

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) 個別化 T 細胞受容体遺伝子導入 T 細胞療法の臨床応用を目指す独創的かつ革新的ながん抗原および T 細胞受容体スクリーニング法の開発
(英語) Development of original and innovative screening method of cancer antigen and T cell receptor aiming for clinical application of individualized T cell receptor gene transfer T cell therapy

研究開発担当者 (日本語) 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 免疫療法開発分野 分野長 中面 哲也

所属 役職 氏名： (英語) Division of Cancer Immunotherapy,
Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center
National Cancer Center
Chief, Tetsuya Nakatsura

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) 研究統括、がん抗原ペプチド群の同定、CTL のクローニング、IVV 法を用いたがん抗原及び T 細胞受容体スクリーニング法の実践分担施設としての実施

(英語) Research supervision, Identification of cancer antigens, Cloning of CTLs, Implementation of cancer antigen and T cell receptor screening using IVV method

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 先端医療開発センター
所属 役職 氏名： 免疫療法開発分野 分野長 中面 哲也

(英語) Division of Cancer Immunotherapy, (Kashiwa Campus)
Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center
National Cancer Center
Chief, Tetsuya Nakatsura

- 分担研究
開発課題名： (日本語) がん抗原ペプチドを認識する CTL クローン群の T 細胞受容体遺伝子群の同定
(英 語) Identification of T cell receptor of CTL clone recognizing cancer antigen peptide
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 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
免疫療法開発分野 ユニット長 植村 靖史
(英 語) Division of Cancer Immunotherapy,
Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center
National Cancer Center
Laboratory chief, Yasushi Uemura
- 分担研究
開発課題名： (日本語) がん抗原ペプチドを認識する CTL クローン群の T 細胞受容体遺伝子群の同定
(英 語) Identification of T cell receptor of CTL clone recognizing cancer antigen peptide
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門
准教授 金子 新
(英 語) Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University
Associate Professor, Shin Kaneko
- 分担研究
開発課題名： (日本語) IVV 法を用いたがん抗原及び T 細胞受容体スクリーニング法の開発と実践
(英 語) Development and practice of cancer antigen and T cell receptor screening using IVV method
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 学校法人東京理科大学 生命医科学研究所 分子生物学研究部門
准教授 宮本 悦子
(英 語) Division of Molecular Biology Research Institute for Biological Sciences Tokyo University of Science
Associate Professor, Etsuko Miyamoto
- 分担研究
開発課題名： (日本語) 様々な HLA 及び T 細胞受容体のタンパク合成、ならびに HLA-ペプチド複合体と T 細胞受容体の結合解析
(英 語) Protein synthesis of various HLA and T cell receptors, and binding analysis of HLA-peptide complex and T cell receptor
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 学校法人東京理科大学 生命医科学研究所 生命情報科学研究部門
准教授 小園 晴生
(英 語) Research Institute for Biomedical Sciences Tokyo University of Science
Associate Professor, Haruo Kozono

- 分担研究 (日本語) 次世代シーケンスと情報解析
開発課題名: (英語) Next Generation Sequence and Information Analysis
- 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 先端医療開発センター
所属 役職 氏名: TR 分野 研究員 三牧 幸代
(英語) Division of Translational Research, Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center (EPOC), National Cancer Center
Staff Scientist, Sachiyo Mimaki
- 分担研究 (日本語) 個別化がん免疫療法実現のためのがん抗原及び T 細胞受容体予測システムの開発
開発課題名: (英語) Development of prediction system of cancer antigen and T cell receptor for individualized cancer immunotherapy
- 研究開発分担者 (日本語) 株式会社 Preferred Networks 取締役副社長 岡野原 大輔
所属 役職 氏名: (英語) Preferred Networks, Inc.
Executive Vice President & Director, Daisuke Okanohara

