

令和元年6月5日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07162

研究課題名(和文) 遺伝子変異由来ネオエピトープを標的としたがん免疫治療の開発

研究課題名(英文) Development of cancer immunotherapy targeting mutation-derived neoantigens

研究代表者

松下 博和 (MATSUSHITA, Hirokazu)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫制御TR分野・分野長

研究者番号：80597782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異由来のネオ抗原をターゲットにした腎がんの免疫療法を開発することを目的とし、5例の腎癌のエクソーム/RNAシーケンスのデータからin silicoのMHC結合予測アルゴリズムを用いて、121個のHLA-A2拘束性の候補ネオエピトープを同定した。これらのネオエピトープペプチドに対する免疫反応をまずはHLA-A2トランスジェニックマウスを用いてスクリーニングしたところ、15個のペプチドで強い反応が検出された。次に、その15個のペプチドに対するヒト正常人PBMCの免疫反応を検討した。PTEN遺伝子変異由来のネオエピトープに対して反応を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの腎がん組織からエクソーム/RNAシーケンスにより体細胞変異を同定し、MHC結合予測アルゴリズムを用いて候補ネオエピトープを同定した。そして、実際に合成したネオエピトープペプチドに対するヒト正常人PBMCの免疫反応を、人工抗原提示細胞等を利用した我々のアッセイシステムで検出可能であった。本研究を通じて、非常に頻度の低いヒト末梢血中のネオエピトープ特異的T細胞を検出することが可能な培養法とアッセイ法を確立することができ、今後、他のがんのネオエピトープの同定にも応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of developing immunotherapy of renal cell carcinoma (RCC) targeting neo-antigens derived from somatic mutations, using in silico MHC binding prediction algorithm for the data of the exome/RNA sequencing of 5 RCC cases, 121 HLA-A2 restricted candidate neo-epitopes have been identified. The immune response to these neo-epitope peptides first was screened using HLA-A2 transgenic mice, strong reaction was detected in 15 peptides. Then, we examined the immune responses of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HLA-A2 positive healthy donor for the 15 peptides. The reaction was observed for a neo-epitope derived from PTEN gene mutation.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腎癌 遺伝子変異 ネオ抗原 MHC結合予測アルゴリズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近の次世代シーケンスの結果から、メラノーマや肺がんでは体細胞変異の数が他のがん種に比べて非常に多く、この体細胞変異から生じるがん細胞のみに発現し正常細胞には発現しないネオエピトープが免疫系のターゲットとなり、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果に寄与している可能性が報告された(Snyder A, et al. N Engl J Med. 2014; 371 (23): 2189-99., Rizvi NA, et al. Science. 2015;348(6230):124-8.)。

ヒトがんの中で、腎がんはメラノーマと並んで免疫原性の高い腫瘍の一つと考えられている。腎がんの肺転移が自然退縮した例や、腎臓(原発)摘出後に消失した例が報告されており、腫瘍の退縮、消失には免疫応答が関係していると考えられる。また、IL-2やIFNが腎がんの標準治療として用いられ、一部の症例では腫瘍の消失や縮小効果が見られた。さらに、免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体治療において、メラノーマや肺がんとならば高い臨床効果が認められた(Topalian SL, et al. N Engl J Med 2012; 366:2443-54)。これらの事実から、腎がんがメラノーマや肺がんと同様、免疫感受性の高い腫瘍であることが再認識された。

これまで次世代シーケンスを用いたエクソーム解析により腫瘍における体細胞遺伝子変異を同定し、それらから生じるネオエピトープを予測するという一連の予測アルゴリズムの開発を行ってきた(松下、科学研究費基盤C、2013年度、長山、科学研究費基盤C、2014年度)。淡明細胞型腎細胞がん(ccRCC)97症例のエクソームとRNAのシーケンスのデータ(Sato Y. et al. Nat Genet. 45(8): 860-867、2013)をもとに、患者の組織適合性抗原(HLA)を決定し、それぞれのHLAに結合する親和性の高いネオエピトープ(IC50<500nM)の数を、ネオエピトープ予測アルゴリズムを用いて決定した。その候補ネオエピトープの数を中央値でhigh、lowに別け、さらに、全RNAシーケンスのデータからHLAの発現を中央値でhigh、lowに別け、生存期間を検討したところ、HLA-A拘束性の候補ネオエピトープの数が多く(A-neo≥9)、HLA-Aの発現が高い集団では、生存期間が延長する傾向が見られ、さらに、腫瘍内へのCD8陽性T細胞の浸潤が多く、パーフォリンやグランザイムなどの細胞傷害顆粒が発現しており、腫瘍内に強い抗腫瘍免疫応答が誘導されている特徴が認められた(Matsushita H et al, Cancer Immunol Res, 2016)

