

令和元年6月14日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11152

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌におけるネオ抗原および局所免疫応答の統合的解析

研究課題名(英文) Neoantigen and local immune profile in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

長谷川 幸清 (HASEGAWA, Kosei)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：30534193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌74例のシーケンスデータもとに、腫瘍変異遺伝子情報からネオ抗原の予測を行った。次に、ネオ抗原数を変異遺伝子数で割ったものを(neoantigen frequency, NF)として検討したところ、NFが低い群では予後が極めて良好で、NFが高い群で予後が増悪していることが明らかになった。また、NFは卵巣明細胞癌で独立した予後因子となることがわかった。次に発現アレイの情報を利用して検討を進めた結果、NFが低い群で免疫関連遺伝子がより高発現していることがわかった。逆にNFが高い群ではHLA-class Iの発現低下および免疫チェックポイント分子の発現上昇が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌74例のエクソームシーケンスデータを元に、腫瘍変異遺伝子情報からMHC class I結合エピトープの予測を行ない、免疫編集に関して検討した。免疫編集とは腫瘍の発生、発育の段階で抗腫瘍免疫が働いた場合、ネオ抗原を持ったクローンが排除されるため、腫瘍の変異遺伝子数に比較してネオ抗原の数が減少する可能性が考えられている。そこで卵巣明細胞癌で免疫編集が起こっているかを確認するために、ネオ抗原数を変異遺伝子数で割ったものを免疫編集の指標(neoantigen frequency, NF)として検討した

研究成果の概要(英文)：A total of 74 cases of ovarian clear cell carcinoma (CCC) were analyzed in this study. Exome sequencing and expression array were performed. Mutations, neoantigen load, antigen presentation machinery and immune profile were investigated. The number of neoepitopes per mutation (neoantigen frequency, NF) was further analyzed. A correlation between high NF with decreased progression-free survival (PFS) was found. A cox multivariate regression analysis demonstrated that the high NF was an independent prognostic factor for PFS. Immune related genes were frequently highly expressed in tumors with low NF, suggesting evidence of immunoeediting in the low NF group. In contrast, we observed decreased HLA class I expression as well as increased PD1/CD8 ratio in tumors with high NF. These results suggest that tumors with high NF in CCC might have received insufficient immunoeediting due to an immunosuppressive tumor microenvironment.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣明細胞癌 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんはもっとも死亡率の高い婦人科がんであり、多くの症例が腹膜播種を伴う進行例として診断される。化学療法により生存率の改善がある程度見込めるようになったものの、再発し、やがては化学療法耐性となる場合がほとんどで、予後はきわめて不良である。しかし、卵巣がんの生物学的な多様性から、その特性は未だ十分に明らかにされておらず、卵巣がん患者の予後改善をめざす上で、臨床上有用なバイオマーカーの確立、さらには新規治療標的の同定は喫緊の課題と考えられる。

卵巣がんの中では漿液性癌は最も頻度が高く、次に欧米に比較し日本で頻度の高い明細胞癌を合わせると卵巣がん症例の大部分を占める。明細胞癌の発症は欧米では上皮性卵巣癌の約5%程度に対して本邦では20-25%とその人種的な発生の違いも注目されている¹⁾。また、明細胞癌は卵巣がんの組織型の中でも抗がん剤耐性のため予後不良とされているだけでなく、高い静脈血栓症の合併率も問題となっている。そのため、卵巣明細胞癌に対する、既存の化学療法とはことなつた、新たな治療戦略が必要と考えられている。

