

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04831

研究課題名(和文) 肺癌への個別化免疫療法の開発：変異遺伝子由来抗原の同定とiPS細胞技術の応用

研究課題名(英文) Trial to develop a personalized adoptive immunotherapy

研究代表者

服部 登 (Hattori, Noboru)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・教授

研究者番号：00283169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌への個別化免疫療法を開発する目的で、患者特異的かつ癌細胞でのみ発現する新規癌抗原を探索した。まずは肺癌患者から末梢血単核球(正常細胞)と悪性胸水(癌細胞)を採取し、悪性胸水中の癌細胞で初代培養を行った。同一患者から採取した単核球と癌細胞由来のゲノムで、次世代シーケンサーを利用してエクソーム解析を行った。ある1名の肺癌患者から得られた正常細胞と癌細胞のゲノムデータを比較検討したところ、389カ所のIndelと6616カ所のSNPsからなる遺伝子変異が検出された。HLAモチーフ検索プログラムを用いて、癌細胞のみに発現する新規癌抗原の候補を複数個同定した。

研究成果の概要(英文)：To develop a personalized immunotherapy of lung cancer, we searched for a new tumor antigen specific to tumor cells. We collected peripheral blood mononuclear cells and malignant pleural effusion, and established primary cultures of cancer cells derived from pleural effusion. Whole-exome sequencing of mononuclear cells and cancer cells derived from the same patient identified 389 indels and 6616 SNPs. We found several candidates for new tumor antigens using the computational algorithm to identify HLA-binding peptides.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：養子免疫療法 癌特異的変異抗原 腫瘍浸潤性Tリンパ球

1. 研究開始当初の背景

肺癌に対する治療は、分子標的薬や抗 PD-1 抗体 (免疫チェックポイント阻害薬) の発見により劇的に進歩し、予後も改善している。とはいえ、依然として予後不良の疾患であり、未だに日本における部位別がん死亡率が第 1 位の疾患である。

予後のさらなる改善のために、新規の治療オプションの導入が望まれる。選択肢の一つとして、免疫療法は以前から注目されてきたが、肺癌への免疫療法の応用は、前述の抗 PD-1 抗体の有効性が示されたことも受けて一層の注目を集めつつある。癌免疫療法における免疫細胞の標的分子としては、癌細胞にのみ発現する”癌抗原”が最も望ましいが、肺癌治療研究においてこのような癌抗原を探索し、免疫療法の標的として利用する試みは行われていない。

2. 研究の目的

肺癌患者の肺癌細胞と正常細胞を同一患者から採取し、ゲノム DNA のエクソーム解析を行うことで検出される変異遺伝子の中から患者特異的な癌抗原ペプチドを抽出する。こうして得られた患者特異的かつ癌細胞でのみ発現する変異遺伝子由来の癌抗原を見出し、それを標的とする細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte : CTL) を人工的に作成する。iPS 細胞技術を用いて、この CTL を大量に作成し、CTL の癌細胞に対する殺細胞効果を調べることにより、肺癌の個別化免疫療法開発の可能性を追求することを目的とする。

3. 研究の方法

実験 癌組織と正常組織の採取

広島大学病院を受診した成人肺癌患者を対象とした。さらに肺癌患者から癌細胞を十分量採取するために、癌性胸水が病理学的に証明された患者を対象を絞った。これらの患者のうち、研究内容を十分理解した上で自身の意思で研究への協力を決定し、文書で承諾の得られた症例から胸水 (肺癌組織として採取) および末梢血 (正常組織として採取) を採取した。採取した胸水中の癌細胞を用いて通常培養およびスフェロイド培養による初代培養を試みた。また、採取された末梢血を HLA 研究所へ提出し、HLA 遺伝子型を調べた (Luminex 法)。

さらに、腫瘍浸潤性リンパ球を採取した。Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare) を 75%濃度に希釈し、患者から採取した胸水を遠心分離することで癌細胞と単核球をそれぞれのバンドに分離形成し、単核球相を腫瘍浸潤性リンパ球として抽出^{1,2)}し、冷凍保存した。

実験 次世代シーケンサー

HLA 型が A24:02 あるいは A02:01 であった患者のうち、初代培養に成功した癌細胞および末梢血から DNeasy Blood & Tissue Kit

(QIAGEN) を用いて、それぞれの DNA を抽出した。

DNA を 3 μg ずつ準備し、SureSelect XT Reagents 16 反応 (Agilent) および Human All exon V6 16 反応 (Agilent) を用いて、HiSeq2500 (Illumina) で全エクソーム解析を行った。解析は Rapid Run mode、Paired-end sequencing、100bp で、4 レーンずつ行った。

