

# 免疫チェックポイント阻害剤有効例における 細胞傷害性 T 細胞抗原の同定

名古屋大学大学院医学系研究科

分子細胞免疫学 特任教授 赤塚 美樹

## 1. 研究の背景・目的

T 細胞の活性化を負に調節する免疫チェックポイント分子を阻害することで、悪性腫瘍に対する新しい免疫療法が開発されたが、その優れた抗腫瘍効果の恩恵を被るのはがん種によって多少の差はあるものの、概ね 2～3 割の患者のみであり、その原因の究明が大きな課題となっている<sup>1)</sup>。名古屋大学を中心に行われた先行研究で、特定の HLA クラス I 型を持つ悪性黒色腫患者では治療効果が得られやすい傾向が認められた（未発表データ）。この事象の説明の一つとして、免疫原性の高いペプチドがその HLA 型分子にのみ結合し T 細胞へ抗原提示される可能性が挙げられる。先行研究では悪性黒色腫細胞株の特定の HLA 型分子に結合しているペプチドを生化学的に抽出・精製し、アミノ酸配列からペプチドが由来する遺伝子を同定し、その中で悪性黒色腫細胞株に選択的に発現しているものをすでに絞り込んでいる。

そこで本研究では、これらの候補ペプチドで健常人もしくは免疫チェックポイント阻害剤治療を受け経過の良好な患者の末梢血 CD8 陽性 T 細胞を刺激し、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導を計画した。クローンが得られれば、候補ペプチドに反応する T 細胞が患者体内で感作されていることになるため、このような抗原特異的 T 細胞を検出できる HLA テトラマー試薬を合成し、免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける患者の治療前後の CTL の動態を検討することとした。

## 2. 研究の対象ならびに方法

ペプチドの準備：候補ペプチドおよびポジティブコントロール用のペプチド (CMV、EBV 由来の既知のペプチド) は外注で人工合成し、T 細胞の刺激に用いた。

健常人末梢血 T 細胞での検討：抗腫瘍効果との相関が示された HLA 型を有する健常ボランティア末梢血より単核球を分離し、磁性ビーズによりナイーブ CD8 陽性 T 細胞を分離した。残りの単核球に含まれる単球を培養皿に付着させ、GM-CSF および IL-4 で樹状細胞を誘導、炎症性サイトカインで成熟させた後ペプチドをパルスし刺激しナイーブ CD8 陽性 T 細胞を刺激した。反応増殖してくる T 細胞集団 (T 細胞株) について各ペプチドへの反応性を IFN- $\gamma$  産生を指標とした ELISA または細胞内サイトカイン染色法で機能解析した。

患者末梢血 T 細胞での検討：免疫チェックポイント治療を受け抗腫瘍効果の認められた患者については残余血として保存された末梢血単核球を拘束性 HLA 分子を遺伝子導入した K562/CD86 細胞株ないしは T2 細胞にペプチドをパルスして刺激し、同様な機能解析を行

った。増殖の良好な T 細胞株が得られた場合には限界希釈法でクローニングを行い、増殖が認められた個々の T 細胞についてペプチド特異的な IFN- $\gamma$  産生の有無について評価した。

### 3. 研究結果

#### 健常人末梢血 T 細胞での検討：

健常人からの誘導の場合、腫瘍細胞で過剰発現する自己抗原に反応しうる T 細胞分画は胸腺で負の選択を受けていない naïve 分画にあると考えられたため CD45RA 陽性細胞を濃縮したほか、抗原刺激には樹状細胞を誘導して用いた。Naïve 分画からの抗原特異的 T 細胞誘導は容易ではないため、CMV や EBV に未感染の HLA-A24 陽性健常人より採血を行い、上述の実験系が働くかを確認した。EBV の BRLF1 遺伝子由来ペプチド TYPVLEEMF (TYP) を 10  $\mu$ M で樹状細胞に添加して CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞を interleukin-2 存在下で 2 回刺激したところ T 細胞増殖が認められ、T2/HLA-A24 細胞に TYP ペプチドを添加して刺激したところ 19% の interferon- $\gamma$  産生細胞が認められた。こちらの細胞を限界希釈法でクローニングしたところ HLA-A24/TYP テトラマーで 100% 染色される T 細胞クローンが 3 種類得られた。

