

がんゲノミクスによる腫瘍抗原とT細胞受容体解析から 腫瘍免疫をイメージする

糸井充穂¹⁾, 井上亮太郎¹⁾, 山口裕美²⁾, 江角真理子²⁾, 大荷澄江³⁾, 杉谷雅彦³⁾

Imaging of tumor immunology based on genomics-derived tumor neoantigen and tumor-associated antigen TCR repertoire

Miho ITOI¹⁾, Ryotaro INOUE¹⁾, Hiromi YAMAGUCHI²⁾,
Mariko ESUMI²⁾, Sumie OHNI³⁾, Masahiko SUGITANI³⁾

要旨

「非自己」として提示された腫瘍抗原(neoantigen)と、これを認識する腫瘍特異的T細胞の同定・特定は、がん免疫応答を利用した治療法に極めて重要である。我々は大腸癌組織の病理診断用ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた全エキソーム解析から大腸癌の抗原エピトープを予測した。また、同試料の癌部(リンパ球浸潤部位も含む)、非癌部及び周辺リンパ節から抽出したDNAを用い、癌部との距離を反映させたT細胞受容体多様性(レパトア)解析を行い、腫瘍特異的T細胞CDR3β配列を予測した。

1. はじめに

近年数々の免疫抑制分子が明らかとなり、腫瘍免疫が成立していることがわかってきた。これらの分子の阻害を解除する治療法や腫瘍抗原(neoantigen)を用いた腫瘍ワクチン、腫瘍特異的T細胞を用いた免疫賦活化治療が注目されている。癌の遺伝子変異は50-100個と数が多く、これらアミノ酸置換を伴う腫瘍特異的遺伝子変異がneoantigen候補となる。しかし、実際にどの体細胞変異ペプチドが非自己としてそのヒトのもつ主要組織適合遺伝子複合体(MHC, ヒトの場合にはHLA)に提示され腫瘍抗原として働くか、を明らかにするのは困難であった。最近NGSデータを用いたHLA遺伝子座位領域の解析やHLA-neoantigen候補の親和性解析が確立し、情報学的な手法の発達により、腫瘍特異的細胞傷害性(CD8⁺)T細胞エピトープ、neoantigen候補の同定ができるようになった¹⁾。さらにT細胞受容体(TCR)の遺伝子の多様性解析(レパトア解析)では、シーケンズデータからT細胞の多様性を定量化でき、病理組織の場所によってclonal expansionした

TCR CDR (complementary determining region) 3β配列が腫瘍との関連で見つかり、腫瘍抗原に応答する特異的T細胞受容体のCDR3βを同定できる。腫瘍特異的遺伝子変異が多い(=neoantigenの種類が多い)がんほど、腫瘍免疫の誘導は高いと考えられ、このレパトア解析は最近注目を集めた新しい手法である^{2), 3)}。これらの解析法はがん免疫プロファイリングとして、がんの種類及び個々の免疫学的特性を理解する手立てとして注目されている。

大腸癌組織における免疫イメージングを試みるには、大腸癌腫瘍抗原を決定する必要がある、免疫ゲノムプロファイリングが必須である。我々は大腸がんの腫瘍抗原候補を確定するため、大腸組織の非癌部及び癌部からDNAを採取し、全エキソーム解析の結果をもとに抗原エピトープを予測した。さらに、TCRレパトア解析は、従来の冷凍癌組織を用いる方法とは異なり、高い精度のレパトア解析が可能となるよう、薄切切片から癌部のみを採取し、癌部に高頻度で出現するT細胞受容体のCDR3β配列を特定した。

1) 日本大学医学部一般教育学系物理学分野

2) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野

3) 日本大学医学部病態病理学系形態機能病理学分野

糸井充穂: itoi.miho@nihon-u.ac.jp

2. 対象及び方法

大腸組織の病理診断用ホルマリン固定パラフィン包埋組織から癌組織と非癌部組織をマクロダイセクションし、そのDNAを抽出して全エキソーム解析を行なった (SureSelect XT Human All Exon, HiSeq2500)。高頻度の腫瘍特異的遺伝子変異から、neoantigen候補を選定する。また、HLA配列の生データからHLA遺伝子型決定 (タイピング) をHLA-VBSeq (c) 2015, Tohoku University) を用いて解析した⁴⁾。また、NetMHCpanを用い、決定したHLAタイプに対し、変異でMHCクラスIと結合し親和性が上昇する9merの変異ペプチドを見つけ、neoantigen候補を割り出した⁵⁾。一方、腸管傍リンパ節 (201)・中間リンパ節 (202) から同病理診断用ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いてDNAを抽出し、上記癌組織、非癌部組織DNAとともに、TCR-CDR3β領域のレパトア解析を行なった (iRepertoire-HTBI-vj)。

3. 結果および考察

全エキソーム解析により、癌部DNAにおいて見られた体細胞ミスセンス変異は1291個であった。そのうち変異頻度0.1以上の変異遺伝子115個から、腸管で発現している遺伝子をpick upし、52個がネオアンチゲン候補を生み出す変異遺伝子であるとした。また、HLA領域のリードから、本検体のHLAのハプロタイプは (A*31:01:02, A*24:03:01), (B*40:01:02, B*15:01:01:01), (C*15:02:01, C*04:01:01:01) であった。

