

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03008

研究課題名(和文) 完全個別化医療に向けた口腔癌のネオアンチゲンの探索および宿主免疫応答の網羅的解析

研究課題名(英文) Exploring of neoantigen and immune response in Patients with Oral Cancer

研究代表者

濱田 良樹 (HAMADA, YOSHIKI)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70247336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がんにおけるT細胞受容体の多様性と臨床的予後因子との相関性については不明である。本研究では、次世代シーケンサーを用いて口腔がん患者個人のNeo-antigen に反応を示していると考えられる腫瘍浸潤リンパ球におけるTCRを同定することを目的とした。原発組織と転移陽性の頸部リンパ節でいくつかの共通したクローンを持つTCR遺伝子を同定した。さらに、同一患者内の転移陽性リンパ節は陰性リンパ節よりも多様性が高くなっていた。転移陽性リンパ節におけるTCRレパトアは、腫瘍抗原への免疫応答を反映していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた口腔がん患者ごとの TCR 遺伝子情報は、抗腫瘍効果の新規遺伝子診断・治療評価法の確立へと寄与する可能性を秘めており、個々の口腔がん患者ごとのNeo-antigenを標的とした強い免疫応答を誘導する革新的ながん免疫治療法開発の端緒となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The characteristics of T cell repertoire including diversity and similarity, as well as its prognostic significance in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) remain unknown. In this study, we applied a high throughput T cell receptor (TCR) sequencing method to characterize the T cell repertoires of explored the signatures of TCR repertoires in the OSCC primary tumor tissues and paired cervical lymph nodes from 16 OSCC patients, and their potential value in predicting the prognosis of patients. Our results revealed that several clonotypes uniquely detected in primary tumors which differed from paired metastatic lymph nodes. In addition, the TCR repertoire diversity in metastatic lymphatic nodes from was higher than in other non-metastatic lymph nodes. More importantly, the clonality in TCR repertoire of metastatic lymphatic node may be associated with role of the immune response to the tumor antigen, which involves in the prognosis of the patients.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔がん T細胞受容体 ネオアンチゲン

1. 研究開始当初の背景

進行性の口腔がん治療では、臨床試験によって確立された標準治療に沿った形で白金製剤や分子標的薬を組み合わせたがん特異性の高い治療が実施されている。その治療効果判定については、生存率の改善や腫瘍組織の縮小などを指標とした比較的マクロな評価法が用いられており、臨床学的には個体間での治療効果に大きな相違があることから、各個人の遺伝情報に基づく腫瘍免疫学的見地からの診断・治療評価法が必要とされている。口腔がんにおける腫瘍免疫学的知見としては、腫瘍抗原ペプチドや腫瘍浸潤 T リンパ球(TIL)、とくに制御性 T 細胞の浸潤と予後との相関性に基づく研究がなされてきたが (Zhou X, et al; Oral Oncol. 2015), がん患者ごとの腫瘍抗原ペプチドおよび TIL を個体認識するまでの遺伝子診断ツールが存在しないため、個人の遺伝情報に基づく抗腫瘍効果を事前に把握することが可能となる個別化医療となり得る遺伝子診断・治療評価法を行うことは困難とされてきた。

がん細胞はそのがん化の過程で多くの体細胞遺伝子突然変異(somatic mutation)を蓄積しており、正常細胞に存在しないアミノ酸変異を伴うタンパク質を発現している。細胞内のタンパク質は、8~11 アミノ酸からなるペプチドに分解された後、MHC クラス I 分子のポケット状の構造に結合して細胞表面に提示され、T 細胞受容体(T cell receptor; TCR) によって認識される。がんの突然変異数および Neo-antigen が多いほど腫瘍縮小効果を示しやすく予後が良好であることが示されており (T. Schumacher, et al; Science 2015), Neo-antigen を認識している高親和性の T 細胞が生体内に存在し、さらには腫瘍抗原特異的な免疫応答によって抗腫瘍効果を発揮していることを反映しているとされているが、患者ごとの詳細な TCR による免疫応答については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、口腔がん患者個人の遺伝情報に基づいた口腔がんの腫瘍消失をもたらす新規がんワクチン療法を構築するために、次世代シーケンサーを用いて口腔がん患者個人の Neo-antigen に反応を示していると考えられる TIL の TCR を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 標準治療を実施した口腔がん患者の臨床情報収集

標準治療を実施した口腔がん患者の年齢・性別・既往歴・現病歴・現症(全身、局所)について詳細な調査を行うと同時に患者に本研究の意義を説明し、以後の検索の同意を得た。

(2) 検体採取・免疫組織学的検討

口腔がん生検あるいは切除時の切除材料の病理学的評価ならびに分子標的薬の標的遺伝子の免疫組織学的検索を行った。

(3) 口腔がん局所における腫瘍免疫応答に関わる遺伝子発現解析

口腔がん生検あるいは切除時の切除検体組織より Total RNA を抽出し、cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR 法により T 細胞マーカー (CD3, CD4, CD8) および腫瘍免疫マーカー (PD-1, PD L-1) の mRNA レベルでの遺伝子発現解析を行った。