実験 変異遺伝子の抽出

全エクソーム解析で得られたゲノムデータから VarScan を用いて、バリエーションを検索した。正常組織 (末梢血 DNA) では検出されず、癌組織 (初代培養細胞 DNA) でのみ検出される遺伝子変異を SNPs と indel に分け抽出し、一覧とした。その中から変異の頻度が高く、有意な変異であることが予想される遺伝子変異を複数候補とする。

実験 HLA モチーフ検索プログラム

日本電気株式会社の所有する HLA モチーフ検索プログラムを用いて、実験で得られた変異遺伝子によりコードされるアミノ酸の前後 10 個のアミノ酸配列と HLA クラス I との結合予測を行い、結合度の高い変異ペプチドを数候補に挙げ、テトラマーを合成する。

4. 研究成果

実験 癌組織と正常組織の採取

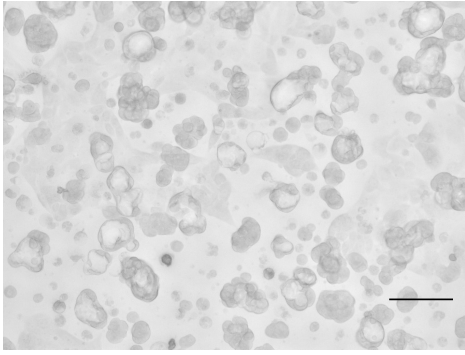
悪性胸水を持つ肺癌患者計 11 名から同意を取得し、検体を採取した。HLA 遺伝子型はうち 7 名で検査した (Table 1)。

Table 1. 患者一覧

No.	age	sex	histology	HLA type
1	79	Male	Adenocarcinoma	0201
2	58	Female	Adenocarcinoma	2402
3	54	Male	Small cell carcinoma	0201,0206
4	75	Female	Adenocarcinoma	0201,2402
5	72	Male	Small cell carcinoma	ND
6	46	Female	Adenocarcinoma	ND
7	64	Male	Adenocarcinoma	ND
8	71	Male	Adenocarcinoma	0201,3101
9	72	Female	Adenocarcinoma	ND
10	64	Female	Adenocarcinoma	1101,3101
11	73	Male	Adenocarcinoma	2402

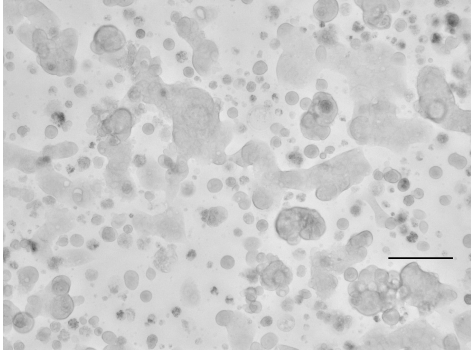
上記症例のうち、初代培養に成功したものは No.2、8、11 の 3 例であった。No.2 (Figure 1) と No.11 (Figure 2) の顕微鏡所見を下記に示す。

Figure 1. No.2 の初代培養 (×200)



Scale bar means 100 μm

Figure 2. No.11 の初代培養 (× 200)



Scale bar means 100 μm

実験 次世代シーケンサー

実験 で初代培養に成功し、かつ HLA 遺伝子型が A24:02 あるいは A02:01 であった 3 例に対して、全エクソーム解析を行った。

実験 変異遺伝子の抽出

全エクソーム解析を行った 3 例のうち、まずは No.11 のゲノムデータを用いて VarScan によるバリエーション検索を行った。正常細胞由来と癌細胞由来のゲノムの間に差がみられたのは、Indel で 389 か所、SNPs で 6616 か所であった。このうち、正常組織では検出されず、癌細胞のみで検出され、遺伝子変異により有意な蛋白変化がおけると予想されたものは Indel で 2 か所、SNPs で 22 か所であった (Table 2)

Table 2 変異遺伝子 (No.11)

