

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461448

研究課題名(和文) 網羅的なゲノム解析によるテラーメイド腫瘍抗原の同定

研究課題名(英文) Identification of cancer-related antigen based on next-generation sequencing data

研究代表者

近藤 英生 (Kondo, Eisei)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：30379747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍における体細胞遺伝子変異のうちアミノ酸置換を伴うものは、非自己として細胞傷害性T細胞(CTL)に認識されるため、腫瘍関連抗原となり得る。以前より我々が開発しているCD40活性化B細胞を用いる方法は、10-20mlと少量の血液より抗原提示細胞とCTLの双方を樹立可能であるため、急性骨髄性白血病の治療として同種造血幹細胞移植を行った症例を対象として、これら変異に基づく抗原の同定を試みた。計2例より文書同意を得て研究を行ったが、FLT3 Y572C変異を認めた症例ではT細胞の反応が確認できず、またもう1例では対象の変異を絞り込むことができず、同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Cancer-related missense somatic mutations (so-called neoantigens) can be recognized by cytotoxic T-cell as non-self tumor antigens. We have been reported that CD40-activated B cells are efficient antigen presenting cells and can be generated from small amount of peripheral blood. We aimed to identify acute myeloid leukemia associated neo-antigens from patients treated with allogeneic stem cell transplantation. We have assessed CD8+ T cell response against neoantigen candidates from two patients with written informed consent, but failed to detect it.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 CTL CD40-B 白血病

1. 研究開始当初の背景

**テラーメイド抗原としての腫瘍体細胞遺伝子変異**

次世代シーケンス技術の進化によって、短期間で各個人やそれぞれの腫瘍細胞の全ゲノムを解析することが可能となるとともに、劇的に費用も低下し、1000 ドルゲノム時代目前となった。2008年にLeyらにより急性骨髄性白血病(AML)患者の全ゲノムシーケンス解析が報告(Ley, T. J., et al.: Nature, 456: 66-72, 2008)されて以来、がんの全ゲノム解析報告は爆発的に増加し、複数の患者で共通に見つかった体細胞遺伝子変異の解析から、新たな疾患関連遺伝子や標的遺伝子が同定され、病因の解明や治療法の開発につながっている。腫瘍における体細胞遺伝子変異のうちアミノ酸置換を伴うものは、このアミノ酸置換を含むペプチド断片がヒト主要組織適合抗原(HLA)クラスIに提示された場合、非自己としてCTLに認識され得るため、腫瘍関連抗原としての一面もある。一般的に、体細胞遺伝子変異が分子標的薬の標的遺伝子となるには、driver mutationとしての機能を持つこと及び複数の患者に共通に認められることが必要であるが、CTLの標的となるには機能は問題でなく(driver mutationでなくても良い)また一人の患者にしかみられない変異であっても、その患者においてはCTLの標的として有用である可能性がある。したがって、次世代シーケンス技術によって、患者一人一人の体細胞遺伝子変異解析が可能となったことは、それぞれ個別の腫瘍関連抗原カタログを作成できるようになったとも言える。体細胞遺伝子変異に基づく抗原は、腫瘍関連抗原の分類としては、BCR-ABLキメラ蛋白などと同じく腫瘍のみに発現される「変異に基づく抗原」となる(表1)。癌生殖系列抗原などは転写因子AIREの働きにより胸腺髄質上皮細胞に発現され(Gotter et al. J. Exp. Med. 199: 155-166, 2004)、抗原特異的Tリンパ球は負の選択を受け得るのに対し、腫瘍限定抗原は胸腺で発現されないため負の選択を受けず、avidityの高いリンパ球が末梢に存在し、より高い抗腫瘍効果が期待できる。

BCR-ABLやBRAF V600Eの変異部分など、複数の患者に共通にみられる体細胞遺伝子変異に由来するペプチドがCTLの標的となるとの報告はあるが、本研究のように、患者のもつすべての体細胞遺伝子変異を対象としCTLの反応性を確認する研究は現在までに報告がない。また、多くの腫瘍免疫の研究はA24、A2など頻度の高いHLAのみを対象としているが、免疫学的に優れた効果があることはHLAの頻度が高いことと同義ではない。ある患者において、真に優れた効果を発揮する抗原を同定するには、HLAクラスI(HLA-A,-B,-C、最大6種類)すべて

