞に候補薬剤を各種濃度で添加し、ヒト末梢血単核球から分離培養し DID 色素でラベルした未熟樹状細胞と 24 時間共培養し、樹状細胞による貪食能および分化能をフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡で測定する。さらに、同様に薬剤で処理した骨髄腫細胞を CFSE でラベルしたヒト T 細胞と 5 日間共培養し、T 細胞に対する増殖刺激能を評価する。

（3）遺伝子データベースによる既存薬スクリーニング

上記で得られた ICD 誘導剤の添加に伴う遺伝子変化をマイクロアレイ法により検出し、その中で小胞体ストレスに関わる遺伝子変化などを薬剤応答遺伝子データベースに入力する。得られた候補薬剤について、上記と同様の検討を行う。

（4）CXorf48 を特異的に認識する T 細胞受容体（TCR）のクローニング

健常人末梢血より単核球を分離し、HLA-A*24:02 拘束性 CXorf48 エピトープペプチドをパルスした樹状細胞を用いて刺激する。CXorf48 特異的デキストラマー陽性細胞を分離し mRNA を抽出する。TCR 遺伝子の可変領域の外側と定常領域に結合するアダプターを使用した Polymerase Chain Reaction（PCR）法により TCR 遺伝子を増幅し、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクス解析により TCR 鎖および 鎖のレパトアを同定する。

（5）CXorf48 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞の作成

上記で得られた TCR 遺伝子クローンを T 細胞株である Jurkat76.7 細胞（内因性 T 細胞受容体欠損、CD8 高発現株）にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、骨髄腫細胞に対する抗原特異性を検討する。

4. 研究成果

(1) 難治性骨髄腫細胞株に対する ICD 誘導剤の同定

in silico の薬剤スクリーニングに用いる基礎データとして、骨髄腫治療薬 7 剤について *in vitro* の検討を行った。その結果、プロテアソーム阻害剤である carfilzomib および bortezomib がハイリスク症例を含む多発性骨髄腫細胞株に対して CRT の細胞表面発現の増強、HMGB1 の放出増加を誘導し、ICD 誘導効果を持つことを見出した (図 1)。

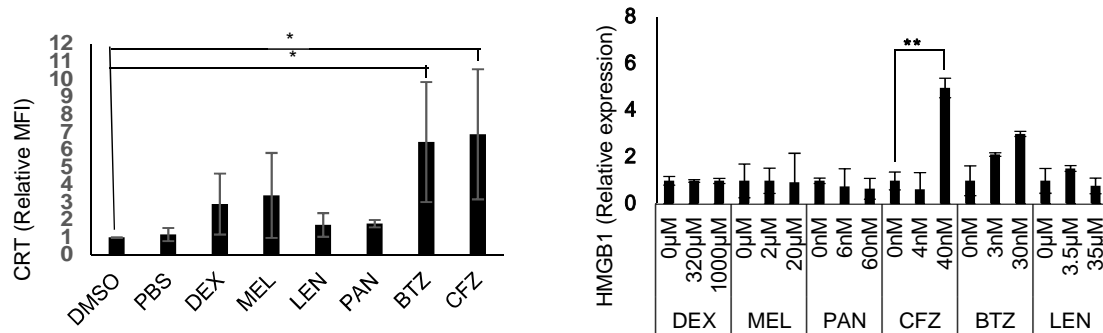


図 1 薬剤添加による ICD 誘導能

(2) プロテアソーム阻害薬のがん免疫増強効果の検討

薬剤で処理した MUM24 細胞とヒト由来樹状細胞を共培養した結果、carfilzomib を用いた際に、樹状細胞における成熟マーカーである CD86 の発現がもっとも高かった。また、薬剤処理した GFP 導入 MUM24 細胞と DID でラベルした樹状細胞を共培養したところ、lenalidomide、bortezomib、carfilzomib を用いた際に樹状細胞による貪食能が高い傾向が認められた (図 2)。さらに、骨髄腫細胞が ICD を起こすことによって T 細胞の増殖が促進されるかどうかを検討するために薬剤で処理した MUM24 細胞と CFSE でラベルしたヒト T 細胞を共培養したところ、bortezomib および carfilzomib を用いた際に T 細胞の分裂が観察された (図 3)。

