

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14410

研究課題名(和文) 癌細胞に浸潤するB細胞の網羅的遺伝子解析に基づく抗腫瘍抗体の開発研究

研究課題名(英文) Analysis of B cell receptors expressed on tumor infiltrating B cells by next generation sequencing

研究代表者

竹田 和由 (TAKEDA, KAZUYOSHI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80272821

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)：次世代型シーケンサーを用いて、癌組織に浸潤するB細胞(TIB)に発現するB細胞レセプター(BCR・抗体)を網羅的に解析・同定する研究を行った。治療効果が得られた場合にはBCRのクローナリティーは低く、治療効果がなかった場合にはBCRは非常にオリゴクローナルであった。BCRのクローナリティーの変化が治療結果の原因なのか結果であるのか解析を進めている。抗腫瘍効果が得られなかった癌に浸潤するB細胞が産生する抗体と、治療効果が得られた複数の個体に共通する抗体の作製を行い、抗原の解明等を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have examined B cell receptor (BCR)(antibody) expressed on tumor infiltrating B cells (BCRs) by next generation sequencing (NGS). In the tumors that were effectively rejected by immune therapies, BCR clonality was less. Besides, BCRs were highly oligoclonal when we examined TIBs in the immune therapy-resistant tumors, suggesting specific infiltration of TIBs. We now analyze whether alteration of BCR clonality is causes or results of the difference of therapeutic effects. Moreover, we made antibodies produced by TIBs that clonally infiltrating in resistant tumors and antibodies produced by TIBs commonly observed in several rejected tumors, and we are now going to define their antigens.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞レセプター 抗体 T細胞レセプター 抗腫瘍抗体 腫瘍免疫 次世代型シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

これまで、申請者はマウスモデルを用いて腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞(CTL)の生体内での誘導および活性化を目的とした抗体療法の研究において、以下に示すような先進的な報告を行ってきた。

(1)細胞死を誘導する TNF 関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)の発癌や転移に対する免疫学的監視機構の発見。(Nature Med. 2001;7:94-100, J. Exp. Med. 2001;193:661-670, 2002;195:161-169)

(2)TRIL に対する細胞死誘導レセプターである DR5 に対するアゴニスティック抗体を用いた抗体単独治療の開発。(J. Exp. Med. 2004;199:437-448)

(3) 世界で初めての化学発癌した癌をも完全に拒絶しうる、抗 DR5 抗体と、抗原提示細胞の活性化を行う抗 CD40 抗体および CTL を活性化する抗 CD137(4-1BB)抗体の3種抗体の併用(trimAb)により癌特異的 CTL を効果的に誘導する抗体療法の開発。(Nature Med. 2006;12:693-698)

(4) 免疫チェックポイントを抑制する抗体による癌組織内の免疫学的環境の改善により、trimAb 療法による癌特異的免疫療法の奏効率を向上させる治療法の探索。(J. Immunol. 2010;184:5493-5501)

その後、東大医科学研究所で発見された癌特異的に強発現し癌細胞としての特性の維持に重要な役割をする遺伝子に由来する複数の癌抗原(oncoantigen)エピトープの探索研究や、これらを用いた癌ワクチン療法の臨床研究を多くの施設と共同で行った。(J. Transl. Med. 11:291. 2013., OncoImmunology 2(11):e27010. 2013. 他)

これらのマウスモデルでの研究およびヒト臨床試験は、腫瘍特異的な CTL の誘導により癌治療を目指す研究である。これらの研究の過程で、マウス癌組織やヒト癌組織に予想よりも多くの B 細胞が浸潤していることに気づいた。それまでも、癌組織に腫瘍組織内浸潤 B 細胞(TIB)が存在することは報告されていた。TIB は、いくつかのマウスモデル実験における免疫抑制性の B 細胞に関する報告から regulatory T 細胞や MDSC (Myeloid derived suppressor cell)と併に、癌組織中で抗腫瘍免疫を抑制していると想定されているが、その明確な抗腫瘍免疫における生理学的意義、作用機序等は全く明らかにされていない。さらに、この TIB が産生する抗体の特異性は全く明らかにされておらず、従って、この TIB の産生する抗体の抗腫瘍免疫における意義も不明である。