がん免疫療法は手術療法、化学療法、放射線療法に次ぐ、第4のがん治療法として注目を浴びてきた。しかしその臨床効果はこれまで明らかではなかった。近年抗 CTLA-4 抗体、抗 PD1/PD-L1 抗体などのいわゆる免疫チェックポイント阻害剤の臨床効果の報告が相次いでおり、非常に期待されているが、その効果はがん腫や患者によってまだかなり限定的である。卵巣癌に関しては Hamanishi らがプラチナ耐性卵巣癌に対する抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) の単剤投与の奏効率が15%と報告しているが、注目すべきは、そのうち2例が完全奏効 (CR) で、その後も効果を継続していること。また、2例のうち1例は抗がん剤耐性と考えられる明細胞癌であった²⁾。一方 Disis らは2015年の ASCO で再発卵巣癌75例に対する抗 PD-L1 抗体である Avelumab の第1b相のオープンラベル拡大試験の臨床効果について報告している。奏効率は10.7%にすぎなかったが、腫瘍制御率は54.7%と高く、2例の明細胞癌では30%以上の縮小を認めた。以上のことから化学療法に耐性を示す卵巣明細胞癌であっても、免疫チェックポイント阻害薬の効果が期待できる可能性が示唆されているが、より効果的な患者の抽出のためには、効果予測のバイオマーカーの確立が非常に重要であると考えられる。1990年代に Boon らがT細胞を認識するがん関連抗原を分子レベルで同定し、それらを標的とした特異的がん免疫療法の臨床応用が盛んに試みられてきた。残念ながら、メラノーマをのぞいて臨床効果は乏しい。その主な原因の一つとしては、標的抗原の免疫原性が低いため、高い免疫反応が得られないことが推測されている。近年の次世代シーケンサーの登場により網羅的な遺伝子変異解析がより簡便に施行できるようになり、腫瘍の遺伝子変異由来の抗原、いわゆるネオ抗原 (neoantigen、ネオアンチゲン) が注目されるようになってきた。遺伝子変異由来の抗原は、免疫系からは非自己として認識されるために、抗原特異的T細胞が効率よく誘導されると考えられる^{3,4)}。現在、免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーとしても変異遺伝子 (ネオ抗原) の数などが期待されている⁵⁾。

免疫療法を成功に導くには、前述の抗原に加えて局所でのT細胞を中心とした免疫応答に関する解析およびその理解が不可欠であると考えられる。つまり抑制性の免疫環境により免疫系が反応できないのか、あるいはそもそも免疫不全状態になっているのかなど。卵巣明細胞癌において、ネオ抗原、腫瘍局所の免疫プロファイルおよび生存情報や化学療法奏効率などの臨床効果とあわせて解析することは、卵巣明細胞癌における免疫療法の確立に非常に有用であると考えられる。

参考文献

- 1) Del Carmen, et al. Gynecol Oncol. 126:481-490. 2012
- 2) Hamanishi J, et al. J Clin Oncol. Sep 8. 2015
- 3) Robbins PF, et al. Nat Med. 19:747-752. 2013
- 4) van Rooij N, et al. J Clin Oncol. 31:E439-442, 2013
- 5) Rizvi NA, et al. Science 348:124-128, 2015

2. 研究の目的

化学療法抵抗性である卵巣明細胞癌に対するがん免疫療法の確立を目指して、免疫学的標的の探索や個別化がん免疫治療の効果予測バイオマーカーの策定のために、腫瘍局所における免疫プロファイルおよび次世代シーケンサーによる遺伝子変異プロファイルから推測するネオ抗原を統合的に解析し、卵巣明細胞癌のもつ腫瘍免疫学的特性をあきらかにする。

3. 研究の方法

次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム (P-DIRECT) で行われた卵巣明細胞癌74例の Whole exome sequence のデータおよび遺伝子発現に関してはマイクロアレイのデータを用いて行った。

HLA (human leukocyte antigen) タイピング

卵巣明細胞癌のエクソームシーケンスデータより、HLA タイピングソフトウェア (Omixon target HLA) を用いて HLA のタイピングを行った。

ネオアンチゲンの予測

卵巣明細胞癌のエクソームデータを利用して、変異遺伝子をもとに新たな抗原性をもつと考えられる、いわゆるネオアンチゲンの抗原決定基であるネオエピトープを *in silico* で解析した。IEDB (immune epitope database and analysis resource) を利用して、予測変異箇所を含んだ 17 アミノ酸配列より、9-mer あるいは 10-mer のペプチドエピトープを抽出し、NetMHCpan の MHC class I epitope binding algorithms を用いてそれぞれの HLA との結合予測のランキングを行い、IC50 の値が 500nM 以下のものを予測ネオエピトープ、それがコードする遺伝子をネオアンチゲンとした。

生存解析

サブグループ間の生存解析は JMP6.0 を用いて Kaplan-Meier 法により生存率曲線を作成し、各グループ間の無増悪生存期間 (PFS) 及び全生存期間 (OS) に関してログランク検定を行った。

