

博士論文

肺癌に対する腫瘍内免疫応答の解析

唐崎 隆弘

目次

略号一覽	• • •	2
要旨	• • •	4
序文	• • •	5
方法	• • •	1 7
結果	• • •	2 6
考察	• • •	5 5
結語	• • •	7 0
謝辞	• • •	7 1
引用文献	• • •	7 2

略号一覧

(a)DC	(Activated) Dendritic cells
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ES	Enrichment score
FDR	False discovery rate
FPKM	Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped
GSEA	Gene set enrichment analysis
HLA	Human leukocyte antigen
IC ₅₀	Inhibitory concentration of 50%
IDO1	Indoleamine2,3-dioxygenase 1 gene
IGS	Immunogram Score
(im)CG antigen	(Immunogenic) Cancer-germline antigen
Log ₂ FC	Log ₂ fold-change
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells

MHC	Major histocompatibility complex
NES	Normalized enrichment score
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TIL	Tumor infiltrating lymphocytes
Treg	Regulatory T cells

要旨

腫瘍に対する免疫応答を、いくつかのステップからなる一連のサイクル（癌免疫サイクル；Cancer-Immunity Cycle）と捉える概念が提唱されている。我々は、網羅的遺伝子解析データを用いて癌免疫サイクルの各ステップの状態をスコア化し、レーダーチャートを用いて可視化する新たな評価法を考案した（“Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle”）。肺癌検体 20 例に対して、immunogram を用いて腫瘍内免疫応答を解析した。その結果、各患者における immunogram はそれぞれ多様なパターンを示しており、患者毎に異なる腫瘍内免疫応答が生じていることが確認された。その中で共通点を探索すべく、T 細胞浸潤が豊富な T cell-rich 型と T 細胞浸潤に乏しい T cell-poor 型、そしてその中間である T cell-intermediate 型に分類したところ、いくつかの特徴が観察された。T cell-rich 型では豊富な腫瘍浸潤リンパ球(TIL)で特徴づけられ、チェックポイント因子を含む抑制性因子の発現が亢進していた。組織型の違いは TIL 側の因子とは特に関連しないことが示唆された。Immunogram を用いた腫瘍内免疫応答の解析は、患者毎の最適な複合治療選択の指標となり得るかもしれず、個別化肺癌治療の展開に向けて、有用性が期待される。

序文

胸部悪性腫瘍の代表である肺癌は癌死因の第1位であり、日本における年間死亡者数は7万人を超える (http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/)。全患者の7割を占めるとされる切除不能進行非小細胞肺癌や術後再発に対しては、放射線、化学療法、分子標的薬を中心とした治療が行われるが、いまだ予後は不良である。

近年、免疫チェックポイント分子を阻害する抗CTLA-4抗体や抗PD-1/PD-L1抗体などの分子標的薬が開発され、臨床試験で様々な癌腫に対する有効性が示されたことから、癌に対する免疫治療は今非常に注目されている[1-5]。日本においても2015年12月に非小細胞肺癌に対する抗PD-1抗体の適応申請が承認された。腫瘍内あるいは担癌個体には、免疫抑制性の環境が形成されており、腫瘍特異的T細胞の誘導や作用が抑制されている。多彩な分子の相互作用が関与しているが、その中でもT細胞上に発現するCTLA-4やPD-1は、免疫チェックポイント分子と呼ばれる。それぞれ抗原提示細胞上に発現するCD80/CD86、あるいは腫瘍細胞や間質細胞に発現するPD-L1と結合し、免疫応答を制御する作用を持つ。これらは、過剰な免疫応答による組織損傷を防ぐためのブレーキ役として作用する生理的な反応である。抗PD-1/PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体に代表さ

れる免疫チェックポイント阻害薬は、チェックポイント分子の発現によって抑制されていた内因性抗腫瘍免疫を再活性化することで作用する（図1）。免疫チェックポイント阻害薬が効いたことにより、生体には癌に対する免疫応答が存在することが再認識され、多くの臨床医が癌免疫治療に注目するきっかけとなった。

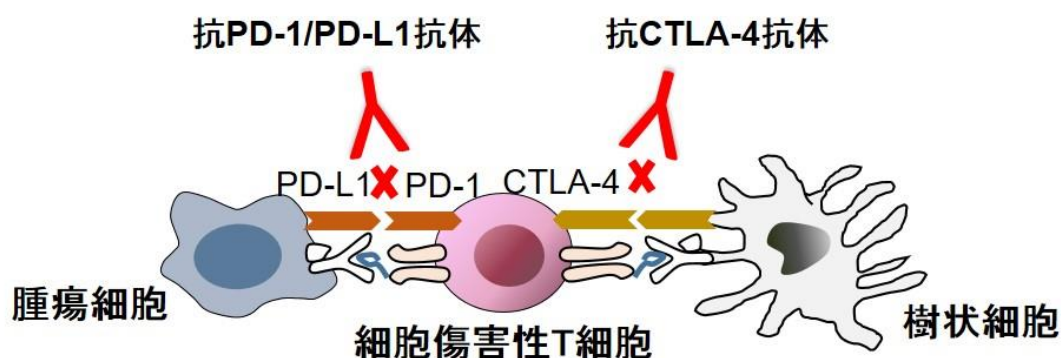


図1 免疫チェックポイント阻害薬

癌免疫治療のあゆみ

癌免疫研究の歴史は古く、1890年代にはすでに癌免疫の存在が提唱されており、1909年には免疫系によって癌の発生が抑制されているという癌免疫監視機構の概念が提唱されている[6-8]。一方で、免疫はそもそも自己と非自己を識別するシステムであるから、自己の細胞から発生する癌細胞を認識すること

は不可能であろう、という癌免疫を否定する意見も多かった。そこで、癌免疫を科学的に分子レベルで証明するために、腫瘍に浸潤したリンパ球が認識する抗原、すなわち腫瘍抗原・癌抗原の同定に向けた研究が 1980 年代より盛んに行われた。腫瘍を特異的に認識する T 細胞をプローブとして用いる発現クローニング法により、1988 年にマウスの化学発癌剤誘発腫瘍で変異抗原 P91A が同定され、1991 年にはヒト悪性黒色腫(メラノーマ)細胞から MAGE-1 が同定された[9, 10]。癌抗原が分子レベルで同定され、癌免疫が成立することが証明されて以降、癌細胞で過剰に発現しているタンパクや分化抗原などの腫瘍関連抗原や、精巣・生殖細胞と癌細胞でのみ発現を認める癌生殖細胞(精巣)抗原(cancer germline [testis] antigen)などの多数の癌抗原が同定された。一方で、分化抗原や過剰発現による腫瘍関連抗原は、正常細胞にも発現を伴うことから、免疫寛容のメカニズムにより高親和性 T 細胞を誘導することは困難である。これらの抗原を用いた癌ワクチン治療は、患者に特異的な免疫応答を誘導することができても、明らかな治療効果を得ることはまれであった。そのため、癌免疫治療に対して懐疑的な見方をする人も多く、実際それまでの癌免疫治療は一部のメラノーマにおいて臨床効果を示したのみであった。

この状況を一変させたのが、抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の登場だった。従来の抗癌剤に対して抵抗性を示した非

