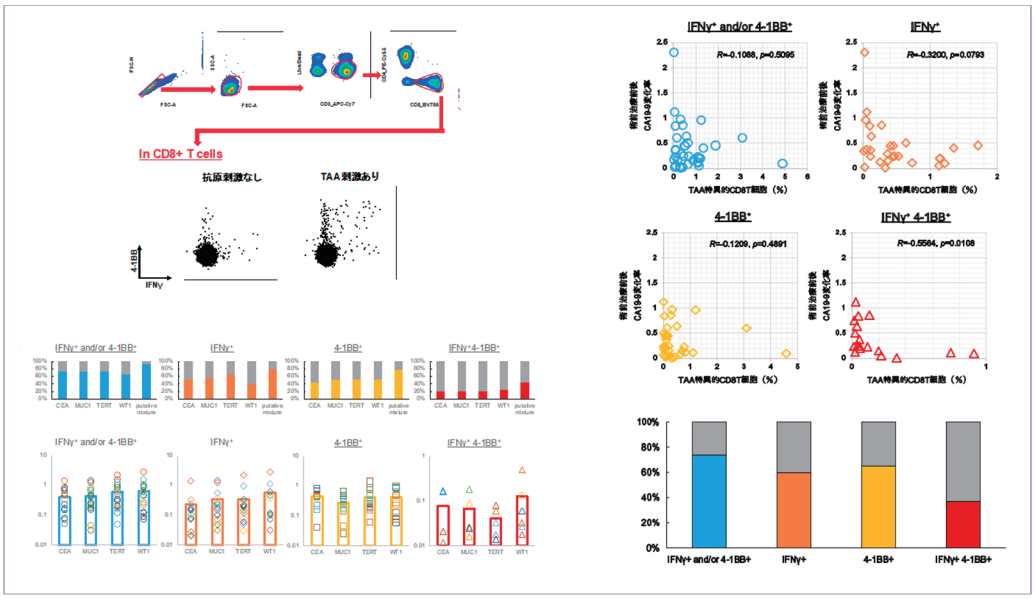
50　高次免疫学的解析手法を用いた膵癌免疫微小環境の解析	秋田　裕史

【目的】膵癌は予後不良な癌であり、新たな治療戦略の開発が望まれる。複数の悪性腫瘍に対し、免疫チェックポイント分子阻害剤を中心とした免疫療法が臨床的に使用されるようになってきたが、膵癌においては未だ治療選択肢とはなっていない。本研究では、膵癌特異的癌抗原に対し、患者由来末梢血単核球細胞（PBMC）を用いた膵癌特異的免疫応答反応の検出 assay を構築し、腫瘍関連抗原（tumor-associated antigen：TAA）反応 $CD8^+$T 細胞と病態との関連についての検討を行った。

【方法】TAA データベースより膵癌で発現する癌抗原を同定し、膵癌患者の実際の PBMC を用いて癌抗原特異的免疫応答反応の実験系を確立する。さらに Stage Ⅰ～Ⅲの未治療膵癌患者 58 名から採取した PBMC を用い、抗原特異的反応の臨床的意義について検討した。

【結果】403 種類の TAA が登録されている TAA データベースから、過去の報告をもとに CEACAM5（CEA）、MUC1、TERT、WT1、NY-ESO-1（CTAG1A）、TRP2（DCT）の 6 種類を選択した。次に 1,404 種類の細胞株の RNAseq による mRNA 発現データセットを用いて、選択した 6 種類の TAA について発現を調べたところ、CEACAM5、MUC1、TERT、WT1 の 4 種類について複数の膵癌細胞株での発現を認めた。最後に TCGA に登録されている 178 膵癌検体の遺伝子発現データにより、ヒト膵癌検体で実際に高発現していることを確認した。以上より、CEACAM5、MUC1、TERT、WT1 を PBMC 刺激に用いる TAA として選択した。次に、様々な治療フェーズおける膵癌患者由来 PBMC 検体を用いて、TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞反応を検出した。本研究では検出感度を上げるために、まず PBMC をペプチドプールで刺激後、IL-2 存在下で 10 日間培養し、さらにペプチドプールで再刺激し、フローサイトメーターを用いて TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞を検出した。その結果、44.00%のドナーで各 TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞反応を検出することができた。最後に total Taas 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の有無と術前治療開始時患者背景の関連性に関して検討した。IFNγ^+/4-1BB$^+$total Taas 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の有無は、年齢、性別、血算などを含むその他の治療開始時の患者背景と、有意な相関は認められなかった。一方、IFNγ^+/4-1BB$^+$total TAAs 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の頻度は術前療法前後の CA19-9 変化率との間に有意な逆相関が見られた（R＝−0.56、p＝0.011）（図）。これにより TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞反応は、術前治療の効果に関与している可能性が示唆された。

