

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14403

研究課題名(和文) T細胞受容体遺伝子導入T細胞を用いたNeoantigen 解析システム

研究課題名(英文) Detection of neoantigens by gene-engineered T cells

研究代表者

垣見 和宏 (Kakimi, Kazuhiro)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：80273358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞はそのがん化の過程で、多くの体細胞遺伝子突然変異を蓄積する。遺伝子変異産物のうち、アミノ酸変異を伴う一部のものはMHCペプチド複合体として細胞表面に提示されT細胞受容体によって認識される抗原となる。腫瘍特異的な遺伝子変異に由来するアミノ酸配列を持った抗原はネオアンチゲンと呼ばれる。ネオアンチゲンは胸腺内で発現を認めないため、中枢性の免疫寛容が誘導されず高い免疫原性を有する可能性があり、免疫治療の標的となることが期待されている。次世代シーケンサーを活用してネオアンチゲンとネオアンチゲン反応性T細胞を同定する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Somatic mutations accumulate in cancer cells during cancer progression. Recent studies reported that T cells recognize antigens derived from tumor-specific mutated genes, so-called neoantigens, and mediate immune responses against tumor cells. These neoantigens are not expressed in the thymus and escape from the mechanism of central tolerance; thereby, their immunogenicity is higher than conventional tumor antigens. In this study, we developed the pipeline to predict and prioritize neoantigens by integrating RNA-Seq data with whole-exome sequencing. In addition, we demonstrated that T cell receptor gene sequencing technique using next-generation sequencer is quite useful to detect the expansion of antigen-reactive T cells. It is 1000-times more sensitive to detect antigen-reactive T cells than flowcytometry. Integrating these two novel techniques allow us to identify neoantigens and neoantigen-reactive T cells.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 ネオアンチゲン TCR レパトア解析 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

近年注目されている免疫チェックポイント阻害剤治療では、20-30%程度の患者で臨床効果が認められるが、内因性の抗腫瘍免疫応答が増強した患者において効果が得られたと考えられている。また、腫瘍における遺伝子変異が多いほど腫瘍内の免疫応答が活性化しており、免疫チェックポイント阻害剤の効果が期待できるのではないかと報告されている。がん細胞はその癌化の過程で多くの体細胞遺伝子突然変異(somatic mutation)を蓄積していく。アミノ酸変異を伴う遺伝子変異産物のうち、一部のものは細胞内でプロテアソームによる分解を受けてペプチドに分解され、MHCクラスI分子へ結合して細胞表面に提示される。それがT細胞受容体によって認識される抗原となる。がん細胞特異的な遺伝子変異に由来する抗原はもともと体内(正常細胞中)に存在しないため、ネオアンチゲン(neoantigen)と呼ばれる。胸腺内に発現を認めないネオアンチゲンに対しては、免疫寛容が誘導されないため、高い免疫原性を有する可能性がある。遺伝子変異が蓄積したがん細胞にはネオアンチゲンが存在し、ネオアンチゲンに特異的なT細胞受容体(TCR)を有するT細胞が癌細胞を認識し攻撃を開始する。腫瘍免疫において、このネオアンチゲンが標的となって一連の免疫応答が誘導されることが示されている。

効果的ながん免疫治療を実現するためには、ネオアンチゲンとネオアンチゲン特異的T細胞の両者の同定が求められており、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍免疫の中心となるネオアンチゲンと、それを認識する腫瘍特異的T細胞の両面から、抗腫瘍免疫応答を解明することである。

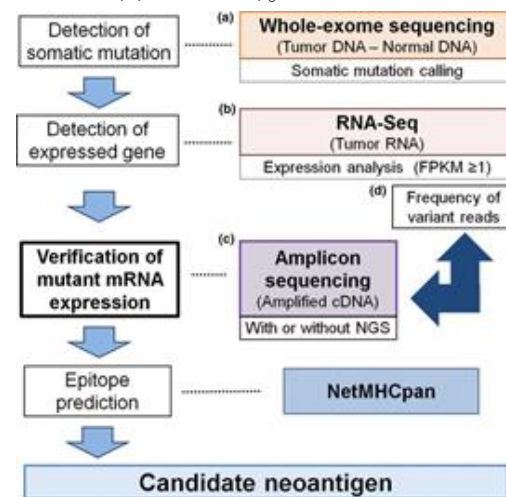
がん細胞やその周囲の環境による免疫抑制性の環境により、腫瘍内に存在する腫瘍特異的T細胞(TIL)の増殖は阻害されていることが多い。腫瘍特異的な免疫応答が誘導されている患者においても、多彩な免疫抑制メカニズムによって、腫瘍特異的なT細胞の増殖や活性化が抑制されている。そこで、本研究において、TCR遺伝子解析技術と、ネオアンチゲン同定システムを活用し、腫瘍特異的T細胞を含んだTILからTCR遺伝子をクローニングし、増殖能を持ったT細胞株に遺伝子導入して腫瘍特異的T細胞を再構築し、その細胞を用いてネオアンチゲンを同定するシステムを構築するための基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを活用したTCR遺伝子解析:末梢血単核細胞(PBMC)から、mRNAを抽出し、オリゴdTプライマーを用いた逆