(4) 口腔がん患者ごとの TCR レパトア解析

研究手法として研究分担者の鈴木らが開発した Adaptor-ligation PCR 法 (Matsutani T, Suzuki R, et al. Hum Immunol, 1997) と、独自に開発したバイオインフォマティクスによるデータ処理 (Kitaura K, Suzuki R, et al; BMC Immunol. 2016, Front Immunol. 2017) を加えることによって、Neo-antigen を認識する抗腫瘍効果を持つ TIL の TCR レパトアのライブラリを構築した。さらに、TCR 遺伝子の抗原認識に関わる相補性決定領域(CDR3) のシーケンスを解析することにより、病変部に浸潤している T 細胞のクローン特異性を絞り込んでいった。

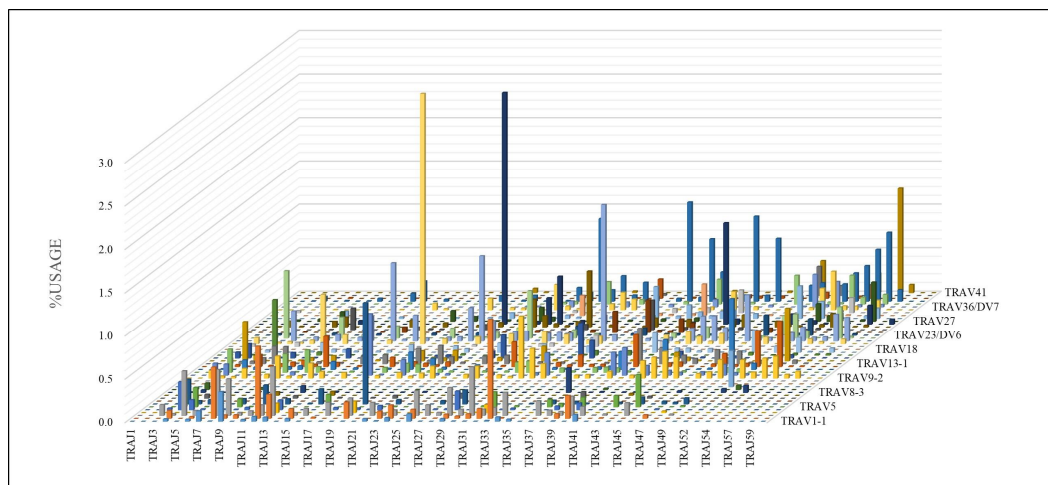
4. 研究成果

(1) 標準治療を実施した口腔がん患者の臨床情報収集・病理組織検査

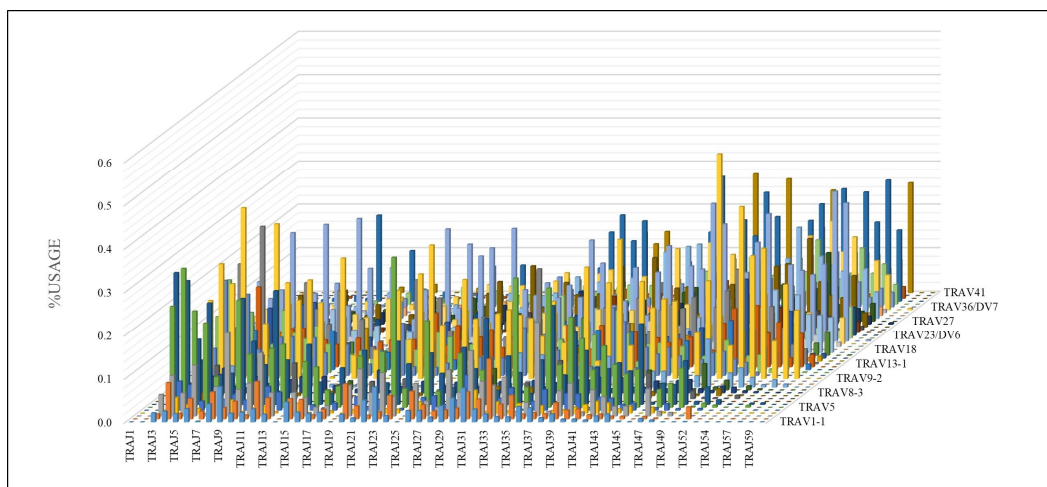
鶴見大学歯学部口腔顎顔面外科学講座および関東労災病院歯科口腔外科において口腔がん患者 40 名を研究対象とした。病理組織学的検査について、全症例ともに扁平上皮癌 (SCC) の診断結果を得た。

(2) 口腔がん患者ごとの特異的変異抗原 (Neo-antigen) / TCR レパトア解析

結果 1-1. 口腔がん原発組織における 3D TCR VA レパトア解析結果(75 歳 女性)