局所免疫プロファイル

発現アレイのデータをもとに DAVID Bioinformatics Resources 6.8 tool を用いて gene ontology 解析及び遺伝子セット用いた Gene set enrichment 解析を行った。

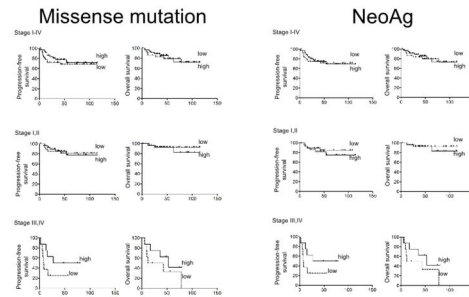
4. 研究成果

74 例の卵巣明細胞癌の背景を図 1 に示す。78% が stage I/II であり、ほとんどの症例で初回完全手術施行であった。エクソームシーケンスのデータ元に各症例の腫瘍変異数を選出し、HLA class I のデータとともにネオエピトープの予測を行った。がネオエピトープを一つでも持つ抗原をネオアンチゲンとした。予測されたネオアンチゲンの中央値は 21 (最小値は 0、最大値は 297) であった。2 例はハイパーミューターと考えられた。変異数が多い腫瘍及びネオアンチゲンを多く持つ腫瘍は予後が良い可能性があるため、腫瘍変異及びネオアンチゲンを多く持

図1. 卵巣明細胞癌74例の患者背景

	N (%)
Total patients	74 (100)
Age	
>55	37 (50)
≤55	37 (50)
FIGO stage	
I	47 (63)
II	11 (15)
III	10 (14)
IV	6 (8)
Ascites cytology	
positive	24 (32)
negative	50 (68)
Residual tumor	
yes	10 (14)
no	64 (86)

図2. 腫瘍変異およびネオアンチゲンと患者予後



つ症例と、少ない症例に群わけし予後を比較した (図 2)。PFS、OS 共に予後差は認めなかった。次に免疫編集に関して検討した。免疫編集とは腫瘍の発生、発育の段階で抗腫瘍免疫が働いた場合、ネオアンチゲンをを持ったクローンが排除されるため、腫瘍の変異遺伝子数に比較してネオアンチゲンの数が減少する可能性が考えられている。そこで卵巣明細胞癌で免疫編集が起きているかを確認するために、ネオアンチゲン数を変異遺伝子数で割ったものを免疫編集の指標 (neoantigen frequency, NF) として検討した (図 3)。NF が低い群では予後が極めて良好で、NF が高い群で予後が増悪していることが明らかになった。多変量の解析の結果でも NF は特に stage I/II 期の卵巣明細胞癌で独立した予後因子となることがわかった。この背景にどのような免疫因子が関わっているかを明らかにするため、発現アレイの情報を利用して検討を進めた。

図3. Neoantigen frequency (NF)と患者予後

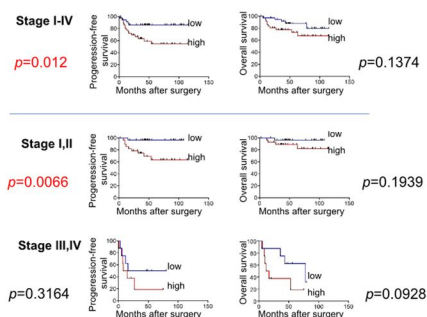
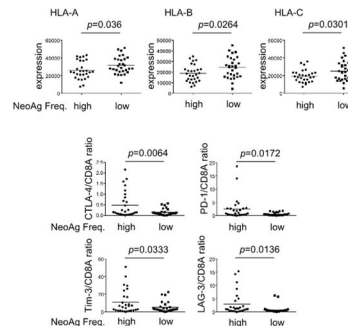


図4. NF high 群における抗腫瘍免疫応答の減弱



DAVID Bioinformatics Resources 6.8 tool を用いて gene ontology 解析を行った結果、NF が

低い群、つまり予後良好の群では抗腫瘍免疫応答に関連する遺伝子の発現が有意に増加していることが明らかになった。この結果を確認するために、異なる手法でも解析を進め、特定の遺伝子セットを用いた Gene set enrichment 解析も行った。その結果“effector memory CD8 T cells”や“T cells”の遺伝子セットが、NF が低い群でより高発現していることがわかった。逆に NF が高い群、つまり予後の悪い群ではどのようなメカニズムがその背景にあるかを検討したところ、NF が高い群ではネオアンチゲンの抗原提示に必要な HLA-class I の発現が腫瘍局所で低下していること、さらに腫瘍局所に浸潤している CD8 陽性 T 細胞上の免疫チェックポイント分子 PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 が発現していることが明らかになった。

