

令和元年6月15日現在

機関番号：32665
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2018
 課題番号：17K16865
 研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析データに基づく婦人科癌に対するペプチドワクチンターゲットの同定
 研究課題名(英文) Identification of peptide vaccine target in gynecologic cancer based on mRNA sequencing
 研究代表者
 池田 悠至 (IKEDA, Yuji)
 日本大学・医学部・助教
 研究者番号：80713453
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：データベースを用いて、正常組織に発現が極めて低く、かつ子宮体癌に高発現している10遺伝子を同定した。HLA-A*24およびHLA-A*02のMHCに親和性が高い抗原(ペプチド)を同定した。特に候補ペプチドの多かったRGPD6は子宮体癌のみならず子宮頸癌、卵巣癌を始め多くの癌にて発現していた。また再発子宮頸癌に対するペプチドを用いたがんワクチンのPhase I臨床試験の治療標的への免疫誘導性を、ワクチンを投与された患者血液を用いて検討した。その結果、FOXM1およびMELKに対して高い免疫応答を示している事が判明した。これらは婦人科癌における新規免疫治療の治療標的として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回同定されたがんの特異性をターゲットとした免疫療法の開発は直接的にがん細胞を攻撃するアクセルの役割を担う事が大いに期待される。即ちこれらのターゲットを認識するT細胞を患者に投与する事で、がんを特異的に攻撃する免疫システムの構築が出来る可能性がある。加えて将来的には現在旺盛なチェックポイント阻害薬(免疫機構のブレーキを解除する意義がある)を併用する事でよりその効果も高める可能性があり、今後の研究開発の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Firstly, mRNA sequencing data obtained from 582 samples of endometrial cancer and 53 control samples from 31 normal organs were extracted from cancer genome atlas (TCGA) database and Genotype-Tissue Expression project, respectively. After filtering of protein coding genes, 8 to 12 peptides with high binding affinity to HLA-A*24 and -A*02 alleles were identified. Analysis of binding affinity revealed that 21 and 146 peptides derived from ten genes of interest showed high binding affinity to those HLA. Remarkably, RGPD6 is the most reliable candidate target. Secondly, we conducted a phase I dose-escalation trial using a mixture of 5 peptides to vaccinate cervical cancer patients with HLA-A*2402. Interferon- enzyme-linked immunospot assays for each of the 5 antigens showed that 8 (89%) and 7 (78%) patients had high T-cell responses to FOXM1 and MELK, respectively. As a result, RGPD6, FOXM1 and MELK are seemed to be a strong candidate of immunotherapeutic target for gynecologic cancers.

研究分野：婦人科癌

キーワード：がん精巢抗原

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

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

癌免疫に関して説明する。細胞死を起こした癌細胞からは抗原が放出される。それらは樹状細胞(DC)に代表される抗原提示細胞に取り込まれ分解され、分解産物であるペプチドが小胞体において主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex; MHC)に結合し抗原提示細胞の細胞膜上に提示される。通常、8~11連鎖のアミノ酸からなるペプチドがMHCクラスIに適合するとされ、その配列はヒト白血球抗原(Human Leukocyte Antigen; HLA)に依存する。即ちHLAのサブタイプによりMHC上に提示される抗原の種類は異なる。MHCに提示された抗原はT細胞受容体を介しCD8+ T細胞に認識され、抗原特異的Cytotoxic T cell(CTL)が誘導される。抗原特異的CTLは癌細胞のHLAクラスIに提示された特異抗原を認識する。CTLにより癌細胞の細胞死が誘導された場合、死細胞からの更なる抗原の放出が期待される。

癌抗原には様々なタイプが存在する。免疫治療においては自己免疫性疾患に類似する機序による自己臓器および組織への障害性を防ぐため、より腫瘍特異性の高い抗原が望まれる。すなわち癌特異的に発現している蛋白が標的として最適である。近年、遺伝子変異に基づく変異アミノ酸からなる抗原であるネオアンチゲンが着目されているがネオアンチゲンとなる遺伝子変異の92%は直接的な細胞癌化との関連が示唆されていない変異であり、患者間で共有されている抗原はほとんどない。従ってネオアンチゲンの治療開発・臨床応用は非常に高価となる事が見込まれる。一方、オンコアンチゲンは癌精巢抗原を含む腫瘍(もしくは精巢)のみに発現している抗原を指す。HLAサブタイプが同じであれば患者間の共通性が高く、低コストにて癌ワクチンの開発および運用が可能となる。日本人は全体の約6割がHLA-A*24もしくはHLA-A*02を有しており、オンコアンチゲンをターゲットにした免疫治療に大きな可能性を秘めている。