II. 成果の概要 (総括研究報告)

国立がん研究センター倫理審査委員会に承認済みの「2014-165 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」の研究を開始した。現時点で 50 例の登録と検体処理が完了している。国立がん研究センター東病院にて手術で切除された肺がん組織検体を使用した。まず、腫瘍組織、正常組織を使用して ex vivo FACS 解析を行い、自己腫瘍反応性の TIL 中の CTL を早期に単離するためのマーカーの探索を行った。一方、一部の腫瘍組織に IL-2 を添加し、TIL を増殖させた。腫瘍組織の一部を免疫不全マウスに移植し、Patient-derived xenograft (PDX) としてがん細胞株の樹立を試みた。TIL 中の CTL が自己のがん細胞を認識できるかを調べるため、患者毎の TIL 中の CTL と PDX 腫瘍を共培養し、CD107a 解析を行った。さらに、腫瘍組織と正常組織の DNA を抽出し、次世代シーケンサー解析を行った。

50 例中 20 例において肺がん切除検体の腫瘍組織と正常組織を使用した ex vivo FACS 解析を行ったところ、正常組織と比較し腫瘍組織内の CTL では CD107a, PD-1, CD137, Tim-3 の発現の上昇が見られた。一方、肺がんの切除検体 50 例の全例において腫瘍組織から TIL を増殖させることができた。また、PDX モデルにて患者由来がん細胞が生着した症例において、増殖させた TIL 中の CTL と自己の PDX がん細胞を共培養したところ、自己腫瘍を認識し CD107a 陽性となる細胞が検出された。CD107a と PD-1 の二重染色で分けてソートした解析では、CD107a+PD-1+細胞が自己腫瘍に反応する TIL 中の CTL の分画であった。さらに 50 例中 32 例においては次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を行い、腫瘍組織と正常組織の比較により腫瘍特異的な遺伝子変異を抽出し、HLA も同定して、HLA に結合しうるネオアンチゲンペプチドのリストアップをした。

肺がん患者の切除検体から得た TIL と PDX モデルを使用した CD107a やチェックポイント分子の解

析により自己腫瘍反応性を持つ TIL 中の CTL を単離することが可能となった。今後、TIL 中の CTL の認識抗原を同定することや、早期に単離した自己腫瘍反応性 TIL 中の CTL の TCR をクローニングし再構築することにも取り組む。

抗原ペプチド群及びそれを認識する TCR 同定における IVV 法の活用については、概念を検証し、システムを構築することを目指して、まずはポジコンの系を立ち上げているところである。

がん抗原及び TCR 予測システムの開発においては、まず、IEDB データベースを用いて、既存の HLA 結合ペプチド予測サイトである NetMHC の性能評価を行った。人工知能を用いた機械学習（ディープラーニング）によって、今後、NetMHC の性能を超えるプログラムを完成させる。

We started a research on "2014-165 Fundamental study aiming at development of tumor infiltrating lymphocyte therapy using complicated gene mutation of lung cancer" approved by the National Cancer Center Ethics Review Committee. Currently 50 cases of registration and specimen processing are completed. Lung cancer tissue specimens excised by surgery at the National Cancer Center East Hospital were used. First, ex vivo FACS analysis was performed using tumor tissues and normal tissues, and a marker for isolating CTLs in self-tumor reactive TILs at an early stage was searched. On the other hand, IL-2 was added to some tumor tissues to grow TIL. We transplanted a part of the tumor tissue to immunodeficient mice and tried to establish a cancer cell line as Patient-derived xenograft (PDX). In order to investigate whether CTL in TIL can recognize autologous cancer cells, CTL in TIL and PDX tumor for each patient were co-cultured and CD 107a analysis was performed. In addition, DNA of tumor tissue and normal tissue was extracted and next generation sequencer analysis was carried out.

In ex vivo assay, we found that the expression of CD107a or co-inhibitory molecules on CD8+ T cells in tumor tissues was higher than that in normal tissues. On the other hand, TILs were successfully expanded in vitro from all tumor tissues. In addition, using immunodeficiency mice, patient derived xenografts (PDX) were generated from some primary tumor tissues, and, the reactivity of TILs against autologous PDX cancer cells was evaluated by CD107a assay. Tumor reactive CTLs were enriched from TILs by sorting for CD107a+ PD-1+ CD8+ T cells and expanded in vitro. Furthermore, the next generation sequencing approach was carried out to identify the antigens recognized by TILs. We performed whole-exome sequencing on matched tumor and normal DNA isolated from 32 patients with lung cancer. The candidate of mutated epitopes (neoantigens) were identified using a peptide-MHC-binding algorithm.