小細胞肺癌やメラノーマ患者の一部において、免疫チェックポイント阻害剤は、長期間に渡る優れた抗腫瘍効果の持続をもたらした。これまで免疫療法が無効であると考えられていた種々の固形癌に対しても有効性を示したことから[11]、とうとう癌に対する免疫療法が無視できない治療として認知された。それを象徴するように、米国の Science 誌は Breakthrough of the Year 2013 に「癌免疫治療 (Cancer immunotherapy)」を選出した[12]。

一方で、免疫チェックポイント阻害剤のみでは肺癌に対する奏効率が20%前後とも言われており、より多くの患者に対して効果を得るためには、まだ多くの課題が残されている。チェックポイント阻害剤は抗癌剤と比較して非常に高価であり、また自己免疫反応に関連した重篤な副作用も報告されている。チェックポイント阻害剤の有効性が高く見込まれる患者を選択する、あるいは治療継続の是非を判定するための有効なバイオマーカーの探索が急がれている。

チェックポイント阻害剤の効果に影響する因子

臨床試験結果に対する解析から、チェックポイント阻害剤の奏効率と関連する因子がいくつか示されている(表1)。

表 1. チェックポイント阻害剤の効果への影響が示唆されている因子

因子	チェックポイント阻害剤	対象
腫瘍細胞表面における PD-L1 発現	ニボルマブ (抗 PD-1)	非小細胞肺癌、メラノーマ、腎癌
	ペンブロリズマブ (抗 PD-1)	非小細胞肺癌
腫瘍細胞以外の間質細胞の PD-L1 発現	アテゾリズマブ (抗 PD-L1)	非小細胞肺癌、他
腫瘍浸潤 CD8 ⁺ T 細胞	ペンブロリズマブ (抗 PD-1)	メラノーマ
変異遺伝子数	ペンブロリズマブ (抗 PD-1)	非小細胞肺癌
ネオアンチゲン数	イピリムマブ (抗 CTLA-4)	メラノーマ
ミスマッチ修復遺伝子異常	ペンブロリズマブ (抗 PD-1)	大腸癌、他

癌免疫において癌細胞を攻撃する effector 細胞の主役は CD8⁺ T 細胞である。

チェックポイント阻害剤はいわば「免疫のブレーキを外す治療」とも言えるが、

攻撃の主体である CD8⁺ T 細胞がそもそも存在しなければ効果は期待しにくい。

実際に、メラノーマでは腫瘍浸潤 CD8⁺ T 細胞の多寡が抗 PD-1 抗体の効果と関連していたと報告されている [13]。

また、腫瘍細胞における PD-L1 の発現の高い症例において、抗 PD-1 抗体の効果が高かったとする報告が多い [3, 14-16]。腫瘍細胞だけでなく腫瘍内に浸潤する免疫細胞などを含む間質細胞上の PD-L1 発現の多寡が抗 PD-L1 抗体の効果と有意に関連していたとする報告もある [2]。一方で PD-L1 発現に対する判定法は定まっておらず、報告によって抗体の種類や発現度合いの cut-off はまちまちである。また PD-L1 発現陰性の腫瘍においても治療が奏功した患者が少

なからず存在する。そのため、PD-L1 の免疫染色結果のみでチェックポイント阻害剤の適応を選択することは望ましくないとされている[11]。

癌細胞特異的遺伝子変異の多さとチェックポイント阻害剤の効果の関連性も報告されている[17, 18]。癌細胞はその癌化の過程で多くの体細胞遺伝子突然変異を蓄積する。アミノ酸変異を伴う遺伝子変異産物のうち、一部のものは細胞内でプロテアソームによる分解を受けてペプチドに分解されたのち小胞体内へ輸送され、MHC クラス I 分子への結合とアミノ酸のトリミングを受ける。そして細胞表面に MHC ペプチド複合体として提示され、T 細胞受容体によって認識される抗原となる。癌細胞特異的な遺伝子変異に由来する抗原は正常細胞中に本来存在しないため、neoantigen（新生抗原）と呼ばれる（図 2）。

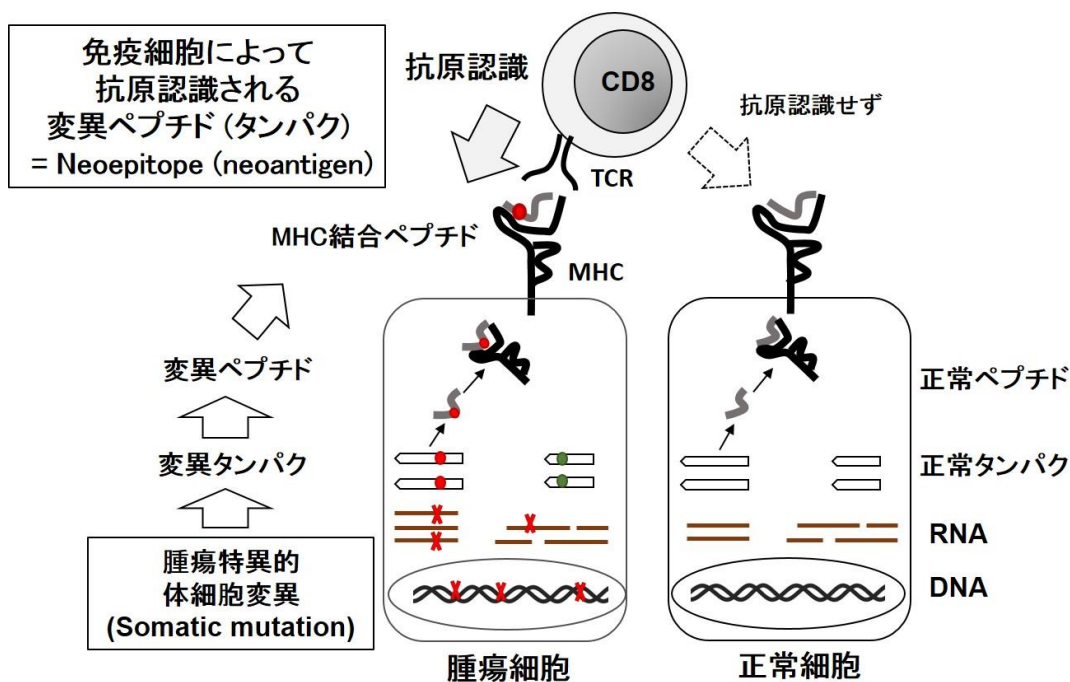


図 2 Neoantigen とは

胸腺内で発現を認めない neoantigen に対しては、中枢性の免疫寛容が誘導されないことから、高い免疫原性を有する可能性があると考えられている。抗腫瘍免疫応答が誘導される際、この neoantigen が T 細胞の標的となり、腫瘍拒絶にかかわる抗原になりうることが示されている [19]。先に述べたようにチェックポイント阻害剤は T 細胞のブレーキを外すことで抗腫瘍免疫応答を活性化させる。癌細胞に蓄積した変異が多いほど、癌細胞内で合成される変異ペプチドの種類が多く、neoantigen の数 (neoantigen load) も多いと予測される。Neoantigen が多いほど、それを認識する T 細胞が誘導されるチャンスが多くなり、チェックポイント阻害剤の効果が期待できると考えるのは自然である。変異の多い癌ほどチェックポイント阻害剤の効果の見込みが高いことは、このようにして説明される。このことを裏付けるように、チェックポイント阻害剤の効果が総じて乏しいとされた大腸癌でも、ミスマッチ修復遺伝子に異常があり体細胞変異が突出して多い一部の患者において、チェックポイント阻害剤の高い有効率が確認されている [20]。