今までは発現アレイの結果などに基づき抗原が決められていたが、近年はゲノム領域での技術進化により、遺伝子の発現を網羅的に解析する事が可能になった。しかし未だそのようなデータを活用し抗原を定めた報告は乏しい。

本研究は婦人科癌において治療に最適なペプチドワクチンの抗原同定を目的としている。既存の公的データベースを駆使しながらスーパーコンピューターを用い低コストにて婦人科癌における治療ターゲットを選定する事が可能であり、今回本プロジェクトを立案した。最終目標は治療効果が極めて高いペプチドワクチン療法を婦人科癌で樹立する事にあり、本プロジェクトはその臨床試験実施にむけた基礎的研究である。

2. 研究の目的

(1) 婦人科癌において癌特異的に高発現しているタンパク質を網羅的解析により同定する

(2) 1)における高発現タンパク質の中でHLA-A*24、A*02に高いAffinityを有するペプチドを同定し、そのペプチドから誘導された抗原特異的T細胞が殺細胞能を持つかを検証する

(3) 婦人科癌において有効性が期待されるペプチドワクチンの組み合わせを決定する

3. 研究の方法

(1) データベースを用いた子宮体癌におけるオンコアンチゲンの同定

本研究ではまず子宮体癌に注目し解析を行った。The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベースより子宮体癌の RNA sequencing のデータを取得した。データは各遺伝子単位の発現レベルが解析されているもの (Level3) で特殊な認定を必要とせず取得が可能であった。その結果を Genotype-Tissue Expression project (GTE) にある正常組織の RNA sequencing の結果と比較する。Super computer (Shirokane3) 上にて Fisher's exact test を基本とした統計解析処理を行い正常組織に発現が乏しく、なおかつ子宮体癌に高頻度に発現している遺伝子を同定した。

(2) Super computer を用いた in Silico でのペプチドの MHC への親和性 (Affinity) の解析

続いて HLA-A*24 (および A*02) において MHC に高い親和性 (Affinity) を有するペプチドを予測した。解析には各 HLA サブタイプにおける結合ペプチドの Affinity を予測するソフトウェアの netMHC4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) を前述の Shirokane3 にて運用し、(1) にて得られた高発現している遺伝子がコードするタンパク質の中で日本人に頻度の高い HLA-A*24 および HLA-A*02 において高い MHC への Affinity を有するペプチドを含むものを予測した。Affinity が 500nM 以下であったものを抽出した。

(3) 候補のペプチドを持つタンパクの発現の検証

mRNA 上に存在する蛋白が必ずしもタンパク質として発現しているとは限らないため、上記にて High affinity と判断されたペプチドを含む mRNA がコードするタンパク質が子宮体癌に発現しているかを Human Protein Atlas を用いて検証した。

(4) 抗原特異的 CTL の誘導および殺細胞能の検討

上記にて発現が認められたペプチドにおいて、HLA-A*24 (もしくは A*02) の健常人ボランティアの血液から特異的な細胞障害性 T 細胞を誘導し、その殺細胞能を評価した (現在検討中)

(5) 子宮頸癌におけるオンコアンチゲンをを用いた臨床試験における免疫学的検証

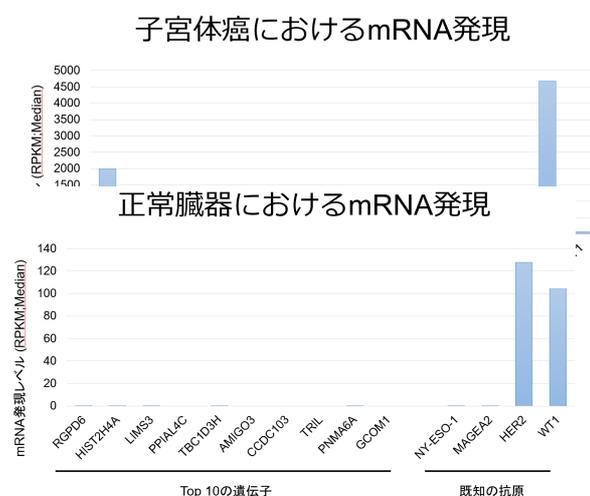
FOXM1、HJURP、MELK は子宮頸癌のオンコアンチゲンとして知られている。これらを主なターゲットとした再発子宮頸癌を対象としたペプチドワクチンの臨床試験における、特異的細胞障害性 T 細胞の免疫誘導性を検証した。ペプチドワクチンを投与された症例における血液を用い、ELISPOT アッセイを用いて免疫誘導の指標となる IFN- γ を測定した。