膵癌患者の PBMC における膵癌特異的癌抗原免疫応答反応の臨床的意義



50. 高次免疫学的解析手法を用いた膵癌免疫微小環境の解析

秋田　裕史

大阪国際癌センター 消化器外科／次世代医療開発センターがん病態解析室

Key words：膵癌，癌抗原特異的免疫応答反応，$CD8^+$T 細胞，術前治療，PD-1

緒　言

膵癌は世界的に見ても 5 年生存率が 10%未満の予後不良な癌である。切除が唯一の根治療法であるが、実際に切除できる症例は全体の 20%と少なく、仮に切除できても再発率が高い。そこで治療成績を向上させるために、近年、術前治療や術後補助療法が積極的に行われているが、未だ治療効果は十分ではなく、治療成績向上を目指して新たな取り組みが必要である。一方で、近年では、免疫チェックポイント阻害剤を用いて免疫を利用して癌細胞を効果的に死滅させる癌免疫療法がさまざまな癌腫に対して行われているが、膵癌では奏功率（ORR）3.1%となっており［1］、他癌に比して十分な効果が認められていないのが現状である。

免疫チェックポイント阻害剤を用いた免疫療法の薬効において、その中心的役割を担うのは、癌細胞に対して直接的に作用する癌特異的 $CD8^+$T 細胞である。その上で、これら $CD8^+$T 細胞による癌細胞への障害活性が示される現場は癌組織であり、Tumor infiltrating lymphocytes（TIL）と呼ばれる癌組織浸潤性の T 細胞がその役割を担う。一方で、実際の治療中に免疫チェックポイント阻害剤の TIL への影響を直接的に評価するためには、癌部周囲の組織生検を複数回行う必要があり患者への侵襲が大きいため現実的ではない。対照的に、末梢血は低侵襲で検体を得ることができ、また治療経過中複数回の採取が可能であるため、患者状態を経時的に把握する治療効果予測バイオマーカーとして有用となることが期待される。実際、肺癌においては、末梢血 $CD8^+$T 細胞の細胞障害活性は TIL の機能を反映し、また、PBMC 中 TEMRA CD8 の割合（フローサイトメトリー）と癌組織中 T 細胞の killing 活性とが相関するという報告もある［2］。加えて、PBMC 中 $CD8^+$T 細胞は、一般的に癌患者の臨床所見を反映することが知られているが［2，3］、膵癌においては、PBMC 中の $CD8^+$T 細胞における PD-1 の発現は、膵癌患者で優位に高く、リンパ節を含む遠隔転移の割合と相関することが知られている［4］。

本研究では、膵癌患者の PBMC を用いた免疫応答反応の臨床的意義を検証するため、まず実験系に利用可能な膵癌特異的癌抗原を同定し、さらに癌抗原と実際の PBMC を用いて膵癌特異的免疫応答反応を評価する実験系を確立し、最後に PBMC を用いて、腫瘍関連抗原（tumor-associated antigen : TAA）特異的 $CD8^+$T 細胞反応の臨床的意義を検討した。

方　法

1. 対象

対象は 2019 年から 2021 年で、術前治療後に切除を企図している治療開始前の膵癌患者。対象患者の PBMC を①術前治療開始前、②切除前（術前治療終了後）、③根治切除後の 3 つのタイムポイントで採集した。採集した PBMC はすべて血液摂取後 6 時間以内に分離し、cell count は MUSE Cell Analyser（Luminex）を用いて行った。

2. フローサイトメトリー解析

再刺激した $CD8^+$T 細胞を protocol に従い、Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit（L34957）を用いて染色し、さらに各表面マーカー抗体で染色した後、FACSymphony A5（BD Biosciences）を用いて解析した。