一方で、メラノーマや肺癌に対するチェックポイント阻害剤の臨床試験において、遺伝子変異数 (mutational load) や予測 neoantigen の数が少ない患者の中にも、高い抗腫瘍効果を認める症例が少なからず存在した。メラノーマや

肺癌と比較して変異が総じて少ないと言われる腎癌においても、チェックポイント阻害剤の効果が確認されている[15]。腎癌では免疫応答の標的として内因性レトロウィルスの関与が指摘されており[21]、チェックポイント阻害剤の効果と関連しているのかもしれない。チェックポイント阻害剤の効果と遺伝子変異や neoantigen の数の間には、集団レベルでは相関が確認できるものの、個々の症例における治療効果を予測・判定するためのバイオマーカーとして変異数や neoantigen 数を利用するのは難しいと考えられている[11]。

このように、チェックポイント阻害剤の効果と関連する因子についての解析は進んでいるものの、これらの因子をバイオマーカーとして個々の症例の治療選択にそのまま利用することは現実的でない。癌免疫はダイナミックなシステムとして成り立っており、これまでのような単一因子ごとの評価ではなく、システム全体として評価する新たな枠組みが求められている。

癌免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle)

腫瘍に対する免疫応答を、いくつかのステップからなる一連のサイクル(癌免疫サイクル ; Cancer-Immunity Cycle) として理解することが提唱されている[22] (図3)。

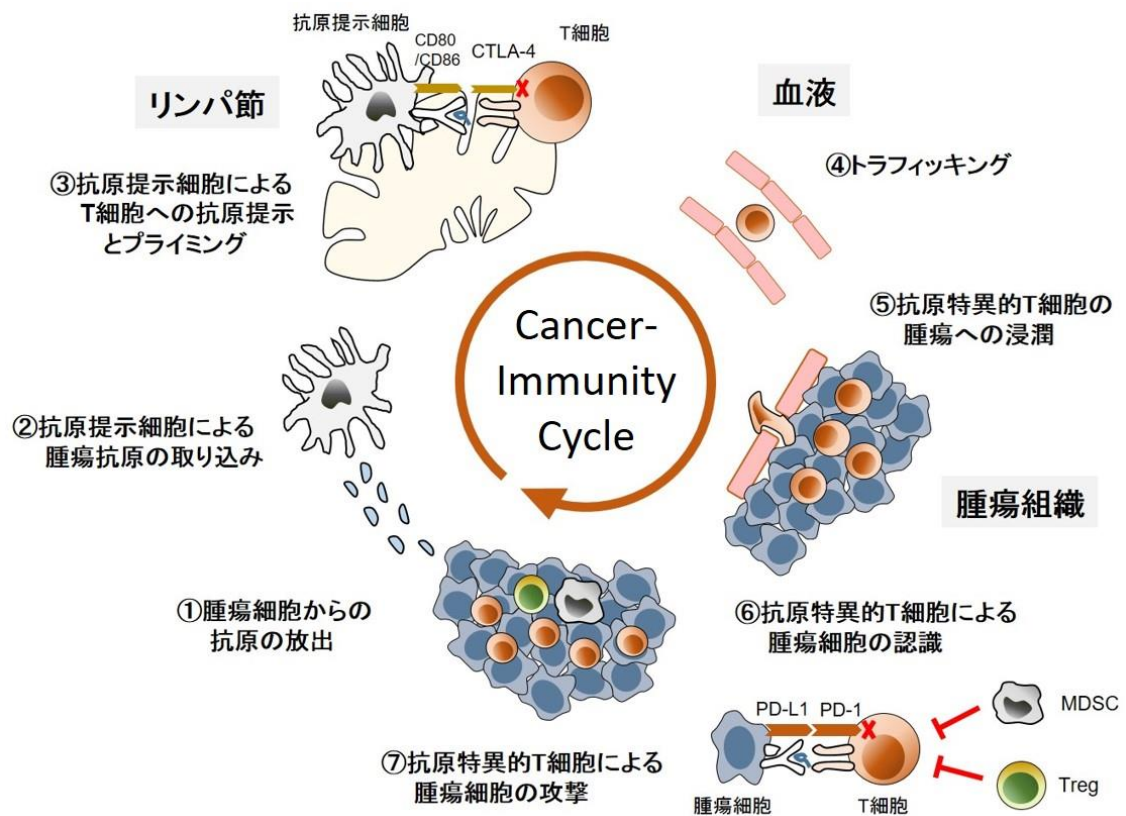


図3 癌免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle) *文献[22]より改編

腫瘍抗原が腫瘍細胞から放出され(図3-①)、腫瘍抗原を樹状細胞などの抗原提示細胞が取り込み、MHC分子に結合させて細胞表面へ提示しつつリンパ節へと遊走する(図3-②)。リンパ節に到達した抗原提示細胞はT細胞に抗原を提示し、抗原特異的なT細胞が活性化する(図3-③)。活性化したT細胞が腫瘍組織へと遊走し(図3-④)、浸潤する(図3-⑤)。腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞をT細胞が認識し(図3-⑥)、攻撃する(図3-⑦)。T細胞に攻撃され細胞死を起こした腫瘍細胞は新たな腫瘍抗原を放出する(図3-①)。この一連のサイクルのどのステ

ップが障害されても効果的な抗腫瘍免疫応答の誘導が困難になり、癌が免疫監視機構から逃避する。最も重要な点は、腫瘍に対する免疫サイクルが抑制されているステップと、その組み合わせは多種多様であり、一人一人の患者によって異なる。例えば抗 PD-1 抗体の効果が期待できる患者は、チェックポイント因子の発現によって 図 3-⑦ が障害されている患者である。逆に言えば、これ以外のステップが障害されている場合、チェックポイント阻害剤のみでは臨床効果が期待できない可能性が高い。このように、患者ごとの腫瘍免疫抑制因子を正しく把握することにより、適切な治療戦略を検討し、チェックポイント阻害剤のみならず最適な癌免疫治療を選択することが可能になる。

このような複雑系である免疫系を評価する上で、複数の項目を同時に評価し、それをわかりやすく可視化するツールが求められている。それに対する一つの提案が“Immunogram”という表現法である。Blank らは 2016 年に Science 誌上で、癌免疫に関連した複数の因子を患者ごとに可視化する架空のツールとして、“Cancer Immunogram”の一案を提唱した[23]。複数の因子についてレーダーチャートを用いて同時に評価するという手法自体は新しいものではないが、患者ごとの腫瘍免疫状態を多角的に評価し、最適な治療の組み合わせを考えていくためのツールとして今後の応用が期待された。そして、実臨床データをどのようにして immunogram に落とし込むかが、課題として浮かび上がった。

