

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659625

研究課題名(和文) 次世代シーケンスにより同定された個別遺伝子変異を標的としたがんワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of cancer vaccine therapy targeting individual genetic mutations identified by next generation sequencing

研究代表者

中島 淳(Nakajima, Jun)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90188954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、次世代シーケンスとMHCクラス I 結合予測アルゴリズムを組み合わせることで、腫瘍特異的な遺伝子変異から候補固有抗原を同定するシステムを、膵がん組織を用いて構築した。また、候補固有抗原に対する免疫反応をマウス生体で検証するアッセイ法も確立した。肺がん6例(喫煙者3例と非喫煙者3例)においては、遺伝子変異(ミスセンス変異)の数は喫煙者で平均280個に対し、非喫煙者で平均75個であった。予測された候補固有抗原(エピトープ)の数は、それぞれ平均535個と140個であった。将来の個別化がん免疫治療の準備段階として、抗原同定システムを構築し、肺がん候補固有抗原を同定することが可能であった。

研究成果の概要(英文)： We established the method to identify candidate unique antigens from cancer specific mutations in pancreatic cancer specimens by combining next generation sequencing with MHC class I binding algorithm. We also developed an assay to verify immune responses against those candidate unique antigens in mice. In total 6 lung cancer patients consisting of 3 smokers and 3 non-smokers, the numbers of genetic mutations (missense mutations) were 280 on average in former versus 75 in latter. Accordingly, the numbers of candidate unique antigen-derived T cell epitopes predicted by the algorithm were 535 on average in former versus 140 in latter. We successfully created the system predicting candidate unique antigens and verifying them, which is a prerequisite for individualized cancer immunotherapy development in lung cancer patients.

研究分野：呼吸器外科学

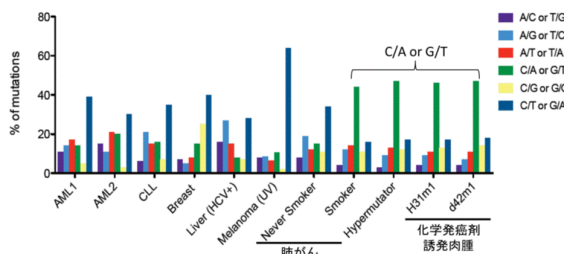
キーワード：肺がん 次世代シーケンス 遺伝子変異 MHCクラス I 結合予測法 固有抗原 変異ペプチド 免疫反応  
個別化がん免疫治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 化学発癌剤誘発マウス肉腫は、腫瘍免疫学の中で最もよく用いられてきた腫瘍の一つであり、この腫瘍モデルから固有抗原の存在が初めて示された (Old, L. J. et al. Annu Rev Med 15, 167-86, 1964)。これまで固有抗原の高い免疫原性については広く認識されていたが (Srivastava PK et al. Immunol Today. 9:78-83, 1988)、その同定はあまりされてこなかった。むしろ、ヒトでは一般に免疫原性の低い共通抗原の研究に力が注がれてきた。我々は、次世代シーケンスと MHC クラス I 結合予測法を用いて、免疫原性の高い化学発癌剤誘発マウス肉腫からドミナントな固有抗原を同定した (Matsushita, H. et al. Nature 482:400-4, 2012)。この拒絶抗原はミスセンス変異により生じた変異ペプチドであった。

(2) 我々は、次世代シーケンサーを用いて、喫煙者に発生した肺がんはマウスの化学発癌剤誘発肉腫と同様、遺伝子変異の数が非常に多いことを示した。さらに両者が塩基転換の特徴 (C/A または G/T) がよく酷似していることを示した (図 1)。

図 1



2. 研究の目的

本研究の目的は、個々の肺がんにおける遺伝子変異に基づく固有抗原の同定と個別化がん免疫治療の開発である。手術で切除された肺がん組織を用いて、次世代シーケンスと MHC クラス I 結合予測法を用いて、腫瘍細胞に発現する免疫原性の高い固有抗原を予測する。その予測した抗原が、実際に生体内で免疫反応を起こしているかどうかの検証を行い、固有抗原を同定する。この新しい方法を用いた抗原の同定法を一般的なものに発展させて、個々の肺がん患者に対する、免疫原性の高い固有抗原を用いた強力な個別化がん免疫治療の道を開く。

3. 研究の方法

(1) がん組織、正常組織に対して、エクソーム解析 (全エクソンシーケンス)、トランスクリプトーム解析 (全 RNA シーケンス) を行った。調製された DNA を市販されている全エクソン領域濃縮キット (イルミナ社、TruSeq Exome Enrichment Kit) によって濃縮し、濃縮後の DNA より次世代シーケンサー用のライブラリを構築し、汎用型の次世代シ