3. データ解析

フローサイトメトリーのデータはFlowJoを用いてゲーティングを行った。TAA-specific cellsの判定は、癌抗原刺激時の値からペプチドなし刺激（DMSO）時の値を差し引いて 0.01％以下は反応なしとした。統計解析にはR/Bioconductor（R version 4.2.1）もしくはGraphPad Prism（version 9.0.0;GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いた。

4. 本研究に対する倫理承認

本研究は、大阪国際癌センターおよび共同研究機関である医薬基盤健康栄養研究所の倫理委員会によって承認され、対象者から書面による同意を取得し、サンプル採集および解析を行っている。

結　果

1. 膵癌細胞において発現のみられるTAAの選択

膵癌ドナーPBMCにおける主要なTAA特異的$CD8^+$T細胞反応を検出する目的で、まず、アッセイに用いるTAA候補を膵癌細胞における発現を基に選択した。403種類のTAAが登録されているTAAデータベース（TANTIGEN2.0）に登録されており、これまでに膵癌細胞におけるTAA候補としての報告があり、かつ過去にペプチドワクチンの臨床試験にも用いられたことがあるものの中から、我々はCEACAM5（CEA）、MUC1、TERT、WT1の4種類、および他癌でペプチドワクチンの臨床試験に用いられたことがあるNY-ESO-1（CTAG1A）、TRP2（DCT）の2種類を選択した。次に、Cancer Cell Line Encyclopedia（CCLE）に登録されている 1,404 種類の細胞株の RNAseq による mRNA 発現データセットを用いて選択した 6 種類の TAA について発現を調べたところ、6 種類の TAA のうち、CEACAM5、MUC1、TERT、WT1の4種類について複数の膵癌細胞株での発現を認めた。一方、CTAG1A及びDCTについてはいずれの細胞での発現も認められなかった。また、膵癌以外の細胞株における発現との比較により、CTAG1A及びDCTが膵癌細胞株に特異的に発現しているという結果は得られなかった。加えて、複数の主要な膵癌細胞株（原発巣由来4種、肝臓転移由来1種、リンパ節転移由来1種）を用いて、qRT-PCRによりこれら6種類の候補遺伝子のmRNA発現解析を行った。その結果、使用した6種の膵癌細胞株において、CTAG1はいずれの細胞株においても検出されなかった。また、RNAseqにおいて発現が確認された4種類の癌抗原（CEACAM5、MUC1、TERT、WT1）に関して、DCTと比較して、BxPC3においてはCEACAM5が、MiaPaCa2においてはMUC1とWT1が、Panc1においてはMUC1とWT1が、PSN1においてはTERTが、SUIT2においてはMUC1が、TYPK1においてはCEACAM5とMUC1がそれぞれ有意に発現上昇していた。また、TCGAに登録されている178膵癌検体（原発巣178 vs 4 normal tissue）の遺伝子発現データにより、上記分子のうちCEACAM5/MUC1/TERTについては、ヒト膵癌検体で実際に高発現していることも確認された。以上の結果により、我々はCEACAM5、MUC1、TERT、WT1をPBMC刺激に用いるTAAとして選択した。

2. 膵癌患者PBMCにおける各TAA特異的$CD8^+$T細胞反応の検出系の確立

次に、様々な治療フェーズおける膵癌患者由来 PBMC 検体を用いて、膵癌患者由来 PBMC 中の TAA 特異的$CD8^+$T細胞反応を検出した。PBMC中のTAA特異的$CD8^+$T細胞は、低頻度であることが知られているため、本研究では検出感度を上げるために、まずPBMCをペプチドプールで刺激後、IL-2存在下で10日間培養してTAA特異的細胞を増幅した。この時刺激に用いた4種のTAA（CEA、MUC1、TERT、WT1）は、全長をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いた。10日間培養後に同様のペプチドプールで再刺激し、フローサイトメーターを用いてTAA特異的$CD8^+$T細胞を検出した。この時、抗原特異的$CD8^+$T細胞のマーカーとして汎用されるIFNγ及び、activation-indiced marker（AIM）として知られる4-1BB発現を指標として、IFNγと4-1BBのいずれかが陽性（IFNγ$^+$and/or 4-1BB$^+$）、IFNγ及び4-1BBの単陽性（IFNγ$^+$or 4-1BB$^+$）、あるいはdouble positive（IFNγ$^+$and 4-1BB$^+$）の4つのクライテリアに基づき抗原特異的応答を評価した（図 1a、b）。その結果、各種抗原に対するレスポンダーの同定に

