

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08577

研究課題名(和文) 個別化精密がん免疫療法開発を目的とした腫瘍組織からのネオアンチゲン解析

研究課題名(英文) Neoantigen analysis in tumor tissues for development of personalized precision cancer immunotherapy

研究代表者

久保 真 (KUBO, Makoto)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：60403961

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)：新鮮乳癌32症例の生検材料を用いたNGSによる全エクソンDNA+RNAの解析では、遺伝子変異数はトリプルネガティブ乳癌で多い傾向であった。遺伝子変異数はTILとそのPD-L1発現率(免疫染色IHC)、T細胞活性化マーカーGZMB、予想されるネオアンチゲン候補数とは正の相関を示した。また、ネオアンチゲン予測解析より得られた変異ペプチドによるパルス樹状細胞に対する自己リンパ球のIFN- γ 産生は、ペプチド濃度依存性に反応が増幅し、ネオアンチゲンパルス樹状細胞で刺激したリンパ球による自己腫瘍に対する細胞障害性は増強した。以上より、ネオアンチゲンは乳癌微小環境における免疫標的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NGSを用いた全エクソンDNA+RNAの解析の結果、乳癌におけるネオアンチゲンの存在を確認し、ネオアンチゲンで刺激されたTリンパ球によって腫瘍に対する細胞障害性は増強されることが示された。副作用の少ない精密個別化医療として細胞医薬への道を開いた社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Analysis of total exon DNA + RNA by next-generation sequencer (NGS) using biopsy material from 32 cases of fresh breast cancer showed that the number of gene mutations tended to be higher in triple-negative breast cancer. The number of gene mutations showed a positive correlation with TIL and PD-L1 expression rate (according to immunostaining IHC), T cell activation marker GZMB, and expected number of neoantigen candidates. Subsequently, the IFN- γ production of autologous lymphocytes against pulsed dendritic cells with the mutant peptide obtained by neoantigen predictive analysis was amplified in a peptide concentration-dependent manner. In addition, the cytotoxicity of lymphocytes stimulated with neoantigen-pulsed dendritic cells to autologous tumors was enhanced. These results suggest that neoantigen is an immune target in the breast cancer microenvironment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ネオアンチゲン がん微小環境 腫瘍免疫 乳癌 腫瘍遺伝子変異量 腫瘍浸潤リンパ球 がんゲノム

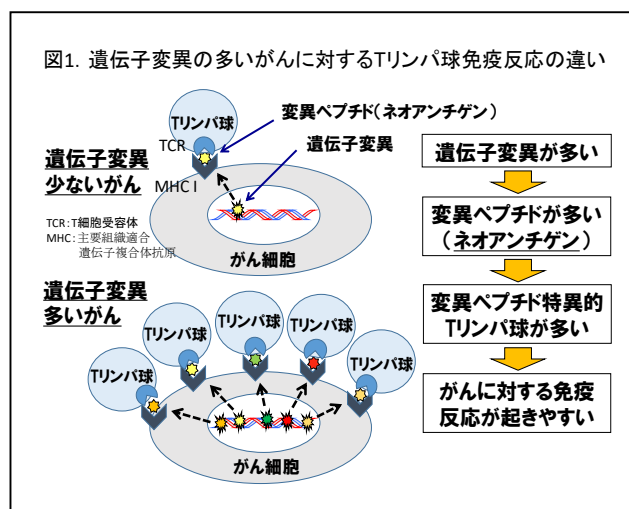
1. 研究開始当初の背景

次世代遺伝子解析の進歩により、細胞の遺伝子解析が比較的容易になったことで、正常細胞とがん細胞における全遺伝子の網羅的な解析を行うことが可能となり、がん細胞に特異的な体細胞変異抗原を特定できるようになった。この変異に由来するネオ抗原は、正常細胞には認められない非自己抗原であり¹、そのため高い免疫原性を持つと考えられる²。さらに、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)が認識する抗原はネオ抗原であり³、ネオ抗原ペプチドを利用したワクチン療法によりネオ抗原特異的免疫反応が引き起こされることも報告されている⁴。