さらに、臨床試験「腎細胞がんに対する樹状細胞ワクチン治療の安全性と有効性の評価」(UMIN 000002136)を行っている(前述のccRCC 97症例はここに含まれない)。この樹状細胞ワクチンは、樹状細胞に自己腫瘍ライセートを導入したワクチンである。そのワクチン治療経過中に腫瘍ライセートに対するT細胞免疫反応を検出できた症例があった。また、そのような症例で良好な臨床効果が見られた(Matsushita H et al, Journal for Immunotherapy of Cancer 2014, 2:30)。腫瘍ライセートには、遺伝子変異由来のアミノ酸変異を伴ったネオエピトープを網羅的に含んでいる。しかし、この腫瘍ライセートに含まれるネオエピトープは未同定である。

2. 研究の目的

遺伝子変異由来のアミノ酸変異を伴ったネオエピトープが腎がんの抗腫瘍効果、臨床効果に寄与しているという proof of concept (POC) を得て、それをターゲットにした腎がん免疫治療を開発することが目的である。臨床試験「腎細胞がんに対する樹状細胞ワクチン治療の安全性と有効性の評価」に登録され、腫瘍ライセート導入樹状細胞ワクチンを受けた患者のエクソーム/RNAシーケンスのデータから、我々の構築してきたネオエピトープ予測アルゴリズムにより、候補ネオエピトープを選択し、実際にそのネオエピトープが免疫反応を引き起こすか検証する。腫瘍ライセートに対する免疫反応、予後がわかっているワクチン治療症例を用いてこの検証作業を行うことで、我々のネオエピトープ予測アルゴリズムを更に改良し臨床応用に繋げる。

3. 研究の方法

(1)患者検体の採取およびDNA、RNAの調製

臨床試験(UMIN000002136)に登録され、治療を受けた患者の腫瘍組織、近傍正常組織からDNA、RNAの調製を行った。

(2)ネオエピトープの予測

8例の患者の腎がん腫瘍組織、近傍正常組織のDNA、RNAから全エクソームシーケンスと腫瘍組織のRNAシーケンスを行った。

(3)ネオエピトープペプチド合成

それぞれの症例につき、選択したアフィニティの高いペプチドをペプチド合成装置(Syrowave パイオタージ・ジャパン株式会社)で合成した。

(4)人工抗原提示細胞(aAPC)の作成

それぞれのHLAを発現する人工抗原提示細胞(artificial antigen presenting cell, aAPC)を作成した。K562にCD86、4-1BBLを導入した細胞株(86BB)にHLA遺伝子を導入しHLA発現86BB株を得た。

(5)ネオエピトープ特異的免疫反応の検証

上記aAPCを用いて、予測した候補ネオエピトープに対する免疫反応が実際に引き起こされるかを、細胞内IFN-gamma染色法およびELISA法で検証した。

4. 研究成果

8例の腎がん腫瘍組織、近傍正常組織からDNA、RNAの調製を行い、全エクソンシーケンスと腫瘍組織の全RNAシーケンスを行った。エクソーム変異解析ソフトMuTectによる8例のミスセンス変異は平均44個(17-65個)であった。腎がん組織の全RNAシーケンスでFPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments sequenced)が1以上のものを選択した。8例の患者のHLA-A、-B、-Cに基づき、ミスセンス変異由来でImmune Epitope Database (IEDB)のNetMHCpanでIC₅₀が500nM以下のアフィニティの高いネオエピトープを選択した(図1)。

これらのうちHLA-A2陽性患者5例の腎癌のデータから121個のHLA-A2拘束性の候補ネオエピトープを同定した。これらのネオエピトープペプチドを合成し、ペプチドに対する免疫反応をまずはHLA-A2トランスジェニックマウスの脾細胞を用いてスクリーニングした。15個のペプチドに対して強いIFN-gammaの産生が見られた(図2)。