Indel						
chromosome	position	reference	variant	intensity	protein	type of variant
chr17	7673717	T	TG	HIGH	TP53	frameshift_variant
chr17	43091904	TA	T	HIGH	BRCA1	frameshift_variant
SNPs						
chromosome	position	reference	variant	intensity	protein	type of variant
chr1	58782755	C	A	HIGH	JUN	stop_gained
chr3	38698081	C	T	Moderate	SCN10A	missense_variant
chr3	122704716	C	T	HIGH	PARP14	protein_protein_contact
chr3	179230077	G	A	HIGH	PK3CA	protein_protein_contact
chr4	9782999	G	A	Moderate	DRD5	missense_variant
chr7	27163677	G	A	HIGH	H0XA9	stop_gained
chr7	55173985	A	G	Moderate	EGFR	missense_variant
chr7	55191822	T	G	Moderate	EGFR	missense_variant
chr8	102225992	C	T	Moderate	RRM2B	missense_variant
chr10	8055779	C	G	Moderate	GATA3	missense_variant
chr11	77130647	C	T	HIGH	MYO7A	stop_gained
chr11	83168832	C	T	Moderate	PCF11	missense_variant
chr12	109191707	C	T	HIGH	ACACB	stop_gained
chr16	3966286	T	C	Moderate	ADCY9	missense_variant
chr17	8828897	C	T	Moderate	PK3R6	missense_variant
chr18	69010949	C	T	HIGH	CCDC102B	stop_gained
chr19	1108816	G	C	Moderate	SBN02	missense_variant
chr19	1421218	G	T	Moderate	DAZAP1	missense_variant
chr19	8953602	G	T	Moderate	MUC16	missense_variant
chr19	10499701	G	T	Moderate	KEAP1	missense_variant
chr20	58855159	C	T	Moderate	GNAS	missense_variant
chrX	139204105	C	T	HIGH	FGF13	start_lost

実験 HLA モチーフ検索プログラム

HLA モチーフ検索プログラムを用いて、実験で得られた変異遺伝子によってコードされるアミノ酸を中心としたアミノ酸配列と HLA クラス I (HLA A24:02) との結合予測を行った。計 227 通りのアミノ酸配列について検討を行った。A2402 との結合予測数値が高いものから順に 25 個の変異を候補に挙げた (Table 3)

Table 3. HLA 結合予測リスト (No.11)

No.	protein	sequence	A2402 score
1	SCN10A	TYIIISFLI	5.9232
2	RRM2B	KLKTDEKYF	5.4909
3	PARP14	TLQEVHFL	5.4217
4	GNAS	PQPKASCSL	5.3854
5	GATA3	ALPEEVDVL	5.2954
6	PARP14	LHPSDHENI	5.293
7	PARP14	KTLQEVHFL	5.0658
8	RRM2B	KDLPHWNKL	5.0083
9	PCF11	GPVGTPLWF	4.9703
10	DAZAP1	PHNCVETEL	4.9671
11	SCN10A	YIIISFLII	4.9657
12	SCN10A	FLIIVNMYI	4.916
13	ADCY9	GVIGTTKLL	4.9037
14	PCF11	TPLWFEGPI	4.8926
15	GATA3	LPEEVDVLF	4.8806
16	PCF11	PPGPVGTPL	4.8632
17	GATA3	YMDAAQYAL	4.8606
18	SCN10A	IVNMYIAVI	4.8369
19	SCN10A	TTYIIISFL	4.8152
20	MUC16	SPLPVTSL	4.8096
21	PARP14	LKTLQEVHF	4.7795
22	ACACB	INLLETESF	4.762
23	TP53	KKGEPHHEL	4.7596
24	DAZAP1	VETELREYF	4.7425
25	PCF11	PGPVGTPLW	4.6053

今後、上記の上位数個のアミノ酸配列についてテトラマーを合成し、まずは患者由来の腫瘍浸潤リンパ球がこのテトラマーを認識するかどうかを評価予定である。さらに、iPS

細胞技術を用いた、癌抗原特異的な CTL の作成と癌細胞に対する殺細胞効果を調べることも検討している。

<引用文献>

1 . Shimono M, Uenaka A, Noguchi Y, Sato S, Okumura H, Nakagawa K, Kiura K, Tanimoto M, Nakayama E. Identification of DR9-restricted XAGE antigen on lung adenocarcinoma recognized by autologous CD4 T-cells. *Int J Oncol* 2007; 30: 835-40.

2 . Whiteside TL, Miescher S, MacDonald HR, Von Fliedner V. Separation of tumor-infiltrating lymphocytes from tumor cells in human solid tumors. A comparison between velocity sedimentation and discontinuous density gradients. *J Immunol Methods*. 1986; 90: 221-233.