ーケンサー (イルミナ社、HiSeq1000) でライブラリに含まれる DNA 断片の両端から 100 塩基を読みとった。得られた DNA の配列情報をリファレンスゲノム配列に整列させ、変異解析ソフトにより解析し、腫瘍特異的な変異候補を同定した。

全遺伝子の mRNA レベルでの発現解析プロファイル、およびトランスクリプトームレベルでの変異解析を行った。poly A+ RNA のみを濃縮した後、市販されている全 RNA 調製キット (イルミナ社、TruSeq RNA Sample Preparation Kits v2) によって、次世代シーケンサー用の cDNA ライブラリを構築した。シーケンスによって得られた配列情報をもとに発現解析を行い、エクソーム解析で絞り込まれた変異タンパク候補が、実際に腫瘍細胞内でどの程度発現しているかを予測し、多数の候補に対しての順位づけを行った。

Immune Epitope Database の NetMHCpan を用いて、変異由来の変異ペプチドの MHC クラス I へのアフィニティ (比較的強いと考えられる IC50<500) を指標にして、固有抗原数を計算した。

(2) 肺がんにおける HLA-A2 拘束性の変異ペプチドに関しては、候補ペプチドを人工合成後、それらを HLA-A2 トランスジェニックマウスに 2 回免疫し、マウス生体内で変異ペプチド特異的な CTL を誘導できるか検証した。最終免疫 2 週間後に脾臓を採取し、それぞれの変異ペプチドと共培養し、IFN- $\gamma$  の産生を IFN $\gamma$  ELISPOT と IFN $\gamma$  分泌アッセイ法で調べた。

(3) 肺がんにおいて、肺がん組織のがん部と非がん部が両方そろった 6 例について、同様に全エクソームシーケンスと全 RNA シーケンスを行った。肺がんと同様、腫瘍特異的な変異を同定し、全 RNA シーケンスで RNA の発現を調べ、候補となる固有抗原数を計算した。

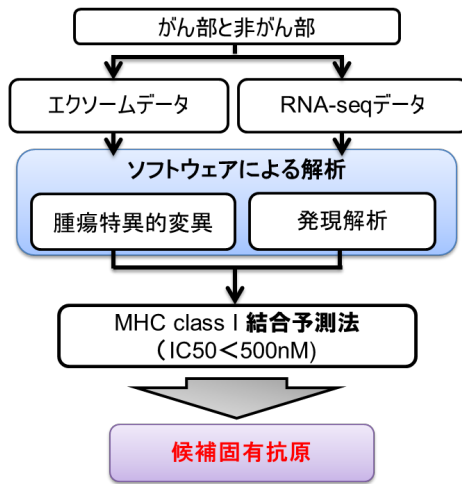
4. 研究成果

(1) 候補固有抗原同定システムの構築

次世代シーケンスと MHC クラス I 結合予測法を用いた候補固有抗原同定システムを構築するため、まず、当院で既にかん組織のがん部と非がん部の両方がセットで入手可能であった肺がん組織計 5 例 PK001 ~ PK005 を用いた。全エクソームシーケンスにより、がん部と非がん部のエクソームを比較することで 1 例あたり平均 1028 個 (719-1673 個) の腫瘍特異的な変異を同定し、その中でコーディング領域に存在する変異を平均 147 個 (86-299 個) 同定した。さらに、全 RNA シーケンスのデータをもとに RNA の発現が見られるものに絞り、最終的には 1 例あたりミスセンス変異を平均 128 個 (78-251 個) 同定した。この変異由来の変異ペプチドの MHC クラス I へのアフィニティ (比較的強いと考えられる IC50<500) を指標にして、候補固有抗原数 (HLA-A2 あるいは HLA-A24 拘束性のいずれか) を計算したところ、1 例あたり平均 53

個 (11-116 個) となった。

図2

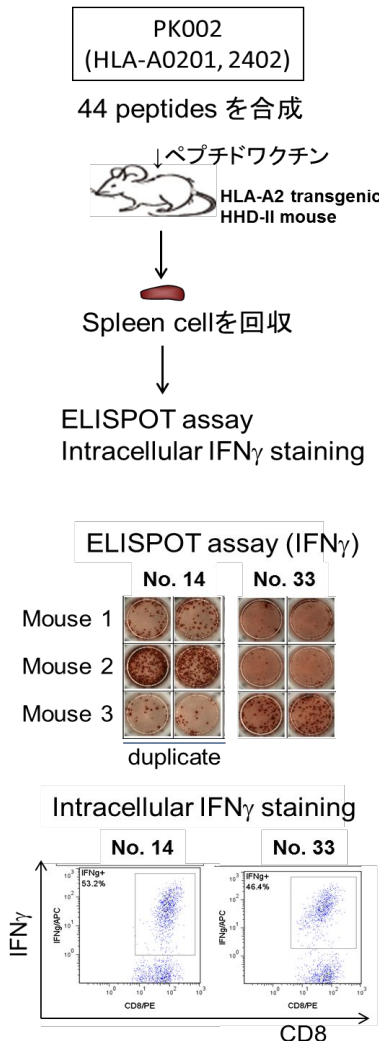


膵がん組織を用いて、次世代シーケンスと MHC クラス I 結合予測法を用いた候補固有抗原同定システムを構築できた (図2)

