

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10612

研究課題名(和文)胆道癌における遺伝子変異と免疫抑制分子及びネオアンチゲン発現の解析

研究課題名(英文)Analysis of neoantigen from gene mutation in biliary tract cancer

研究代表者

有賀 淳 (ARUGA, Atsushi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：40221056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当該施設において外科手術時にICにて同意が得られた胆道癌患者4人よりそれぞれ胆道癌部及び非癌部を4サンプルずつ、合計8サンプルを採取し、各サンプルよりDNAを抽出してそれぞれのライブラリ調整及びテンプレート調整を行った後に、次世代シーケンサーにて全エクソームシーケンスを実施した。Ion Reporterによるtumor-normalペア解析より、胆道癌組織における変異遺伝子と変異部位を同定し、シーケンスリードデータより各サンプルのHLA-Aアリルを決定した後に、各HLA-Aアリルに対するネオアンチゲンエピトープの結合能をNetMHCにて解析して、各胆道癌のネオアンチゲンエピトープを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌は外科手術、抗がん剤治療、放射線療法が発展した現在でも未だに予後が極めて不良な疾患であり、有効な治療法の開発が必須である。近年、T細胞の免疫応答を強く抑制する免疫チェックポイントを阻害する抗体医薬が開発され、癌に対する免疫応答の重要性が明らかとなった。特に癌細胞における遺伝子変異由来のネオアンチゲンに対してT細胞が強く応答することが判明している。本研究ではヒト胆道癌における遺伝子変異を解析し、T細胞免疫応答の標的となるネオアンチゲンエピトープの同定が可能であることを示した。今後の胆道癌のネオアンチゲン標的免疫治療の新規開発のため、意義のある研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：A total of 8 samples were collected from 4 patients with biliary tract cancer after informed consent at our institution. DNA was extracted from each sample and library and template for the next-generation sequencer were prepared. After identifying the mutant gene and mutation site in the biliary tract cancer tissue by tumor-normal pair analysis with Ion Reporter software and determining the HLA-A allele of each sample from the sequence read data, the neoantigen epitope of each cancer tissue was identified by NetMHC, which could analyze the binding ability of the peptides to HLA-A allele.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：胆道癌 ネオアンチゲン 腫瘍免疫 遺伝子解析 免疫療法 遺伝子変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胆道癌は予後が極めて不良な疾患であり、有効な治療法の開発が必須である。近年、T細胞の免疫応答を強く抑制する免疫チェックポイントを阻害する抗体医薬が開発され、多くの癌種で保険収載されたが、胆道癌への開発は十分進んでいない。免疫チェックポイントに関する研究の結果より、ヒトの癌に対する免疫応答は主にT細胞が癌細胞における遺伝子変異に由来する変異抗原(ネオアンチゲン)を認識して強い免疫応答を起こすことが判明した。癌細胞の遺伝子変異は近年開発が進んでいる次世代シーケンサーを利用した全エクソームシーケンスから同定が可能であり、その解析結果よりネオアンチゲンを同定する方法が現在メラノーマや肺癌などを対象として精力的に進められている。胆道癌においても同様なメカニズムによりネオアンチゲンに対するT細胞免疫応答を利用した新規治療法の開発が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では未だ有効な治療法に乏しいヒト胆道癌に対して、癌細胞における遺伝子変異を次世代シーケンサーを使用した全エクソームシーケンスで解析して、その結果より遺伝子変異の部位と変異アミノ酸を同定し、in silicoでのコンピューター解析によりネオアンチゲンエピトープを同定することを目的とする。個々のヒト胆道癌におけるネオアンチゲンエピトープが同定可能であれば、新たなネオアンチゲン標的免疫治療の開発に繋がることが期待される、意義のある研究と考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 研究に先立ち、東京女子医科大学の遺伝子解析倫理審査委員会に研究計画書を提出し、途中、個人情報保護法の制定、倫理指針の改正等による研究計画書の変更を随時行って最終プロトコールを2017年5月29日に提出し、同年6月2日に承認された。承認研究題目は「胆道癌における遺伝子変異解析」であり、承認番号は337Bである。

(2) 倫理審査委員会の承認後からプロトコールに従い、東京女子医科大学消化器外科において外科的に手術が施行された胆道癌患者に対して本研究の内容を文書を用いたインフォームドコンセントを行い、研究参加への同意が文書で得られた患者の手術切除組織より、癌部及び非癌部を採取して凍結保存した。得られたサンプルはすべて匿名化し、対応表を個人識別情報管理者により厳重に保管した。その後の遺伝子変異解析はすべて匿名化された記号を使用して実施した。