この様に TIB の存在が知られていたものの、その抗腫瘍免疫における意義の研究が進まなかったのは、細胞培養なしに TIB が産生する抗体を解析できず、また全ての TIB が産生する抗体を網羅的かつ定量的に同定する方法がなかったためである。本申請研究の連携研究者である相模原病院臨床研究センター

の鈴木隆二は、次世代シーケンサーを用いて組織から得られた mRNA を用いて、T 細胞レセプターを網羅的かつ定量的に解析する技術を開発していた(BMC Immunol 2016; 17:38.)。申請者は、この連携研究者との協同研究で、組織から得られた mRNA を用いて網羅的に B 細胞レセプター(抗体)を含めた B 細胞に発現する分子を網羅的かつ定量的に解析する技術を開発している。この技術を採用すれば、網羅的かつ定量的に TIB および TIB の産生する抗体の遺伝子情報を迅速に解読・同定することができ、また人工的に TIB の産生する抗体を作製することが可能である。この解析で得られた結果は、すぐに臨床応用可能な抗腫瘍抗体の開発につながるものと考え本研究を発案した。近年、癌に対する抗体療法は抗 Her2 抗体の様な抗腫瘍抗体に加え、免疫チェックポイントを阻害する抗 CTLA4 抗体や抗 PD-1/PD-L1 抗体の応用も進み、臨床的にめざましい成果を上げている。しかし、標的分子の数が限られているために、治療可能な癌腫が限られている。本研究により見出される抗体とその標的分子は、新たな免疫療法への開発へと速やかにつながるものと期待される。

2. 研究の目的

癌治療における抗体療法は臨床的に成果を上げているが、標的分子の数が限られており、治療対象となる癌腫が限られ、新たな標的分子の同定が期待されている。本研究では、癌組織から得られた mRNA を、申請者が連携研究者と併に開発した次世代シーケンサーを用いた網羅的・定量的解析法により解析し、癌組織に浸潤する B 細胞(TIB)および、その産生する抗体の抗腫瘍免疫における意義を明らかにする。さらに人工的に TIB の産生する抗体を作製し、抗体の認識する抗原を同定し、新たな分子を標的とした抗体療法を開発することを最終目標に掲げて研究を進める。

(1)癌組織に浸潤する TIB に発現する B 細胞レセプター(BCR、抗体)を含めた分子を網羅的に解析・同定する。

(2)TIB の産生する抗体を人工的に作製する。

(3)SEREX 法を用いて抗体が認識する抗原を明らかにする。

(4)抗体改変遺伝子操作技術を用いて臨床応用可能な新規抗腫瘍抗体(ヒトキメラ抗体または完全ヒト化抗体)を作製し、臨床的に成果を上げうる新規標的分子の探索と抗体療法を開発する。

(5)免疫療法が奏功している癌組織内の TIB と、免疫治療を回避し増殖している癌組織内の TIB に発現する免疫関連遺伝子を比較しながら機能的解析も行うことで、TIB および TIB の産生する抗体の抗腫瘍免疫における意義を明らかにする。

