

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 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：25462014

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた胃がんミュータノーム解析と個別化がんワクチンの開発

研究課題名(英文)Mutanome analyses by next generation sequencing and individualized cancer vaccine development in gastric cancer

研究代表者

和田 郁雄 (Wada, Ikuo)

東京大学・医学部附属病院・届出診療医

研究者番号：80401082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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、遺伝子変異由来の候補固有抗原を同定するシステムをマウスの胃がんモデルで構築した。これまで29例の胃がん手術組織検体とそのペアーとなる末梢血単核球(PBMC)を採取し保存した。10例で腫瘍浸潤リンパ球(TIL)における免疫チェックポイント分子の発現及び腫瘍内の制御性T細胞の浸潤を解析し、胃がんの腫瘍局所の免疫抑制環境を検討した。また、3例で自己腫瘍に特異的に反応するTILを培養することが可能であった。将来の個別化がん免疫治療の準備段階として、固有抗原同定システムを構築し、胃がんの固有抗原同定に向けた胃がん組織検体を採取できた。

研究成果の概要(英文)：We established the method to identify unique antigens from cancer specific mutations using murine gastric cancer model by combining next generation sequencing with MHC class I binding algorithm. We obtained cancer tissues and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 29 gastric cancer patients. We analyzed the expression of immune checkpoint molecules and the infiltration of regulatory T cells (Tregs) to understand the immune suppressive tumor microenvironment in 10 patients. We successfully cultured tumor infiltrating lymphocytes (TILs) specifically recognizing autologous tumor cells from 3 patients. We created the system predicting candidate unique antigens and obtained promising samples including cancer tissues and TILs, which are a prerequisite for individualized cancer immunotherapy development in gastric cancer patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃がん 次世代シーケンス 遺伝子変異 MHCクラスI結合予測法 固有抗原 TIL 個別化がん免疫治療

1. 研究開始当初の背景

個々のがんの遺伝子異常に基づく固有抗原の存在は、化学発癌剤誘発マウス肉腫を用いた移植実験により初めて示された(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)、簡単に同定する方法がなかったため固有抗原を用いた免疫治療は実現しなかった。一方で、cDNA expression cloning 法、SEREX 法などから多くの分化抗原、過剰発現に伴う抗原、がん・精巢抗原(CT 抗原)などの共通抗原が同定され、これらの共通抗原を用いた免疫治療がヒトに応用されてきた。

胃がんにおいても、様々な共通抗原をターゲットとした免疫療法が臨床応用されてきた。しかし、例えば、最も有望とされる CT 抗原 NY-ESO-1 や MAGE-A4 などは胃がんでは発現しているものの、その発現頻度は低く臨床応用は限られていた。したがって胃がんには発現する強い固有抗原を含めたがん抗原の同定が必要である。最近、22 例の胃がん組織のエクソームシーケンス解析で平均 114 個のミスセンス変異が認められた(Wang et al. Nat. Genetics. 12:19-23, 2011)。また他の報告では 15 例の胃がん組織から平均約 50 個のミスセンス変異が同定された(Zang et al. Nat. Genetics. 5:70-4, 2012)。しかし、これらの遺伝子異常由来の固有抗原の解析は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、個々の胃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。手術で切除された胃がん組織を用いて、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。この方法を用いた抗原の同定システムを発展させて、個々の胃がん患者に対する、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) 全エクソンシーケンス、全 RNA シーケンス解析

がん組織、正常組織より DNA, RNA を調製した。DNA を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、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。

(2) MHC クラス I 結合予測

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 IC50<500) を指標にして、固有抗原数を計算した

(3) 腫瘍局所の抑制性因子の解析

腫瘍浸潤リンパ球(CD4T 及び CD8T 陽性細胞)における免疫チェックポイント分子 (PD-1、Tim-3、LAG3、BTLA) の発現をフローサイトメトリーで解析し PBMC におけるその発現と比較した。また同様に、CD4T 細胞のうち、CD45RA-FOXP3high の強い免疫抑制活性をもつエフェクター型 Treg、抗原刺激によりエフェクター型 Treg となる CD45RA+FOXP3low のナイーブ型 Treg に分類し、それぞれの頻度を腫瘍局所と PBMC で比較した。

(4) 腫瘍特異的免疫反応の検出

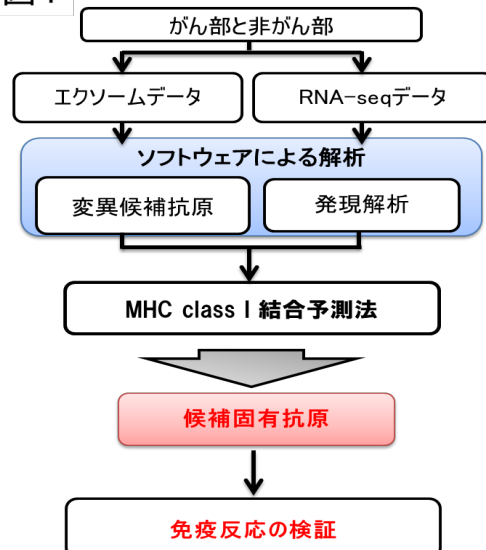
手術によって得られた胃がん組織に対して物理処理、酵素処理を行い TIL、腫瘍細胞を含む細胞集団を採取した。TIL はさらに高濃度の IL-2 で培養した。培養後の TIL の腫瘍特異性を、TIL のみ、または TIL と腫瘍細胞を共培養した時の IFN- γ 産生で検討した。