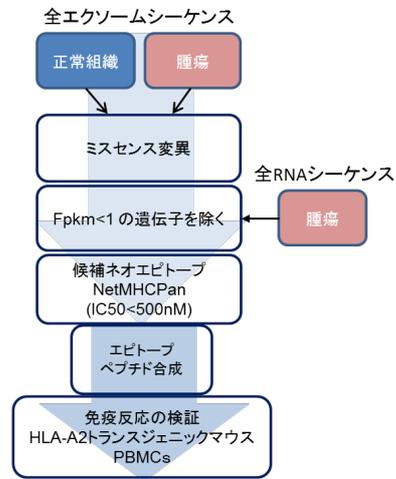


図1 *in silico* MHCクラスI結合予測アルゴリズムによる候補ネオエピトープの同定と免疫反応性の検証

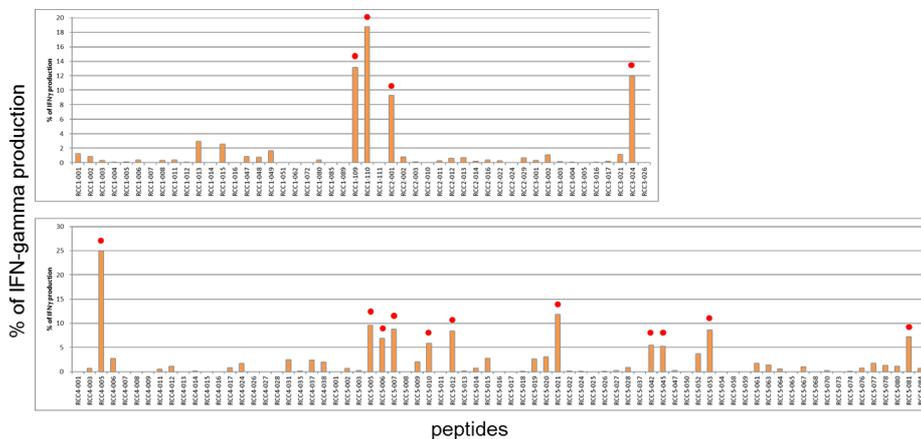


図2 HLA-A2陽性腎癌患者5例のエクソーム/RNAシーケンスデータから121個のHLA-A2拘束性の候補ネオエピトープを同定した。これらのネオエピトープペプチドを合成し、ペプチドに対する免疫反応をHLA-A2トランスジェニックマウスの脾細胞を用いてIFN-gamma ELISAでスクリーニングした。

次に、その15個のペプチドに対するヒト正常人PBMCの免疫反応を検討した。PTEN 遺伝子変異由来のネオエピトープ(RCC5-045)に対して反応を認めた(図3)。