本研究で明らかにしたこと

最適な癌免疫治療を行うためには、Cancer-Immunity Cycle のどのステップが障害されているかを、患者ごとに適切に評価することが望ましい。そこで我々は、個々の患者における腫瘍内免疫応答および癌免疫状態を把握するためのデータソースとして、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析データに注目した。患者ごとの腫瘍内免疫応答を解析するにあたり、まず全エクソンシーケンスデータから腫瘍特異的遺伝子変異を解析し、neoantigen load を評価した。癌生殖細胞（精巣）抗原遺伝子 (cancer-germline [testis] antigen; CG antigen) の発現解析結果と合わせて、腫瘍の抗原性を定量化した。さらに、トランスクリプトームシーケンスから得られる網羅的遺伝子発現データから、Cancer-Immunity Cycle の各ステップにおける免疫状態を個々の患者で予測した。そして、次世代シーケンスデータから解析された Cancer-Immunity Cycle の各ステップの状態を、8本の軸からなるレーダーチャートで表現した (“Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle”) (図4)。そして、この immunogram を用いて、肺癌における腫瘍内免疫応答について解析した。

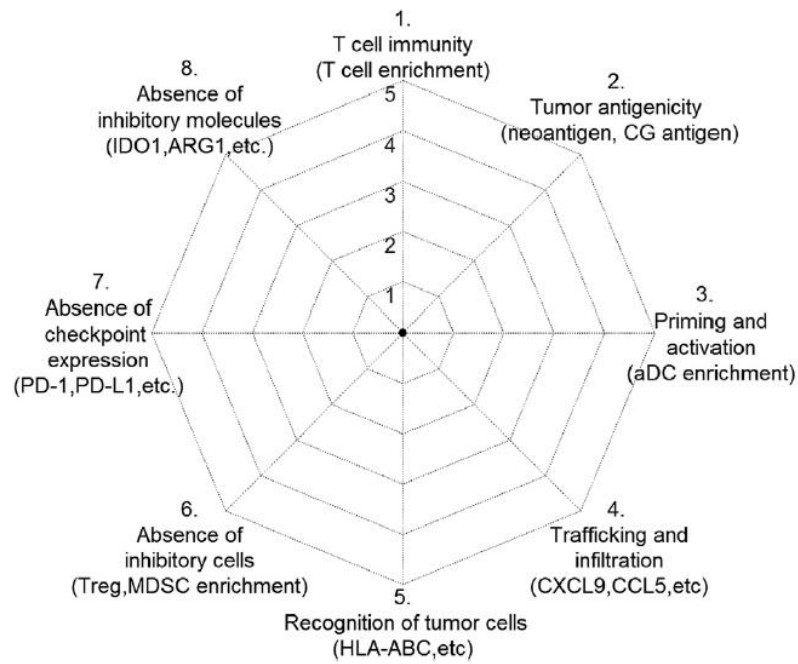


図4 患者ごとの癌免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle) の状態を評価するためのレーダーチャート (Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle)

Cancer-Immunity Cycle の各ステップの状態を、8 項目に分割して評価した。各評価軸において最低 1 点、最大 5 点のスコア (Immunogram Score; IGS) を与えることとし、スコアが高いほど癌免疫の状態としては良好であることを表わすこととした。

方法

対象

東京大学大学院医学系研究科および医学部並びに東京大学医学部附属病院におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会で承認されたプロトコルに基づいて研究計画を遂行した（承認番号 G3545）。2012年11月から2014年12月までに行われた非小細胞肺癌に対する手術症例のうち、術前に文書による同意が得られ、なおかつ十分な量の研究用検体が採取可能であった20例に対して解析を行った。手術による切除標本から腫瘍および正常肺検体を採取し、手術中の動脈留置カテーテルから末梢血検体を採取した。

全エキソンシーケンスと RNA シーケンス

患者から採取した末梢血中単核球(PBMC)はBambanker (Nippon Genetics Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて液体窒素容器で保存した。肺癌および正常肺組織については、肺癌切除手術の際に、標本摘出直後に腫瘍組織および正常肺組織を採取した。5mm以下の切片にカットし、核酸安定化試薬 RNA later (Qiagen,

Hilden, Germany) を用いて 2°C~8°Cの冷蔵庫内で 1~3 日間浸透させた後、-80°Cの冷凍庫で保存した。このようにして保存した検体から、AllPrep DNA/RNA Mini Kit または AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kits (いずれも Qiagen) を用いて genome DNA および total RNA サンプルを精製した。

精製した DNA および RNA サンプルは、かずさ DNA 研究所 (千葉県木更津市) に送付され、次世代シーケンサーによるシーケンスが行われた。概要を述べると、DNA については genome DNA から SureSelect XT Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて DNA シーケンスライブラリーを精製した。エクソン領域の選択的増幅には SureSelect Human All Exon V5 (Agilent Technologies) を使用した。RNA については、SureSelect Strand-Specific RNA library Preparation kit for Illumina (Agilent Technologies) を用いて poly-A 選択的 RNA シーケンスライブラリーを調整した。シーケンスライブラリーは、いずれも次世代シーケンサー HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, CA) 用いてシーケンスされた。全エクソンシーケンス (exome) はいずれも 100 base pair (bp) ペアエンド法で実施した。正常組織の DNA を評価するにあたり、LK001, LK005, LK012, LK013 の 4 例については PBMC 由来の DNA を使用し、他の 16 例については正常肺組織から抽出した DNA を使用した。腫瘍の RNA シーケンス (RNA-seq) はいずれも 100bp ペアエンド法で実施した。LK001, LK004, LK005, LK010, LK012,

LK013 の 6 例に対しては、正常肺組織の RNA シーケンスを 75bp シングルリード法で実施した。

次世代シーケンスデータ解析

Fastq 形式で得られた全エクソンシーケンスリードデータを、hg19 (GRCh37) を参照配列として解析ソフトウェア Burrows-Wheeler Aligner software (v0.7.12) を用いてマッピングした[24]。Picard (v2.1.1) を用いて重複リードを除去した後、Genome Analysis Tool kit (v3.5) を用いてベストプラクティスに準拠し realignment & recalibration を行った[25]。変異解析ソフト VarScan (v2.3.7) および Mutect (v1.1.7) を用いて、腫瘍特異的体細胞変異を検出した[26, 27]。

Fastq 形式で得られた RNA シーケンスリードデータは、解析ソフトウェア Tophat (v1.3.2) を用いて hg19 (GRCh37) にマッピングした[28]。発現量は、Cufflinks (v2.0.2) を用いて fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped (FPKM) の単位で定量化した[29]。各遺伝子の発現値 FPKM が 1 以上の場合に、有意な発現と判定した。

Neoantigen 候補予測と癌生殖細胞（精巣）抗原予測

正常組織由来の全エクソームシーケンスデータに対して、解析ソフトウェア Omixon Target HLA Typing を用いて HLA クラス I (HLA-A, B, C) 遺伝子型を判定した (Omixon, Cambridge, MA) [30]。各患者において同定された腫瘍特異的遺伝子変異から、その患者の MHC と結合能の高いエピトープを予測することにより、患者固有の抗原を予測することが可能である (MHC 結合予測アルゴリズム) [31, 32]。概要を述べると、まず腫瘍特異的変異アミノ酸を中心 (11 番目) とする 21mer の変異ペプチドの配列を用意した。変異ペプチドから得られる全ての 8-11mer エピトープ配列と各患者の HLA-A, B, C の組み合わせについて、解析ソフトウェア NetMHCpan (ver. 2.8) を用いて MHC 結合能を予測した [33]。予測された IC_{50} の値が 500nM 以下の場合に高結合能エピトープと判定した。それぞれの腫瘍特異的変異ペプチドについて、高結合能エピトープを有し、なおかつ当該遺伝子の FPKM 値が 1 以上で有意に発現している場合に、neoantigen 候補と判定した。

