

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462124

研究課題名(和文) パッセンジャー変異を利用した新規肺癌個別化医療、網羅的固有抗原同定システムの構築

研究課題名(英文) Identification of neoantigens and development of a novel personalized lung cancer treatment targeting passenger mutations

研究代表者

長山 和弘 (Nagayama, Kazuhiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00647935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：パッセンジャー変異を主とする腫瘍特異的遺伝子変異に由来する固有抗原を予測するシステムを構築した。まず肺癌6例のエクソームデータに対して、複数のソフトウェアを用いてミスセンス変異を検出するアルゴリズムを構築した。続いて、腫瘍特異的変異に対してMHC結合予測プログラムを用いて15例の肺癌患者の固有抗原を予測した。固有抗原候補の大半は、患者間で共有される頻度の高い変異由来でなく、個々の患者で異なるパッセンジャー変異に由来するものであることが確認された。そして、エクソームとトランスクリプトームデータを組み合わせることで、発現した変異mRNAに由来するn固有抗原候補に効率的に絞り込む手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We developed algorithm to predict tumor specific antigens derive from somatic mutations, so called neoantigens, mostly from passenger mutations. We first identified somatic missense mutations in 6 primary lung cancer patients using multiple mutation-call softwares. Next, we added MHC binding prediction software and predicted candidate neoantigens in 15 lung cancer patients. Most of the predicted neoantigens derived from passenger mutations and were not shared among other patients. Finally, we combined transcriptome (RNAseq) data to exome-analysis pipeline to reduce false positives of expressed mutant mRNA. Thus, we developed efficient pipeline to target passenger mutation that could become candidate neoantigens using exome and RNAseq data.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 遺伝子変異 パッセンジャー変異 neoantigen 個別化医療 網羅的遺伝子解析 エクソーム  
トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌死因の第1位であり、日本における年間死亡者数は7万人を超える。近年、患者個々のゲノム情報に基づいて、治療効果を最大限に高め、副作用を最小限に抑えることを目的とした個別化医療が注目を集めている。癌化とは直接関連がない、いわゆるパッセンジャー変異が腫瘍特異的遺伝子変異の大部分を占めることも網羅的解析より明らかとなってきたものの、パッセンジャー変異自体は、分子標的薬の治療標的とは成り得ないため、これを利用した個別化医療についての探究は殆どなされてこなかった。

2. 研究の目的

パッセンジャー変異を主とする腫瘍特異的遺伝子変異に由来する固有抗原(neoantigen)が、細胞傷害性T細胞の主要な標的となり、一連の抗腫瘍免疫応答が惹起されていることが近年示された(文献1,2)。個々の患者における固有抗原を網羅的に探索し同定することは、有効な癌免疫治療の開発において重要である。本研究の目的は、個々の患者における網羅的固有抗原同定システムの構築、検証、そして最適化である。

3. 研究の方法

(1) 検体採取からDNA/RNAを抽出し変異解析を行うまでのパイプラインを構築すべく、喫煙者および非喫煙者各3例を含む肺癌患者6例の肺癌組織、正常組織(肺または末梢血単核球)を採取し、エクソーム解析、トランスクリプトーム(RNAseq)解析を行った。

(2) 腫瘍特異的遺伝子変異のリストから、MHC結合能予測プログラムを用いて固有抗原候補に絞り込むパイプラインを構築するにあたり、まず既存のオンラインデータベース Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) を利用して、肺癌で高頻度に認められる共通遺伝子変異に由来する neoantigen を同定するパイプライン (off-the-shelf型 neoantigen 同定パイプライン) を構築した。そして15例の肺癌組織、正常組織に対する次世代シーケンスデータを使用して腫瘍特異的遺伝子変異を同定し、実際の neoantigen 候補を予測するパイプライン構築した。二つのパイプラインを比較し、off-the-shelf型 neoantigen 同定パイプラインの妥当性を検証した。

(3) エクソームシーケンスから同定された体細胞変異の中には多くの偽陽性や、変異 mRNA の発現の乏しいものも含まれる。網羅的固有抗原予測パイプラインの最適化にあたり、RNAseq データを利用して変異 mRNA の発現量を計算し、neoantigen 候補となり得る遺伝子変異のリストから偽陽性を減らすことができるか、4症例で検証した。エクソーム・RNAseq に加えて、腫瘍から抽出した RNA から

cDNA を合成し、キャピラリーシーケンサーと次世代シーケンサーを用いた cDNA アンプリコンシーケンスを行った。アンプリコンシーケンスデータを用いて患者固有の neoantigen を予測するアルゴリズムと RNAseq データを用いて予測するアルゴリズムを比較し、フィルタリングを行う際の最適な閾値を求めた。