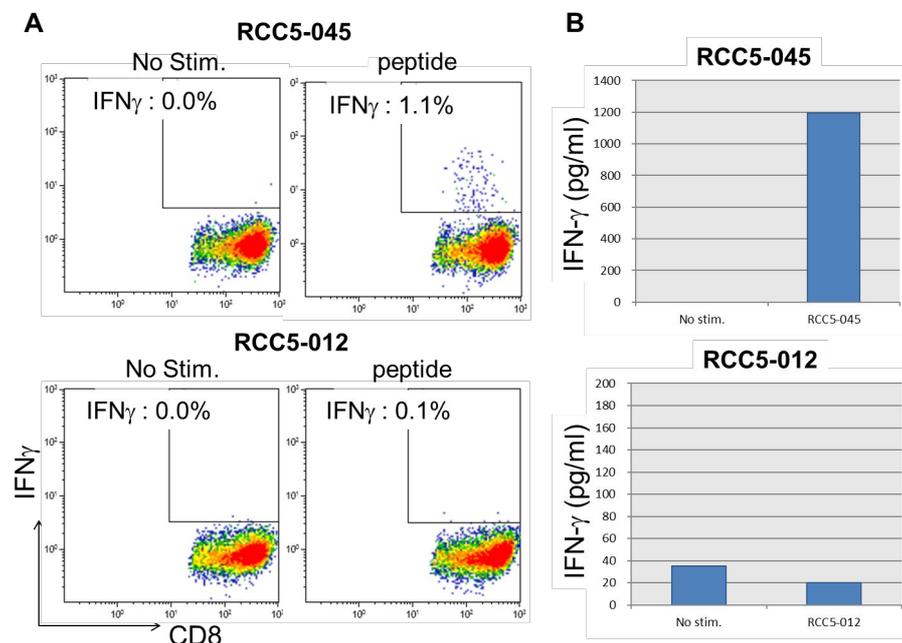


図3 HLA-A2トランスジェニックマウスの脾細胞を用いたスクリーニングで陽性反応を認めた15個のペプチドに対してヒト正常人PBMCの免疫反応を検討した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Nejo T, Matsushita H, Karasaki T, Nomura M, Saito K, Tanaka S, Takayanagi S, Hana T, Takahashi S, Kitagawa Y, Koike T, Kobayashi Y, Nagae G, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Narita Y, Nagane M, Ueki K, Nishikawa R, Aburatani H, Mukasa A, Saito N, Kakimi K. Reduced Neoantigen Expression Revealed by Longitudinal Multiomics as a Possible Immune Evasion Mechanism in Glioma. *Cancer Immunol Res*. 2019 May 14. 査読有
2. Imai Y, Hasegawa K, Matsushita H, Fujieda N, Sato S, Miyagi E, Kakimi K, Fujiwara K. Expression of multiple immune checkpoint molecules on T cells in malignant ascites from epithelial ovarian carcinoma. *Oncol Lett*. 2018 May;15(5):6457-6468. 査読有
3. Yamamoto M, Nomura S, Hosoi A, Nagaoka K, Iino T, Yasuda T, Saito T, Matsushita H, Uchida E, Seto Y, Goldenring JR, Kakimi K, Tatematsu M, Tsukamoto T. Established gastric cancer cell lines transplantable into C57BL/6 mice show fibroblast growth factor receptor 4 promotion of tumor growth. *Cancer Sci*. 2018 May;109(5):1480-1492. 査読有
4. Nagaoka K, Hosoi A, Iino T, Morishita Y, Matsushita H, Kakimi K. Dendritic cell vaccine induces antigen-specific CD8+ T cells that are metabolically distinct from those of peptide vaccine and is well-combined with PD-1 checkpoint blockade. *Oncoimmunology*. 2017 Nov 20;7(3):e1395124. 査読有
5. Hosoi A, Takeda K, Nagaoka K, Iino T, Matsushita H, Ueha S, Aoki S, Matsushima K, Kubo M, Morikawa T, Kitaura K, Suzuki R, Kakimi K. Increased diversity with reduced "diversity evenness" of tumor infiltrating T-cells for the successful cancer immunotherapy. *Sci Rep*. 2018 Jan 18;8(1):1058. 査読有
6. Hoshikawa M, Aoki T, Matsushita H, Karasaki T, Hosoi A, Odaira K, Fujieda N, Kobayashi Y, Kambara K, Ohara O, Arita J, Hasegawa K, Kakimi K, Kokudo N. NK cell and IFN signatures are positive prognostic biomarkers for resectable pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 8;495(2):2058-2065. 査読有
7. Matsushita H, Hasegawa K, Oda K, Yamamoto S, Nishijima A, Imai Y, Asada K, Ikeda Y, Karasaki T, Fujiwara K, Aburatani H, Kakimi K. The frequency of neoantigens per somatic mutation rather than overall mutational load or number of predicted neoantigens per se is a prognostic factor in ovarian clear cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2017 Jun 16;6(8):e1338996. 査読有
8. Aoki T, Matsushita H, Hoshikawa M, Hasegawa K, Kokudo N, Kakimi K. Adjuvant combination therapy with gemcitabine and autologous $\gamma\delta$ T-cell transfer in patients with curatively resected pancreatic cancer. *Cytotherapy*. 2017 Apr;19(4):473-485. 査読有
9. Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori JI, Sato M, Anraku M, Hosoi A, Matsushita H, Morishita Y, Kashiwabara K, Takazawa M, Ohara O, Kakimi K, Nakajima J. An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2017 May;12(5):791-803. 査読有
10. 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 Feb;108(2):170-177. 査読有