4. 研究成果

子宮体癌における日本人に特徴的なオンコアンチゲンの同定

(1) 子宮体癌における、がん特異的な遺伝子の発現

TCGA データベースおよび GTE データベースを用いて、子宮体癌 583 例において高発現があり、正常臓器からの組織 53 検体において発現が低い遺伝子群を同定した。その中で特に子宮体癌において発現が高い 10 遺伝子は *RGPD6*、*HIST2H4A*、*LIMS3*、*PPIAL4C*、*TBC1D3H*、*AMIGO3*、*CCDC103*、*TRIL*、*PNMA6A* および



GCOM1であった(右図)。また、既知のがん精巢抗原である *NY-ESO-1*、*MAGEA2*、今までにがんワクチンのターゲットとして使われた事のある *HER2* や *WT1* の遺伝子発現データも同時に解析したところ、到底された 10 遺伝子は *HER2* と比し遺伝子発現は低かったが、*NY-ESO-1* および *MAGEA2* と比し遺伝子発現は高かった。

一方、正常臓器からの組織における発現も同様に解析を行った(右図)。同定された 10 遺伝子はほぼ発現がなかったが、*HER2* および *WT1* には正常臓器にて高い遺伝子発現を認めた。

(2) mRNA 発現レベル上位 10 遺伝子の HLA-A*24 および HLA-A*02 のペプチドの数

続いて上位 10 遺伝子における HLA-A*24 および HLA-A*02 の MHC に親和性が高い 9 から 12 アミノ酸から成る抗原(ペプチド)を同定した。結果を右表に示す。RGPD6、TBC1D3H、TRIL にて Affinity が 100nM 以下となる高い親和性を持つペプチドが存在した。特に候補ペプチドの多かった RGPD6 は RANBP2 like and GRIP domain containing GTP-binding protein of the RAS superfamily として知られる遺伝子である。そのペプチドの一覧を右表に示す。この遺伝子は示される通り、高い親和性を有するペプチドが多数存在していた。

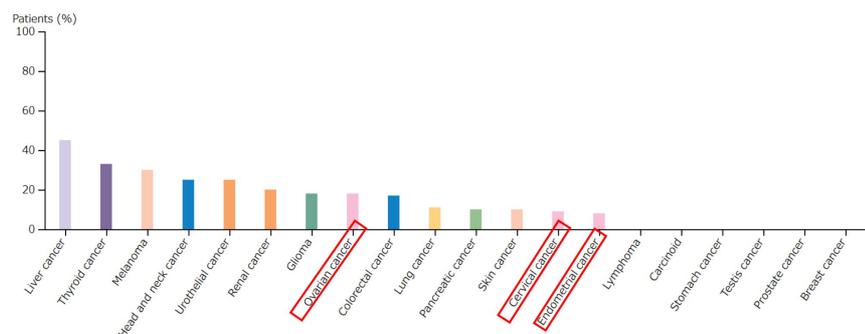
RGPD6 に関し、タンパク発現を Human protein atlas を用いて解析した所、このたんぱく質は子宮

mRNA発現レベル上位10遺伝子の HLA-A*24およびHLA-A*02のペプチドの数

| Affinity (nM) | Number of peptides | | | | |
|---------------|--------------------|---|-------------|----|-----|
| | HLA-A*24*02 | | HLA-A*02*01 | | |
| 1 | RGPD6 | 8 | 15 | 33 | 58 |
| 2 | HIST2H4A | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 3 | LIMS3 | 0 | 2 | 2 | 3 |
| 4 | PPIAL4C | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 5 | TBC1D3H | 0 | 2 | 11 | 17 |
| 6 | AMIGO3 | 0 | 1 | 5 | 13 |
| 7 | CCDC103 | 0 | 0 | 6 | 8 |
| 8 | TRIL | 0 | 0 | 14 | 27 |
| 9 | PNMA6A | 0 | 0 | 4 | 8 |
| 10 | GCOM1 | 0 | 0 | 7 | 10 |
| Total | | 9 | 21 | 83 | 146 |