一方、がんと免疫との関係はこの10年で驚くほど研究が進歩したのは周知の通りである。中でも「免疫チェックポイント」という免疫の自己制御機構、つまり免疫の中心であるTリンパ球が過剰に機能するのを制御するメカニズムが解明されるとともに、この働きを阻害することによって、がんに対する免疫反応を最大限に引き出す免疫チェックポイント阻害剤が開発され、がん征圧にむけて大きな前進がみられた。その代表であるPD-1抗体の治療効果は、ネオ抗原が多いほど免疫反応が強く(図1)、免疫療法の効果が高いことが知られている⁵。

したがって、ネオ抗原に基づく個別化精密がん標的治療の実現が可能となる。また、今まで日本で培われた免疫細胞療法に新時代の遺伝子情報を加え、より精密に個別化され、安全性と効果の高いネオ抗原ペプチドがんワクチン療法開発が期待される。

1. Schumacher TN. *Science*. 2015
2. Hacohen N. *Cancer Immunol Res*. 2013
3. Cohen CJ. *J Clin Invest*. 2015
4. Carreno BM. *Science*. 2015
5. Bouffet E. *J Clin Oncol*. 2016:



2. 研究の目的

本研究の目的は、がん免疫治療の精密個別化である。がん体細胞遺伝子変異に由来するペプチドであるネオアンチゲンは、がん細胞特異的で、より高い免疫原性があると期待されている。さらに、腫瘍に浸潤したリンパ球が認識する抗原はネオアンチゲンであり、その抗原提示がより効率のよいものであれば、ネオアンチゲン・ペプチドを利用したワクチン療法によりネオアンチゲン特異的免疫反応が引き起こされる。

本研究では、(1) ネオアンチゲンの解析、(2) ネオアンチゲンと腫瘍免疫機構との関連を解析し、将来的に(3) ネオアンチゲン・ペプチドを用いた個別化がんワクチン療法開発を目指した。

3. 研究の方法

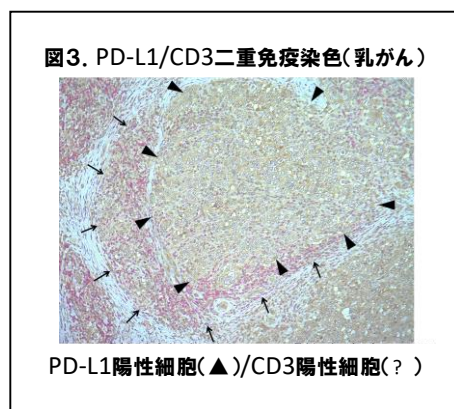
(1) 情報・試料の管理: 難治性・治療抵抗性がんを対象として年間約20例計50例を見込む。コントロールとして血液2ml(白血球)、腫瘍組織の生検・切除による採取と保存を行った(RNAlater)。

(2) ネオアンチゲンの解析: 匿名化された試料をオンコセラピー・サイエンス社/Cancer Precision Medicine社(CPM社)へ送付し、ネオアンチゲンの解析を行った。

(3) T細胞の機能解析

- 1) T細胞の視覚化: PD-L1とCD3の二重免疫組織化学染色(IHC)を行い、T細胞を視覚化した(図3)。
- 2) T細胞活性化の評価: 腫瘍浸潤リンパ球の評価を行い、T細胞活性化の指標とした。T-betやGZMBの免疫染色を行い、機能解析を行った。
- 3) 腫瘍免疫関連遺伝子変異・発現結果の解析を行った。
- (4) 前臨床治療試験を開始

- 1) ネオネオアンチゲン・エピトープペプチドの合成(CPM社に委託)
- 2) ネオネオアンチゲン・樹状細胞ワクチンの作成と治療の実施(Autologousの系)