クラスIのHLAに提示される9merの抗原のうち、野生型 (wild) のペプチドが癌による変異 (mutant) によってHLAとの親和性が強くなると、そのペプチドがneoantigenになる可能性が高い。親和解析の結果、癌による変異で親和性が上昇したペプチドの種類は84種類であり、その中で親和性が著しく上昇したペプチドはHLA-A31:01に提示されるGNISVQILR (wild: GNISVQILG, Gene: FAT4) 及びSCYNCGVSR (wild: SCYNCGVSG, Gene: ZC-CHC2) であった。

癌部・非癌部及びリンパ節201及び202の4箇所について、TCRレパトアは以下のように観測された。uniqueなTCR CDR3β配列数/Read数は、癌部525/14935 (3.5%), 非癌部959/41509 (2.3%) である。

また、201/202リンパ節ではそれぞれ2175/87672 (2.5%), 2210/67952 (3.3%) であった。TCRβ鎖はV (可変) 遺伝子断片52種類, D (多様性) 遺伝子断片2種類, J (結合) 遺伝子断片13種類の組み合わせで多様性が生み出される。全ての箇所を高頻度に観測されたCDR3βのV断片は、V27, V20-1, V6-3, V6-1, J断片はJ2-2, J2-3, J2-5, J2-7であった。

癌部浸潤リンパ球のみで観測されたCDR3β配列の個数は、433であった。癌部浸潤T細胞の多様性 (3.5%) と癌特異性 (82%) が示唆された。この中にclonal expansionした腫瘍特異的T細胞が含まれていると予想される。特に高頻度で観測されたCDR3βアミノ酸配列は、ASSHGHLETQY, ASSLSYWVLEQF, ASRLNGLASFDTQY, ASPGGPQRDTQY, ASSLRG-ANYGYT, ASSYQGGGANVLTであった。

201と202リンパ節のみに共通にみられるCDR3β配列の個数はたった14であった。またすべて4箇所観測された共通のCDR3β配列を持つT細胞の種類は14で、非癌部では観測されずリンパ節と癌部で観測されるCDR3β配列はASSLRGGAGNTQY, ASSPGTGRYEQY, ASSPARQETQY, ASSATGTSNYEQY, SARFGGRTGELF, ASKSRAGGLAAYNEQF, ASKY-GRGIHKNEQF, ASSVEGPGSGELFの8種類であった。このように、腫瘍特異的T細胞受容体のCDR3β配列を提示することができたが、レパトア解析で上げられるT細胞受容体配列にはCD4⁺やBystander T⁶⁾や制御性T細胞も含まれている。癌部浸潤リンパ球における細胞障害性T細胞を定量化するためには、CD8のほか、CD39, CD25などの多重染色が必要となるだろう。また、腫瘍特異的CD8⁺T細胞が実際エピトープ予測したneoantigen候補と反応するかどうかは、テトラマーMHC-peptide (neoantigen候補) 及びCD8⁺T細胞を用いたアッセイやBiacoreを用いたTCR-p-MHCのアフィニティー測定が必須であり、これらは今後の課題である。

文 献

- 1) H. Hackl, P. Charoentong, F. Finotello & Z. Trajanoski. *Nature Reviews*. 2016, 17, 441-458.
- 2) B. Li, T. Li, J. Pignon, B. Wang, J. Wang, S. A. Shukla, R. Dou, Q. Chen, F. S. Hodi, T. K. Choueiri, C. Wu, N. Hacohen, S. Signoretti, J. S. Liu, X. S. Liu. *Nature Genetics*. 2016, 48, 725-732.
- 3) J. J. A. Calis, B. R. Roseberg. *Trends in Immunology*. 2014, 35, 581-590.

- 4) N. Nariai, K. Kojima, S. Saito, T. Mimori, Y. Sato, Y. Kawai, Y. Yamaguchi-Kabata, J. Yasuda, M. Nagasaki. *BMC Genomics*. **2015**, 16 (Suppl 2) :S7
- 5) V. Jurtz, S. Paul, M. Andreatta, P. Marcatili, B. Peters, M. Nielsen. *The Journal of Immunology*. **2017**, 199, 3360-3368.
- 6) Y. Simoni, E. Becht, M. Fehlings, C. Y. Loh, S. Koo, K. W. W. Teng, J. P. S. Yeong, R. Nahar, T. Zhang, H. Kared, K. Duan, N. Ang, M. Poidinger, Y. Y. Lee, A. Larbi, A. J. Khng, E. Tan, C. Fu, R. Mathew, M. Teo, W. T. Lim, C. K. Toh, B. Ong, T. Koh, A. M. Hillmer, A. Takano, T. K. H. Lim, E. H. Tan, W. Zhai, D. S. W. Tan, I. B. Tan, E. W. Newell. *Nature*. **2018**, 557, 575-579.