癌生殖細胞抗原 (CG antigen) については、まず CG antigen 候補の一覧を Cancer Immunity Cancer/Testis Gene Database (<http://www.cta.lncc.br/>) からダウンロードした。ダウンロードした 276 個の遺伝子のうち、今回 RNA シ

一ケンスを行った正常肺組織に関して、全 6 例において FPKM 値が 0 であった 103 遺伝子を、最終的な CG antigen の候補として以後の解析に使用した。各 CG antigen ペプチドから得られる全ての 8-11mer エピトープ配列と各患者の HLA-A, B, C の組み合わせについて、解析ソフトウェア NetMHCpan (ver. 2.8) を用いて MHC 結合能を予測した。CG antigen の各患者における抗原性については、高結合能エピトープ配列を包含し、なおかつ腫瘍組織において FPKM 値が 1 以上で有意に発現している場合に、抗原性ありと判定した。

RNA-seq データを用いた発現解析

免疫細胞浸潤の多寡を評価するにあたり、既報のごとく Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 法を用いた[34, 35]。概要を述べると、まず肺癌検体全 20 例および肺非癌部検体全 6 例について、各遺伝子の発現量 (FPKM 値) を遺伝子ごとに Z 標準化した。各サンプルにおいて、Z 変換後のスコアを用いて全遺伝子を降順に並べた。Angelova や Newman らが報告した、免疫細胞の多寡を反映する遺伝子群を使用し[35, 36]、解析ソフトウェア GSEA (v2.2.2) の PreRanked 法を用いて解析を行った。免疫細胞浸潤の多寡の評価にはまず、各サンプルにおける各遺伝子群の enrichment score (ES) を算出した。続いて遺伝子

ランダムに並び替えて 500 回 enrichment score (ES null)を計算した。これらの数値を用いて、各症例の各遺伝子群に対して、標準化 enrichment score (normalized enrichment score; NES)および false discovery rate (FDR; q 値)を計算した。既報にならい、FDR が 10%未満の場合に免疫細胞の浸潤度合が今回のコホートにおいて有意に多い、または少ないと判定した[35]。

使用した遺伝子群の内容を表 2 に示す。なお、既報の遺伝子群が存在しない場合は、癌免疫サイクルのステップを反映する代表的な遺伝子のリストを文献[22]をベースに作成した。正常肺組織における各遺伝子の発現値の平均を基準とし、腫瘍における発現値を \log_2 fold-change (\log_2 FC) に変換し、腫瘍における各遺伝子の発現が亢進または低下しているかどうかを評価した。

表 2 Immunogram Score 算出に使用した遺伝子群

	Genes
T cells	BATF, BTLA, CCL11, CCL17, CCL22, CCL3, CCL5, CCL7, CCR1, CCR3, CCR4, CCR8, CD1A, CD1B, CD1C, CD1D, CD1E, CD247, CD28, CD3D, CD3E, CD3G, CD69, CD8A, CXCR1, CXCR4, CXCR5, CXCR6, FGF2, FLT3, FOSL1, GRAP2, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HRH2, IFNG, IL10, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL18R1, IL18RAP, IL1B, IL21, IL21R, IL24, IL26, IL27, IL2RA, IL6, IL7, IRF4, IRF8, ITGAL, ITK, JAK2, JAK3, LAIR1, LAT, LAX1, LCK, LCP2, LILRA3, LILRA4, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, MS4A4A, NAPS, NFATC1, NFKB2, P2RY14, PIK3CD, POU2F2, PRF1, RUNX3, SPI1, STAT1, STAT4, TNF, TPRG1, TSLP, UBASH3B, ZAP70

Activated DC	PLA1A, HESX1, MMP12, TNFAIP6, MSC, CCL8, DHX58, IDO, RSAD2, IFI44L, HTR2B, PTGIR, TREM2, ST3GAL6, CYP27A1, FAM70A, KYNU, RASSF4, IL2RA, SLC2A6, CCL5, CD80, FPR3, SLC15A3, CD86, PDCD1LG2, CXCL10, CXCL11, TNFRSF4, EBI3, ARHGAP22, PLA2G7, CCL18, LAMP3, SIGLEC1, CCL1, CCL13, NR4A3, CLIC2, BIRC3, CCL20, TNFRSF11A, IL12B, CCL19, CCR7, CD1E, CD1B, CCL17, CCL22, SLCO5A1, ETV3, CHST7, MAP3K13
Treg	CCL19, CD34, CD72, CTLA4, FOXP3, GADD45B, GEM, IL1RL1, IL9R, MADCAM1, MYH10, NCF2, RCSD1, RYR1, SELE, SELP, SFRP1, SIT1, TIGIT, TLR10, TLR2, TLR7, TLR8, TRAF1, WIPF1, TGFB1
MDSC	ADORA3, AG2, ARG1, BIN2, C1orf162, CAPS, CD117, CD11B, CD11C, CD124, CD14, CD15, CD163L1, CD1D1, CD21, CD23, CD274, CD31, CD35, CD40, CD43, CD44, CD66B, COX2, CR2, CTR9, EBP, FAM48A, FAM70B, FCER2, FCGRT, FERMT3, FLOT1, FLT1, GIMAP7, GLI4, GNA15, GPR34, GPSM3, HLA-DR, IDO, IKZF1, IL12, IL13, IL18BP, IL1R, INPP5D, ITGA3, KDR, KRIT1, LGALS3, MGAT4A, NAIP, NEK3, NFSF13, NOG, PARVG, PDRG1, PECAM1, PIK3R5, PPP1R2P4, PSAP, PTGES2, PTPRE, RNASE1, RP11, S100A8, S100A9, SELPLG, SLA, SLC36A1, SLC44A1, ST8SIA4, STAT3, STAT6, TBXAS1, TFGFB1, TFGFB2, TFGFB3, TFGFB5, TFRC, TPP1, VTCN1
Trafficking & infiltration	CXCL9, CXCL10, CCL5, CX3CL1, LFA1, ICAM1, SELE
Recognition of tumor cells	HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M, TAP1, TAP2
Immune checkpoints	PD-1, BTLA, TIM-3, LAG3, CTLA4, PD-L1, VISTA
Other inhibitory molecules	IL10, IDO1, TGFB1, ARG1, INOS, CTNNB1

免疫染色を用いた免疫細胞浸潤の評価

ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを用いて、CD3⁺ T 細胞および Foxp3⁺ 制御性 T 細胞 (Treg) の腫瘍浸潤を評価した。抗体はウサギポリクローナル抗ヒト CD3 抗体 (Dako, Carpinteria, CA) およびマウスモノクローナル抗ヒト Foxp3 抗体 clone236A/E7 (AbCam, Cambridge, United Kingdom) を使用した。各切片はヘマトキシリンで対比染色した。BIOREVO-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて各切片をデジタルイメージング化し、BZ-II Analyzer image analysis software (Keyence) を用いて、陽性染色面積を定量化した。

