

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26710009

研究課題名(和文)がん浸潤リンパ球の抗原受容体次世代シーケンス～がん免疫システムの包括的理解～

研究課題名(英文) Immunogenetic Repertoire Analysis for Tumor-infiltrating Lymphocytes - toward the Understanding of Tumor Immunology -

研究代表者

加藤 洋人 (Kato, Hiroto)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：60446549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、次世代シーケンスによってがん浸潤リンパ球の抗原受容体レパートリを網羅的に解読し、ゲノミクスの観点から腫瘍免疫の全体像を解明することであった。さらに、がん組織特異的に存在する抗原受容体配列を基盤として、新規抗がん抗体の開発を試みるなど、新しいがん治療戦略の基盤を作ることをも目的とした。以下の成果が得られた。

(1) 臨床がん症例の抗原受容体次世代シーケンス・プロトコールが樹立された。(2) がん組織中にドミナントに存在するT細胞受容体や免疫グロブリンを多数同定できた。(3) 人工発現系を用いて再構築したがん特異的免疫グロブリン分子について機能的スクリーニングを進めることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to comprehensively analyze the antigen receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes by the next generation sequencing and to elucidate the global picture of tumor immunity from the viewpoint of immuno-genetics. Additionally, I also aimed to create a basic database to develop new therapeutic strategies against cancers, such as novel anti-cancer antibodies, based on antigen receptor repertoire sequences that existed dominantly in cancer tissues. The following achievements were obtained.

(1) Next generation sequencing protocols for the antigen receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes in clinical cancer tissues were established. (2) A number of T cell receptors and immunoglobulins that were specifically and dominantly infiltrated in cancer tissues were identified. (3) Functional screening of multiple cancer specific immunoglobulin molecules reconstructed by artificial expression system could be carried out.

研究分野：ゲノム病理学

キーワード：免疫ゲノム ゲノム解析 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

がん組織には、ヘルパーT細胞(Th),細胞傷害性T細胞(CTL),制御性T細胞(Treg),B細胞など多種多彩なリンパ球が浸潤している。そもそもリンパ球とは、1つ1つが異なる抗原受容体を呈する複雑多彩な細胞集団であるが、がん組織においては、そのなかでもがん抗原を認識しうる抗原受容体を呈するリンパ球が集簇して相互に活性化し合い、「がん免疫システム」が形成されている。この「がん免疫」の活性化が強力な抗腫瘍効果を持つという臨床治験が続々と報告されるようになった。しかしながら、がん免疫システムの全体像については解明されていない部分が多く、がん免疫療法の開発戦略についても方向性が定まっていなかった。

がん免疫システムの包括的理解が困難であった最も大きな理由は、従来の技術では、個々のがん浸潤リンパ球の抗原受容体を網羅的に解読することが出来なかったという点にある。つまり、各リンパ球の抗原受容体構造を知ることが出来ないため、がん浸潤リンパ球はクローナルな抗腫瘍免疫反応なのかどうか、がん浸潤リンパ球がどのような抗原受容体を発現しているのか、どのようながん抗原を認識しているのか、などの基本的な疑問にも答えることが出来なかった。免疫細胞は、各細胞の抗原受容体遺伝子座がゲノム再構成を起こすことで、1つ1つ異なる抗原を認識するヘテロ細胞集団となる(ヒトでは 10^{15-25} 通りの抗原受容体遺伝子配列がありうる)。このような多様な細胞集団に対するゲノム解読は従来法では不可能であり、次世代シーケンスの登場をもって実現可能なものとなった。

このような背景を基盤として、この研究では独自の次世代シーケンス・プロトコルを確立し、がん組織に浸潤するリンパ球が発現する抗原受容体(T細胞受容体および免疫グロブリン)レパートリの包括的シーケンシング解析を行うことを目標とした。抗原受容体プロファイリングを基盤として、がん環境に浸潤・集簇するリンパ球の特性について定義づけ、さらにがん環境特異的に存在する抗原受容体配列の同定を目標とした。次世代シーケンスによる抗原受容体完全長シーケンス技術は、その解析データそのものが遺伝子組換え技術による再構築系へと応用可能なフ