加え、4 つの TAA のうちいずれかの抗原に対して抗原特異的応答を示したドナーをレスポンダーと規定し、putative mixture としてその応答率を算出したところ、それぞれ 92.00%、80.00%、76.00%、44.00%のドナーで各 TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞反応を検出することができた。TAA 毎に $CD8^+$T 細胞反応者の割合が異なるのか調べるために、各クライテリアにおける応答率を算出し、chi-square text を行ったが、結果として統計的な有意差は見られなかった（図 1c）。また、responder における各マーカー陽性細胞の割合も解析したが、TAA ごとに 4 つのクライテリア（IFN$\gamma^+$and/or 4-1BB$^+$/IFNγ^+/4-1BB$^+$/IFNγ^+/4-1BB$^+$）いずれにおいても反応性の違いは見られなかった（図 1d）。以上の結果により、我々は各 TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞反応には質的な差異が少ないと考え、以降の実験においては 4 種類の TAA を混ぜて刺激した際の TAAs 特異的 $CD8^+$T 細胞反応を評価することにより、検出感度を最大化して解析を行うこととした。

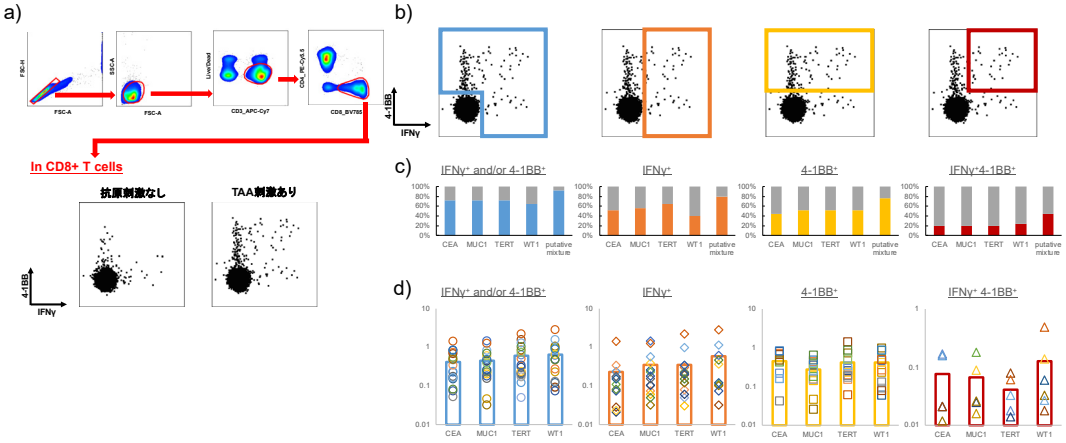


図 1. 膵癌患者 PBMC における TAA 特異的免疫応答反応

a) フローサイトメトリーでの癌抗原に対する免疫応答反応の検出。

b) 陽性判定のための IFNγ、4-1BB 及びその組み合わせ陽性のゲートの設定。

c) 4 種の癌抗原に対する各ゲートで判定した反応陽性検体の割合。

d) 反応陽性検体における各癌抗原に対する各ゲート陽性細胞%の比較。

3. 膵癌患者における術前療法効果と TAAs 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の関連性

膵癌術前治療過程における total Taas 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の経時的変化を調べる目的で、フローサイトメーターによる解析を行った。まず術前治療開始前（TP1）の膵癌患者由来 PBMC（n＝57）を total Taas ペプチドプールで刺激したところ、total Taas 特異的 $CD8^+$T 細胞反応は、IFN$\gamma^+$and/or 4-1BB$^+$、IFNγ^+、4-1BB$^+$、IFNγ^+/4-1BB$^+$が、それぞれ 42 検体（73.684%）、34 検体（59.649%）、37 検体（64.912%）、21 検体（36.842%）であった（図 2a）。次に、total Taas 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の有無と術前治療開始時患者背景の関連性に関して検討した。IFNγ^+/4-1BB$^+$ total Taas 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の有無は、年齢、性別、血算などを含むその他の治療開始時の患者背景と、有意な相関は認められなかった。次に、術前療法（化学療法あるいは化学放射線療法）の治療効果との相関を調べるために、膵癌における血中癌バイオマーカーとして知られる CA19-9、CEA、DUPAN-2 及び CT 画像による腫瘍径について、治療前後について比率と差分を算出し、術前治療前（TP1）、治療後（TP2）、手術後（TP3）の total Taas 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の頻度との相関関係について検討を行った。その結果、IFN$\gamma^+$and/or4-1BB$^+$total TAAs 特異的 $CD8^+$T 細胞頻度は臨床学的進行度（cStage）および治療開始前 CT 画像腫瘍径と逆相関であったが、切除標本による病理学的進行度（pStage）および術前治療後 CT 画像腫瘍径では逆相関は見られず、CT 画像腫瘍径の差分とは順相関であったため、この細胞集団が膵癌の病勢に対する影響を判断することは出来ないと思われた。一方、IFNγ^+/4-1BB$^+$total Taas 特異的 $CD8^+$T 細胞反応の頻度は術前療法前後の CA19-9 変化率との間に有意な逆相関が見られた（R＝−0.56、p＝0.011）（図 2b）。これにより TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞反応は、術前治療の効果に関与している可能性が示唆された。