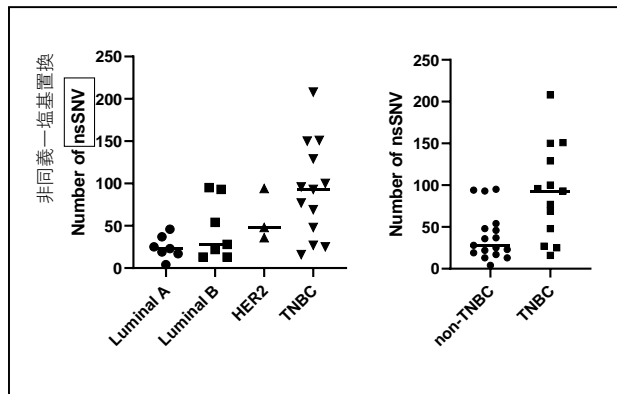


- 3) ワクチン投与後の反応解析 (Elispot 法、Peptide-MHC-tetramer 法) : in vitro モデル
 4) 細胞傷害性 T 細胞の誘導

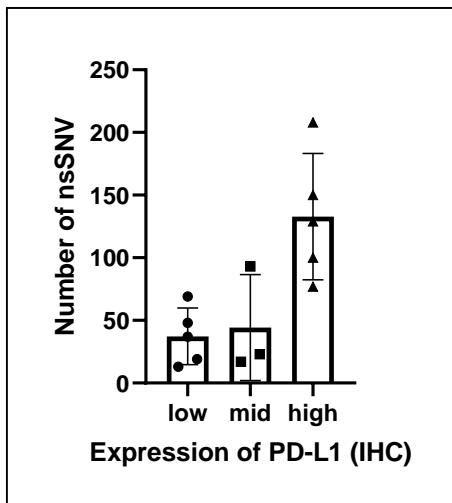
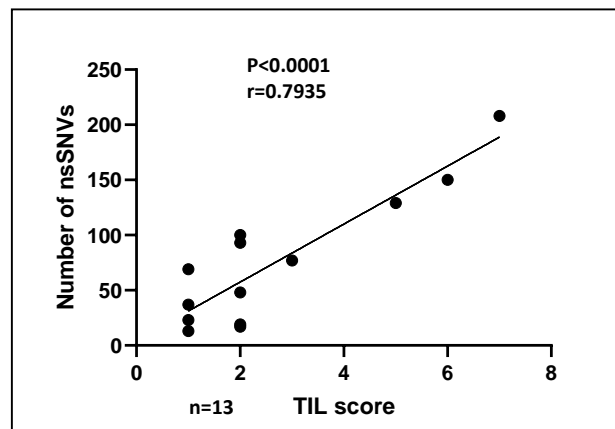
4. 研究成果

(1) 非同義一塩基置換遺伝子変異数は TNBC で多い傾向であった。

遺伝子解析では、非同義一塩基置換すなわちアミノ酸置換を伴う遺伝子変異数は、Luminal A、Luminal B、Her2、TNBC の順に多く、TNBC では平均 98 個、非 TNBC で 29 個と TNBC で多い傾向にあった。



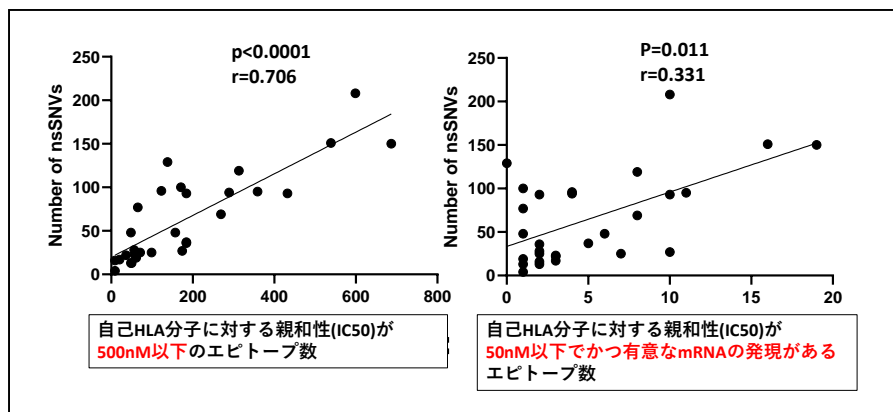
(2) 遺伝子変異数 (非同義変異; nsSNV) は TIL と正の相関を示した。
 間質 TIL の割合によりスコア化し解析すると、遺伝子変異数は TIL と有意な正の相関を示した (右図)。