転写後に5'末端にアダプターを結合させ、TCRのC領域に設定したプライマーとのペアで全長に近いTCRを増幅させた。増幅させたTCR遺伝子産物をプールして次世代シーケンサーで解析した。TCR α 鎖と β 鎖の抗原決定領域であるCDR3配列を解読した。得られたTCR遺伝子配列を元に、末梢血中のT細胞レパトア構成を解析し、抗原特異的T細胞免疫応答の動態を解析した。

(2) 次世代シーケンサーとMHCクラスI分子結合アルゴリズムを用いたin silicoのネオアンチゲン予測:エクソームシーケンスに加えて、全RNAシーケンスのデータから変異遺伝子の発現量と変異アレルを確認するステップを加えることにより、より正確に新生抗原を予測することが可能になることを明らかにした(Cancer Sci. 2017 Feb;108(2):170-177)。



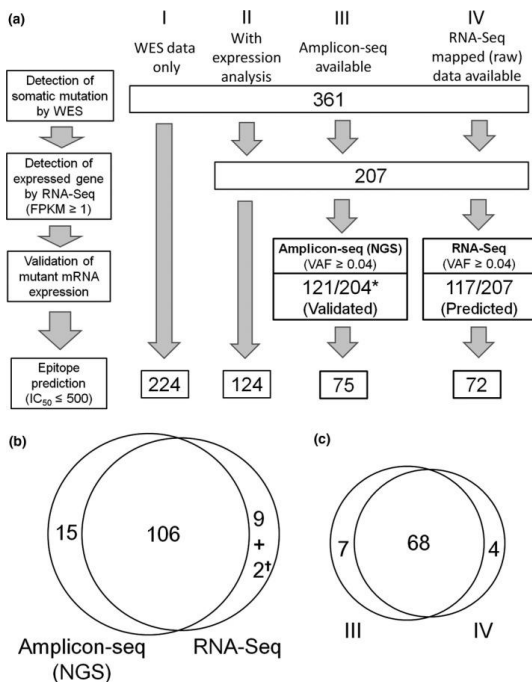
(3) 抗原特異的T細胞同定:次世代シーケンサーを用いたTCR遺伝子解析を応用し、抗原特異的T細胞遺伝子同定システムを構築した。TCR遺伝子配列が既知のpmel-1トランスジェニックマウス由来のT細胞をC57BL/6マウスの脾細胞に0.0001%~1%混入し、抗原ペプチドで72時間刺激培養したのちに、TCR遺伝子解析法とフローサイトメーターによる抗原特異的T細胞の検出を比較した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを活用したTCRレパトアの解析:腫瘍特異的T細胞を検出するためのシステム構築にむけて、NY-ESO-1ワクチン治療を受けた患者の末梢血中のリンパ球から、限界希釈法を用い2つのNY-ESO-1特異的CD8T細胞クローンAおよびBを樹立し、そのTCR遺伝子配列を同定した。ワクチン治療前、治療中、治療後の患者末梢血中のリンパ球のNY-ESO-1特異的TCR遺伝子配列を次世代シーケンサーで解析した。末梢血中の全リンパ球から得られた 1.8×10^6 リードのTCR遺伝子配列中、NY-ESO-1特異的CTLクローンAのTCRのリード数は 1.39×10^4 (1.2%)クローンBのリード数は13