(3) 凍結組織からPureLink Genomic DNA Kit (K-1820-01)を使用してDNAを抽出した。各サンプルより抽出したDNAの濃度はNanoDrop及びQubit4にてOD260nmにて測定し、ODの数値X50でDNA濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を決定した。

(4) 各サンプルから抽出したゲノムDNAをIon AmpliSeq Library Kit Plus (4488990)を用いてライブラリ調整を行った。各サンプルのゲノムDNAを100ng/56 $\mu\text{L}$ に調整し、Ion AmpliSeq Exome RDYプレートに5 $\mu\text{L}$ ずつ分注し、キットのプロトコールに従ってPCRを行った。ライブラリー濃度は50pMで作成した。

(5) テンプレート調整のためにエマルジョンPCRを用いた単一増幅を行い、その後に遠心して回収し、濃縮して半導体チップにローディングした。

(6) Ion Torrentシステムのプロトコールに従って、各サンプルの全エクソームシーケンスを行った。シーケンスのリードデータは専用の外付けポータブルハードディスクに記録して、解析に使用する以外の時間は鍵のかかるデスクの引き出しに保管して管理した。

(7) 各サンプルの遺伝子変異をThermoFisher ScienceのIon Reporterを使用して解析した(<https://ionreporter.thermofisher.com/ir/secure/home.html>)。最初に各サンプルの全エクソームシーケンスデータを用い、同一患者の癌部組織と非癌部組織をペアで比較解析して、癌部組織においてのみ認められたvariant数及びフィルター後のvariant数を解析した。さらに遺伝子変異によりアミノ酸が変異するミスセンス変異を生じている遺伝子を抽出し、変異したアミノ酸の部位と名称を同定した。その上で、NCBIのデータベース上の遺伝子配列データを参照して、変異アミノ酸の前後の8もしくは9アミノ酸基を加えた17もしくは19のアミノ酸基を決定して、各癌組織のネオアンチゲンエピトープ含有配列を決定した。

(8) 非癌部組織のシーケンスにより得られた塩基配列データを用いて、各サンプルのHLA-Aアリルを解析した。HLA-Aの遺伝子情報は6番染色体上の短腕に存在するため、各サンプルのシーケンスデータを染色体にマッピングしたBAMファイルを作成し、Integrative Genomics Viewer(IGV)ソフト上で展開し、hg19の遺伝子配列をリファレンスとしてHLA-A領域の塩基配列を同定した。各サンプルのHLA-Aアリルに関する塩基配列データをIPD-IMG/HLAデータベース(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)に記載のHLA-Aアリルデータと照合して、最も類似性の高いHLA-Aアリルを決定した。

(9) 各サンプルの HLA-A アリルに対して、(7)にて決定された各癌組織のネオアンチゲンエピートープ含有アミノ酸配列の binding affinity を専用解析ソフトである NetMHC4.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHC-4.0>)を用いて in silico に解析して、各癌組織におけるネオアンチゲンエピートープを決定した。この時、HLA-A に結合するペプチドのアミノ酸基は通常 9~10 基のアミノ酸であることより、9mer 及び 10mer のネオアンチゲンエピートープをそれぞれの HLA-A アリルに対して同定した。

#### 4. 研究成果

(1) 胆道癌、特に胆管癌では遺伝子変異解析に十分なサンプルを採取することが困難であり、また手術数も少ないため研究実施のためのサンプル採取は容易ではなかったが、最終的に 2019 年 10 月までに 4 例の胆道癌手術患者より同意が得られて癌部及び非癌部の合計 8 サンプルが採取された。採取されたサンプルはそれぞれ 1N、2C、3N、4C、AN、BC、DN、EC と匿名化された。記号上、1 と 2、3 と 4、A と B、D と E は同一患者のサンプルであり、N は非癌部(normal)、C は癌部(cancer)を意味するものとし、以降の癌部 非癌部ペア解析が可能となるようにした。

(2) 各サンプルよりライブラリ調整に必要な量のゲノム DNA が抽出され、PCR 後の定量測定で 50pm のライブラリー調整が実施できた。

(3) テンプレート調整から Ion Torrent システムによる次世代シーケンサーによる全エクソームシーケンスを行った結果のランレポートにて、良好なシーケンスリードデータが得られたことが確認された(ISP loading 91%以上、Usable Reads 62%以上、Enrichment 100%)。