統計解析

GSEA 法を用いて遺伝子発現値から推測した免疫細胞浸潤度 (NES) と、免疫染色陽性面積の比較には、Spearman 順位相関解析を行った。各症例における neoantigen 候補数 (neoantigen load) と抗原性を有する CG 抗原発現数 (immunogenic CG antigen load; imCG-Ag load) の比較には、非正規性および 0 値の扱いに対応するべく、 $\log(x + 1)$ 変換後の値を用いて Welch の両側 t 検

定を行った。P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。階層的クラスタ解析を行う際は、後述するイムノグラムスコア (Immunogram Score; IGS) の計算過程で得られた Z スコアを用いて、Euclidean 距離行列を作成し、complete 法による類似性の評価し、ヒートマップおよび樹形図を作図した。統計解析および作図には、統計解析ソフトウェア R 3.3.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [<http://www.r-project.org>]) または JMP Pro 13 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を使用した。

結果

非小細胞肺癌に対する手術症例 20 例に対して解析を行った。患者背景について表 3 に示す。20 例のうち、12 例が腺癌であり、そのうち 7 例で EGFR 遺伝子変異を認めた。ALK 融合遺伝子は 1 例からも検出されなかった。肺癌に対する術前化学放射線治療を受けた症例はいなかった。悪性腫瘍の既往のある患者が 9 例いたが、そのうち 3 例で別の肺癌に対する手術治療歴を認めた。この 3 例において今回の肺癌は、病理所見や画像経過などから、既往の肺癌の転移再発ではなく、異時性多発癌と診断された。術後観察期間は中央値 42 カ月（範囲 6–53 カ月）だった。手術時に pStage IV だった 1 例は、術後 6 カ月で原病死した (LK056)。術後 3 年以内に再発した症例は 5 例であり (LK001、LK004、LK047、LK051、LK070)、いずれも pStage II または III だった。この 5 例のうち 2 例は術後 3 年以内に原病死した (LK001、LK004)。無再発ながら 19 カ月の時点で肺炎のため死亡した症例が 1 例いた (LK071)。残りの 13 例は、術後 3 年の時点で無再発生存していたが、このうち 1 例は術後 48 カ月の時点で胸膜播種再発と診断された (LK010)。pStage I の 5 例は、観察期間中（中央値 42 カ月、範囲 36–52 カ月）全例が無再発生存していた (LK013、LK029、LK044、LK073、LK075)。

表 3 患者背景

	年 性 齡 別	喫煙歴 (Pack- Year)	悪性腫瘍 の既往	組織型	EGFR 遺伝子 変異	病理病期 (TNM 第 7 版)	転帰 (術後 3 年)
LK001	78 M	116	(-)	AD	(-)	T1bN1M0-IIA	原病死
LK004	80 F	0	(-)	AD	19del	T2aN2M0-IIIA	原病死
LK005	76 M	114	胃癌	LCNEC	(-)	T2bN1M0-IIB	無再発 生存
LK010	71 F	0	(-)	AD	E709G, L858R	T1bN2M0-IIIA	無再発 生存*
LK012	66 M	46	(-)	SQ	(-)	T3N0M0-IIB	無再発 生存
LK013	34 F	0	肺癌(AD)	AD	19del	T1bN0M0-IA	無再発 生存
LK029	78 M	60	(-)	SQ	(-)	T1bN0M0-IA	無再発 生存
LK044	73 F	0	(-)	AD	19del	T2aN0M0-IB	無再発 生存
LK047	41 M	21	(-)	AD	L858R	T1bN2M0-IIIA	再発 (生存)
LK049	65 M	111	肺癌(SQ)	AD	(-)	T2aN1M0-IIA	無再発 生存
LK051	70 M	112	肺癌(AD)	AD	E709V, L858R	T2aN2M0-IIIA	再発 (生存)
LK053	59 F	0	(-)	AD	(-)	T2bN2M0-IIIA	無再発 生存

LK056	81	M	56	(-)	AD	(-)	T2bNxM1-IV	原病死 無再発
LK059	75	M	28	(-)	AD	(-)	T2bNOM0-IIA	生存 無再発
LK060	65	M	62	(-)	SQ	(-)	T2aN1M0-IIA	生存 無再発
LK066	81	M	80	膀胱癌	SQ	(-)	T2bNOM0-IIA	生存 再発
LK070	67	M	71	直腸癌	SQ	(-)	T3NOM0-IIB	(生存) 他病死
LK071	79	F	10	胃癌	SQ	(-)	T1aN2M0-IIIA	(無再発)
LK073	67	M	40	胃癌	AD	Q701L, L858R	T2aNOM0-IB	無再発 生存
LK075	81	M	70	リンパ腫	SQ	(-)	T1aNOM0-IA	無再発 生存

M, 男性; F, 女性; AD, 腺癌; LCNEC, 大細胞神経内分泌癌; SQ, 扁平上皮癌;
19del, exon19 deletion

*, 術後48カ月の時点で再発あり

本研究では、Cancer-Immunity Cycle の各ステップの状態を患者ごとに評価し可視化するために、“Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle” を開発した。Immunogramの作成にあたり、各患者の癌免疫状態を、8個のImmunogram Scores (IGS) で評価した： IGS1. T細胞の多寡、IGS2. 腫瘍の抗原性、IGS3. T細胞のプライミング・活性化、IGS4. T細胞の遊走・浸潤、IGS5. T細胞によ

る腫瘍の認識、IGS6. 抑制性免疫細胞（Treg, 骨髄性抑制細胞;MDSC）の有無、IGS7. チェックポイント分子の発現の有無、IGS8. その他の抑制性因子の有無。Cancer-Immunity Cycle は T 細胞性免疫応答の惹起において重要な概念であるが、このことをふまえて T 細胞の多寡を immunogram の第 1 軸に据えた。

第 1 軸 (Immunogram Score 1; IGS1) T 細胞の多寡

網羅的遺伝子発現データから T 細胞浸潤の多寡を推量するにあたり、T 細胞の多寡を反映する 86 個の遺伝子からなる既報の遺伝子群 (T cell gene set) を使用した。正常肺の発現平均値を基準にした腫瘍内での各遺伝子の発現値をヒートマップで表現したものを図 6 に示す。