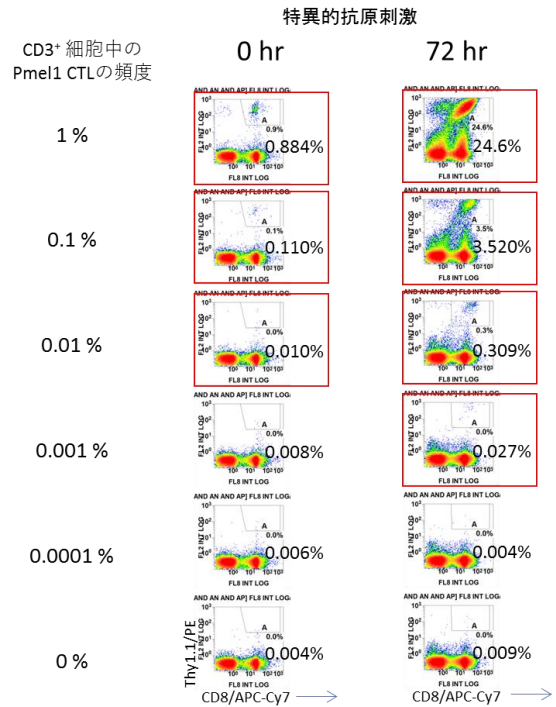
(0.0007%)であった。TCR 遺伝子解析法は、従来の細胞生物学的な免疫モニタリング法と比較して、非常に定量的であり、かつ高感度であり、TCR 遺伝子解析法を用いて、腫瘍免疫応答を詳細に解析することが可能であることを明らかにした。

(2) 次世代シーケンサーと MHC クラス I/II 分子結合アルゴリズムを用いた *in silico* のネオアンチゲン予測：我々は手術で得られた4例の肺がん検体から DNA/RNA を抽出し全エクソンシーケンス (WES) と RNA シーケンス (RNA-Seq) を実施した。腫瘍特異的な遺伝子変異のうち、アミノ酸変異を伴うミスセンス変異は、合計で 361 個検出された。そのうち、腫瘍での遺伝子発現が伴うもの (FPKM \geq 1) は 207 個であった。腫瘍内での変異アミノ酸を持った遺伝子発現を確認するため、腫瘍の mRNA から cDNA を合成し、変異を指摘された領域を PCR で増幅し、サンガーシーケンス法と次世代シーケンサー法で検証したところ、腫瘍内に実際に変異 mRNA の検出はそれぞれ 121 と 117 であった。これらの情報をもとに、(I) WES データの 361、(II)



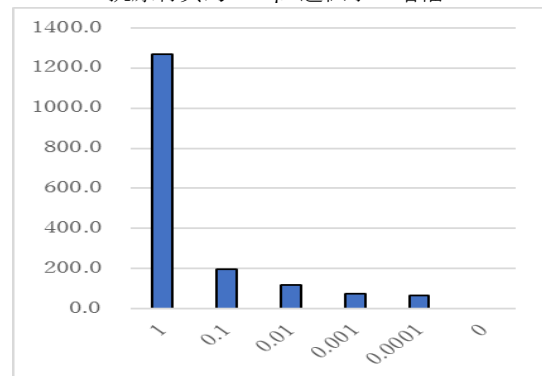
WES+FPKM \geq 1、(III) WES+変異の検証、(IV) WES+RNA-Seq (VAF) の4通りの変異データから NetMHCpan を用いてそれぞれの患者の MHC クラス I 分子に結合するネオアンチゲンを予測すると、(I) 224、(II) 124、(III) 75、(IV) 72 個のネオアンチゲンがリストアップされた。抗腫瘍免疫応答の標的となるネオアンチゲンは、腫瘍内での遺伝子発現が重要であることから、(III)、(IV) の手法での正確なネオアンチゲン予測が重要である。

(3) 抗原特異的 T 細胞同定：ネオアンチゲンとネオアンチゲンに特異的に反応する T 細胞



細胞を検出するために、研究成果 (2) で同定されたネオアンチゲンペプチドを合成し、リンパ球を刺激培養することで、ネオアンチゲン反応性 T 細胞を検出するシステムを構築した。通常のプロサイトメーターによる測定では、検出限界は 0.01%~0.1% である。72 時間の抗原ペプチド刺激で、抗原特異的な T 細胞の活性化と増殖に伴い、刺激前に 0.001% の細胞が、0.027% まで増殖しており、バックグラウンドとの差が困難ではあるが、検出は可能になった。

抗原特異的 TCR β 遺伝子の増幅



我々が開発した 72 時間で増殖した TCR 遺伝子のコピー数をもとに抗原特異的 T 細胞の同定法では、0.0001~0.0001% の抗原特異的 T 細胞が検出可能であった。

