

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430148

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた腎がん固有抗原の同定と個別化がん免疫治療の開発

研究課題名(英文) Identification of unique antigens by next generation sequencing and development of individualized cancer immunotherapy in clear cell renal cell carcinoma

研究代表者

松下 博和 (Matsushita, Hirokazu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80597782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000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結合予測法を用いて、遺伝子変異由来の抗原(ネオアンチゲン)を同定するシステムを構築した。97症例の腎がんの解析において、ネオアンチゲンの数が多くHLAの発現が高い集団は予後が良好であり、腫瘍内にCD8、パーフォリン、グランザイムを高発現していた。しかし、腫瘍内ではCTLA-4、PD-1といった免疫チェックポイント分子の発現が高く、同時に免疫抑制を引き起こしていることが考えられた。将来、腎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、抗原同定システムを構築し、ネオアンチゲンの発現と腫瘍内の免疫シグネチャー、そして予後との関連を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established a method to identify neoantigens derived from tumor-specific mutations by combining next generation sequencing (NGS) with MHC class I binding algorithm. In 97 clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), we demonstrated that patients with high neoantigen load and HLA expression correlated with better clinical outcomes and also they expressed high CD8A, perforin and granzyme A. However, immunosuppressive molecules such as CTLA-4 and PD-1 were also highly expressed in the tumor, suggesting that abundant neoepitopes associated with greater antitumor effector immune responses were counterbalanced by a strongly immunosuppressive microenvironment. We have created the system predicting candidate neoantigens and showed that neoantigen load, antigen presentation machinery, and immune signatures determine prognosis in ccRCC. They are prerequisites for individualized cancer immunotherapy development in the patients.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：腎がん 次世代シーケンス 遺伝子変異 MHCクラスI結合予測法 免疫チェックポイント分子 ネオアンチゲン 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)。

(2) ヒトのがんの中で、腎がんはメラノーマと並んで免疫原性の高い腫瘍の一つである。メラノーマでいくつかの分化抗原やがん・精巢抗原 (CT 抗原) が同定されてきたのに対し、腎がんではがん抗原がほとんど同定されていない。今回の新しい方法で、腎がんの強い固有抗原が同定できれば、サイトカインと組み合わせた治療や、樹状細胞を利用した固有抗原特異的な免疫治療が可能になり、その治療効果が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、個々の腎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。手術で切除された腎がん組織を用いて、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、個々の腎がん患者に対する、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、正常組織に対して全エクソンシーケンス、全 RNA シークエンスを行った。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 $IC_{50} < 500$) を指標にして、固有抗原数を計算した。

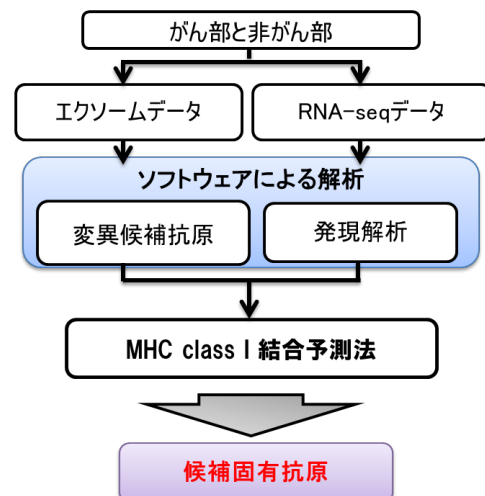
(2) すでにシーケンスの済んだ当院の腎がん症例 97 例の全エクソンシーケンスと全 RNA シークエンスのデータを用いて、患者の変異の数、さらに HLA に結合する親和性の高い候補ネオアンチゲン ($IC_{50} < 500$) の数をクラス I 結合予測アルゴリズムで決定した。また、全 RNA シークエンスのデータから、免疫関連分子の発現を解析し、予後との関連も検討した。

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膵がん組織計 5 例 PK001 ~ PK005 を用いた。全エクソームシーケンスにより 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 $IC_{50} < 500$) 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。ヒトのがん部・非がん部組織を使い、次世代シーケンスを用いた候補固有抗原同定システムを構築することができた (図 1)。