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 14 件)

1 . Otsuki T, Nakashima T, Hamada H, Takayama Y, Akita S, Masuda T, Horimasu Y, Miyamoto S, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyata Y, Miyake M, Kohno N, Okada M, Hattori N. Aminopeptidase N/CD13 as a potential therapeutic target in malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 2018; 51: 1701610. (査読有)

2 . Masuda T, Hirano C, Horimasu Y, Nakashima T, Miyamoto S, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N. The extent of ground-glass attenuation is a risk factor of chemotherapy-related exacerbation of interstitial lung disease in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018; 81: 131-9. (査読有)

3 . Namba M, Masuda T, Nakamura T, Horimasu Y, Miyamoto S, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N. Additional Octreotide Therapy to Sunitinib Achieved a Decrease in Sunitinib-refractory Chylous Effusion Complicated with Lymphangiomyomatosis. *Intern Med*. 2017; 56: 3327-31. (査読有)

4 . Sakamoto S, Yamada T, Terazaki Y, Yoshiyama K, Sugawara S, Takamori S, Matsueda S, Shichijo S, Yamada A, Noguchi M, Itoh K, Hattori N, Kohno N, Sasada T. Feasibility Study of Personalized Peptide Vaccination for Advanced Small Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 2017; 18: e385-94. (査読有)

5 . Yamaguchi K, Iwamoto H, Sakamoto S,

Horimasu Y, Masuda T, Miyamoto S, Nakashima T, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N. *AGER* rs2070600 polymorphism elevates neutrophil-lymphocyte ratio and mortality in metastatic lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2017; 8: 94382-92. (査読有)

6 . Izumi Y, Masuda T, Horimasu Y, Nakashima T, Miyamoto S, Iwamoto H, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N. Chronic Intestinal Pseudo-obstruction and Orthostatic Hypotension Associated with Small Cell Lung Cancer that Improved with Tumor Reduction after Chemoradiotherapy. *Intern Med* 2017; 56: 2627-31. (査読有)

7 . Horimasu Y, Ishikawa N, Tanaka S, Hirano C, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N, Kohno N. MUC1 in lung adenocarcinoma: cross-sectional genetic and serological study. *BMC Cancer* 2017; 17: 263. (査読有)

8 . Sakamoto S, Matsueda S, Takamori S, Toh U, Noguchi M, Yutani S, Yamada A, Shichijo S, Yamada T, Suekane S, Kawano K, Naitou M, Sasada T, Hattori N, Kohno N, Itoh K. Immunological evaluation of peptide vaccination for cancer patients with the HLA -A11+ or -A33+ allele. *Cancer Sci* 2017; 108: 598-603. (査読有)

9 . Takayama Y, Hattori N, Hamada H, Masuda T, Omori K, Akita S, Iwamoto H, Fujitaka K, Kohno N. Inhibition of PAI-1 Limits Tumor Angiogenesis Regardless of Angiogenic Stimuli in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Res* 2016; 76: 3285-94. (査読有)

10 . Omori K, Hattori N, Senoo T, Takayama Y, Masuda T, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Hamada H, Kohno N. Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Attenuates Transforming Growth Factor- β -Dependent Epithelial Mesenchymal Transition and Differentiation of Fibroblasts to Myofibroblasts. *PLoS One* 2016; 11: e0148969. (査読有)

11 . Ihara D, Hattori N, Horimasu Y, Masuda T, Nakashima T, Senoo T, Iwamoto H, Fujitaka K, Okamoto H, Kohno N. Histological Quantification of Gene Silencing by Intratracheal Administration of Dry Powdered Small-Interfering RNA/Chitosan Complexes in the Murine Lung. *Pharm Res* 2015; 32: 3877-85. (査読有)

12 . Sakamoto S, Matsueda S, Takamori S, Toh U, Noguchi M, Yutani S, Yamada A, Shichijo S, Yamada T, Suekane S, Kawano K, Sasada T, Hattori N, Kohno N, Itoh K. Immunological evaluation of peptide vaccination for cancer

patients with the HLA-A26 allele. Cancer Sci 2015; 106: 1257-63. (査読有)

13 . Akita S, Hattori N, Masuda T, Horimasu Y, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyake M, Kohno N. MT95-4, a fully humanized antibody raised against aminopeptidase N, reduces tumor progression in a mouse model. Cancer Sci 2015; 106: 921-8. (査読有)

14 .Sakamoto S, Yoshitomi M, Yutani S, Terazaki Y, Yoshiyama K, Ioji T, Matsueda S, Yamada A, Takamori S, Itoh K, Hattori N, Kohno N, Sasada T. Evaluation of prognostic significance of granulocyte-related factors in cancer patients undergoing personalized peptide vaccination. Hum Vaccin Immunother 2015; 11: 2784-9. (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

服部 登 (HATTORI NOBORU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授
研究者番号：00283169

(2)研究分担者

河本 宏 (KAWAMOTO HIROSHI)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00343228

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()