These results may provide the marker to isolate tumor reactive TILs ex vivo. We will identify the antigens recognized by these tumor-reactive CTLs. Combined with bioinformatics prediction and the assay with ex vivo isolated TILs, we try to determine useful TCR and that recognized antigen for cancer immunotherapy.

With respect to utilization of IVV method for TCR identification to recognize antigen peptide, we are starting up the system of Posicon, aiming at verifying the concept and constructing the system.

In the development of cancer antigen and TCR prediction system, evaluation of existing HLA binding peptide prediction site, NetMHC, was performed using the IEDB database. By deep

learning using artificial intelligence, we will complete a program that exceeds the performance of NetMHC in the future.

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 10件、国際誌 8件）

1. Ofuji K, Saito K, Suzuki S, Shimomura M, Shirakawa H, Nobuoka D, Yawada Y, Yoshimura M, Tsuchiya N, Takahashi M, Yoshikawa T, Tada Y, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Nakamoto Y, Nakatsura T. Perioperative plasma glypican-3 level may enable prediction of the risk of recurrence after surgery in patients with stage I hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Dec 27. doi: 10.18632/oncotarget.14271. [Epub ahead of print]
2. Suzuki S, Sakata J, Utsumi F, Sekiya R, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Efficacy of Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy on the Survival of Patients with Refractory Ovarian Clear Cell Carcinoma. *OncoImmunology*. 2016, 5(11):e1238542.
3. Ueda N, Zhang R, Tatsumi M, Liu TY, Kitayama S, Yasui Y, Sugai S, Iwama T, Senju S, Okada S, Nakatsura T, Kuzushima K, Kiyoi H, Naoe T, Kaneko S, Uemura Y. BCR-ABL-specific CD4+ T-helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells. *Cell Mol Immunol*. 2016 May 16. doi: 10.1038/cmi.2016.7. [Epub ahead of print]
4. 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 Vγ9Vδ2 T lymphocyte-mediated killing is increased by zoledronate. *Int. J. Oncol*. 2016, 48,1794-1804.
5. 中面哲也. 第1章バイオ医薬品 9.がんワクチン、臨床薬学テキストシリーズ バイオ医薬品と再生医療. 中山書店. 2016, 96-107.
6. 中面哲也. がん免疫療法ーがん完治に向けての新たな治療法の探索ーII.各論 がんペプチドワクチン Glypican-3 抗原を標的にしたがんペプチドワクチン. *日本臨牀*. 2016, 75,257-262.
7. 鈴木利宙, 中面哲也. 「特集」躍進するがん免疫療法 ネオアンチゲンとそれを標的としたがんワクチン療法. *日本薬学会会誌「ファルマシア」*. 2016, 53, 15-19.
8. 中面哲也. がん免疫療法の時代がやってきた (Era of cancer immunotherapy has come.). *Jpn J.Clin.Immunol*. 2016, 39, 164-171.
9. 中面哲也. 腫瘍抗原の同定・分類とネオアンチゲン-今改めて見直される役割. *実験医学増刊*. 2016,34,55-60.
10. 中面哲也. I 総論 17.消化器がんの免疫療法:エビデンスと期待. *臨牀消化器内科*. 2016, 31, 107-112.
11. Miyasaka T, Watanabe Y, Akahoria Y, Miyamura N, Ishiia K, Kinjo Y, Miyazaki Y, Liu T-Y, Uemura Y, Kawakami K. Human CD4⁺ CD8⁻ invariant natural killer T cells promote IgG secretion from B cells stimulated by cross-linking of their antigen receptors. *World Journal of Vaccines*. 2016, 6, 34-41.