(4) Ion Reporter5.12 による normal-tumor ペア解析による各サンプルの variant 数

Normal	Tumor	Total Genes	Total Variants	Filtered in Variants
1N	2C	19687	742	290
3N	4C	20499	466	191
AN	BC	19697	448	199
DN	EC	19695	333	76

Filter: 0.0<P<5.0E-6, Confident somatic variants, 10.0<CNV confidence range<1.0E7, 0.1<allele ratio<1.0

(5) 遺伝子変異の解析結果よりミスセンス変異遺伝子を抽出し、それらの変異部位および変異アミノ酸を同定した。1N-2C ペア解析で 49、3N-4C ペア解析で 42、AN-BC ペア解析で 62、DN-EC ペア解析で 9 のミスセンス変異が同定された。次に、ミスセンス変異が見つかった遺伝子の変異アミノ酸の前後 8 基の正常アミノ酸配列を、NCBI のデータバンクに掲載されているリファレンス遺伝子配列を参照して同定した。例えば No.1 の NT5C1A 遺伝子の 76 番目のアミノ酸前後 8 アミノ酸基配列は NCBI の NM\_032526.2 のリファレンスシーケンスデータでは QQIYTEQGMEEYVRYQL であるが、76 番目の Val が Met に変異しているのが QQIYTEQGMEEYVRYQL となる。これが 9mer のネオアンチゲンペプチドを含む候補エピートープとなる([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_032526.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_032526.2))。下記に、1N-2C ペア解析結果から一部を記載する。なお、さらに前後に 1 アミノ酸基を加えたものが 10mer の候補エピートープとなる。

No.	Gene	Coding	Amino Acid Change	Epitope with neoantigen
1	NT5C1A	226G>A	Val176Met	QQIYTEQGMEEYVRYQL
2	LRIF1	1410G>C	Lys470Asn	SSNYLKQSNTLFTNPIF
3	SIKE1	381T>A	Asp127Glu	MVAKKAVEAEPVKAH
4	FLG	6891G>C	Glu2297Asp	RAGHGHSAADSSRQSGTH
5	F5	3684G>C	Gln1228His	RNLSPALGHMPSDLS
6	KLHL20	1588A>G	Arg530Gly	SSAERYNPGTNQWSPVV
7	KIAA0040	70T>A	Tyr24Asn	LTKHQEGINNTICLGLV
8	CCSAP	83G>A	Arg28His	WEEYGPCYHELLHYRLG
9	FSIP2	19585C>A	Pro6529Thr	IVPHVGKKTVKIDPKII

(6) 各非癌部サンプルのシーケンスデータを染色体上にマッピングした BAM ファイルを作成して、

IGV2.7.2 ソフトウェア上で展開して可視化し、6 番染色体上の HLA-A 遺伝子領域の塩基配列を解読した(マッピングとリファレンスには hg19 を使用)。各非癌部サンプルの HLA-A 領域遺伝子の塩基配列を IPD-IMG/HLA データベース(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)にある HLA-A アリルデータと照合して、最も類似性の高い HLA-A アリルを推定した。

sample	HLA-A*	%Positive	%Identities
1N	24:02, 26:01	98%, 98.5%	98%, 98.5%
3N	24:02, 26:01	97.1%, 97.6%	97.1%, 97.6%
AN	24:02 (homo)	99.5%	99.5%
DN	24:02 (homo)	98.8%	99.5%

(7) 変異アミノ酸を含むネオアンチゲンエピープの決定には、(6)で推定した各サンプルの HLA-A アリルへのペプチドエピープの binding affinity を解析して決定した。例えば NT5C1A 遺伝子の場合、ネオアンチゲンエピープは変異アミノ酸含む QQIYTEQGMEEYVRYQL から得られる 9 個の 9mer エピープが候補となる。それぞれのエピープの HLA-A\*24:02 への binding affinity を NetMHC4.0 を使用して解析した結果を下記に示した。

No.	Peptide Epitope (9mer)	Binding Affinity(nM)	%Rank
1	QQIYTEQGM	36437.5	36
2	QIYTEQGME	44541.1	75
3	IYTEQGMEE	19603.1	12
4	YTEQGMEEY	41455.7	55
5	TEQGMEEYV	37884.4	40
6	EQGMEEYVR	40807.3	55
7	QGMEEYVRY	31201.5	25
8	GMEEYVRYQ	44677.7	75
9	MEEYVRYQL	31488.4	26

