

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) がん細胞の遺伝子変異を認識する腫瘍浸潤リンパ球の TCR レパトアと認識抗原解析に基づく効果予測法の確立と、同定 TCR による革新的な個別がん免疫療法の開発
(英語) Development of prognostic evaluation methodology for cancer patients by tumor infiltrating lymphocyte TCR repertoire recognizing genetic mutations, and innovative cancer immunotherapy utilizing the identified TCR
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 生命医科学講座
腫瘍医学分野 教授 池田 裕明
- 所属 役職 氏名： (英語) Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, professor, Hiroaki Ikeda
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) がん細胞の遺伝子変異を認識する腫瘍浸潤リンパ球の TCR レパトアと認識抗原解析に基づく効果予測法の確立と、同定 TCR による革新的な個別がん免疫療法の開発
- 開発課題名： (英語) Development of prognostic evaluation methodology for cancer patients by tumor infiltrating lymphocyte TCR repertoire recognizing genetic mutations, and innovative cancer immunotherapy utilizing the identified TCR
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 生命医科学講座
腫瘍医学分野 教授 池田裕明
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Oncology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Professor, Hiroaki Ikeda

- 分担研究 (日本語) 個別がん変異に対する T 細胞応答及びネオアンチゲンエピ
トープ解析と、それらを用いた複合的がん免疫療法の開発
- 開発課題名 : (英 語) Development of comprehensive cancer immunotherapy based on the
analysis of T cell response against individual cancer mutations and neo-
antigen epitope
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科 遺伝子免疫・細胞治療学
教員 珠玖洋
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Immuno-gene Therapy, Mie University Graduate School of Medicine,
Professor, Hiroshi Shiku
- 分担研究 (日本語) がん細胞の遺伝子変異検出および遺伝子変異由来エピトープの予測
- 開発課題名 : (英 語) Detection of somatic mutations and prediction of mutated epitopes
from individual cancer data
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学医科学研究所 教授 宮野悟
- 所属 役職 氏名 : (英 語) The institute of medical science, the University of Tokyo, Professor, Satoru Miyano
- 分担研究 (日本語) TIL の TCR 迅速クローニング、TCR レパトア解析、
および機能解析
- 開発課題名 : (英 語) Rapid cloning of TCR from TIL, TCR repertoire analysis, and their
functional analysis
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 准教授 岸裕幸
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Immunology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical
Sciences, University of Toyama, Associate Professor, Hiroyuki Kishi
- 分担研究 (日本語) ヒト腫瘍組織、正常組織の採取と解析試料作成、腫瘍浸潤各種免疫担当細
胞の解析、TCR 遺伝子導入 T 細胞の機能解析および機能解析
- 開発課題名 : (英 語) Collection of human cancer and normal tissues and sample preparations,
analysis of tumor infiltrating immune cells, and functional analysis of
TCR gene modified T cells
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人 国立がん研究センター中央病院 選択医療科
医員 北野滋久
- 所属 役職 氏名 : (英 語) National Cancer Center Japan, National cancer Center Hospital, Medical Staff
Shigehisa Kitano

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

池田裕明教授（国立大学法人長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 生命医科学講座 腫瘍医学分野）は本研究を総括し、各研究分担者の情報交換と調整をはかり、研究代表者は研究分担者と協力して試料や情報の共有に関するシステムの構築を行い、当初の計画を順調に進捗させた。TCR 遺伝子導入 T 細胞を作成し、そのマルチファンクション性解析、非自己細胞を用いた T 細胞療法の開発を進めた。

英文

We developed the system to share the samples and information among the researchers that satisfactory made progress of the project. We engineered the T cells to express tumor-reactive TCR and analyzed their multifunctionality. We also developed the T cell therapy utilizing allogeneic T cells.

和文

珠玖洋教員（国立大学法人三重大学大学院医学系研究科 遺伝子免疫・細胞治療学）は大腸がん検体の取得・研究施設間の搬送を可能とする倫理委員会での承認を得ている。In vitro での大腸がん培養技術 CTOS (cancer tissue-originated spheroid)法の確立を行った。3 症例中 2 例の大腸がん細胞の in vitro 培養及び維持が可能となっている。担癌マウスモデルにおいて同定されたネオエピトープの詳細な解析から、より high-throughput 性を持つ手法の必要性を明らかにし、タンデム mRNA を用いた妥当性の確認を行った。また、東京大学宮野研究室との共同で、解析後にスムーズにタンデム mRNA 作製が行えるパイプラインの確立を進めている。第一症例の TIL と培養腫瘍細胞を用いた解析から、大腸がん TIL 中の PD-1 陽性分画に腫瘍応答性 CD8 陽性 T 細胞が存在することを確認した。

英文

It has been approved by the ethics committee that enables acquisition of colorectal cancer specimens and transfer between research facilities. We established the cancer tissue-originated spheroid (CTOS) method for in vitro culture of colorectal cancer. Currently, 2 out of 3 cases of colorectal cancer cells can be cultured and maintained in vitro. From the detailed analysis of the neo-epitope identified in the tumor-bearing mouse model, the necessity of a method with higher throughput property was clarified and the validity using tandem mRNA was confirmed. Also, in collaboration with the University of Tokyo Miyano laboratory, we are now establishing a pipeline that can smoothly prepare tandem mRNA after analysis. Analysis using TIL of the first case and cultured tumor cells suggested that tumor-responsive CD8-positive T cells exist in the PD-1 positive fraction in colorectal cancer TIL.