これは、長期間の細胞培養なしに TIB の産生する抗体を同定し作製する世界最速の新規抗腫瘍抗体の作製技術を用いて、TIB の機能

を基礎免疫学的に明らかにすると同時に、抗腫瘍免疫療法に応用可能な機能分子と抗体を見出し開発する画期的な研究である。

3. 研究の方法

(1) 免疫治療モデルにおける治療効果と TIB の関連の解析

B16メラノーマ細胞およびCMS5線維肉腫細胞モデル

gp100 は B16 メラノーマ細胞に発現するメラノーマ抗原で、この gp100 に特異的な CTL として Pmel-1 (Thy1.1 陽性) が樹立されている。また、メチルコラントレン (MCA) 誘導の CMS5 線維肉腫細胞には、変異型細胞外シグナル制御キナーゼ (mERK) 抗原が癌抗原として発現していることが示されており、mERK に特異的な CTL として DUC18 が樹立されている。B16 メラノーマ細胞の系では $1\sim 10\times 10^5$ 個の Pmel-1 CTL (Thy1.1 陽性) を Th1.2 陽性の B6 マウスに i.v. 移入した 1 日後に B16 メラノーマ細胞 5×10^5 個を皮下移植する。CMS5 線維肉腫細胞の系では $1\sim 10\times 10^5$ 個の DUC18 CTL を BALB/c マウスに i.v. 移入した 1 日後に CMS5 線維肉腫細胞 5×10^5 個を皮下移植する。癌細胞の移植と同日および 5 日後、10 日後に regulatory T 細胞の除去を行う抗 CD4 抗体 (GK1.5)、免疫チェックポイント阻害抗体として知られている抗 CTLA4 (CD154) 抗体 (UC10-4F10)、抗 PD-1 (CD279) 抗体 (RMP1-14)、または免疫を活性化する抗 CD40 抗体 (FGK45)、抗 CD137 (4-1BB) 抗体 (3H3)、抗 GITR (CD279) 抗体 (DTA-1)、抗 OX40 (CD134) 抗体 (OX86) またはコントロール抗体を $200\mu\text{g}$ i.p. 投与する。癌細胞移植から 5 日後、7 日後、10 日後、14 日後と癌の増殖を確認し、退縮傾向にある癌と治療をエスケープし増殖傾向にある癌に分ける。14~25 日後に、それぞれの群から癌組織を採取し、mRNA を得ると共に、リンパ球を単離し、CD19 の発現により TIB の比率を解析する。また TIB を分離して、癌に浸潤するリンパ球および TIB の mRNA を取得する。B16 メラノーマモデルでは、その中の Pmel-1 CTL の比率を Thy1.1 の発現により解析する。得られた mRNA は網羅的解析に用いる。

4T1-HA 乳癌および EG7 リンフォーマモデル

gp100 や mERK より抗原性が高い外来性抗原を遺伝子導入により発現させた癌細胞を用いる実験系では、より顕著に免疫療法の効果が見られ、明確な差のある結果が得られると考えられる。influenza hemagglutinin (HA) 遺伝子を導入した乳癌細胞 4T1-HA 細胞や、EL4 リンフォーマ細胞に OVA 遺伝子が導入された EG7 細胞をマウスに移植し、HA 特異的 CTL クローン (CL4) または OVA 特異的 CTL クローン (OT-1) を i.v. 移入する系でも同様の解析を行う。4T1-HA 乳癌細胞または EG7 リンフォーマ細胞を 5×10^5 個、それぞれ BALB/c マウスまたは B16 マウスに皮下移植し、

同日に抗原特異的 CTL を $1\sim 5\times 10^6$ 個 i.v. 移入する。と同様に 5 日後、10 日後、15 日後に免疫を活性化する抗体、免疫抑制を解除する抗体、またはコントロール抗体を $200\mu\text{g}$ i.p. 投与する。癌細胞移植から 5 日後、7 日後、10 日後、15 日、20 日、25 日後と癌の増殖を確認し、退縮傾向にある癌と治療をエスケープし増殖する癌に分ける。20 日または 25 日後に、それぞれの群から癌組織を採取し、mRNA を得ると共に、リンパ球を単離し、CD19 の発現により TIB の比率を解析する。また TIB を分離して、癌に浸潤するリンパ球および TIB の mRNA を取得する。得られた mRNA は網羅的解析に用いる。