12. Kitayama S, Zhang R, Liu T-Y, Ueda N, Iriguchi S, Yasui Y, Kawai Y, Tatsumi M, Hirai N, Mizoro Y, Iwama T, Watanabe A, Nakanishi M, Kuzushima K, Uemura Y, Kaneko S. Cellular adjuvant properties and direct cytotoxicity of redifferentiated V α 24 invariant NKT-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2016, 6, 213-227.
13. Kaneko S. In Vitro Generation of Antigen-Specific T Cells from Induced Pluripotent Stem Cells of Antigen-Specific T Cell Origin. *Methods in Molecular Biology*. 2016, 1393, 67-73.
14. Ohashi, H. and Miyamoto-Sato, E. Cell-free technologies for proteomics and protein engineering. *Protein Pept. Lett.*, 2016, 23(9), 819-827.
15. 小沢正晃、宮本悦子. ポストゲノム時代の創薬開発. 理大科学フォーラム：東京理科大学科学教養誌. 2016, 33(7): 30-33.
16. 諸橋賢吾、宮本悦子. 共同企画、『医学の歩み』特集企画－インタラクティブ医科学のすすめ－. 2016, 259(8).
17. 宮本悦子. 『医学の歩み』特別企画－インタラクティブ医科学のすすめ－「はじめに」. 2016, 259(8).
18. 大橋広行、長谷川舞衣、宮本悦子. 『医学の歩み』特別企画－インタラクティブ医科学のすすめ－「インタラクティブが拓く未来医療」. 2016, 259(8): 825-831.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 肝胆膵癌領域における根治的外科治療後の再発予防ワクチン療法の開発, 口頭, 中面哲也, ワークショップ 11 第 116 回日本外科学会定期学術集会 (大阪), 2016/4/14~16, 国内.
2. 肝癌術後の危険群を予測する新たな Glypican3 ELISA 法の開発, 口頭, 大藤和也, 中面哲也, ワークショップ「肝癌制圧の分子基盤と臨床への展開」、第 52 回日本肝臓学会総会 (千葉) 2016/5/19~20, 国内.
3. iPSC based adoptive immunotherapy by using genome editing strategy. Poster, Minagawa A, Hotta A, Uemura Y, Nakatsura T, Kawana K, Kaneko S. International Society for Stem Cell Research, San Francisco, USA, 2016/6/23 日, 国外.
4. 抗 PD-1 抗体あるいは抗 CD4 抗体併用によるペプチドワクチン療法の増強効果、口頭, 中面哲也、澤田雄、藤浪紀洋、第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪), 2016/7/27~29, 国内.
5. 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に関する前臨床的検討, 口頭, 藤浪紀洋, 吉川聡明, 澤田雄, 下村真菜美, 水野正一, 北野滋久, 植村靖史, 中面哲也, 第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪), 2016/7/27~29, 国内.
6. インターフェロン α を産生する iPS 細胞由来増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法, 口頭, 土屋伸広, 植村靖史, 岩間達章, 張エイ, 得光友美, 鈴木利宙, 吉川聡明, 澤田雄, 田久保圭誉, 阪上-沢野朝子, 宮脇敦史, 千住覚, 遠藤格, 中面哲也, 第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪), 2016/7/27~29, 国内.