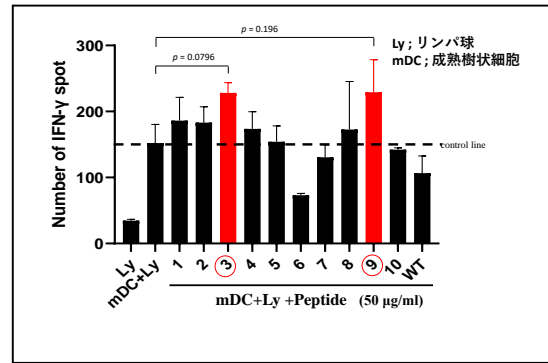
(3) 遺伝子変異数 (nsSNV) は、TIL の PD-L1 発現率 (IHC) と正の相関を示した (左図)。

TIL : 浸潤リンパ球
 IHC : 免疫組織染色

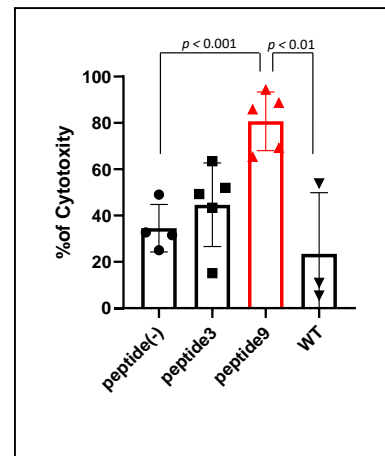
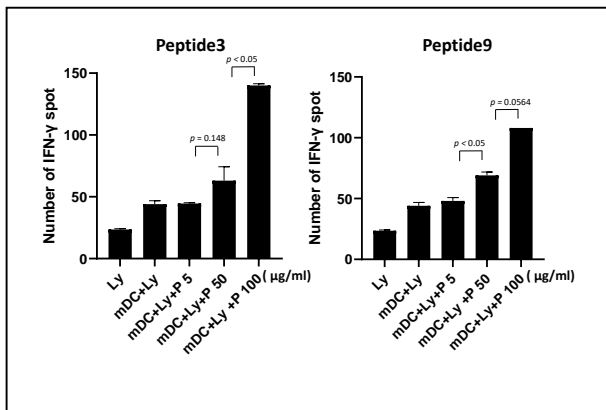
(4) 遺伝子変異数 (nsSNV) と予想されるネオアンチゲン数とは正の相関を示した (下図)。



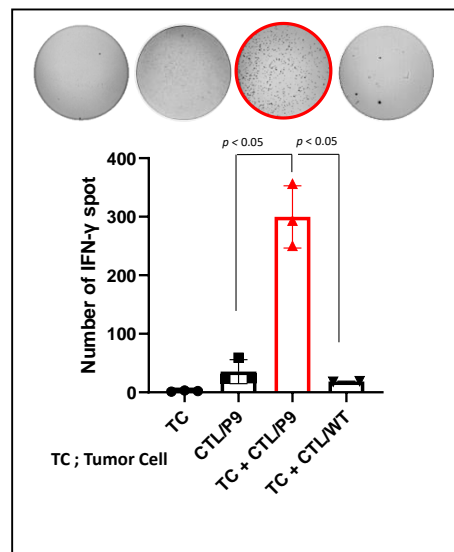
(5) 変異ペプチドパルス樹状細胞に対する自己リンパ球の IFN-g 産生 (ELISPOT)
 合成した 10 種類の変異ペプチドを成熟樹状細胞にパルスし、末梢血リンパ球を加えて 48 時間共培養して IFN ガンマの産生を ELISPOT 反応で見た。ペプチド 3 と 9 に対する反応が高いことがわかった (右図)。