和文

宮野悟教授（国立大学法人東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析センターDNA 情報解析分野）は、がん個別体細胞変異検出および変異エピトープ予測のために必要な、解析コンポーネント群の整備を進め、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センタースパコン上へ実装を行った。体細胞変異検出に関しては、Exome 変異検出パイプラインからの変異コールの情報(SNV および Indel)の情報と RNA-seq データからの情報を統合した手法の開発を進めた。高免疫原性エピトープ予測に関しては、解析効率の向上のため変異エピトープ結合能予測ソフトウェアの並列実行環境を整備した。またベイズ統計に基づく HLA 型決定アルゴリズムの開発も進め性能向上を得た。

英文

We studied to develop and implement computational tools that identify somatic mutations and predict immunogenic neo-epitopes from cancer patient data; those tools were installed on the supercomputer system at Human Genome Center, the institute of medical science, the University of Tokyo. To identify promising candidate epitopes rapidly, we investigated ways to integrate information from Exome-seq and RNA-seq data analyses and parallelized a neo-epitope prediction tool on the supercomputer for speeding up the data analysis. We also continued to improve our Bayesian HLA typing algorithm.

和文

岸裕幸准教授（富山大学 大学院医学薬学研究部（医学））は、TIL より腫瘍特異的 T 細胞受容体（TCR）を取得するために、腫瘍特異的反応性 T 細胞を分離するための最適な細胞マーカーの選択を行い、CD8+ TIL の PD-1+CD137+の細胞分画を取得しその TCR を回収する方法の優位性を見出した。また、これまでに担癌モデルマウスを用いて、腫瘍浸潤リンパ球の TCR レパトアを単一細胞レベルで解析することにより、腫瘍内でクローナルに増殖している T 細胞集団を検出し、その TCR を T 細胞に発現させることで、*in vivo*, *in vitro* において腫瘍を傷害することを示してきた。今年度は、ヒト腫瘍浸潤リンパ球を解析し、同様にクローナルに増殖している T 細胞集団を見出した。

英文

We analyzed the cell marker that efficiently purify the tumor specific T cells from TILs, and found that PD-1+CD137+ TIL may represents the desired population. We had analyzed T cell receptor (TCR) repertoire of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in tumor-inoculated mice by single cell analysis. We found the clonally expanded population in TILs and obtained their TCR α and β pairs. The expression of the TCR in T cells made the T cells exert the cytotoxicity to the tumor *in vivo* as well as *in vitro*. This year, we have analyzed the TILs from cancer patients, found the corresponding clonally expanded population in TILs and analyzed their TCR.

和文

北野滋久医員（国立研究開発法人 国立がん研究センター中央病院 選択医療科）は、T 細胞と抗原提示細胞および腫瘍細胞についてより詳細な解析ができるようにマルチカラーフローサイトメーターの染色パネルの改良を行った。また、腫瘍細胞に含まれる各種免疫系細胞の分離と保存方法について条件検討を進め、組織から各種免疫担当細胞の分離方法および保存方法の最適化、および本研究に特化したマルチカラーフローサイトメーターのパネルの条件設定等を行った。

英文

We improved the multi-color flow cytometry staining panel for the analyses of T cells, antigen presenting cells, and tumor cells. In addition, we evaluated the conditions for the purification and preservation of the tumor cells and immune cells in the tissues.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 7 件）

1. Kazuyoshi Takeda, Masafumi Nakayama, Yoshihiro Hayakawa, Yuko Kojima, Hiroaki Ikeda, Naoko Imai, Kouetsu Ogasawara, Ko Okumura, David M. Thomas, Mark J. Smyth. IFN-g is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoeediting. *Nature commun.* 2017, 8:14607.
2. Maki T, Ikeda H, Kuroda A, Kyogoku N, Yamamura Y, Tabata Y, Abiko T, Tsuchikawa T, Hida Y, Shichinohe T, Tanaka E, Kaga K, Hatanaka K, Matsuno Y, Imai N, Satoshi Hirano. Differential detection of cytoplasmic Wilms tumor 1 expression by immunohistochemistry, Western blotting, and mRNA quantification. *Int J Oncol.* 2017, 50(1):129-140.
3. Kyogoku N, Ikeda H, Tsuchikawa T, Abiko T, Fujiwara A, Maki T, Yamamura Y, Ichinokawa M, Tanaka K, Imai N, Miyahara Y, Kageyama S, Shiku H, Hirano S. Time-dependent transition of the immunoglobulin G subclass and immunoglobulin E response in cancer patients vaccinated with cholesteryl pullulan-melanoma antigen gene-A4 nanogel. *Oncol Lett.*, 2016, 12(6):4493-4504.
4. Fujii K, Miyahara Y, Harada N, Muraoka D, Komura M, Yamaguchi R, Yagita H, Nakamura J, Sugino S, Okumura S, Imoto S, Miyano S, Shiku H. Identification of an immunogenic neo-epitope encoded by mouse sarcoma using CXCR3 ligand mRNAs as sensors. *OncoImmunology.* 2017 in press.
5. Hamana H, Shitaoka K, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. A novel, rapid and efficient method of cloning functional antigen-specific T-cell receptors from single human and mouse T-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 474, 709-14.
6. Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Tamai T, Hamana H, Ozawa T, Kishi H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Iida N, Fushimi K, Muraguchi A, Kaneko S. Association Between High-Avidity T-Cell Receptors, Induced by alpha-Fetoprotein-Derived Peptides, and Anti-Tumor Effects in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 2017 in press