メチルコラントレン (MCA) による線維肉腫の発癌モデル

臨床に非常に近い実験モデルと考えられ、MCA で発癌した癌には、CMS5a の様に何らかの内在性癌抗原 (neoantigen) が発現する可能性が高いことが示唆されており、かつ、trimAb 療法で癌の退縮および拒絶が可能である。そこで、MCA による発癌モデルで、癌の大きさが長径で 5mm に達した時点から、5 日おきに抗 DR5 抗体 (MD5-1)、抗 CD40 抗体 (FGK45)、抗 CD137 抗体 (3H3) を同時に $200\mu\text{g}$ i.p. 投与する (trimAb 療法)。その日から 5 日後、7 日後、10 日後、15 日、20 日後と癌の増殖を確認し、退縮傾向にある癌と治療をエスケープし増殖する癌に分ける。20 日後に、それぞれの群から癌組織を採取し、mRNA を得ると共に、リンパ球を単離し、CD19 の発現により TIB の比率を解析する。また TIB を分離して、癌に浸潤するリンパ球および TIB の mRNA を取得する。得られた mRNA は網羅的解析に用いる。

(2) 免疫学的解析

上記のモデルで腫瘍と同時に、脾臓、所属リンパ節、非所属リンパ節からリンパ球の懸濁液を調整し、種々の表面マーカーを用いたフローサイトメトリーにより免疫担当細胞集団を同定し、細胞数の経時変化を解析する。(3) mRNA を用いた TIB に発現する遺伝子と BCR (抗体) の網羅的かつ定量的解析

得られた癌組織およびリンパ球、TIB から適法に従って mRNA を抽出する。これを BCR の相補的二本鎖 DNA の両端にアダプターを付加した後にアダプタープライマーを用いて遺伝子増幅することで非バイアス的に増幅する新規手法で、多様な BCR を発現した B 細胞の存在比率を変えずに定量的に解析する。この結果を、大規模な遺伝子配列情報を高速処理し、BCR 遺伝子の高速検索を行うクラウド型バイオインフォマティクス遺伝子解析ソフトウェアにより、数 Gb の遺伝子情報について既存のリファレンス配列に対して相同性検索を行い、各領域配列のアサインメントを行うとともに、分類、集計作業を一括して行い、BCR の頻度解析や分布・分散解析、さらには試料間での類似性の解析を行う。

(4) 抗体の作製と抗原の同定

頻度が高い抗体遺伝子に関しては、即座にその抗体遺伝子を発現ベクターに組み込み、大腸菌または CHO 細胞で、その抗体を作製する。この抗体を SEREX 法に用いて、抗体の認識する抗原の同定を進める。同時に得られた抗体を用いて実験系に用いた癌細胞株、マウス皮下で増殖している癌組織切片、治療により退縮している癌の組織切片の染色を行い、抗原分子の発現頻度等の解析を行う。抗原を強発現する細胞が見出された場合には、その細胞を用いての抗原同定を行う。

(5) 抗体の改変

治療効果の得られそうな新たな抗体の候補が得られた場合には、抗体改変遺伝子操作技術を用いて臨床応用可能な新規抗腫瘍抗体（ヒトキメラ抗体または完全ヒト化抗体）を作製する。その後、その特異性、affinity、機能性等をヒト由来の細胞を使って確認し、臨床応用の可能性を探る。

[倫理面への配慮]

「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、順天堂大学および相模原病院における動物取扱の取り決めを遵守して行う。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、各施設における動物倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受けて実施する。

4. 研究成果

外来性抗原を発現する2つの癌細胞および、内在性の癌抗原を発現した2つの癌細胞を用いての、いずれの治療実験系においても、非常に興味深いことに、癌組織へ浸潤する T 細胞と T 細胞レセプター (TCR)、B 細胞 (TIB) と TIB の産生する抗体 (IgG と IgM) の解析結果には共通した傾向が見られた。