| HLA-A*2402 | | HLA-A*0201 | |
|------------|--------------|--------------|--------------|
| Peptides | Affinity(nM) | Peptides | Affinity(nM) |
| SYQPLCLPF | 14 | YMYAGSLLL | 3.3 |
| SYWNLALIF | 29.1 | KLFPGSPAI | 6 |
| SSYQLCLPF | 34.8 | SLFGFSFNA | 6 |
| YLKNVLLQF | 35.5 | YQPLCLPFV | 7 |
| IFGQTSSTF | 39.9 | KLFDLIQSELYV | 7.6 |
| FYMYAGSLL | 40.4 | KLFRFDAEV | 8.1 |
| LYSQGVKLF | 40.7 | FLEMKGHFYM | 8.7 |
| FMYAGSLLL | 47.9 | FYMYAGSLLL | 9.4 |
| YWVERAALF | 50.8 | FDLIQSELYV | 11.6 |
| RAWMWSASF | 67.5 | MLNSVMQEL | 13.5 |
| VSYWNLALI | 67.6 | VLMEQIKLL | 14.3 |
| VLYSQGVKL | 69.2 | YLLRPAANV | 15.6 |
| YQPLCLPF | 76.8 | FLGLLYEL | 19.7 |
| AWMWSASDF | 78.4 | KLFDLIQSEL | 20.3 |
| YSQGVLFRR | 98.9 | ALYDALFSS | 22.1 |

体癌のみならず子宮頸癌、卵巣癌を始め多くの癌にて発現している事が明らかとなった(右図)。従って、婦人科癌をはじめ多くの癌における

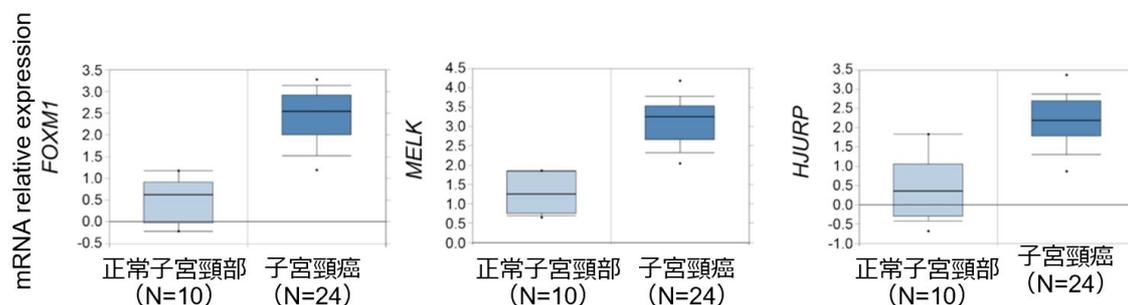


の免疫治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

現在、このたんぱく質をターゲットとした新たな免疫治療の開発を行っている。

子宮頸癌におけるオンコアンチゲンをを用いた臨床試験における免疫学的検証

我々は再発子宮頸癌においてオンコアンチゲンを主なターゲットとしたペプチドを用いたがんワクチンの PhaseI 臨床試験を行った。治療標的となった抗原のオンコアンチゲンである FOXM1、MELK、および HJURP の 3 種は下記に示す通り正常子宮頸部に比し、子宮頸癌で高い発現がある事が確認されている。