以上の結果から、ネオアンチゲンを指標にして卵巣明細胞癌の免疫学的背景を検討したところ、免疫編集が起こっているタイプとそうでないタイプがあることがわかった。免疫編集が起こっている指標 (NF 低値) は独立した予後良好因子であることが明らかになった。また免疫編集が起こっていない群 (NF 高値) の原因としては、腫瘍の免疫からのエスケープ機能である抗原提示能の低下や抑制性免疫ネットワークが関連すると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Bagnoli M, Shi TY, Gourley C, Speiser P, Reuss A, Nijman HW, Creutzberg CL, Scholl S, Negrouk A, Brady MF, Hasegawa K, Oda K, McNeish IA, Kohn EC, Oza AM, MacKay H, Millan D, Bennett K, Scott C, Mezzanzanica D. Gynecological Cancers Translational, Research Implementation, and Harmonization: Gynecologic Cancer InterGroup Consensus and Still Open Questions. *Cells*. 査読あり、2019 Feb 26;8(3).
2. Oda K, Hamanishi J, Matsuo K, Hasegawa K. Genomics to immunotherapy of ovarian clear cell carcinoma: Unique opportunities for management. *Gynecol Oncol*. 査読あり、2018 Sep 11. pii: S0090-8258(18)31174-0. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.09.001. [Epub ahead of print] Review.
3. Imai Y, Hasegawa K, Matsushita H, Fujieda N, Sato S, Miyagi E, Kakimi K, Fujiwara K. Expression of multiple immune checkpoint molecules on T cells in malignant ascites from epithelial ovarian carcinoma. *Oncol Lett*. 査読あり、2018 May;15(5):6457-6468. doi: 10.3892/ol.2018.8101.
4. Hasegawa K, Ikeda Y, Kunugi Y, Kuroaki A, Nagao S, Nakamura Y, Fujiwara K. Phase I Study of Multiple Epitope Peptide Vaccination in Patients with Recurrent or Persistent Cervical Cancer. *J Immunother*. 査読あり、2018 May;41(4):201-207. doi: 10.1097/CJI.0000000000000214.
5. Hasegawa K, Matsushita H, Oda K, Yamamoto S, Nishijima A, Imai Y, Asada K, Ikeda Y, Karasaki T, Fujiwara K, Aburatani H, Kakimi K. The frequency of neoantigens per somatic mutation rather than overall mutational load or number of predicted neoantigens per se is a prognostic factor in ovarian clear cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 査読あり、2017 Jun 16;6(8):e1338996.

[学会発表](計 2 件)

1. Kosei Hasegawa, Hirokazu Matsushita, Katsutoshi Oda, Shogo Yamamoto, Akira Nishijima, Yuichi Imai, Kayo Asada, Yuji Ikeda, Keiichi Fujiwara, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiro Kakimi. High frequency of neoantigens per mutation is a risk factor for recurrence in ovarian clear cell carcinoma. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Sep 28, 2017
2. Kosei Hasegawa, Hirokazu Matsushita, Katsutoshi Oda, Shogo Yamamoto, Akira Nishijima, Yuichi Imai, Kayo Asada, Yuji Ikeda, Keiichi Fujiwara, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiro Kakimi. Immunoediting, neoantigen frequency, and clinical outcome in patients with ovarian clear cell carcinoma. Annual Meetings on Women's Cancer, National Harbor, MD, USA, March 14, 2017

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/kokusai/fujinshuyo/>

https://www.researchgate.net/profile/Kosei_Hasegawa/research

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：織田克利

ローマ字氏名：ODA, katsutoshi

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院・女性外科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30359608

研究分担者氏名：松下博和

ローマ字氏名：MATSUSHITA, hirokazu

所属研究機関名：愛知県がんセンター（研究所）

部局名：腫瘍免疫制御 TR 分野

職名：分野長

研究者番号（8桁）：80597782

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。