以上より naïve T 細胞分画からの抗原特異的 T 細胞が誘導できたため、HLA-Bx (特許申請中) 分子より抽出した 8 種類のなかで特に腫瘍に発現が限局した 6 種類の候補腫瘍抗原ペプチド (特許申請中、全て正常細胞での発現は精巣に限局したいわゆる cancer-testis (CT) 抗原) を用いた実験を行った。健常人#1 から誘導を行ったが、増殖する T 細胞集団を得られなかった。健常人#2 からは 2 回誘導を試みた。1 回は#1 の場合と同様増殖を認めなかったが、2 回目では増殖が得られ、6 種類中 1 ペプチドに弱陽性反応が得られたためクローニングを行い、16 個のクローンが得られたが最終的に該当ペプチドに対する interferon- $\gamma$  産生反応は得られなかった。

#### 患者末梢血 T 細胞での検討：

今回、対象とした拘束性 HLA を有し、免疫チェックポイント阻害剤治療後経過の良好な患者 5 名のうち 2 名を解析した。治療により候補ペプチド抗原に反応する T 細胞が活性化している可能性があること、残余血由来の単核球数が限られていたことから樹状細胞を誘導できず、代替抗原提示細胞として副刺激分子 CD86 および拘束性 HLA を発現させた K562 を使用した。1 例は nivolumab, もう 1 例は durvalumab の治療を受けていた。2 例の単核球を 3 回同様に刺激したところ T 細胞の増殖を認めたが、個別のペプチドに有意な反応性を示す T 細胞集団は見いだせなかった。現在残りの 3 例について検討を予定している。

### 4. 考察

近年、腫瘍特異的な T 細胞を誘導してその T 細胞受容体を取り出し遺伝子改変 T 細胞を作成し養子免疫に用いる方法<sup>2)</sup>や、認識される抗原を DNA ワクチンの形で能動免疫療法に応用する研究が進んでいる<sup>3)</sup>。特に腫瘍における遺伝子変異がもたらす蛋白質構成アミノ酸配列の変化が新たな腫瘍特異的抗原 (ネオアンチゲン、ネオ抗原) となり、免疫チェッ

クポイント阻害剤治療後に現れる効果の標的となっている。他方で腫瘍浸潤リンパ球の解析から、ネオ抗原だけでなく、従来から提唱されていた過剰発現する自己抗原（主に CT 抗原）に対する T 細胞も機能している<sup>4)</sup>。前者の場合は遺伝子変異を次世代シーケンスし非同義置換アミノ酸を同定、患者の HLA 型をもとに結合するペプチド配列を予測するものである。予測精度は向上しつつあるものの、最近の報告でも実際に反応する T 細胞が得られる場合はごくわずかであり<sup>5)</sup>、アプローチの改良が必要である。我々は過剰発現抗原に焦点を当て、実際に HLA 分子に結合しているペプチドのなかで CT 抗原に該当するものを選択しており、予測によるバイアスは回避している。しかしながら免疫反応にはヒエラルキーが存在し、各個体においてその時点でより抗原性の強いものに集中する性質があるため、たとえ HLA にペプチドが提示されていても特異的 T 細胞の存在割合が低く、限られた血液細胞内に含まれていなかった可能性がある。今後前向きに検体を収集する場合は、採血量ないしは採血回数を増やすなど、特異性 T 細胞を得られる可能性を高める必要があると思われる。また HLA に複数結合していたペプチドランキング上位にあるものが高い抗原性を有するとは限らない。代替案としては免疫チェックポイント阻害剤の効果が認められた患者 T リンパ球を患者自身の腫瘍細胞ないしは腫瘍細胞株に患者の拘束性 HLA を導入して抗原提示細胞とし、標的細胞を傷害できるような T 細胞ないしは TCR 配列データを<sup>6)</sup> から抗原を探索する古典的方法も再検討する必要があると思われる。

## 5. 文献

- 1) Akatsuka Y. TCR-Like CAR-T Cells targeting MHC-bound minor histocompatibility antigens. *Front Immunol.* 11: 257, 2020. (総説)
- 2) 赤塚 美樹. 免疫チェックポイント阻害療法の進歩. *臨床血液.* 60:1341-1350, 2019. (総説)
- 3) Gros A, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med* 2016; 22:433.
- 4) Murata K, et al. Landscape mapping of shared antigenic epitopes and their cognate TCRs of tumor-infiltrating T lymphocytes in melanoma. *Elife.* 2020 Apr 21;9. pii: e53244.
- 5) Löffler MW, et al. Multi-omics discovery of exome-derived neoantigens in hepatocellular carcinoma. *Genome Med.* 11: 28, 2019.
- 6) De Simone M, et al. Single Cell T Cell Receptor Sequencing: Techniques and Future Challenges. *Front Immunol.* 9: 1638, 2018.

## 6. 論文発表

本研究内容については論文・学会発表に至る T 細胞誘導および解析ができておらず、今後さらに解析を行う予定である。