(6) ペプチド濃度依存性の反応増幅
 ペプチド 3、ペプチド 9 いずれにおいても、IFN ガンマの産生は Dose-dependent であった (下図)。



(7) ネオアンチゲンパルス樹状細胞で刺激したリンパ球による細胞障害試験
 単球由来樹状細胞を作成し、反応性ネオ抗原ペプチドをパルスした末梢血単核球と混合培養を行うことにより細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の作製を試みた結果、自己腫瘍細胞に傷害性のある CTL を誘導できた (上右図)。



(8) 自己腫瘍細胞に対するネオ抗原ペプチドパルス樹状細胞刺激リンパ球の反応
 ペプチド 9 で刺激したリンパ球を自己腫瘍細胞に加えた時の IFN γ 産生をみた。WT コントロールと比較して有意な反応の増加がみられた (右図)。

以上、すべての結果は現在投稿し査読中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Zaguirre Karen, Kai Masaya, Kubo Makoto, Yamada Mai, Kurata Kanako, Kawaji Hitomi, Kaneshiro Kazuhisa, Harada Yurina, Hayashi Saori, Shimazaki Akiko, Morisaki Takafumi, Mori Hitomi, Oda Yoshinao, Chen Sanmei, Moriyama Taiki, Shimizu Shuji, Nakamura Masafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Validity of the prognostication tool PREDICT version 2.2 in Japanese breast cancer patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1605 ~ 1613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawaji Hitomi, Kubo Makoto, Yamashita Nami, Yamamoto Hidetaka, Kai Masaya, Kajihara Atsuko, Yamada Mai, Kurata Kanako, Kaneshiro Kazuhisa, Harada Yurina, Hayashi Saori, Shimazaki Akiko, Mori Hitomi, Akiyoshi Sayuri, Oki Eiji, Oda Yoshinao, Baba Eishi, Mori Masaki, Nakamura Masafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Comprehensive molecular profiling broadens treatment options for breast cancer patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 529 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Makoto, Kumamaru Hiraku, Isozumi Urara, Miyashita Minoru, Nagahashi Masayuki, Kadoya Takayuki, Kojima Yasuyuki, Aogi Kenjiro, Hayashi Naoki, Tamura Kenji, Asaga Sota, Niikura Naoki, Ogo Etsuyo, Iijima Kotaro, Tanakura Kenta, Yoshida Masayuki, Miyata Hiroaki, Yamamoto Yutaka, Imoto Shigeru, Jinno Hiromitsu	4. 巻 27
2. 論文標題 Annual report of the Japanese Breast Cancer Society registry for 2016	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 511 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-020-01081-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Ryuichiro, Ohtsuka Takao, Kubo Makoto, Kajihara Atsuko, Fujii Atsushi, Watanabe Yusuke, Mori Yasuhisa, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Shindo Koji, Ohuchida Kenoki, Nakamura Masafumi	4. 巻 51
2. 論文標題 FoundationOne CDx gene profiling in Japanese pancreatic ductal adenocarcinoma patients: a single-institution experience	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 619 ~ 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02123-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 MORISAKI TAKAFUMI, KUBO MAKOTO, UMEBAYASHI MASAYO, YUAN YUAN, TSUYADA AKIHIRO, TANAKA HIROTO, KOYA NORIHIRO, NAKAGAWA SHINICHIROU, MORISAKI TAKASHI, NAKAMURA MASAFUMI	4. 巻 39
2. 論文標題 Usefulness of the nCounter Analysis System to Monitor Immune-related Biomarkers in PBMCs During Anti-PD-1 Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4517 ~ 4523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.13628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Hitomi, Kubo Makoto, Kai Masaya, Yamada Mai, Kurata Kanako, Kawaji Hitomi, Kaneshiro Kazuhisa, Osako Tomofumi, Nishimura Reiki, Arima Nobuyuki, Okido Masayuki, Kishimoto Junji, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 176