図 1



(2) 腎がん 97 症例の検討

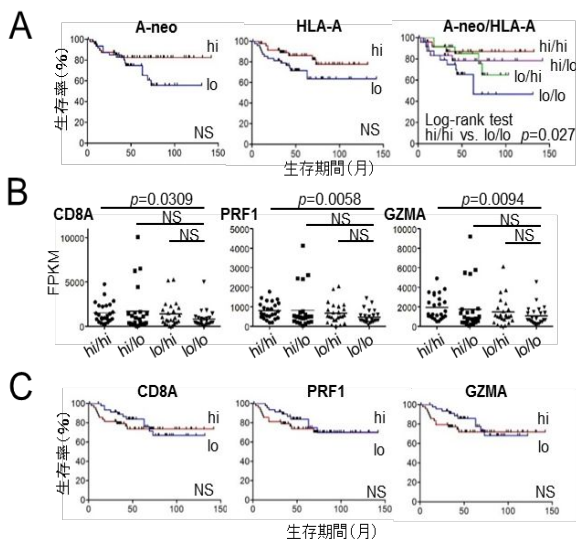
当院の腎がん症例 97 例の全エクソンシーケンスと全 RNA シーケンスのデータから、患者個々の変異の数、さらに HLA に結合する親和性の高い候補ネオアンチゲン ($IC_{50} < 500$) の数をクラス I 結合予測アルゴリズムで決定した。腫瘍特異的変異の数と予後との間に相関はなかったが、候補ネオアンチゲンの数を中央値で high, low に別け、さらに、全 RNA シーケンスのデータから HLA の発現を中央値で high, low に別け全生存期間を検討したところ、ネオアンチゲンの数が多く HLA の発現が高い集団は、ネオアンチゲンの数が少なく HLA の発現が低い集団に比べて全生存期間が延長する傾向があった (図 2A)。

また、ネオアンチゲンの数が多く HLA の発現が高い集団では、腫瘍内の CD8、パーフォリン、グランザイムの発現が高く、腫瘍内に強い抗腫瘍免疫応答が誘導されていた (図 2B)。これらの遺伝子発現と予後とに相関はなかったが (図 2C)、CTLA-4、PD-1 といった免疫チェックポイント分子の発現と相関しており (図 2D)、免疫抑制を引き起こしていることが考えられた。

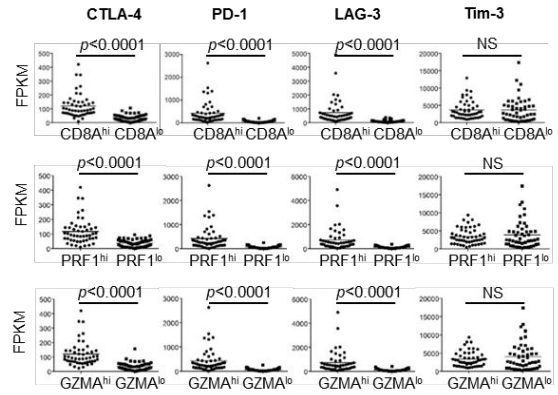
これらのデータは、腎がんにおいてネオアンチゲンに対する免疫応答が予後に関与している可能性を示しており、また、一部の腎がん患者が免疫チェックポイント阻害剤に感受性を示すという事実を裏付けている。以上の結果は、遺伝子変異由来のネオアンチゲンに対する T 細胞の免疫応答が、腫瘍の拒絶やコントロールに関与している可能性を示している。

本研究内容は Cancer Immunol Res. 2016 4(5): 463-71. に発表した。

図2



D



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11件)

1. Matsushita H, Sato Y, Karasaki T, Nakagawa T, Kume H, Ogawa S, Homma Y, Kakimi K. Neoantigen load, antigen presentation machinery, and immune signatures determine prognosis in clear cell renal cell carcinoma. Cancer Immunol Res. 2016 4(5): 463-71. 査読有
2. Karasaki T, Nagayama K, Kawashima M, Hiyama N, Murayama T, Kuwano H, Nitadori JI, Anraku M, Sato M, Miyai M, Hosoi A, Matsushita H, Kikugawa S, Matoba R, Ohara O, Kakimi K, Nakajima J. Identification of Individual Cancer-Specific Somatic Mutations for Neoantigen-Based Immunotherapy of Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2015 Dec 29;11(3):324-333. 査読有
3. Kakimi K, Karasaki T, Matsushita H, Sugie T. Advances in personalized cancer immunotherapy. Breast Cancer. 2016 Mar 21. [Epub ahead of print] 査読有
4. 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- γ -dependent cell-cycle arrest. Cancer Immunol Res. 2015 Jan;3(1):26-36. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0098. 査読有
5. 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
6. 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