これらの技術を統合して、次世代シーケンサーを活用した新生抗原と特異的 T 細胞同定システムを構築することができた。これにより、新生抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の研究と治療法の開発が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori JI, Sato M, Anraku M, Hosoi A, Matsushita H, Takazawa M, Ohara O, Nakajima J, Kakimi K. Prediction and prioritization of neoantigens: integration of RNA sequencing data with whole-exome sequencing. *Cancer Sci.* 2017;108 (2): 170-177. 査読有り
- ② Kakimi K, Karasaki T, Matsushita H, Sugie T. Advances in personalized cancer immunotherapy. *Breast Cancer.* 2017; 24 (1) :16-24. 査読有り
- ③ Matsushita H, Sato Y, Karasaki T, Nakagawa T, Kume H, Ogawa S, Homma Y, Kakimi K. Neoantigen Load, Antigen Presentation Machinery, and Immune Signatures Determine Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(5):463-71. 査読有り
- ④ Karasaki T, Nagayama K, Kawashima M, Hiyama N, Murayama T, Kuwano H, Nitadori J, Anraku M, Sato M, Miyai M, Hosoi A, Matsushita H, Kikugawa S, Matoba R, Ohara O, Kakimi K, Nakajima J. Identification of Individual Cancer-Specific Somatic Mutations for Neoantigen-Based Immunotherapy of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(3):324-33. 査読有り
- ⑤ Kurose K, Ohue Y, Wada H, Iida S, Ishida T, Kojima T, Doi T, Suzuki S, Isobe M, Funakoshi T, Kakimi K, Nishikawa H, Udono H, Oka M, Ueda R, Nakayama E. Phase Ia Study of FoxP3+ CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2015;21 (19): 4327-36. 査読有り
- ⑥ Miyai M, Eikawa S, Hosoi A, Iino T, Matsushita H, Isobe M, Uenaka A, Udono H, Nakajima J, Nakayama E, Kakimi K. Detection and Tracking of NY-ESO-1-Specific CD8+ T Cells by High-Throughput T Cell Receptor β (TCRB) Gene Rearrangements Sequencing in a Peptide-Vaccinated Patient. *PLoS One.* 2015 Aug 20;10(8):e0136086. 査読有り

[学会発表] (計 21 件)

- ① Kazuhiro Kakimi, An Immunogram for the

Cancer Immunotherapy, The 32nd Nagoya International Cancer Treatment Symposium, 2017/2/11、愛知がんセンター (愛知県・名古屋市)

- ② 垣見和宏、腫瘍内免疫応答の評価と個別化がん免疫治療法の開発、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/9、仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ③ 松下博和、垣見和宏、ネオアンチゲンに対する免疫応答と免疫シグネチャーの解析、第 14 回日本免疫治療学研究会、2017/2/11、伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)
- ④ 長岡孝治、宮井まなみ、飯野環、木村真之介、高橋卓也、細井亮宏、松下博和、垣見和宏、ネオアンチゲンワクチンの有効性の検討、第 14 回日本免疫治療学研究会、2017/2/11、伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)
- ⑤ 細井亮宏、長岡孝治、飯野環、竹田和由、鈴木隆二、松下博和、垣見和宏、免疫制御にかかわる抗体治療による腫瘍特異的な CTL の誘導と抗腫瘍効果の比較、第 14 回日本免疫治療学研究会、2017/2/11、伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区)
- ⑥ 小林由香利 長岡孝治 細井亮宏 飯野環 木村真之介 高橋卓也 泉謙道 藤枝奈緒 大平公亮 神原香織 松下博和 垣見和宏、健常人 PBMC を用いた癌患者ネオアンチゲン候補ペプチドのスクリーニング、第 14 回日本免疫治療学研究会、2017/2/11、伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)
- ⑦ 垣見和宏、CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) 療法、第 31 回 Transfusion Medicine Conference、2017/1/27、IPC 生産性国際センター (神奈川県・三浦郡葉山町)
- ⑧ Takahiro Karasaki, Kazuhiro Nagayama, Hideki Kuwano, Jun-ichi Nitadori, Masaaki Sato, Masaki Anraku, Akihiro Hosoi, Hirokazu Matsushita, Yasuyuki Morishita, Kosuke Kashiwabara, Masaki Takazawa, Osamu Ohara, Kazuhiro Kakimi, Jun Nakajima、Immunogram for Cancer-Immunity Cycle towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer、IASLC 17th World Conference on Lung Cancer, 2016/12/7, Vienna, Austria
- ⑨ Hirokazu Matsushita, Kazuhiro Kakimi、Immunoediting of mutation associated neoantigens in the tumor、第 45 回日本免疫学会、2016/12/7、沖縄コンベンション