結果 1-2. 口腔がん転移陽性頸部リンパ節（顎下リンパ節）における 3D TCR VA レパトア解析結果(75 歳 女性)



結果 2-1. 口腔がん原発組織における 3D TCR VA Clone 結果(75 歳 女性)

TRA Ranking Top10					
Rank	TRAV	TRAJ	CDR3	Reads	%Reads
1	TRAV20	TRAJ18	CAVQASRGSTLGRLYF	3,702	2.60
2	TRAV26-2	TRAJ23	CILRSNNQGGKLIF	3,496	2.45
3	TRAV41	TRAJ57	CAVTQGGSEKLVF	1,610	1.13
4	TRAV26-2	TRAJ43	CILTNDMRF	1,570	1.10
5	TRAV21	TRAJ34	CASYNTDKLIF	1,568	1.10
6	TRAV6	TRAJ20	CALVLNDYKLSF	1,328	0.93
7	TRAV38-2/DV8	TRAJ37	CASSGNTGKLIF	1,152	0.81
8	TRAV12-2	TRAJ49	CAVSQFYF	1,025	0.72
9	TRAV1-2	TRAJ12	CAVLDSYKLIF	994	0.70
10	TRAV22	TRAJ5	CAVVLMDMGRRALTF	990	0.69

結果 2-2. 口腔がん転移陽性頸部リンパ節（顎下リンパ節）における 3D TCR VA Clone 結果(75 歳 女性)

TRA Ranking Top10					
Rank	TRAV	TRAJ	CDR3	Reads	%Reads
1	TRAV38-2/DV8	TRAJ9	CAYTGGFKTIF	310	0.17
2	TRAV6	TRAJ12	CALLMDSSYKLIF	268	0.15
3	TRAV21	TRAJ9	CAVVQTGGFKTIF	268	0.15
4	TRAV38-2/DV8	TRAJ52	CAYLANAGGTSYGKLTIF	229	0.12
5	TRAV13-1	TRAJ31	CAASIGNNARLMF	205	0.11
6	TRAV8-4	TRAJ4	CAVSDGGYNKLIF	182	0.10
7	TRAV5	TRAJ23	CAESYNQGGKLIF	156	0.09
8	TRAV5	TRAJ9	CAGDTGGFKTIF	153	0.08
9	TRAV36/DV7	TRAJ20	CAVPLDYKLSF	135	0.07
10	TRAV21	TRAJ20	CAVRLNDYKLSF	129	0.07

本症例で原発巣と転移陽性顎下リンパ節で高発現して共通して存在していた TCR VA Clone としては, TRAV22 TRAJ10 CAVVTGGGNKLTIF であったので, 当該患者の腫瘍抗原を直接に認識している TCR 遺伝子の可能性が示唆された.

本研究における T 細胞受容体解析系によって腫瘍抗原特異的な TCR 遺伝子ライブラリの構築が可能となった.

口腔がん患者の Neo-antigen に反応していると考えられる TCR 遺伝子情報は, 抗腫瘍効果の新規遺伝子診断・治療評価法の確立へと寄与し, 個々の口腔がん患者ごとの Neo-antigen を 標的とした強い免疫応答を誘導する革新的ながん免疫治療法開発の端緒となることが期待される.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mori Takahiro, Kumagai Kenichi, Nasu Keisuke, Yoshizawa Takamasa, Kuwano Koji, Hamada Yoshiki, Kanazawa Hideki, Suzuki Ryuji	4. 巻 22
2. 論文標題 Clonal Expansion of Tumor-Infiltrating T Cells and Analysis of the Tumor Microenvironment within Esophageal Squamous Cell Carcinoma Relapsed after Definitive Chemoradiation Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1098 ~ 1098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22031098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 熊谷賢一, 大橋祥浩, 中村那々美, 仲宗根 康成, 市川はるの, 川口浩司, 堀江彰久, 鈴木隆二, 濱田良樹
2. 発表標題 ErbB4は口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移の危険因子である
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiki Hamada
2. 発表標題 Mandibular Reconstruction Using A Custom-Made Titanium-Mesh Tray with Autogenous Particulate Cancellous Bone and Marrow (PCBM)
3. 学会等名 13th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Kumagai, Kazutoshi Nakaoka, Shusuke Yamada, Koji Kawaguchi, Tomoko Ikawa, Yuko Shigeta, Naohiko Harada, Noboru Kawamura, Takumi Ogawa, Yoshiki Hamada.
2. 発表標題 Computer assisted secondary mandibular reconstruction using the custom-made titanium mesh tray based on the "restoration-driven" concept
3. 学会等名 69th Kongress & Praxisführungsseminar der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	熊谷 賢一 (KUMAGAI KENICHI) (10518129)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI) (70373470)	独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）・臨床免疫研究室・室長 (82710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------