(2) 候補固有抗原の免疫反応の検証

もっとも変異の多かった PK002 で免疫反応

図3



の検証を行った。HLA-A2 拘束性の候補固有抗原由来変異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を用いて検証した。44 個の変異ペプチドのうち 2 つのペプチド (No.14 と No.33) で、ELISPOT、細胞内 IFN $\gamma$ 染色法の両方で強い反応が見られた (図3)。候補固有抗原の中から、実際に免疫反応を起こす変異ペプチドを同定できた。

(3) 肺がんにおける候補固有抗原の同定

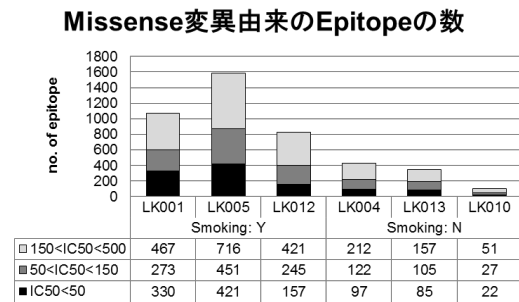
肺がんにおいても、肺がん組織のがん部と非がん部が両方そろった 6 例 (喫煙者 3 例と非喫煙者 3 例) より、エクソームシーケンスと RNA シーケンスとを行った。膵がんで行なった方法をそのまま肺がんに応用し、これまでの報告と同様、喫煙者は非喫煙者に比べミスセンス変異が多いことがわかった。喫煙者で平均 280 個 (102-491 個) に対し非喫煙者で平均 75 個 (24-154 個) であった (表1)。

表1

	喫煙者			非喫煙者		
	LK001	LK005	LK012	LK004	LK013	LK010
Missense	247	491	102	154	24	47
Nonsense	12	32	4	14	2	3
Synonymous	73	164	32	86	17	32

膵がんて構築した固有抗原同定システムを用いて肺がんでも同じ解析を行ったところ、ミスセンス変異由来の候補となる IC<sub>50</sub><500 の固有抗原 (エピトープ) の数は、喫煙者で平均 535 個 (421-716 個)、非喫煙者で平均 140 個 (51-212 個) であった (図4)。

図4



将来、肺がんに対する個別化がん免疫治療を行っていく準備段階として、候補抗原同定システムを構築し、固有抗原の候補を同定することが可能であった。今後は、候補固有抗原由来の変異ペプチドに対する免疫反応を、膵がんと同様、HLA トランスジェニックを用いて検討する。また、患者の末梢血リンパ球、腫瘍浸潤リンパ球の、これらの変異ペプチドに対する反応性も検討していく。

## 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10件)

1. Matsushita H, Hosoi A, Ueha S, Abe J, Fujieda N, Tomura M, Maekawa R, Matsushima K, Ohara O, Kakimi K. Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN  $\gamma$ -dependent cell-cycle arrest. *Cancer Immunol Res*. 2015 Jan;3(1):26-36. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0098. 査読有
2. 宮井まなみ, 垣見和宏 がん免疫治療におけるパラダイムシフト *BioClinica* 2015 Vol.30 No.3;220-221 査読無
3. Hosoi A, Matsushita H, Shimizu K, Fujii S, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Maekawa R, Matsushima K, Kakimi K. Adoptive cytotoxic T lymphocyte therapy triggers a counter-regulatory immunosuppressive mechanism via recruitment of myeloid-derived suppressor cells. *Int J Cancer*. 2014 Apr 15;134(8):1810-22. doi: 10.1002/ijc.28506. 査読有
4. 垣見和宏 特集 癌免疫・細胞療法 revisited、がん免疫治療新時代に向けて *JSI Newsletter* 2014, Vol.23 No.1, p4 <http://www.jsi-men-eki.org/general/newsletter.htm> 査読無
5. Ichinose J, Watanabe K, Sano A, Nagase T, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. Alternative polyadenylation is associated with lower expression of PABPN1 and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2014 Sep;105(9):1135-41. doi: 10.1111/ 査読有
6. Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 2014 Jul;45(7):1397-405. doi: 10.1016
7. 松下博和 特集 癌免疫・細胞療法 revisited、がんに対する免疫監視・編集と免疫チェックポイント阻害剤による強化 *JSI Newsletter* 2014, Vol.23 No.1, p6 <http://www.jsi-men-eki.org/general/newsletter.htm> 査読無
8. Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T, Nakajima J. T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2014 Feb;3(1):23-33.doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.01. 査読有
9. Izumi T, Kondo M, Takahashi T, Fujieda N, Kondo A, Tamura N, Murakawa T, Nakajima J, Matsushita H, Kakimi K. Ex vivo characterization of T-cell repertoire in patients after adoptive transfer of V  $\alpha$ 9V  $\beta$ 2 T cells expressing the interleukin-2 receptor  $\alpha$ -chain and the common  $\gamma$ -chain. *Cytotherapy*. 2013 Apr;15(4):481-91. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.12.004. 査読有
10. 中島 淳, 前川 隆司, 垣見 和宏 T細胞を用いたがん免疫治療 腫瘍内科 Vol. 12 No. 2, page 204-213, 2013 査読無