対象患者は下記に示される再発子宮頸癌 9 症例であった。

| Patient no. | Dose of peptides (mg) | HLA-A genotype | Age (years) | FIGO stage | TNM | Histotype | PS | RT after rec | No. of previous chemo regimens |
|-------------|-----------------------|----------------|-------------|------------|----------|--------------------|----|--------------|--------------------------------|
| PCA001 | 0.5 | 02:06/24:02 | 31 | IIB | T2bN0M0 | adenosquamous | 0 | Yes | 2 |
| PCA002 | 0.5 | 02:01/24:02 | 69 | IIB | T2bN0M0 | squamous | 0 | No | 2 |
| PCA003 | 0.5 | 24:02/- | 58 | IB1 | T1b1N0M0 | squamous | 0 | No | 1 |
| PCA004 | 1 | 24:02/31:01 | 64 | IIIB | T3bN1M0 | endometrioid adeno | 0 | Yes | 7 |
| PCA005 | 1 | 02:01/24:02 | 50 | IIB | T2bN0M0 | adeno | 0 | Yes | 1 |
| PCA006 | 1 | 24:02/26:01 | 64 | IVB | T4aN1M1 | squamous | 0 | No | 1 |
| PCA007 | 2 | 24:02/26:01 | 34 | IVB | T2bN1MA | squamous | 0 | No | 2 |
| PCA008 | 2 | 11:01/24:02 | 79 | IIB | T2bN0M0 | squamous | 0 | Yes | 1 |
| PCA009 | 2 | 02:01/24:02 | 40 | IB2 | T1b2N1M0 | squamous | 0 | No | 1 |

この試験における対象症例よりプロトコールに則り倫理委員会承認の元血液を採取し、投与されたペプチドワクチンに対する免疫応答に関し、ELISPOT アッセイでの IFN γ を測定する事で評価した。結果を下記に示す。

| ID | Course | CTL Response | | | | | Control |
|--------|-----------|--------------|------|-------|--------|--------|---------|
| | | FOXM1 | MELK | HJURP | VEGFR1 | VEGFR2 | |
| PCA001 | pre-vacc. | + | + | + | - | - | +++ |
| | 1 | NA | +++ | NA | NA | - | +++ |
| | 2 | +++ | + | - | - | - | +++ |
| | 3 | +++ | +++ | - | - | + | +++ |
| | 4 | +++ | +++ | - | - | + | +++ |
| PCA002 | pre-vacc. | - | - | + | + | - | +++ |
| | 1 | - | - | - | - | - | +++ |
| | 2 | + | - | - | - | - | +++ |
| | 3 | - | - | - | + | - | +++ |
| PCA003 | pre-vacc. | + | + | + | - | + | +++ |
| | 1 | +++ | +++ | - | - | - | +++ |
| | 2 | NA | NA | NA | NA | NA | - |
| | 3 | +++ | +++ | - | - | - | +++ |
| | 4 | +++ | +++ | + | - | - | +++ |
| | 5 | +++ | + | - | + | - | +++ |
| PCA004 | pre-vacc. | - | ++ | - | - | - | +++ |
| | 1 | +++ | +++ | - | - | - | +++ |
| | 2 | +++ | +++ | - | - | - | +++ |
| | 3 | +++ | +++ | - | - | - | +++ |
| PCA005 | pre-vacc. | - | + | - | - | - | +++ |
| | 1 | + | ++ | - | - | - | +++ |
| PCA006 | pre-vacc. | + | - | - | - | - | +++ |
| | 1 | +++ | + | - | - | - | +++ |
| PCA007 | pre-vacc. | - | - | - | - | - | +++ |
| | 1 | +++ | ++ | + | - | + | +++ |
| PCA008 | pre-vacc. | NA | NA | NA | - | NA | +++ |
| | 1 | - | - | - | - | - | +++ |
| PCA009 | pre-vacc. | + | - | - | + | - | +++ |
| | 1 | +++ | + | - | + | - | +++ |

FOXM1 および MELK に対して高い免疫応答を示していた。即ちこれらが免疫療法のターゲットとして有効である可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hasegawa K, Ikeda Y, Kunugi Y, Kurosaki A, Imai Y, Kohyama S, Nagao S, Kozawa E, Yoshida K, Tsunoda T, Nakamura Y, Fujiwara K 査読あり

J Immunother. 2018 May;41(4):201-207

〔学会発表〕(計 3 件)

Yuji Ikeda; Identification of endometrial cancer specific immunotherapeutic targets by comprehensive *in Silico* analysis American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2019

Yuji Ikeda; Identification of endometrial cancer specific immunotherapeutic targets by comprehensive *in Silico* analysis 第72回日本産科婦人科学会学術講演会 2019年

Yuji Ikeda; Phase I study of multiple epitope peptide vaccination in patients with recurrent or persistent cervical cancer, 第71回日本産科婦人科学会学術講演会 2018年

〔図書〕(計 0 件)〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

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。