7. Tanaka H, Fujiwara H, Ochi F, Tanimoto K, Casey N, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Sugiyama T, Barrett AJ, Yasukawa M. Development of Engineered T Cells Expressing a Chimeric CD16-CD3 ζ Receptor to Improve the Clinical Efficacy of Mogamulizumab Therapy Against Adult T-Cell Leukemia. Clin Cancer Res. 2016, 22(17):4405-16.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Analysis of TCR repertoire usage and identification of antigens recognized by CT26 tumor-infiltrating CD8+ T cells. ポスター, 藤井啓介, 宮原慶裕, 村岡大輔, 下岡清美, 浜名洋, 岸裕幸, 珠玖洋, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内
2. 腫瘍浸潤リンパ球の単一細胞解析による腫瘍特異的 TCR の同定および治療への応用 (担癌マウスモデル), 岸裕幸, 村口篤, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6-8, 国内
3. がんに対する遺伝子改変 T 細胞輸注療法の臨床開発, 口頭, 池田裕明, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
4. Adoptive transfer of WT1-specific TCR-gene-transduced T lymphocytes in patients with hematological malignancies, 口頭, 俵 功, 藤原 弘, 村田 誠, 赤塚 美樹, 西田 徹也, 寺倉 精太郎, 恵美 宣彦, 榊屋 正浩, 池田 裕明, 片山 直之, 安川 正貴, 影山 慎一, 珠玖 洋, 日本癌学会, 2016/10/7, 国内
5. 「Recent Advances in Cancer Immunotherapy」 「Immunomonitoring in Cancer Immunotherapy」、口頭、北野滋久、第54回日本癌治療学会学術集会、2016/10/20、国内
6. バイオマーカーによる最適化免疫療法、口頭、北野滋久、第54回日本癌治療学会学術集会、2016/10/22、国内
7. 癌の治癒を目指すT細胞輸注療法, 口頭, 池田裕明, 第29回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2016/12/2, 国内.
8. T cell receptor obtained from tumor-infiltrating lymphocytes without using tumor-specific antigens exhibits cytotoxicity to tumors in vitro and in vivo. Shitaoka K, Kishi H, Hamana H, Hayakawa Y, Ozawa T, Muraguchi A. 第45回日本免疫学会総会・学術集会, 2016/12/5~8, 国内.

9. Phase 1 Clinical Trial of Adoptive Immunotherapy for Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome, Using Gene-Modified Autologous Lymphocytes Expressing WT1-Specific T-Cell Receptor ポスター、Kazushi Tanimoto, Hiroshi Fujiwara, Isao Tawara, Masahiro Masuya, Shinichi Kageyama, Tetsuya Nishida, Makoto Murata, Seitaro Terakura, Yoshiki Akatsuka, Hiroaki Ikeda, Yoshihiro Miyahara, Ikuei Nukaya, Kazutoh Takesako, Nobuhiko Emi, Naoyuki Katayama, Hiroshi Shiku, Masaki Yasukawa. American Society of Hematology 58th Annunal Meeting & Exposition, 2016/12/3-6, 海外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. がん免疫療法開発のガイダンス 2016～がん免疫療法に用いる細胞製品の品質、非臨床試験 の考え方～ 池田裕明 厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業 公開シンポジウム がん免疫療法 2017 -複合化と個別化の科学基盤とレギュレーション- 2017/2/20 国内.
2. ネオアンチゲン等の新たながん免疫療法の標的 池田裕明 厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業 公開シンポジウム がん免疫療法 2017 -複合化と個別化の科学基盤とレギュレーション- 2017/2/20 国内.
3. がん免疫療法開発のガイダンス 2016 後期臨床試験の考え方
北野滋久, 厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業 ガイダンス作成のための検討委員会 国内.
がん免疫療法の臨床試験ワーキンググループ 委員、エフェクター細胞療法ワーキンググループ 委員、免疫チェックポイント阻害療法・複合がん免疫療法ワーキンググループ 委員
4. 日本臨床腫瘍学会編 がん免疫療法ガイドライン北野滋久, (金原出版) 2016 年 12 月 20 日発行 ガイドライン委員 国内.

(4) 特許出願

公開対象なし