ォーマットであり、新しい抗がん抗体の開発や新規がん抗原の同定を効率よく行うことができる」と期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代シーケンスによってがん浸潤リンパ球の複雑多彩な抗原受容体遺伝子配列を網羅的に解読し、免疫ゲノミクスの観点からがん免疫システムの全体像を解明することであった。また、抗原受容体レパートリ解析によって得られたシーケンス情報を、新しいがん抗原の同定あるいは新しい抗がん抗体の開発などといった臨床応用可能な基盤的成果に繋げていきたいと考えた。本研究によって、がん免疫システムの包括的理解が深まることや、新規がん免疫療法開発に向けた基盤的データを取得できることが期待された。

具体的には、以下の項目を目標として研究を進めた。

- (1) 多くの臨床がん試料について、がん浸潤リンパ球の抗原受容体遺伝子を次世代シーケンス法によって網羅的に解読し、がん環境においてどのようなアミノ酸構造を持つ抗原受容体が見られるのか、各症例・各細胞系統について包括的に解明する。
- (2) さまざまながん症例で特異的に見られる抗原受容体構造及び免疫グロブリン構造を同定する。
- (3) 抗原受容体レパートリを病理所見や臨床病歴を考慮しながら症例・細胞系統に跨って統合解析し、「抗原受容体レパートリからみた腫瘍免疫」を定義づける。
- (4) 同定された腫瘍特異的T細胞受容体や免疫グロブリンの人工的再構築を試み、新規がん抗原の同定あるいは将来の免疫療法に応用可能な抗がん抗体の探索を進める。

3. 研究の方法

本研究では、がん浸潤リンパ球の複雑多彩な抗原受容体遺伝子を、独自のプロトコルに基づく次世代シーケンス技術で全解読することを第一の目標とした。以下の段階で研究を進めた。

- (1) リンパ球抗原受容体遺伝子の増幅プロトコルの検討：抗原受容体遺伝子座のさ

さまざまなV領域およびC領域を標的としたプライマーを用いて、凍結がん試料から抽出されたRNAを鋳型としたmultiplex PCRを行い、抗原受容体遺伝子を増幅するためのプロトコルを検討し、樹立した。

- (2) サンプル採取：凍結保存された多くの臨床がん試料を薄切・標本化し、がんの病理学的特性や組織の保存状態などを検討したうえで本研究の対象症例を選別し、それらの標本からRNAを抽出した。
- (3) 抗原受容体遺伝子の次世代シーケンス解析：(1)で樹立されたプロトコルを用いて、(2)で抽出されたRNAを鋳型とする抗原受容体遺伝子増幅および増幅産物の次世代シーケンス解析を行った。
- (4) 抗原受容体レパートリと臨床病理学的因子などを統合解析することによって、がん浸潤リンパ球レパートリの特性と臨床病理学的因子との関連性を解析した。精製された免疫グロブリン分子の純度や構造を確認し、抗体分子として実験に利用可能なことを確認した。
- (5) 腫瘍特異的に存在する免疫グロブリン遺伝子として同定されたもののうち複数の例について、遺伝子組換え法によって人工再構築し、発現・精製した。
- (6) 再構築された免疫グロブリンについて、その抗原の探索を進めた。また、がん細胞に対する反応性や細胞増殖への影響を指標とした機能的スクリーニングを進め、抗がん抗体として応用可能な免疫グロブリンの候補を探索した。

4. 研究成果

以下の項目の研究成果が得られた。

- (1) がん浸潤リンパ球の抗原受容体次世代シーケンス・プロトコルの確立
凍結保存された病理組織検体からのRNAの抽出、抗原受容体遺伝子(T細胞受容体および免疫グロブリン)を標的としたmultiplex PCRプロトコルの検討、PCR増幅産物の精製法についての検討、次世代シーケンス・プロトコルの検討、シーケンスデータの解析アルゴリズムの検討など、各実験段階におけるプロトコルを洗練化し、凍結保存された臨床がん試料を使用したがん浸潤リンパ球