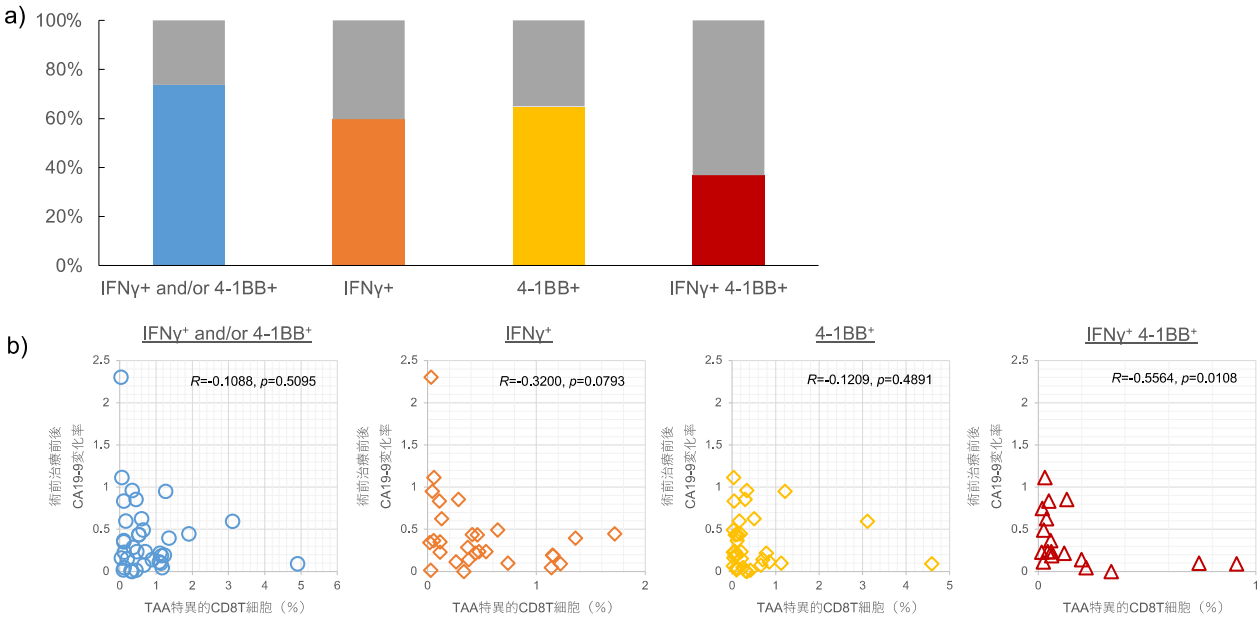


図 2. 膵癌患者 PBMC における癌特異的抗原に対する免疫応答反応の検討

a) 膵癌患者 PBMC における IFNγ、4-1BB のそれぞれの陽性率。

b) 免疫応答反応と術前治療効果（CA19-9 減少率）との関係。IFNγ陽性かつ 4-1BB 陽性細胞%は、CA19-9 減少率と有意に相関していた。

考　察

今回の我々は、まず末梢血 PBMC 中の $CD8^+$T 細胞を用いて、膵癌の病態を反映する免疫応答、特に TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞の質的、量的特性に焦点を当て解析を行った。一般に、癌抗原特異的 $CD8^+$T 細胞の解析をする上で考慮しなければならないのは、対象となる抗原は TAA と neoantigen に大別されることである。Neoantigen は、癌への特異性が高いというメリットがあるものの、癌細胞の heterogeneity に対して neoantigen に対する T 細胞は限定的にしか作用しない可能性がある［5］。また、上皮系の癌では neoantigen に反応する TIL は少ないことが報告されている。加えて、neoantigen は TAA に比べより対象となるドナーを選ぶ必要があり、一方で TAA を用いた場合はより広いドナーを対象に研究を進めることができることから、本研究では TAA に対する免疫反応を検討することとした。その上で、我々は、膵癌細胞で特に高発現していると考えられる 4 つの TAAs を選択し、それら抗原に対するオーバーラッピングペプチドを用いて TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞について評価を行った。結果として total TAAs 特異的 $CD8^+$T 細胞の頻度が、CA19-9 を指標とした時に術前治療効果と相関することを見出した。この結果は、TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞が、術前療法の有効性に寄与している可能性を示唆している。

ただし本研究は、これら血中 TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞と組織中の関連性に関する解析は行っておらず、同様の細胞が組織において癌細胞排除に機能しているかは不明であり、あくまで現時点では血液バイオマーカーの一つを見出したにすぎない。ただ、組織検体を用いた TIL の解析は、より直接的に癌微小環境における免疫を調べる方法として有効であるが、同時に、組織検体の採取は侵襲が大きく、同一患者における経時的変化を追うのは困難である。一方で、末梢血検体は、比較的低侵襲で採取することができ治療経過中複数回の採取が可能であり、外科的手術により病巣を摘出した後の状態も評価できるという点も含め、経時的変化を把握するのに有用と考えられる。例えば肺癌においては、末梢血 PBMC 中 $CD8^+$T 細胞の細胞障害活性は癌組織中 T 細胞の機能と相関するという報告があり［2］、直接的ではないものの癌細胞に対する $CD8^+$T 細胞の影響を把握することは可能であることが報告されている。