4. 研究成果

(1) まず、喫煙者および非喫煙者各3例を含む肺癌患者6例の肺癌組織、正常組織(肺または末梢血単核球)に対して、腫瘍特異的変異を同定した。エクソームシーケンスにて得られたデータを、BWA を用いてリファレンスゲノムに整理させ、Mutect や Varscan などの変異解析ソフトを用いて腫瘍特異的体細胞変異を同定した。得られたミスセンス変異数を喫煙者・非喫煙者で比較すると、従来の報告同様、喫煙者の変異候補数は、非喫煙例の変異候補数を総じて上回っており、使用した変異解析パイプラインの妥当性を確認した(表1)。

	喫煙指数 (Brinkman index)	Mutect OR Varscan	Mutect AND Varscan	Mutect only	Varscan only
喫煙者1	2320	441	227	107	107
喫煙者2	2280	673	441	149	83
喫煙者3	920	186	96	41	49
非喫煙者1	0	253	30	202	21
非喫煙者2	0	191	23	118	50
非喫煙者3	0	150	42	87	21

表1. 複数のソフトウェアで解析した肺癌患者6例におけるミスセンス変異数

また、同定される変異は使用するソフトによっても若干の差異があり、複数の変異解析ソフトを使用する必要性が確認された。

(2) まず、患者間で共有される頻度の高い遺伝子変異を COSMIC から抽出し、MHC 結合能予測プログラム netMHCpan を用いて個々の患者にとって抗原となり得るかを予測したところ(図1A)、15例で計132個の候補(仮想 neoantigen) が得られた。続いて同じ15例のシーケンスデータに対して(1)と同様の変異解析パイプラインを実行し(図1B)、計3016個の missense 変異を同定した。

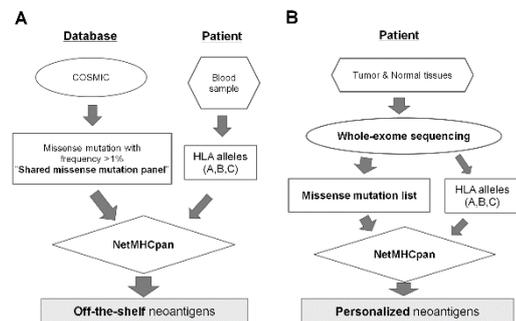


図1. 固有抗原予測アルゴリズム。(文献3より)

A. Off-the-shelf 型予測パイプライン

B. 個別化予測パイプライン

このうち、netMHCpan を用いて MHC 結合能を予測したところ neoantigen 候補を作り得る変異は 1875 個だった。COSMIC から抽出され

た仮想 neoantigen 132 個のうち、シーケンスデータから同定された 1875 個の neoantigen 候補と一致したものは、4 個 (3 症例) のみであった。各患者における neoantigen の大半は、患者間で共有される頻度の高いドライバー変異由来でなく、個々の患者で異なるパッセンジャー変異に由来することが、この一致率の低さの要因だった。個々の患者におけるシーケンスデータを活用し、パッセンジャー変異も含めて標的 neoantigen を同定するパイプラインの方が有用であることが確認された。

(3) 肺癌 4 症例のエクソームシーケンスで同定された合計 361 個の腫瘍特異的変異について、RNAseq データから発現解析ソフトウェア Cufflinks を用いて一定量 (fpkm 値 1 以上) の発現のある遺伝子 207 個に絞りこんだ。RNA から合成した cDNA を PCR で増幅し、キャピラリーシーケンスを行った。解析可能であった 204 個の変異のうち、116 個において変異 mRNA の存在を確認した。

さらに、次世代シーケンサーを用いて cDNA アンプリコンシーケンスを行った。次世代シーケンスデータを扱う際は、変異リードの出現頻度 (variant allele frequency; VAF) が何% 以上の際に「変異あり」と認定するか閾値を設定する必要がある。次世代アンプリコンシーケンスと前述のキャピラリーシーケンスデータを対照し、Receiver-operator curve 解析を行った結果 VAF 4% を閾値とするのが最適であることを確認した。

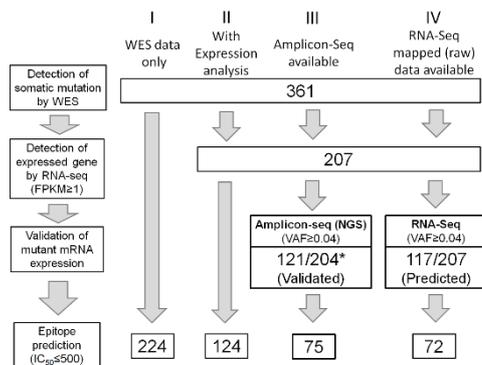


図2. トランスクリプトームシーケンス (RNAseq) を組み合わせた網羅的固有抗原予測アルゴリズム (文献 4 より)

そして最終的に、RNAseq データに対してこの VAF 4% の閾値を用いてフィルタリングを行うことで、発現した変異 mRNA の抽出および neoantigen 候補の予測を効率的に行うことができることを確認した。

#### 参考文献

1. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoeediting. Matsushita H, et al. Nature. 2012; 482(7385): 400-4.
2. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. Castle JC, et al. Cancer Res.