[学会発表](計8件)

1. 垣見和宏 CTL 治療における腫瘍内免疫応答の解析 第12回日本免疫治療学研究会学術集会、2015/2/18、東京ガーデンパレス 東京都文京区
2. 福元 健人, 四元 拓真, 中尾 啓太, 此枝 千尋, 長山 和弘, 似鳥 純一, 安樂 真樹, 村川 知弘, 中島 淳 肺癌術後再発無治療経過中に再発巣縮小をきたした2例。第55回日本肺癌学会学術集会、2014/11/16, 京都国際会館、京都府京都市
3. 安樂 真樹, 四元 拓真, 中尾 啓太, 福元 健人, 川島 光明, 高橋 剛史, 村山 智紀, 此枝 千尋, 一瀬 淳二, 日野 春秋, 長山 和弘, 似鳥 純一, 村川 知弘, 中島 淳 癌治療歴を有する肺癌手術症例の検討。第55回日本肺癌学会学術集会、2014/11/15, 京都国際会館、京都府京都市
4. 垣見和宏 Development of T cell-based cancer immunotherapy 第18回日本がん免疫学会総会、2014/7/31、ひめぎんホール、愛媛県松山市
5. 細井亮宏、平野康介、松下博和、瀬戸泰之、前川隆司、垣見和宏 腫瘍内の免疫抑制性環境の制御による腫瘍特異的CTL移入治療の増強 第18回日本がん免疫学会総会、2014/7/31、ひめぎんホール、愛媛県松山市
6. 垣見和宏、榮川伸吾、磯辺みどり、松下博和、宮井まなみ、細井亮宏、藤枝奈緒、鶴殿平一郎、上中明子、中山睿一 TCR ディープシーケンスによるNY-ESO-1 特異的T細胞のモニタリング 第18回日本がん免疫学会総会、2014/7/31、ひめぎんホール、愛媛県松山市
7. 松下博和、中島淳、井上雄太、村川知弘、垣見和宏 養子免疫治療における

キメラ抗原受容体遺伝子導入ターゲット細胞としてのV<sub>9V</sub> 2T細胞 第73回日本癌学会学術集会、2014/9/27、神奈川県横浜市

8. 垣見和宏 "クリニカルゲノミクスへの期待:がん免疫治療の見地から"かずさDNA 研究所/産総研 生命情報工学研究センター共催ワークショップ 2013/11/20、東京、お台場

〔図書〕(計3件)

1. 中島 淳 先進医療フォーラム編集 がん先進医療 NAVIGATOR がん治療研究の最前線 細胞療法・免疫療法3 ソレドロン酸誘導 T細胞を用いた免疫療法 非小細胞肺癌
2. 垣見和宏 「松島綱治、山田幸宏監訳」アパス-リックマン-ピレ 分子細胞免疫学原著第7版 第8章 リンパ球の成熟と抗原レセプター遺伝子再構成
3. 松下博和 「松島綱治、山田幸宏監訳」アパス-リックマン-ピレ 分子細胞免疫学原著第7版 第11章 B細胞活性化と抗体産生

〔その他〕

ホームページ等  
東京大学医学部附属病院 呼吸器外科  
<http://cts.m.u-tokyo.ac.jp/>  
東京大学医学部附属病院 免疫細胞治療学講座  
[http://immunoth.umin.jp/result/index\\_03.html](http://immunoth.umin.jp/result/index_03.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

村川知弘 (MURAKAWA, Tomohiro)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 50359626

(3) 研究分担者

佐野 厚 (SANO, Atsushi)  
東京大学・医学部附属病院・登録研究員  
研究者番号: 20569834

(4) 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: 80273358

(5) 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: 80597782