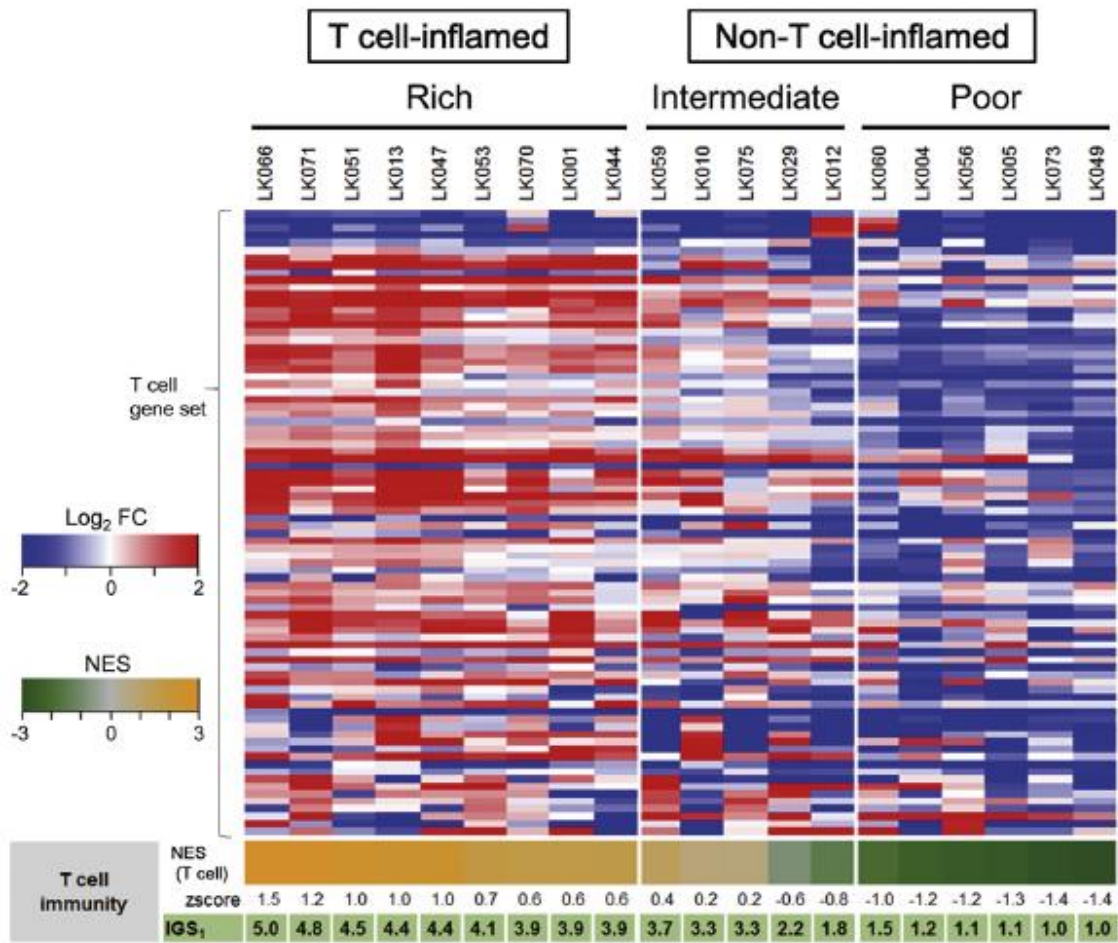


図6 T cell gene set に含まれる各遺伝子の発現量を表したヒートマップ、および IGS1 (腫瘍浸潤 T 細胞の多寡) の計算結果

T cell gene set を用いて、GSEA PreRanked 法 (以下、GSEA 法) によって T 細胞浸潤の多寡をスコア化した。GSEA 法について概要を述べると、まず各遺伝子の発現量 (FPKM 値) を、解析コホート内で遺伝子ごとに Z 標準化する。Z 標準化した遺伝子発現値に従って、症例ごとに降順に全遺伝子を並べ直し Ranked gene list を作成する。並べ直した遺伝子について、解析対象 gene set 内に一

致するものがあるかどうか順に判定していき、一致するものがあれば加点、なければ減点することで点数を増減させていく。全遺伝子についての判定が終了した時点までで、最も高かった（低かった）累積値を enrichment score (ES) として算出する。さらに、遺伝子をランダムに並び替えて同様の計算を繰り返し実施した場合の算出値と比較することで、ES を標準化し、Normalized enrichment score (NES) に変換する。GSEA 法で得られた enrichment plot の一例を図 7 に示す。

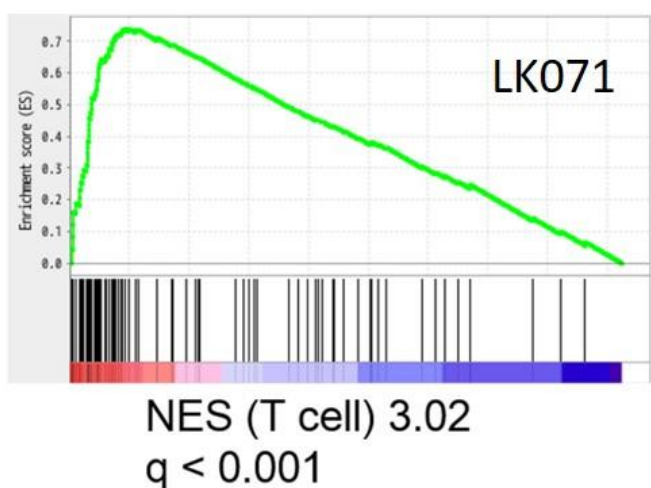


図 7 Enrichment plot (T cell) の一例 (LK071 ; T cell-rich 型)

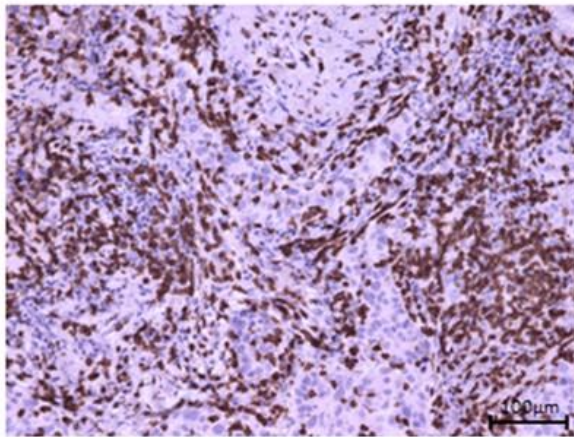
図 7 において、上段は enrichment plot を表わし、下段は Ranked gene list を表わす。Ranked gene list では相対的に発現の高い遺伝子から順に左から並んでおり、T cell gene set に含まれる 86 個の遺伝子のみが黒線で表されている。その他のすべての遺伝子は白線で表されている。Ranked gene list の左

から順に、各遺伝子が T cell gene set に含まれているかどうか判定し、下段が黒線の時 (T cell gene set に含まれている時) は加点し、白線に時は減点する、というルールに従って上段の enrichment plot を作図する。加点減点の大きさや順位による重みづけに関しては、default の設定を使用した。

全 20 例のうち、9 例において T 細胞が有意に多いと判定された (NES>0 かつ q 値<0.1; T cell-rich 型)。また、T 細胞が有意に少ないと判定されたのは 6 例だった (NES<0 かつ q 値<0.1; T cell-poor 型)。残りの 5 例を T cell-intermediate 型に分類した。また、既報に従い、T cell-rich 型を T cell-inflamed 型と定義し、残りの症例 (T cell-intermediate または T cell-poor) を non-T cell-inflamed 型と定義した [35]。

GSEA 法による T 細胞浸潤推量の妥当性について、免疫染色を行って検証した。抗 CD3 抗体染色写真の一例を図 8 に示す。結果、NES (T cell) と CD3⁺面積は高度に相関することが確認された ($r = 0.83$, $p < 0.0001$) (図 9)。

LK071



CD3+ 13850 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$

図8 抗CD3抗体染色写真の一例 (LK071 ; T cell-rich 型)