2012; 72(5): 1081-91.

3. Identification of Individual Cancer-Specific Somatic Mutations for Neoantigen-Based Immunotherapy of Lung Cancer. Karasaki T, et al. J Thorac Oncol. 2016; 11(3):324-33.

4. Prediction and prioritization of neoantigens: integration of RNA sequencing data with whole-exome sequencing. Karasaki T, et al. Cancer Sci. 2017; 108(2): 170-177.

#### 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 4 件)

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. 査読あり  
doi: 10.1111/cas.13131.

唐崎隆弘、中島淳、垣見和宏  
総説 Neoantigens と Whole-Exome Sequencing  
癌と化学療法 43 巻 7 号, 791-797 (2016)

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. 査読あり  
doi: 10.1016/j.jtho.2015.11.006.

Miyai M, Eikawa S, Hosoi A, Iino T, Matsushita H, Isobe M, Uenaka A, Uono H, Nakajima J, Nakayama E, Kakimi K. Detection and Tracking of NY-ESO-1-Specific CD8+ T Cells by High-Throughput T Cell Receptor (TCRB) Gene Rearrangements Sequencing in a Peptide-Vaccinated Patient. PLoS One. 2015;10(8):e0136086. 査読あり  
doi: 10.1371/journal.pone.0136086.

[学会発表](計 11 件)

唐崎隆弘、長山和弘、中島淳. Immunogram を用いた肺癌治療の最適化. 第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会、東京大学 伊藤国際学術研究センター (東京都文京区).

2017/2/11

唐崎隆弘、長山和弘、垣見和宏、中島淳。イムノグラムを用いた肺癌に対する個別化治療戦略。第 57 回日本肺癌学会学術集会、福岡国際会議場、福岡サンパレス、福岡国際センター(福岡県福岡市)。2016/12/20

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. Vienna(Austria). 2016/12/7

Kazuhiro Nagayama, Takahiro Karasaki, Hideki Kuwano, Jun-ichi Nitadori, Masaaki Sato, Masaki Anraku, Hirokazu Matsushita, Kazuhiro Kakimi, Jun Nakajima. Concomitant driver mutation determines the tumor growth in EGFR mutation positive lung adenocarcinoma. IASLC 17th World Conference on Lung Cancer. Vienna(Austria). 2016/12/5

唐崎隆弘、長山和弘、垣見和宏、中島淳。肺癌における mutational/neoantigen burden と免疫チェックポイント、immune signature に関する検討。第 33 回日本呼吸器外科学会総会、国立京都国際会館(京都府京都市)。2016/5/12

垣見和宏(シンポジウム・招待講演)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、日本免疫治療学研究会ジョイントシンポジウム、大阪国際会議場(大阪府大阪市)。2016/3/18

唐崎隆弘、長山和弘、中島淳。肺癌における neoantigen load、免疫チェックポイント、および immune signature に関する検討。第 13 回日本免疫治療学研究会学術集会、東京ガーデンパレス(東京都文京区)。2016/2/27

松下博和、垣見和宏(シンポジウム・招待講演)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、東京ガーデンパレス(東京都文京区)。2016/2/27

唐崎 隆弘、長山和弘、桑野秀規、似島純一、安樂真樹、佐藤雅昭、垣見和宏、中島淳。既存のデータベースから抽出した遺伝子変異を

ターゲットとした肺癌ペプチドワクチン開発の限界について。第 56 回日本肺癌学会学術集会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。2015/11/28

垣見和宏(シンポジウム・招待講演)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、ロイトン札幌・ホテルさっぽろ芸文館(北海道札幌市)。2015/7/16

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 (ICCIM2015)、東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)。2015/7/9

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長山和弘(NAGAYAMA, Kazuhiro)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00647935

### (2) 研究分担者

中島 淳(NAKAJIMA, Jun)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：90188954

(3) 研究分担者

村川知弘 (MURAKAWA, Tomohiro)  
東京大学・医学部附属病院・登録研究員  
研究者番号：5 0 3 5 9 6 2 6

(4) 研究分担者

安樂真樹 (ANRAKU, Masaki)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：7 0 5 9 8 5 5 7

(5) 研究分担者

似鳥純一 (NITADORI, Jun-ichi)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：4 0 4 2 4 4 8 6

(6) 研究分担者

北野健太郎 (KITANO, Kentaro)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：7 0 6 4 7 0 7 3

(7) 研究分担者

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：8 0 2 7 3 3 5 8

(8) 研究分担者

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：8 0 5 9 7 7 8 2