7. 卵巣明細胞腺癌に対する GPC3 を標的としたペプチドワクチン療法～臨床第Ⅱ相試験のデータ解析から見える今後の課題, 口頭, 柴田清住, 鈴木史朗, 中面哲也, 吉川史隆, 第 20 回日本がん免疫学会総会 (大阪), 2016/7/27～29, 国内.
8. iPSC based adoptive immunotherapy by using genome editing strategy. Poster, Minagawa A, Hotta A, Uemura Y, Nakatsura T, Kaneko S. International Congress of Immunology, Melbourne, Australia, 2016/8/22, 国外.
9. がん免疫療法の基礎, 口頭, 中面哲也, 日本病院薬剤師会関東ブロック第 46 回学術大会 シンポジウム 1 「がん免疫療法における基礎と臨床」 (千葉), 2016/8/27, 国内
10. がん免疫療法の時代がやってきた, 国内, 中面哲也, 第 44 回日本臨床免疫学会総会 ランチョンセミナー (東京), 2016/9/8～10, 国内.
11. 血中全長型 Glypican-3 測定による肝細胞がん診断技術の開発, 口頭, 三浦雅央, 藤浪紀洋, 齊藤桂吾, 須藤浩三, 吉田智一, 中面哲也, 第 36 回日本分子腫瘍マーカー研究会 (横浜), 2016/10/5, 国内.
12. 選択的スプライシングによって生成する分泌型 Glypican-3 アイソフォームの同定 (Alternative splicing generates the soluble isoform of glypican-3 in HCC and melanoma cell lines.), ポスター, Saito K, Yoshikawa T, Saito Y, Fujinami N, Suzuki T, Jimmy C, Nakatsura T, 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016/10/6～8, 国内.
13. IFN α を産生する iPSC 由来増殖性ミエロイド細胞のがん治療への応用 (iPSC-pMCs genetically engineered to express IFN α as a potential cell medicine for cancer), ポスター, Tsuchiya N, Uemura Y, Iwama T, Zhang R, Suzuki T, Yoshikawa T, Sawada Y, Takubo K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Endo I, Nakatsura T, 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016/10/6～8, 国内.
14. 今知っておくべき免疫チェックポイント阻害薬を含むがん免疫療法の基礎, 口頭, 中面哲也, 第 54 回日本癌治療学会学術集会 スポンサーディンポジウム 5 (横浜) 2016/10/20～22, 国内.
15. Perioperative plasma glypican-3 levels predict the risk of post-operative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. Poster, Saito K, Nosaka T, Takahashi K, Naito T, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nemoto T, Nakamoto Y, Nakatsura T. AASLD2016 (Boston) ,2016/11/11～15, 国外.
16. Cellular adjuvant properties and direct cytotoxicity in rejuvenated V α 24 i/variant NKT cells from human induced pluripotent stem cells. ポスター, Zhang R, Kitayama S, Liu T, Ueda N, Iwama T, Nakatsura T, Kuzushima K, Kaneko S, Uemura Y, 第 45 回日本免疫学会学術集会 (沖縄), 2016/12/5～7, 国内.
17. iPSC-derived autocrine-proliferating antigen-presenting cells as an unlimited source of T cell stimulator for cancer immunotherapy. ポスター, Iwama T, Zhang R, Tsuchiya N, Saito Y, Mizuno S, Ueda N, Kubo Y, Makahara S, Miyashita A, Fukushima S, Senju S, Nakatsura T, Uemura Y. 第 45 回日本免疫学会学術集会 (沖縄), 2016/12/5～7, 国内.
18. Phase I study of Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy for pediatric patients with refractory solid tumors (難治性小児固形腫瘍に対する GPC3 ペプチドワクチン療法の第 I 相試験), ポスター, Hosono A, Kaneda H, Hara J, Kinoshita Y, Kohashi K, Manabe A, Yoshimura K, Nakatsura T, 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 (東京) 2016/12/15～17, 国内.

19. インターフェロン α を産生する iPS 細胞由来増殖性ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法の開発, ポスター, 土屋伸広, 岩間達章, 張エイ, 得光友美, 吉川聡明, 澤田雄, 田久保圭誉, 遠藤格, 中面哲也, 植村靖史, 第 16 回日本再生医療学会総会 (仙台), 2017/3/7~9, 国内.
20. CD4-modification of re-differentiated BCR-ABL-specific T cells promote the priming of leukemia antigen-specific CTLs via DCs, ポスター, 上田格弘, 植村靖史, 張エイ, 喜多山秀一, 安井裕, 巽美奈子, 劉天懿, 葛島清隆, 清井仁, 金子新, 第 75 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜・横浜市), 2016/10/6/~8, 国内.
21. 長谷川舞衣, 小沢正晃, 有吉絢香, 大橋広行, 宮本悦子, In vitro virus を利用した疾患にかかわる標的タンパク質のケミカルインタラクトーム解析, ポスター, 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2016/11/30~12/2, 国内.
22. 有吉絢香, 長谷川舞衣, 小沢正晃, 黄麗娟, 金沢水樹, 大橋広行, 宮本悦子, IVV-HiTSeq を用いた肝細胞がん誘導因子デオキシコール酸 (DCA) の標的タンパク質の探索, ポスター, 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2016/11/30~12/2, 国内.
23. 職業性胆管がん一症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較, ポスター, 三牧幸代, 中森正二, 久保正二, 木下正彦, 戸塚ゆ加里, 中釜斉, 落合淳志, 江角浩安, 土原一哉, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 中面哲也, がん免疫療法について, 杏林大学 がんと共にすこやかに生きる講演会, (対象者: がん患者、そのご家族、一般市民), 2016/6/4, 国内.
2. 中面哲也, 最新のがん免疫療法について, 株式会社メディクロス 社内勉強会, 2016/7/6, 国内.

(4) 特許出願

該当なし