の抗原受容体次世代シーケンス・プロトコルが確立された。

- (2) 多くの臨床がん試料を用いたがん浸潤リンパ球の抗原受容体レパートリ・プロファイルの取得

上記で確立された抗原受容体次世代シーケンス・プロトコルを用いて、さまざまな臨床がん症例の凍結試料を用いた抗原受容体レパートリ・プロファイリング(T細胞抗原受容体および免疫グロブリンのシーケンス解析)を進めた。各サンプルで少なくとも数十万リード以上の次世代シーケンス・リードを得ることができ、十分な深度の抗原受容体データベースを取得することができた。

- (3) がん特異的に存在する抗原受容体配列の探索

同一症例の非がん部組織と比較して、がん組織特異的にみられた抗原受容体遺伝子配列を探索したところ、各症例で複数のがん特異的配列を同定することができた。複数症例にわたって共通したがん特異的抗原受容体配列はほとんどみられなかったが、抗原受容体レパートリの膨大な多様性を考えると、個人間での共通配列がなかったことは矛盾のない結果と思われた。

- (4) がん特異的な存在を呈した免疫グロブリンの人工発現系による再構築

この研究計画で確立された次世代シーケンス・プロトコルでは抗原受容体遺伝子のほぼ全長を解読することが可能なため、上記で同定されたがん特異的抗原受容体配列の候補については、シーケンス配列を基盤として遺伝子組み換えによるクローニングが可能である。同定された複数のがん特異的免疫グロブリン遺伝子について、遺伝子組換えクローニングと人工タンパク発現系を利用した免疫グロブリン分子の再構築を進めた。

- (5) 再構築された免疫グロブリン分子についての機能解析

人工発現系によって再構築された複数のがん特異的免疫グロブリンの候補分子について、がん細胞に対する反応性(フローサイトメーターや蛍光免疫染色による検討)や増殖抑制能(MTTアッセイ

やリアルタイム細胞数自動計測装置による検討)などの機能解析を行い、新しい抗がん抗体の候補分子となる免疫グロブリンの探索を進めた。また、がん特異的 T 細胞抗原受容体についても、がん細胞に対する反応性の評価法および抗原の同定法などについて検討を進めた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiroto Katoh, Shumpei Ishikawa. Genomic pathobiology of gastric carcinoma. *Pathol Int.* (査読あり) 2017 Feb;67(2):63-71. doi:10.1111/pin.12493. PMID: 28004449.

〔学会発表〕(計 4 件)

Hiroki Konishi, Daisuke Komura, Hiroto Katoh, Ken Tominaga, Ryohei Suzuki, Shumpei Ishikawa. Prediction of Antigen-specific Immunoglobulins from Amino Acid Sequences Using Semi-supervised Deep Learning. *15th European Conference on Computational Biology.* Hague, Netherlands. 2016/9/3.

Hiroto Katoh, Daisuke Komura, Hiroki Konishi, Ryohei Suzuki, Asami Yamamoto, Reiko Sato, Masashi Fukayama, Hiroyuki Aburatani, Shumpei Ishikawa. Immunogenetic Characterization of Tumor-infiltrating TCR Repertoire in the Gastric Carcinoma Environments Using Archived Histopathological Specimens. *AIRR 2016 Community Meeting.* Rockville, Maryland, USA. 2016/6/27.

Hiroto Katoh, Daisuke Komura, Hiroki Konishi, Asami Yamamoto, Masashi Fukayama, Shumpei Ishikawa. Immunogenomic Characterization of Tumor-infiltrating TCR Repertoire in the Gastric Carcinoma Environments Using Archived Histopathological Specimens. *3rd Annual Immunogenomics 2015 Shaping the Future of Human Health.* Huntsville, Alabama, USA.

2015/9/28-2015/9/30.

Hiroto Katoh, Daisuke Komura, Hiroki Konishi, Asami Yamamoto, Masashi Fukayama, Shumpei Ishikawa. Immunogenetic Profiling of Tumor-infiltrating T Cells among Human Gastric Cancer. *Immune Profiling in Health and Disease.* Seattle, Washington, USA. 2015/9/9-2015/9/11.

〔図書〕(計 1 件)

加藤洋人, 石川俊平. 科学評論社「胃がん領域のゲノム病理学の進歩とゲノム個別化がん治療」*血液内科.* 2016. 72(4):544-549.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 洋人 (KATOH, Hiroto)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ゲノム病理学分野・助教
研究者番号 : 60446549