2. 論文標題 T-bet+ lymphocytes infiltration as an independent better prognostic indicator for triple-negative breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 569 ~ 577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10549-019-05256-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurata Kanako, Kubo Makoto, Kai Masaya, Mori Hitomi, Kawaji Hitomi, Kaneshiro Kazuhisa, Yamada Mai, Nishimura Reiki, Osako Tomofumi, Arima Nobuyuki, Okido Masayuki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 27
2. 論文標題 Microsatellite instability in Japanese female patients with triple-negative breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 490 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-019-01043-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 久保真, 森崎隆史, 甲斐昌也, 梅林雅代, 島崎亜希子, 林早織, 原田由利菜, 川地眸, 金城和寿, 倉田加奈子, 森瞳美, 山田舞, 森崎隆, 中村雅史
2. 発表標題 乳癌におけるネオアンチゲン解析の有用性
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保真, 甲斐昌也, 山田舞, 中村雅史
2. 発表標題 Precision Oncology: 乳がんゲノムプロファイリングから見えてきたこと
3. 学会等名 第26回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保真, 川地眸, 甲斐昌也, 山田舞, 倉田加奈子, 森 瞳美, 金城和寿, 本山由利菜, 林早織, 島崎亜希子, 森崎隆史, 沖英次, 中村雅史
2. 発表標題 マルチプレックス遺伝子パネルFoundationOne CDxが変えるHER2陽性乳癌の周術期治療
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kurata K, Kubo M, Yuan Y, Harada Y, Morisaki T, Shimazaki A, Hayashi S, Kawaji H, Kaneshiro K, Yamada M, Kai M, Nakamura M
2. 発表標題 Tumor Mutational Burden in Japanese Patients with Triple Negative Breast Cancer
3. 学会等名 The 42nd San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaji H, Kubo M, Yamashita N, Harada Y, Shimazaki A, Hayashi S, Kurata K, Yamada M, Kaneshiro K, Kai M, Babe E, Oda Y, Nakamura M
2. 発表標題 A prospective evaluation of comprehensive tumor profiling using a targeted Next-generation sequencing for Japanese breast cancer patients
3. 学会等名 The 42nd San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada Y, Kubo M, Mori H, Kai M, Yamada M, Kurata K, Kawaji H, Kaneshiro K, Hayashi S, Shimazaki A, Morisaki T, Yamaguchi R, Arima N, Nishimura R, Okido M, Nakamura M
2. 発表標題 PD-L1 expression of tumor infiltrating immune cells has potential as a biomarker in triple-negative breast cancers
3. 学会等名 The 42nd San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森崎隆史、久保真、梅林雅代、吉村祥子、川地暉、倉田加奈子、金城和寿、森瞳、山田舞、林早織、本山由利菜、甲斐昌也、中村雅史、森崎隆
2. 発表標題 乳癌におけるネオアンチゲン解析の意義
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanako Kurata, Makoto Kubo, Hitomi Mori, Hitomi Kawaji, Yurina Motoyama, Lumi Kuroki, Mai Yamada, Kazuhisa Kaneshiro, Masaya Kai, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Microsatellite Instability in Triple Negative Breast Cancers
3. 学会等名 The 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitomi Mori, Makoto Kubo, Masaya Kai, Kanako Kurata, Hitomi Kawaji, Kazuhisa Kaneshiro, Yurina Motoyama, Rumi Kuroki, Mai Yamada, Reiki Nishimura, Masayuki Okido, Yoshinao Oda, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Transcription factor T-bet and PD-L1 expression in tumor microenvironment of triple-negative breast cancer
3. 学会等名 The 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院 臨床・腫瘍外科 研究室ホームページ http://www.surg1.med.kyushu-u.ac.jp/surg1/html/kenkyu/rinshou_kenkyu/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	甲斐 昌也 (KAI Masaya) (10755242)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	中村 雅史 (NAKAMURA Masafumi) (30372741)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大西 秀哉 (ONISHI Hideya) (30553276)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	水元 一博 (MIZUMOTO Kazuhiro) (90253418)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	森崎 隆 (MORISAKI Takashi) (90291517)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関