を対象とする必要がある。したがって、汎用性のある既成品としての開発は不可能であり、ひとりひとりの腫瘍の変異、HLAに合わせた解析が必須となる。

表1. 腫瘍抗原の分類

分類	他の正常細胞での発現	胸腺での発現	例
<b>変異に基づく抗原</b>	なし	なし	BCR-ABL, BRAF変異, p53変異
<b>癌生殖系列抗原</b>	精巣、卵巣	あり	MAGE3, NY-ESO-1
<b>分化抗原</b>	腫瘍と同系列の正常細胞	あり	MART-1, gp100
<b>過剰発現抗原</b>	多種の正常細胞	あり	WT1, Her2/Neu, MUC1

**白血病における体細胞遺伝子変異数**

Alexandrovらは、7,042の腫瘍検体を解析し、約500万ヶ所の体細胞遺伝子変異を同定し、その特性を報告している(Alexandrov LB et al. Nature 500, 415-421, 2013)。肺がん、悪性黒色腫など、変異原(たばこ、紫外線)と発癌の関連が深い腫瘍では、1メガベースあたり平均10個と体細胞遺伝子変異を多数認めるが、小児がんや白血病などでは1メガベースあたり平均0.1-1.0個と少ない。また、急性骨髄性白血病(AML)に関する他の報告では、体細胞点突然変異の数は平均20個/ゲノム(コーディング領域では平均1.4個)であり、転座、挿入、欠失は、2ヶ所/ゲノムであったとされている。(Welch J.S., et al.: Cell, 150: 264-78, 2012; 図1)

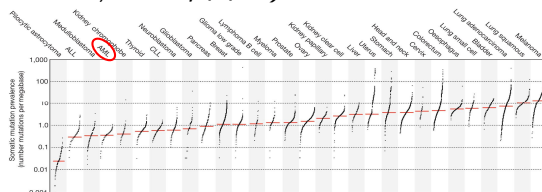


図1. 各腫瘍での体細胞遺伝子変異数

**現在行われている腫瘍免疫療法の課題**

免疫を用いた腫瘍に対する治療として、造血器腫瘍では同種造血幹細胞移植療法が長年行われており、固形がんでは抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体など負の補助刺激受容体を阻害する治療(Pardoll, D.M., et al.: Nat Rev Cancer, 12: 252-264, 2012)が急速に進歩している。同種造血幹細胞移植療法では移植片対白血病(Graft versus Leukemia; GVL)効果によって、白血病を傷害すると考えられているが、合併症である移植片対宿主病(Graft versus Host disease; GVHD)との分離が課題であり、未だ実現していない。腫瘍体細胞遺伝子変異に基づく抗原は、腫瘍のみに発現するため、

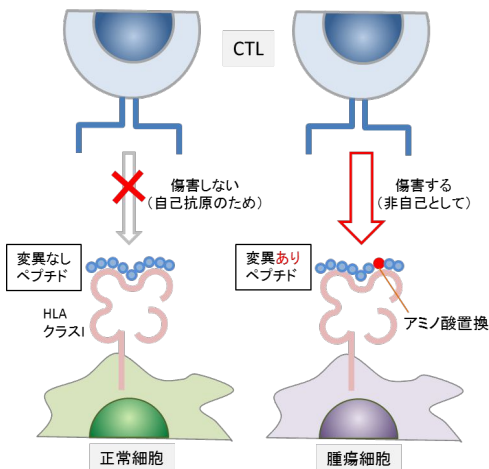


図2. 体細胞遺伝子変異ペプチドのT細胞による認識

他の同種抗原とは異なり GVHD の原因とならないと考えられる。また、負の補助刺激受容体は T リンパ球上に発現しており、免疫の“ブレーキ”として機能しているが、抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体など負の補助刺激受容体を阻害する治療は、“ブレーキ”を解除し、抗腫瘍免疫を高める効果がある。しかし、ブレーキを外すことによって、非特異的に免疫が高まるため、重篤な下痢など自己免疫反応による有害事象が起こる可能性がある。さらなる腫瘍免疫療法の発展には、ブレーキを緩めるとともに、正しい方向にハンドルをきる（免疫が攻撃する方向を制御する）ことが必要であり、腫瘍体細胞遺伝子変異に基づく抗原はその良い候補と考えられる。