7. 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
8. 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
9. 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
10. 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 α 9V β 2 T cells expressing the interleukin-2 receptor α -chain and the common γ -chain. *Cytotherapy*. 2013 Apr;15(4):481-91. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.12.004. 査読有

[学会発表](計16件)

1. Kazuhiro KAKIMI Toward personalized cancer immunotherapy International medical interface symposium (2016IBMI), 2016/3/4, Taipei City, Taiwan
2. Takahiro Karasaki, Kazuhiro Nagayama, Manami Miyai, Hirokazu Matsushita, Shingo Kikugawa, Ryo Matoba, Paul Horton, Osamu Ohara, Kazuhiro Kakimi, Jun Nakajima In silico prediction of neoantigen for lung cancer targeting shared somatic mutations 第19回日本がん免疫学会総会 (ICCIM2015) 2015/7/9、東京都文京区
3. Akihiro Hosoi, Manami Miyai, Tamaki Iino, Hirokazu Matsushita, Shingo Kikugawa, Paul Horton, Osamu Ohara, Kazuhiro Kakimi Immunogenicity and cross-reactivity of tumor-specific mutated-antigens (neoantigens) identified by MHC-binding prediction 第19回日

本がん免疫学会総会 (ICCIM2015) 2015/7/9、東京都文京区

4. Kosuke Odaira, Hirokazu Matsushita, Ikuo Wada, Yasuyuki Seto, Nao Fujieda, Yukari Kobayashi, Kazuhiro Kakimi Expression of immune-checkpoint molecules on tumor infiltrating lymphocytes in patients with gastric cancer 第19回日本がん免疫学会総会 (ICCIM2015) 2015/7/9、東京都文京区
5. Hirokazu Matsushita, Manami Miyai, Yusuke Sato, Tohru Nakagawa, Haruki Kume, Seishi Ogawa, Yukio Homma, Kazuhiro Kakimi Expression of candidate neoantigens in ccRCC patients and its implication on prognosis 第19回日本がん免疫学会総会 (ICCIM2015) 2015/7/9、東京都文京区
6. 垣見和宏 腫瘍特異的遺伝子変異抗原 (Neo-antigen) を標的としたがん免疫治療とモニタリング 第13回日本臨床腫瘍学会学術集会、2015/7/16、北海道札幌市
7. 大平公亮、松下博和、瀬戸泰之、垣見和宏 胃癌患者における腫瘍浸潤リンパ球の免疫チェックポイント分子の発現、第74回日本癌学会学術集会、2015/10/8、愛知県名古屋市
8. 松下博和、垣見和宏 新生抗原をターゲットにしたがん免疫治療法の開発 第13回日本免疫治療学研究会学術集会、2016/2/27、東京都文京区
9. 大平公亮、和田郁雄、藤枝奈緒、小林由香利、泉謙道、高橋卓也、木村真之介、松下博和、瀬戸泰之、垣見和宏 胃癌患者における腫瘍浸潤T細胞の免疫チェックポイントの発現 第13回日本免疫治療学研究会学術集会、2016/2/27、東京都文京区
10. 垣見和宏 腫瘍特異的遺伝子変異抗原 (Neoantigen) を標的としたがん免疫治療 第15回日本再生医療学会総会、2016/3/18、大阪府大阪市
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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

15 . 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_H 9V_H 2 T 細胞 第 73 回日本癌学会学術集会、2014/9/27、神奈川県横浜市

16 . 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 2 件)

1. 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
2. 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 免疫細胞治療学講座

http://immunoth.umin.jp/result/index_03.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 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

(3) 研究分担者

久米春喜 (KUME, Haruki)
東京大学・医学部附属病院・登録研究員
研究者番号：20569834