すべての 9mer 及び 10mer のネオアンチゲン候補エピープについて Binding affinity より %Rank を算出し、%Rank<0.5 を strong binders、%Rank<2 を weak binders としてネオアンチゲンエピープを決定した。それ以外のエピープは HLA-A アリルに結合する可能性が低いいため、ネオアンチゲン候補より除外した。下記は 1N-2C サンプルのペア解析より得られた 2C の HLA-A\*24:02 に対する 9mer のネオアンチゲンエピープである。

Gene	Peptide(9mer)	Binding Affinity(nM)	%Rank
HGSNAT	YWYLKHASW	107.2	0.2
KLHL20	RYNPGTNQW	127.9	0.25
CCSAP	EYGPCYHEL	201	0.4
LRIF1	NYLKQSNTL	190.8	0.4
PSMD11	RYQEALQLG	261.8	0.5
USP22	IYDKMERI	773.9	1
LRIF1	YLKQSNTLF	1519	1.5
ASIC2	HYKHKQFSM	1938.2	1.8

同様の解析を HLA-A\*26:01 に対して実施すると下記のネオアンチゲンエピープが決定された。

Gene	Peptide(9mer)	Binding Affinity(nM)	%Rank
SPTBN5	EIAIYWSSM	32.53	0.05
FSD1	ETPAFMFHL	290.05	0.25
TIMM10	MLADMYNRM	478.32	0.3
NT5C1A	YTEQGMEEY	688.13	0.4
CBLB	DAAEFCRKF	932.15	0.5
NTNG2	EVYSRWAGS	827.27	0.5
PIEZO2	EVNKDIPYH	1713.96	0.7
TIMM10	EVEMLADMY	2278.45	0.9
MYBPC2	EISDPYLTL	2498.28	0.9
COLEC10	YIMQEEKNY	2842.72	1
SPTBN5	ALQEEIAIY	3483.82	1.2
MYBPC2	LMVEISDPY	3761.71	1.2
LRIF1	YLKQSNTLF	3970	1.3

PKHD1L1	EVVHITIAE	4371.07	1.4
---------	-----------	---------	-----

これらの解析をサンプル 4C、BC、EC についても実施し、それぞれの胆道癌におけるネオアンチゲンペプチドエピトープを同定した。

Sample	HLA-A アリル	Neoantigen (9mer)	Neoantigen (10mer)
2C	A*24:02	8	19
2C	A*26:01	14	16
4C	A*24:02	9	15
4C	A*26:01	11	14
BC	A*24:02 (homo)	7	7
EC	A*24:02 (homo)	0	0

#### (8)考察と展望

以上より、胆道癌患者より得られた癌部と非癌部の組織から DNA を抽出して、次世代シーケンサーによる全エクソームシーケンスを実施し、癌部でのミスセンス変異に由来する変異アミノ酸を含むネオアンチゲンエピトープの同定が可能であった。各サンプルの遺伝子変異数には差異が認められたが、特に同定されたネオアンチゲンエピトープの個数も異なり、生体の T 細胞免疫応答の個体差を生じる要因になっていることが推測される。

今回同定された複数のネオアンチゲンの中で、どのエピトープが最も強力な免疫応答を励起するのは必ずしもペプチドの HLA への binding affinity だけでは決定できないことも推測されるため、今後は得られたネオアンチゲンエピトープを基にペプチドを合成してそれぞれのネオアンチゲンに対する免疫応答を解析することが重要と考えられる。将来的にはビッグデータを取り入れた AI により抗原エピトープのアミノ酸配列のみで T 細胞免疫応答の強さが判定できることも可能性が高い。

今回は T 細胞免疫応答の主体となる HLA-A アリルに関してネオアンチゲンの解析を実施したが、HLA-B アリルも T 細胞の免疫応答に関与することが知られているので、同様の解析を HLA-B アリルについても実施することにより、ネオアンチゲン標的免疫治療の適応が拡大されることも期待される。また最近では DNA の変異解析のみならず、RNA シーケンスを同時に実施して、実際に抗原として発現している量のファクターを加えた解析も検討されており、今後ネオアンチゲンの同定がさらに確実に簡便に実施可能となることが予測される。本研究では予後不良で治療法の乏しい胆道癌に対する新規治療の開発としてネオアンチゲンを標的とした新規免疫治療に繋がるネオアンチゲンエピトープ解析を実施した。今後の更なる研究の進展と臨床への展開が熱望される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----