以上、本研究において我々は、TAA 特異的 $CD8^+$T 細胞刺激用抗原分子を選択し、膵癌患者由来末梢血中の $CD8^+$T 細胞の癌抗原特異的応答をフローサイトメーターにより検出する系を樹立し、TAA 抗原特異的応答の強弱が術前療法の効果を示す CA19-9 変化に関わることを示した。本研究で示した *in vitro*（＝TAA 特異的応答の高感度同定）と *ex vivo*（＝詳細な $CD8^+$T 細胞サブセットプロファイリング）を組み合わせた方法による末梢血モニタリングにより、治療効果の事前の予測、ひいては患者の層別化に繋がる可能性が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、医薬基盤健康栄養研究所の山本拓也である。

文　献

1） Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. JAMA oncology. 2019;5(10):1431-8. Epub 2019/07/19. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.1588. PubMed PMID: 31318392;

2） Iwahori K, Shintani Y, Funaki S, Yamamoto Y, Matsumoto M, Yoshida T, et al. Peripheral T cell cytotoxicity predicts T cell function in the tumor microenvironment. Scientific reports. 2019;9(1):2636. Epub 2019/02/24. doi: 10.1038/s41598-019-39345-5. PubMed PMID: 30796310

3） Holm JS, Funt SA, Borch A, Munk KK, Bjerregaard AM, Reading JL, et al. Neoantigen-specific CD8 T cell responses in the peripheral blood following PD-L1 blockade might predict therapy outcome in metastatic urothelial carcinoma. Nature communications. 2022;13(1):1935. Epub 2022/04/13. doi: 10.1038/s41467-022-29342-0. PubMed PMID: 35410325

4） Shen T, Zhou L, Shen H, Shi C, Jia S, Ding GP, et al. Prognostic value of programmed cell death protein 1 expression on CD8+ T lymphocytes in pancreatic cancer. Scientific reports. 2017;7(1):7848. Epub 2017/08/12. doi: 10.1038/s41598-017-08479-9. PubMed PMID: 28798308

5） Cafri G, Yossef R, Pasetto A, Deniger DC, Lu YC, Parkhurst M, et al. Memory T cells targeting oncogenic mutations detected in peripheral blood of epithelial cancer patients. Nature communications. 2019;10(1):449. Epub 2019/01/27. doi: 10.1038/s41467-019-08304-z. PubMed PMID: 30683863