11. Odaira K, Kimura SN, Fujieda N, Kobayashi Y, Kambara K, Takahashi T, Izumi T, Matsushita H, Kakimi K. CD27(-)CD45(+) $\gamma\delta$ T cells can be divided into two populations, CD27(-)CD45(int) and CD27(-)CD45(hi) with little proliferation potential. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 23;478(3):1298-303. 査読有
12. Kakimi K, Karasaki T, Matsushita H, Sugie T. Advances in personalized cancer immunotherapy. Breast Cancer. 2017 Jan;24(1):16-24. 査読有
13. 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 May;4(5):463-71. 査読有
14. 松下博和, 唐崎隆弘, 垣見和宏 がん免疫療法 What ' s now and what ' s next? 第3章 がん免疫療法臨床試験からのレッスン 2.宿主免疫でのネオアンチゲンの役割 遺伝子医学 MOOK (31) 151 156 2017 査読無
15. 松下博和 がん免疫 第3回 免疫編集とネオ抗原の意義 炎症と免疫 25(3) 231 235 2017 査読無
16. 松下博和, 垣見和宏 がん免疫療法 II.各論 がん免疫細胞療法 T細胞を用いたがん免疫治療 日本臨床 75(2) 301 305 2017 査読無
17. 松下博和 がん免疫療法の最新動向 免疫チェックポイント阻害剤の将来展望 免疫チェックポイント阻害とネオ抗原特異的T細胞 カレントセラピー 35(2) 113 119 2017 査読無

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Hirokazu Matsushita The role of mutation-derived neoantigens in cancer therapy:A possible Immune evasion mechanism through reduced neoantigen expression in glioma Nagoya Immunology Network in NCU The first international symposium 愛知県名古屋市 (名古屋市立大学病院 3階大ホール) 2019/3/11
2. 松下博和 高悪性度漿液性腺癌 (HGSC) におけるネオアンチゲンの多寡と予後との関連 第16回 日本免疫治療学会学術集会 東京都文京区(東京大学 伊藤国際学術研究センター) 2019/2/23
3. 松下博和 次世代シーケンサーを活用したネオアンチゲンに対する免疫応答の検討第31回 日本バイオセラピー学会 学術集会総会、東京都新宿区 (京王プラザホテル) 2018/12/13 ~14
4. Matsushita H, Hasegawa K, Oda K, Yamamoto S, Asada K, Yabuno A, Nishijima A, Karasaki T, Ikeda Y, Fujiwara K, Aburatani H, Kakimi K Neoantigen load and HLA-class I expression characterize a subset of HR-proficient high-grade serous ovarian carcinomas with favorable prognosis and T cell-inflamed phenotype. AACR(American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2018, McCormick Place North/South Chicago, Illinois
5. Matsushita H, Hasegawa K, Kakimi K Neoantigen burden and HLA -class I expression define a subgroup of HR-proficient high-grade serous ovarian carcinomas with T-cell-inflamed phenotype and better prognosis THE 45th NAITO CONFERENCE ON Immunological and Molecular Bases for Cancer Immunotherapy 2018, SAPPORO, Japan
6. 松下博和, 垣見和宏 次世代シーケンサーを活用したネオアンチゲンと免疫応答の解析 第14回 日本がん免疫学会 (シンポジウム・招待講演) 岡山市 2018/8/1
7. 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 学術集会 (シンポジウム・招待講演) 東京都文京区 2017/2/11
8. Matsushita H, Hasegawa K, Oda K, Yamamoto S, Nishijima A, Imai Y, Asada K, Ikeda Y, Karasaki T, Fujiwara K, Aburatani H, Kakimi K Neoantigen frequency as an independent prognostic factor in patients with clear ovarian carcinoma(COOC) AACR(American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2017, Washington Convention Center

9. Hirokazu Matsushita, Kazuhiro Kakimi Immunoediting of mutation associated neoantigens in the tumor 第45回 日本免疫学会(シンポジウム・招待講演) 沖縄県宜野湾市 2016/12/7
10. 松下博和、垣見和宏 DC-based immunotherapy targeting neoantigens 第20回 日本がん免疫学会(シンポジウム・招待講演) 大阪府大阪市 2016/7/28
11. 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(シンポジウム・招待講演) 東京都文京区 2016/2/27

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan_seigyoo/index.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：垣見和宏

ローマ字氏名：(KAKIMI, Kazuhiro)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任教授

研究者番号(8桁)：80273358

(2)研究分担者

研究分担者氏名：久米春喜

ローマ字氏名：(KUME, Haruki)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：教授

研究者番号(8桁)：10272577

(3)研究分担者

研究分担者氏名：中川 徹

ローマ字氏名：(NAKAGAWA, Tohru)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：40591730

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。