ンセンター（沖縄県・宜野湾市）

- ⑩ Kazuhiro Kakimi、Personalized Cancer Immunotherapy、2016 International Symposium for Recent Advances in Cell Therapy、2016/10/28、Taipei, Taiwan
- ⑪ 垣見和宏、ネオアンチゲンと Cancer Immunity Cycle、第54回日本癌治療学会学術集会、2016/10/22、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
- ⑫ 垣見和宏、予後・治療効果予測因子としてのネオアンチゲン及び免疫シグネチャーに関する検討、第20回日本がん免疫学会、2016/7/29、大阪国際交流センター（大阪府・大阪市）
- ⑬ 垣見和宏、腫瘍特異的遺伝子変異抗原（Neoantigen）を標的としたがん免疫療法、第15回日本再生医療学会総会、2016/3/18、大阪国際会議場（大阪府・大阪市）
- ⑭ 松下博和、垣見和宏、新生抗原をターゲットにしたがん免疫治療法の開発、第13回日本免疫治療学研究会学術集会、2016/2/27、東京ガーデンパレス（東京都・文京区）
- ⑮ 高橋 卓也、泉 謙道、大平 公亮、小林由香利、藤枝 奈緒、木村 真之介、松下博和、垣見 和宏、がん免疫細胞治療における次世代シーケンサーを活用した投与細胞の品質管理、第13回日本免疫治療学研究会学術集会、2016/2/27、東京ガーデンパレス（東京都・文京区）
- ⑯ Kazuhiro Kakimi、Tumor microenvironment regulates lytic and static effector activity of anti-tumor CTLs、第44回日本免疫学会学術集会、2015/11/20、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）
- ⑰ 宮井まなみ、細井亮宏、飯野環、松下博和、中島淳、中山睿一、垣見和宏、TCRB ディープシーケンスを用いた NY-ESO-1 ペプチドワクチンによる特異的 CD8+T 細胞の動態解析、第7回血液疾患免疫療法研究会学術集会、2015/9/26、伊藤国際学術センター（東京都・文京区）
- ⑱ 垣見和宏、腫瘍特異的遺伝子変異抗原（Neo-antigen）を標的としたがん免疫治療とモニタリング、第13回日本臨床腫瘍学会学術集会、2015/7/16、ロイトン札幌（北海道札幌市）
- ⑲ Takahiro Karasaki, Kazuhiro Nagayama, Manami Miyai, Hirokazu Matsushita, Shingo Kikugawa, Ryo Matoba, Paul

Horton, Osamu Ohara, Kazuhiro Kakimi, Jun Nakajima, In silico prediction of neoantigen for lung cancer targeting shared somatic mutations、第19回日本がん免疫学会総会、2015/7/9、伊藤国際学術センター（東京都・文京区）

- ⑳ Manami Miyai, Shingo Eikawa, Akihiro Hosoi, Tamaki Iino, Hirokazu Matsushita, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Heiichiro Udono, Jun Nakajima, Eiichi Nakayama, Kazuhiro Kakimi、The detection and tracking of NY-ESO-1-specific CD8+ T cells by next generation sequencing of human TCRB CDR3 rearrangements.、第19回日本がん免疫学会総会、2015/7/9、伊藤国際学術センター（東京都・文京区）
- ㉑ Hirokazu Matsushita, Manami Miyai, Yusuke Sato, Tohru Nakagawa, Haruki Kume, Seishi Ogawa, Yukio Homma, Kazuhiro Kakimi、Expression of candidate neoantigens in ccRCC patients and its implication on prognosis、第19回日本がん免疫学会総会、2015/7/9、伊藤国際学術センター（東京都・文京区）

〔その他〕

ホームページ等

<http://immunoth.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣見 和宏 (KAKIMI KAZUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：80273358

(2) 研究分担者

鈴木 隆二 (SUZUKI RTYUJI)

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）・診断・治療研究室・室長

研究者番号：70373470

松下 博和 (MATSUSHITA HIROKAZU)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：80597782