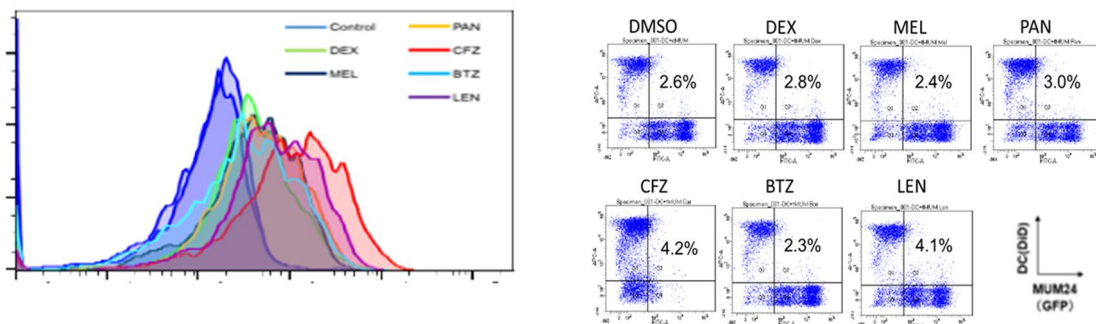


図 2 薬剤による樹状細胞の成熟及び貪食能への影響

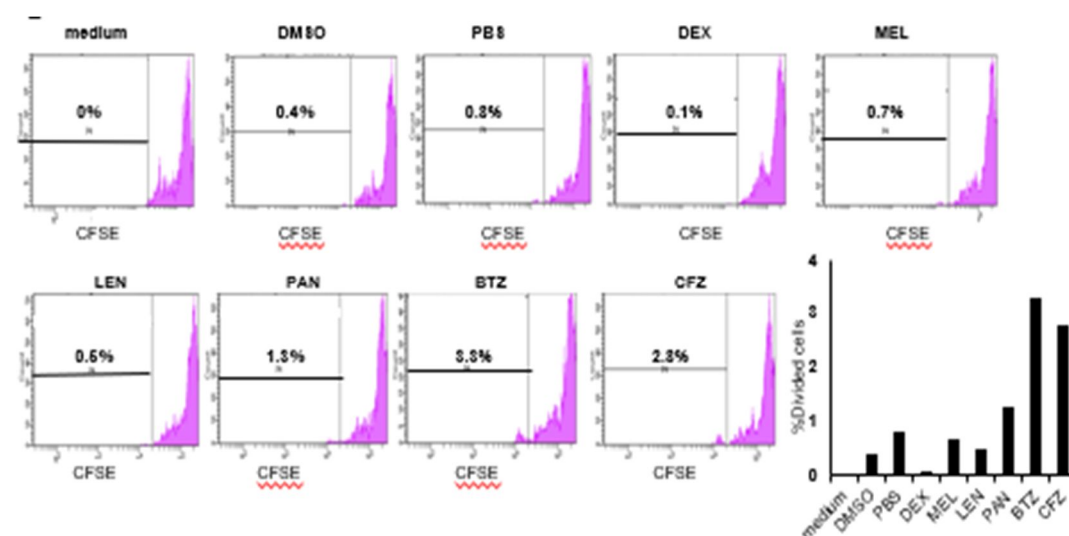


図 3 ICD 誘導骨髄腫細胞の T 細胞への影響

(3) データベースを用いた ICD 誘導剤の同定

プロテアソーム阻害剤を多発性骨髄腫細胞に添加した際に、小胞体ストレス応答機序の中でも IRE1-XBP1 経路が関与することを見出した。さらに、複数の細胞株において、プロテアソーム阻害薬を添加した際に起こる遺伝子変化のデータを DNA マイクロアレイ法で解析した結果、ER ストレス関連遺伝子を含む複数の遺伝子発現が上昇していることを見出した。そこで、薬剤抽出データベースに得られた遺伝子データを入力したが、入手可能な候補化合物が得られなかった。今後さらに別のデータセットを用いて候補化合物の抽出を継続する。

(4) CXorf48 特異的 TCR 導入 T 細胞の作成と反応性の評価

我々がエピトープを同定した新規がん抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子のクローニングを行った結果、3 種のクローン候補を得ることができた。さらにこれらの遺伝子クローンを挿入したレトロウイルスベクターを作成し、ヒト T 細胞株である Jurkat76.7 細胞に遺伝子導入した。作成した 3 種の細胞のうち、1 種類において CXorf48 ペプチドをパルスした CIR-A24 細胞に対して高い IL-2 産生を示した。

今後、本研究で樹立した抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いて、上記で得られた薬剤と T 細胞療法の併用療法により担がんマウス体内で抗腫瘍免疫応答を増強し得るかどうかについて、*in vivo* の系において検討を継続する予定である。

本研究では、プロテアソーム阻害薬が臨床で使用している用量よりも低濃度で ICD を強く誘導することを *in vitro* の系で証明した。また、我々がこれまでに脾臓がんや骨髄腫に高発現することを証明してきた新規がん抗原に特異的な T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を導入したヒト T 細胞を樹立した。今後、プロテアソーム阻害薬と T 細胞療法と組み合わせることで、難治がんに対して真に有効な治療法の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsushita M, Saito S, Yokoe S, Ichikawa D, Hattori Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Characteristics of a Novel Target Antigen Against Myeloma Cells for Immunotherapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines8040579	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Saku Saito, Maiko Matsushita, Kanae Mori, Shinya Yokoe, Daiju Ichikawa, Yutaka Hattori
2. 発表標題 Characteristics of Cytotoxic T Cells against Myeloma Cells for Adoptive Immunotherapy.
3. 学会等名 第10回日本血液学会国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maiko Matsushita, Saku Saito, Kanae Mori, Shinya Yokoe, Daiju Ichikawa, Yutaka Hattori
2. 発表標題 A novel candidate for immunological target in treatment of multiple myeloma.
3. 学会等名 An AACR Special Conference on Tumor Immunology and Immunotherapy（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maiko Matsushita, Sho Kashiwazaki, Satoshi Kamiko, Ryo Uozaki, Tomohumi Yamamoto, Daiju Ichikawa, Yutaka Hattori
2. 発表標題 Analysis of immunogenic cell death (ICD) induced in multiple myeloma cells.
3. 学会等名 CRI-CIMT-EATI-AACR Fourth International Cancer immunotherapy conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1．発表者名 柏崎翔、神子智史、宇於崎涼、山本智史、市川大樹、服部 豊、松下 麻衣子
2．発表標題 プロテアソーム阻害薬の免疫原性細胞死による免疫調節機能
3．学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4．発表年 2018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	服部 豊 (Hattori Yutaka) (20189575)	慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・教授 (32612)	
	河上 裕 (Kawakami Yutaka) (50161287)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任教授 (32612)	

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