## 2. 研究の目的

次世代シーケンス技術の進化によって、各患者の腫瘍細胞における体細胞遺伝子変異を網羅的に解析することが可能となった。これらの変異のうちアミノ酸置換を伴うものは、自己体内には存在しない非自己の抗原であるため、HLA クラス I のいずれかに提示され、細胞傷害性 T 細胞(CTL)の標的となり得る。腫瘍における体細胞遺伝子変異の総数が 10 個程度と少ない急性骨髄性白血病を対象とし、免疫による抗腫瘍効果が確立している同種造血幹細胞移植において、移植後の患者リンパ球の白血病体細胞遺伝子変異に由来するエピトープの認識を解析する。なお、HLA については、患者のもつすべての HLA クラス I を対象とする。本研究の成果は、同種造血幹細胞移植における腫瘍特異的ドナーリンパ球輸注や固形がん患者も含めたテララーメイド腫瘍免疫療法の開発の基礎となる。

## 3. 研究の方法

「網羅的なゲノム解析によるテララーメイド腫瘍抗原の同定」(2014/10/28 当院倫理委員会 承認)の同意説明文書にもとづき、急性骨髄性白血病にて同種造血幹細胞移植

を行った患者に説明と同意を実施。文書による同意を得た後、血液を採取し、末梢血単核球を分離後、凍結保存した。

1) 白血病細胞から DNA を抽出し、網羅的遺伝子解析(ターゲットシーケンス、全エクソン解析)を行う。白血病細胞で得られた体細胞遺伝子変異のうち、正常検体で認められないものを体細胞遺伝子変異とする。これら遺伝子変異のうちミスセンス変異を抽出し、ミスセンス変異を含むアミノ酸(20AA程度)を発現するベクターを作成する。

2) 末梢血単核球より CD40 活性化( CD40-B )細胞樹立し、抗原提示細胞として用いる。この CD40-B 細胞に In vitro transcription 法にて作成したテララーメイド抗原発現 mRNA を導入、または 293T 細胞に HLA 発現ベクターおよびテララーメイド抗原発現ベクターを導入し IFN- ELISPOT 法の標的細胞として用いることで、移植後末梢血中リンパ球の反応性を確認する。反応がみられた検体では、CD8+T 細胞を繰り返し刺激することによって、テララーメイド抗原特異的 CTL 樹立する。樹立された CTL 株の HLA 拘束性を IFN- ELISPOT 法、Europeum release assay、CD107 mobilization assay 法にて解析し、Linear expression fragment(図3)、合成ペプチドなどを用いて、エピトープを同定する。HLA のうち、理研バイオリソースセンターに発現プラスミドが寄託されていない HLA 型に関してはクローニングし、HLA 発現ベクターを作成する。

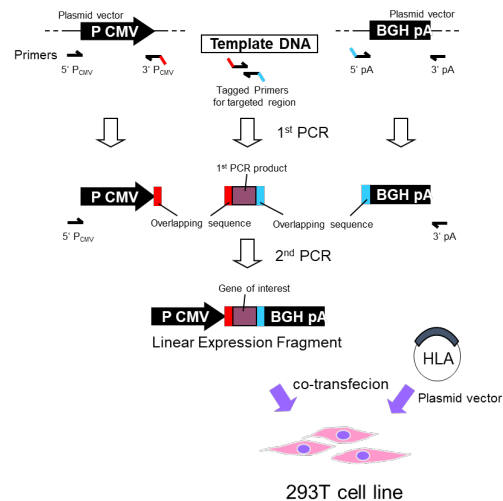


図3. Linear expression fragment 模式図

3) 得られた CTL の一部は、限界希釈法によって、CTL クローンとし、IFN- ELISPOT 法、Europeum release assay、CD107 mobilization assay、Peptide titration assay で解析する。また、樹立した CD40-B 細胞の一部は、EBV ウイルスを感染させ、EBV 形質転換リンパ芽球様細胞を(EBV - LCL)樹立する。