いずれの実験系においても、大多数の免疫療法で、治療効果が得られ癌が退縮傾向にある場合には、癌組織内の TCR のクローナリティーが高くなっており、腫瘍特異的と考えられるオリゴクローナルな T 細胞の浸潤が示された。それに対し、B 細胞の浸潤は治療効果の得られた場合には多くの免疫療法でクローナリティーが低くなり、非特異的な TIB の浸潤が示された。それに対して、治療効果の見られなかった増殖中の癌組織では、BCR が非常にオリゴクローナルで、何らかの特異性を持った B 細胞が選択的に癌組織内へ浸潤していることが示された。

治療効果に相関する TCR のクローナリティーの変化の結果は、これまでの複数の論文報告と一致する。しかし、治療効果が高いほど BCR のクローナリティーの低い事は世界で初めて得られた結果である。現在、この BCR のクローナリティーの変化が治療結果の原因で

あるのか結果であるのか、解析を進めている。一方で、免疫療法が奏効しなかった場合に B 細胞のクローナリティーが高いことは、免疫抑制性 B 細胞に、より強い癌特異性がある可能性が示唆されていると考えられ、この BCR のシーケンスから抗体を作製した。現在、この TIB の免疫抑制作用の解析と、この抗体の認識する抗原の特定を進めており、候補となる抗原を複数同定している。

さらに興味深いことに、抗腫瘍効果の得られた癌に浸潤しているリンパ球の中に、複数の個体に共通する癌抗原特異的な TCR と考えられるシーケンスと伴に、クローナリティーの低い TIB の中でも、複数の個体に共通する IgM と IgG (重鎖と軽鎖) のシーケンスが認められた。この共通の BCR のシーケンスから抗体作製を行い、その抗原の解明を進めているが、研究成果を論文発表等で情報を開示できるまでには至っていない。

治療効果の差に相関した浸潤している TIB のクローナリティーの変化は、免疫療法の治療効果に TIB が影響している可能性が考えられ、抗腫瘍免疫を阻害する抑制性 B 細胞が regulatory T 細胞や MDSC の様に増殖する癌細胞に選択的に浸潤している可能性を示唆している。また、その抗体の認識する抗原の解析は、癌特異的抗体として治療への応用が期待される。しかし、残念ながら本研究期間中に結論を得ることができなかった。今後も、得られたシーケンス情報や抗体を使い、早々に結果を報告できるよう研究を進める。詳細なシーケンス情報等は、今後の特許取得等との関連で公開できない。そのため、解析に用いた複数のマウス癌モデルの中から、ヒトのメラノーマにも発現する癌抗原 gp100 を発現する B16 メラノーマ細胞を、gp100 特異的 Pmel-1CTL 細胞と抗 CD137(4-BB)抗体で治療した実験で得られた結果の 1 例を示す。CTL 移入と活性化抗体に投与により抗腫瘍効果が発揮され退縮傾向にある癌組織と比較して(図1)、治療の効果を受けずに増殖を続けている癌組織には非常に限られた IgM を産生する B 細胞のみ浸潤していることが、TIB の産生する IgM のレパートリーの解析結果から明らかに示されている(図2)。

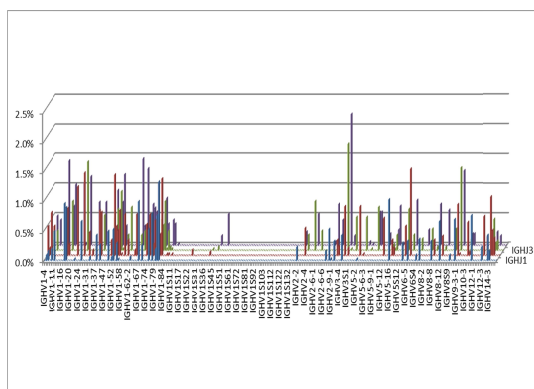


図1: CTL療法が奏功した癌に浸潤したB細胞の産生するIgM repertoire

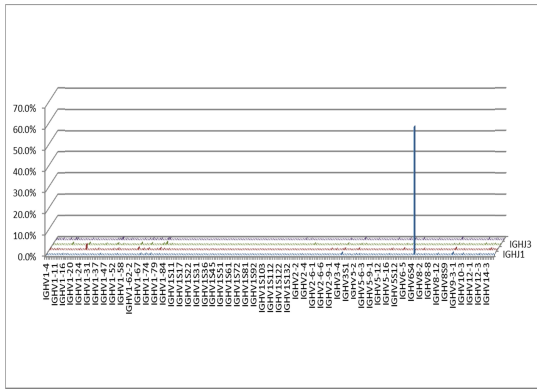


図2:CTL療法耐性の癌に浸潤したB細胞の産生するIgM repertoire

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Takeda, K., Nakayama, M., Hayakawa, Y., Kojima, Y., Ikeda, H., Naoko Imai, N., Ogasawara, K., Okumura, K., Thomas, D. M. and Smyth, M. J.: IFN- γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nature Commun.* 8: 14607, 2017. (査読有り)
DOI: 10.1038/ncomms14607.

Liu, J., Blake, S. J., Harjunpaa, H., Fairfax, K. A., Yong, M. C., Allen, S., Kohrt, H. E., Takeda, K., Smyth, M. J., and Teng, M. W. L.: Assessing immune-related adverse events of efficacious combination immunotherapies in preclinical models of cancer. *Cancer Res.* 76 (18): 5288-5301. 2016. (査読有り)
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0194

Young, A., Ngiow, S. F., Barkauskas, D. S., Sult, E., Hay, C., Stephen J. Blake, S. J., Huang, Q., Liu, J., Takeda, K., Teng, M. W. L., Sachsenmeier, K., and Smyth, M. J. Co-inhibition of CD73 and A2AR adenosine signaling improves anti-tumor immune responses. *Cancer Cell* 30 (3): 391-403.2016. (査読有り)
DOI:10.1016/j.ccell.2016.06.025

Blake, S. J., Stannard, K., Liu, J., Allen, S., Yong, M. C., Mittal, D., Aguilera, A. R., Miles, J. J., Lutzky, V. P., de Andrade, L. F., Martinet, L., Colonna, M., Takeda, K., Kuhnel, F., Gurlevik, E., Bernhardt, G., Teng, M. W., and Smyth, M. J.: Suppression of metastasis using a new lymphocyte checkpoint target for cancer immunotherapy. *Cancer Discov.* 6 (4): 446-459.2016. (査読有り)

DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0944
Naito, T., Baba, T., Takeda, K., Sasaki, S., Nakamoto, Y. and Mukaida, N.: High-dose cyclophosphamide induces specific tumor immunity with concomitant recruitment of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells into tumor sites. *Cancer Letters* 366 (1): 93-99. 2015. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.009

[学会発表](計 3 件)

Nagaoka, K., Hosoi, A., Matsushita, H., Kubo, M., Takeda, K., Kakimi, K. : Most of the CD8+ TIL are tumor reactive in spontaneously regressing or progressing murine gastric cancer. 第44回日本免疫学会学術総会 2015年11月18日札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Matsumura, Y., Ito, Y., Wali, N., Ito, T., Mogushi, K., Terao, Y., Takeda, S., Okumura, K., Takeda, K., Hino, O., Orimo, A. : Carcinoma-associated fibroblasts raise highly aggressive cancer cells via metastasis- promoting autocrine signaling. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月09日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Takeda, K. : IFN- γ produced by cytotoxic T cells immunoedits the cancer genome. International conference of cancer immunotherapy and macrophage 2015. 2015年07月09日 東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹田 和由 (TAKEDA, Kazuyoshi)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号 : 80272821

(3)連携研究者

鈴木 隆二 (SUZUKI, Ryuji)
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