4. 研究成果

(1) 固有抗原同定システムの構築

ヒトの検体を扱う前に、まず、マウスの胃がん細胞株を用いて本研究の抗原同定システムの検証実験を行った。胃がん細胞株と C57BL/6 マウスの正常腺胃から DNA を抽出し、全エクソームシーケンスを実施した。胃がん

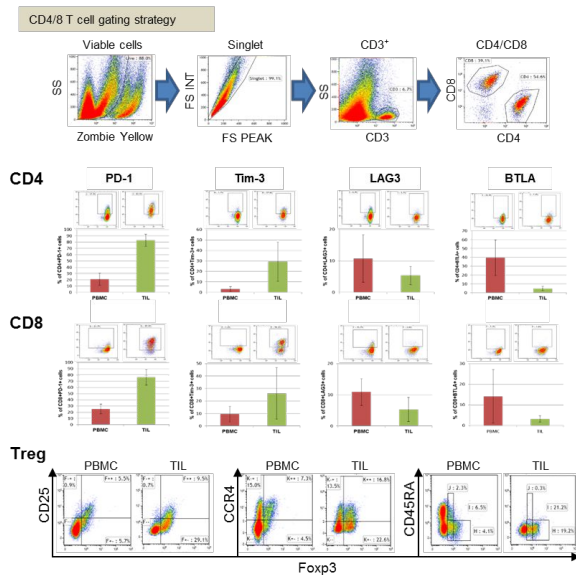
図 1



細胞と正常細胞を比較することで腫瘍特異的なミスセンス変異を同定し、さらにRNAシーケンスのデータで発現を認めるミスセンス変異由来の固有抗原をMHCクラスI結合予測法で予測した。胃がんを拒絶したC57BL/6マウス脾細胞から樹立した細胞傷害性T細胞(CTL)が、予測した抗原を認識し反応するかを検証し固有抗原を同定した。このように、マウスモデルにおいて、次世代シーケンスとMHCクラスI結合予測アルゴリズムでマウスの固有抗原を予測することが可能であった。さらに、予測した抗原が実際に免疫反応を起こしていることを検証することが可能であった(図1)。

東京大学医学部遺伝子解析研究倫理審査委員会と墨東病院倫理委員会において、「個々のがんの遺伝子変異に基づく固有抗原の同定と腫瘍内微小環境の解析に基づく免疫制御法を組み合わせた個別化がんワクチン治療の開発」の承認を得てから、胃がん患者の検体を採取し保存した。

図2



(2) 胃がん局所の免疫抑制環境の検討

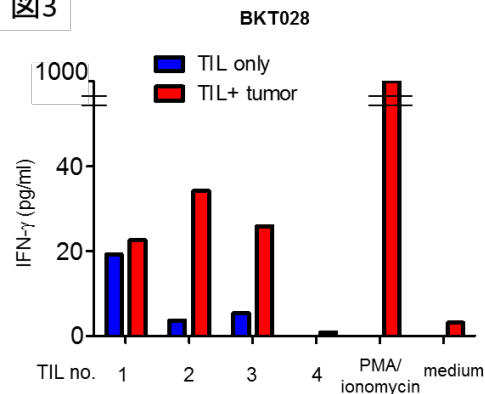
胃がん患者の検体を採取し、25例のがん部と非がん部の組織と末梢血を採取した。また29例中19例で腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を凍結保存し、10例でTILにおける免疫チェックポイント分子(PD-1, Tim-3, LAG-3, BTLAなど)の発現及び、腫瘍中の制御性T細胞の浸潤を検討した。免疫チェックポイント分子の発現は、PD-1、Tim-3では、PBMCに比べTILで高い傾向を示した(図2)。制御性T細胞においても、CD45RA-Foxp3^{high}のエフェクター型TregはPBMCよりもTILで高い傾向を示した。胃がんの腫瘍局所での免疫抑制環境を把握できた。

(3) 腫瘍特異的TILの同定

TILの腫瘍特異性をIFN- γ 産生で検討したところ、3例で自己の腫瘍に特異的に反応するTILを同定することが可能であった(図3、

代表症例 BKT028)。マウスで構築した固有抗原の同定システムを利用してヒトの胃がんから抗原を同定できる3例の候補が選別できた。つまり、保存してある自己のTILを用いて予測した抗原に対する免疫反応を検証することが可能な症例である。

図3



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. 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
2. 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 Mar 15. [Epub ahead of print] 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. 長岡孝治、垣見和宏【胃癌の診療】胃癌の診療 胃癌に対する免疫治療(解説/特集)臨床消化器内科 (0911-601X)30 巻 7 号 Page907-911(2015.05) 査読無
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
- 1 2 . 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
 - 1 3 . 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
 - 1 4 . 垣見和宏、柴川伸吾、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、中山春一 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
 - 1 5 . 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
 - 1 6 . 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 胃食道外科

<http://today3ge.umin.jp/>

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

和田郁雄 (WADA, Ikuo)

東京大学・医学部附属病院・届出診療医

研究者番号：80401082

(2)研究分担者

瀬戸泰之 (SETO Yasuyuki)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00260498

(3)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

(4)研究分担者

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