## 4. 研究成果

急性骨髄性白血病にて同種造血幹細胞移植



を行った患者 2 例より文書同意を得て研究を行った。

症例#1 急性骨髄性白血病 t(8;21)(q22;q22) 第 2 寛解期に非血縁骨髄移植施行し、5 年間再発なし。慢性 GVHD は認めず、免疫抑制剤終了。HLA クラス I (A\*02:06/31:01,B\*35:01/51:01,C\*03:03/14:02)

初診時白血病細胞 DNA を Illumina 社の Myeloid Panel で解析した結果、FLT3 Y572C 変異、BCORL1 A581T を検出した。BCORL1 A581T dbSNP ID:rs188957722 で登録あり、SNP と解釈した。

FLT3 Y572C 変異および前後 9 アミノ酸を含むペプチドのプロテアソーム切断予測を NetChop3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>)を行ったところ、下図の s の部位が切断部位として予想された。

```
FLT3_563-Y572C-581 CHKYKKQFRCESQLQMVQV
                ..SS.S.....S.S..S
```

HLA 発現ベクターはすべて作成済のものが利用可能であった。FLT3\_563-Y572C-581 をコードする mRNA を患者血液より樹立した CD40-B 細胞に Transfect し、IFN- ELISPOT 法にて CD8+T 細胞の反応性を確認したが、スポットは見られなかった。また、293T 細胞にそれぞれの HLA 発現ベクターおよび FLT3\_563-Y572C-581 の Linear expression fragment をトランスフェクトし、同じく標的細胞として IFN- ELISPOT 法にて CD8+T 細胞の反応性を確認したが、こちらもスポットは見られなかった。

症例#2 急性骨髄性白血病

t(7;11)(p15;p15) 第 2 寛解期に血縁一致同種末梢血幹細胞移植施行するも再発し、血縁半合致同種末梢血幹細胞移植施行 3 年間再発なし。皮膚慢性 GVHD あり、免疫抑制剤 (FK506+PSL) 継続中。

HLA クラス I データ

患者(A\*26:01/31:01,B\*13:01/51:01,C\*03:04/07:02)

ドナー(A\*11:01/31:01,B\*13:01/67:01,C\*07:02/-) 下線は合致する HLA

初回移植後再発時の白血病細胞より DNA を抽出し、エクソーム解析 (SureSelectXT Human All Exon V6、111Umina HiSeq) を行った。コーディング領域内のミスセンス変異のうち、dbSNP の登録がなく、検出頻度<20%のものに絞ったところ 89 変異 (42 遺伝子) が残った。患者由来 CD40-B 細胞および HLA 発現ベクターを作成したが、変異数が想定より多く検出され、10 程度に絞るのは困難であったため、CD8+T 細胞の反応確認は行わなかった。

今後、CD40-B 細胞への抗原添加法を改良することで、CD40-B 細胞を用いた抗原特異的 T 細胞検出法の改善をはかるとともに、網羅的

遺伝子解析より得られた遺伝子変異より腫瘍抗原候補を選択するアルゴリズムの確立をはかることで、腫瘍免疫の実態を確認し得る手段、およびそのワクチン等による増強法を実現していきたい。

## 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 3 件)

Becker HJ, Kondo E, Shimabukuro-Vornhagen A, von Bergwelt-Baildon MS. Processing and MHC class II presentation of exogenous soluble antigen involving a proteasome-dependent cytosolic pathway in CD40-activated B cells. Eur J Haematol. 査読有, 97(2), 2016.166-174. DOI: 10.1111/ejh.12699

Kondo E. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J Clin Exp Hematop. 査読有, 56(2), 2016, 100-108 DOI: 10.3960/jslirt.56.100

近藤英生, 前田嘉信: 同種造血幹細胞移植と免疫チェックポイント阻害薬. 臨床血液、査読有、58 巻 5 号、2017、506-513 DOI: 10.11406/rinketsu.58.506

[学会発表](計 1 件)

E. Kondo, K. Yamamoto, T. Masunari, J. Takizawa, Y. Masaki, K. Miura, T. Matsumura, Y. Hiramatsu, J. Murakami, H. Tsujimura, N. Tomita, Y. Maeda, M. Kanno Final results of a phase II trial of R-IDEA as salvage therapy in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma ESMO 2016 Congress 2016/10/8

[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

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 英生 (KONDO, Eisei)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号: 30379747

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし