

HLA 遺伝子解析とネオアンチゲン予測による非小細胞肺癌の術後再発マーカーの同定と癌免疫誘導法への応用

申請者：愛知県がんセンター病院

呼吸器外科部 医長 松井 琢哉

共同研究者：愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫制御 TR 分野 分野長 松下 博和

1. 研究の背景・目的

早期の非小細胞肺癌（NSCLC）は外科的切除が標準治療であるが、術後再発が多く予後不良であり、その克服が社会的に求められている。近年、肺癌を含めた多くの進行癌治療に免疫療法が大きな成果をもたらした。免疫療法を代表する免疫チェックポイント阻害剤は、癌細胞への T 細胞の攻撃を活性化することで効果を発揮するが、この T 細胞の攻撃は癌細胞のもつヒト白血球型抗原（Human leukocyte antigen ; HLA）と、それに特異的に結合するネオアンチゲンが重要な標的となる（1）。この標的なしに T 細胞の攻撃は起こらず、癌細胞は見逃されて増殖するとされ、実際に HLA 発現の低下した進行肺癌では、免疫療法の効果が乏しい傾向にあるとされる（2）。また、HLA 発現低下の一因とされる Loss of heterozygosity (LOH) が腫瘍免疫上のリスクであることは広く認知されているが（3）、その多くは従来の解析法を用いた腫瘍組織 DNA の第 2 区域までの情報によって定義されており、不十分な評価である可能性は否定できない。

進行癌における HLA とネオアンチゲンに関する研究は数多いが、それらが腫瘍免疫で果たす役割から推察するに、切除された早期 NSCLC で起こる術後再発にも、抗腫瘍効果の標的となる HLA とネオアンチゲンに何らかの機能障害が発生している可能性がある。現在 HLA とネオアンチゲンについて早期 NSCLC の術後再発との関連性を検討した報告は少なく、臨床学的有用性は依然不明である。

本研究の目的は、早期 NSCLC の HLA とネオアンチゲンに焦点を当て、術後再発に関連すると評価された複数の HLA を詳細に選別し、それに特異的に結合するネオアンチゲンの免疫原性を調査することで、正確に術後再発リスクの高い HLA を特定することである。術後再発に強く関連する HLA を少数に絞り込み、その HLA を有するがん細胞株を樹立し、予測されたネオアンチゲンに特異的に反応する T 細胞を検出する。その T 細胞の

活性化を測定して免疫原性の評価を行い、将来的には術後再発リスクが高いと評価された HLA 自体を標的にしたネオアンゲン特異的免疫療法の開発への応用を目指す。

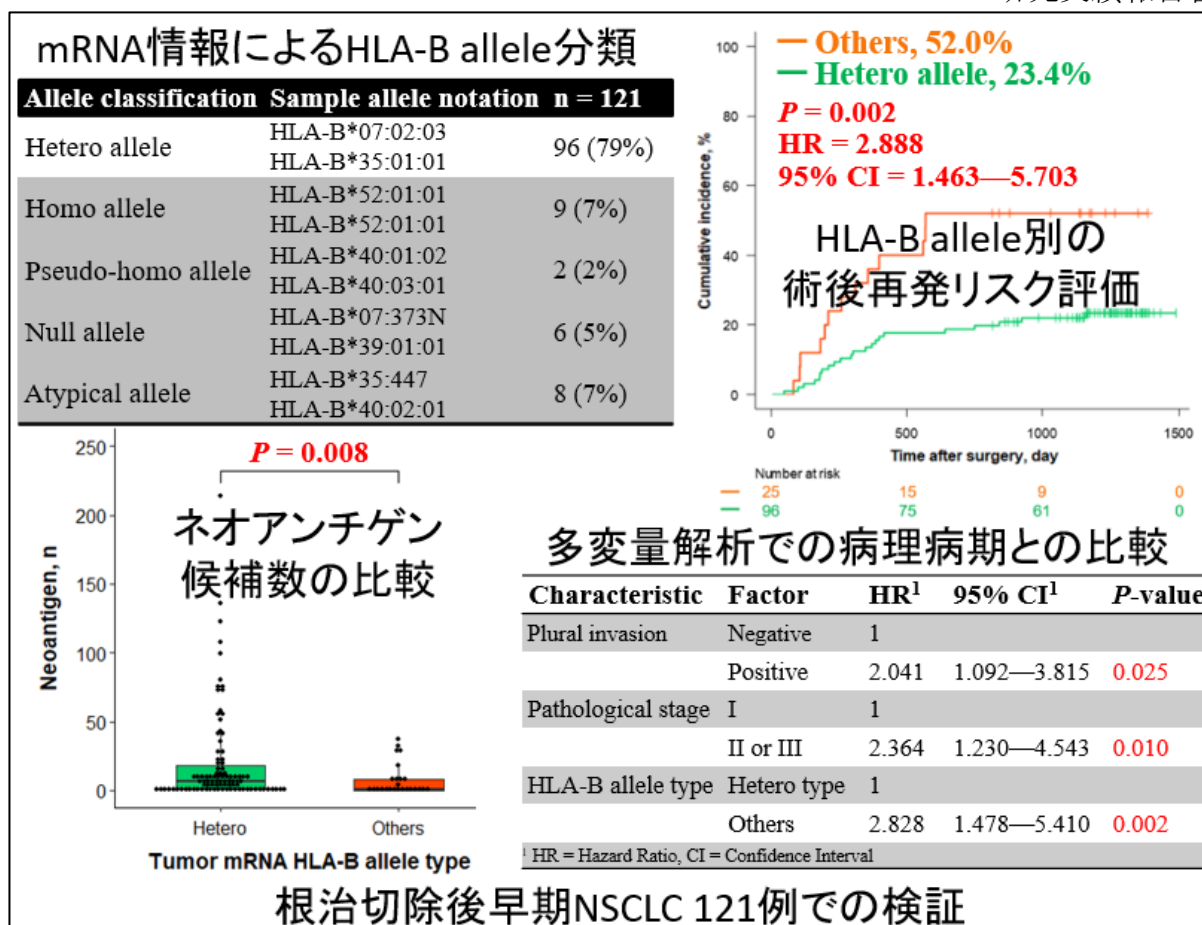
2. 研究の対象ならびに方法

愛知県がんセンター及び関連施設で、根治目的に切除された早期 NSCLC の切除検体から、腫瘍組織 DNA、腫瘍組織 mRNA、正常組織 DNA の全エクソームシーケンス解析と RNA シーケンス解析を次世代シーケンス (Next generation sequencing ; NGS) 技術を用いて行い、各々の結果に基づき HLA タイピングソフトウェアで HLA 型を同定し、術後再発との間に強い相関を示す特定の HLA を探索した。機械学習アルゴリズムを用いたネオアンチゲン予測ツールを活用し、それらの HLA に結合が予測されるネオアンチゲンの候補数を調査し、術後再発との関連性を評価した。同定した術後再発に特異的な HLA の中から、LOH を示すがん細胞株を樹立し、腫瘍特異的リンパ球 (Tumor-infiltrating lymphocyte ; TIL) のペア検体を得た症例で、TIL または末梢血中リンパ球から予測したネオアンチゲンに特異的に反応する T 細胞を検出し、その活性化を測定した。

3. 研究結果

NSCLC 121 例の腫瘍組織 DNA、腫瘍組織 mRNA、正常組織 DNA の全エクソームシーケンス解析と RNA シーケンス解析を NGS で実施し、Omixon 社の HLA タイピングソフトウェアで各々の結果に基づき HLA 型を同定した。さらに東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピューターSHIROKANE を用いて、RNA シークエンスデータから HLA に結合予測されるネオアンチゲンを同定した。腫瘍組織 mRNA による第 3 区域以下までの詳細な解析結果で評価すると、HLA-B の LOH は 9 例 (7%) で、LOH のみでは術後再発予測マーカーとしての有用性は高くなかった (図左上)。申請者らは、最大集団である Hetero allele グループ (H 群) を中心に 5 つの Allele タイプに患者を分類し、H 群とその他 (Others グループ ; O 群) に分けて両群を比較した際に、O 群で有意に術後再発の累積発生率が高いことを見出した (図右上)。さらに、HLA-B に結合可能なネオアンチゲン候補数では、H 群と比較して O 群で有意に候補数の減少が認められた (図左下)。また、この HLA-B の O 群が、病理学的ステージとは独立した予後因子である可能性を発見した (図右下)。

次に、同定した術後再発に特異的な HLA-B の中から、まず LOH を示すがん細胞株を樹立し、TIL のペア検体を得た症例で、TIL または末梢血中リンパ球から予測したネオアンチゲンに特異的に反応する T 細胞を検出し、その活性化の測定を試みた。具体的には、



HLA-B が LOH で片 allele となったがん細胞株にレトロウイルスをトランスフェクションさせ、Loss した HLA-B を導入し Hetero allele へ転換させ、抗生物質による選択プロセスでクローニングを実施した後に、フローサイトメトリーを使用して HLA-B の発現増強の検証を行った。導入した HLA-B に結合が予測されるネオアンチゲンをロードし、T 細胞との共培養を通じてその抗原特異性について評価中である。

4. 考察

今回の検討で、ネオアンチゲン提示能の低下から、術後再発リスクの上昇を引き起こす HLA-B allele の存在が示唆された。さらに解析数を増やすことでより特異的な allele の同定が出来る可能性があり、また観察期間を延長することで術後の再発だけでなく生存率に関する評価も可能になるため、今後追加で検討を行う方針である。また、一連の手順を通じて、HLA-B 遺伝子の導入による T 細胞活性化の変化により、ネオアンチゲンの免疫原性が評価可能となるだけでなく、NSCLC 術後再発に関与する HLA-B とネオアンチゲンという、将来的な個別化医療における新たな治療標的の同定に貢献することが期待される。

5. 文献

- 1) Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, Lin JC, Teer JK, Clifton P, Tycksen E, Samuels Y, Rosenberg SA. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. Nat Med. 19(6):747-52, 2013.
- 2) Chowell D, Krishna C, Pierini F, Makarov V, Rizvi NA, Kuo F, Morris LGT, Riaz N, Lenz TL, Chan TA. Evolutionary divergence of HLA class I genotype impacts efficacy of cancer immunotherapy. Nat Med. 25(11):1715-20, 2019.
- 3) McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, Rowan AJ, Watkins TBK, Wilson GA, Birkbak NJ, Veeriah S, Van Loo P, Herrero J, Swanton C; TRACERx Consortium. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. Cell. 171(6):1259-71.e11, 2017.

6. 論文発表等

○学会発表

- 1) 第 124 回日本外科学会定期学術集会（2024 年 4 月）非小細胞肺癌の術後再発リスク評価におけるヒト白血球型抗原遺伝子解析とネオ抗原予測の有用性 松井琢哉, 松下博和, 山口 類, 福嶋恭啓, 杉田裕介, 瀬戸克年, 坂倉範昭, 高野崇継, 中村龍二, 小田梨紗, 立松 勉, 横田圭右, 奥田勝裕

○競争的研究資金獲得

- 1) 日本学術振興会 科学研究費助成事業 令和 7（2025）年度 若手研究「HLA 遺伝子とネオアンチゲン解析による非小細胞肺癌の術後再発予測と癌免疫誘導法開発」