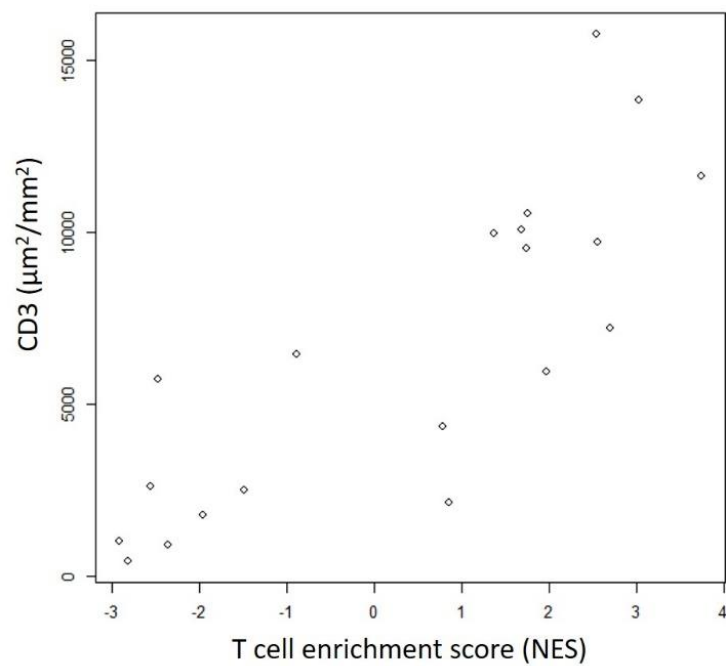


図9 GSEA 法による T 細胞浸潤スコア (NES) と抗 CD3 抗体染色結果の比較

NES と CD3⁺ 面積は高度に相関した ($r = 0.83$, $p < 0.0001$)

Immunogram の作図にあたり、各評価軸は1～5点からなる Immunogram Score (IGS)によって表現した。第1軸の評価 (IGS1) にあたっては、まずT細胞浸潤の NES を全20例においてZスコア変換した。つまり、20例の NES の平均値をMとし、標準偏差をSDとした場合、各症例における IGS のためのZスコアを

$$Z = (NES-M)/SD$$

によって得た。そして、IGS1 を以下の式を用いて定義した

$$IGS1 = 3 + 1.5 * Z$$

IGS=1 から IGS=5 の間に患者を適度に分散させるため、このように IGS を定義した。また、下限と上限はそれぞれ1、5と定義した。NES が平均値と同じ場合 IGS=3 となる。また IGS=4.5 および IGS=1.5 はそれぞれ、NES が平均+1SD または平均-1SD だったことを表わす。他の評価軸においても同様に本式を用いて IGS を計算した。

例えば、LK071 では NES (T cell) = 3.02 であり、20例の中での NES (T cell) の Zスコアは 1.17 だった。従って、 $IGS1 = 3 + 1.5 * 1.17 = 4.76$ と計算された。全症例における IGS1 の値を図6最下段に記した。

第2軸 (IGS2) 腫瘍の抗原性

腫瘍の抗原性の評価には、neoantigen 候補数(neoantigen load)と抗原性を有する CG 抗原発現数 (imCG-Ag load) を使用した。各患者における neoantigen load と imCG-Ag load を図10に示す。Neoantigen load の中央値は T cell-inflamed 型で 23 (範囲 3-183)であり、non-T cell-inflamed 型で 71 (範囲 31-301) だった (p=0.053, 対数変換後に Welch の t 検定を実施)。また imCG-Ag load の中央値は T cell-inflamed 型で 1 (範囲 0-11)であり、non-T cell-inflamed 型で 4 (範囲 1-29) だった (p=0.14)。Neoantigen load と imCG-Ag load の合算値を各患者の腫瘍抗原候補の数とみなし、それを Z スコアに変換した後、IGS1 と同様の式を用いて IGS2 に変換した。

		T cell-inflamed								Non-T cell-inflamed											
		Rich				Intermediate				Poor											
		LK066	LK071	LK051	LK013	LK047	LK053	LK070	LK001	LK044	LK059	LK010	LK075	LK029	LK012	LK060	LK004	LK056	LK005	LK073	LK049
Antigenicity	Neo-antigens	3	81	23	110	17	15	44	183	8	301	70	59	31	85	82	71	43	273	32	127
	imCG antigens	5	11	0	1	1	1	7	5	0	4	1	3	7	19	29	1	1	24	1	15
	zscore	-0.9	0.0	-0.8	0.2	-0.8	-0.9	-0.4	1.1	-0.9	2.5	-0.2	-0.3	-0.6	0.2	0.2	-0.2	-0.5	2.4	-0.7	0.6
	IGS ₂	1.6	3.0	1.8	3.4	1.8	1.7	2.3	4.7	1.6	5.0	2.7	2.5	2.1	3.2	3.4	2.7	2.2	5.0	2.0	3.9

図10 Neoantigen 数、immunogenic cancer-germline antigen 数および、IGS2 の計算結果

第3軸 (IGS3) T細胞のプライミング・活性化

T細胞のプライミング・活性化を間接的に評価するために、活性化樹状細胞の多寡を反映する遺伝子群 (Activated DC gene set) を用いて、GSEA法でNESとq値を算出した[35]。Activated DC (aDC) gene setの各遺伝子の発現値をヒートマップで表現したものを図11に示す。

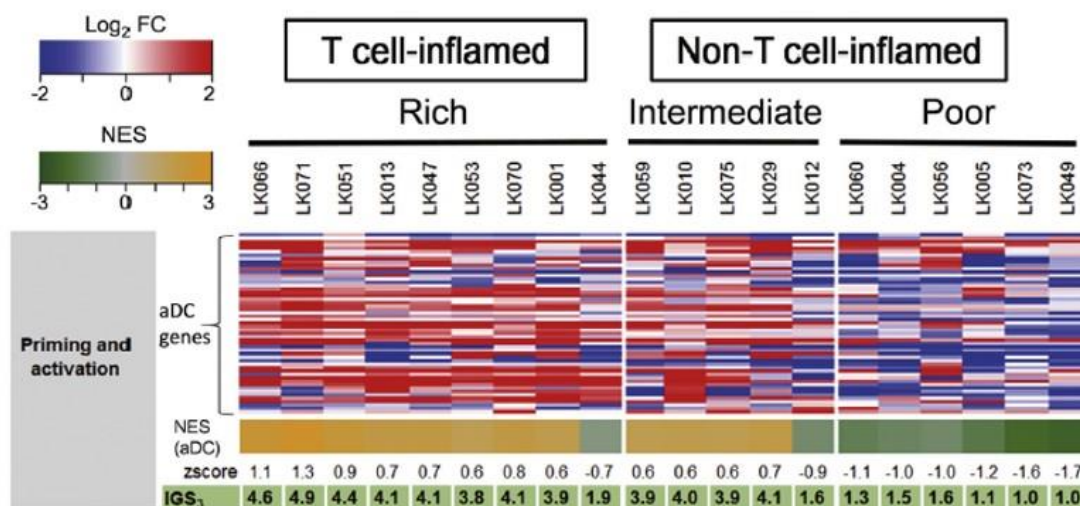


図11 Activated DC gene setに含まれる各遺伝子の発現量を表したヒートマップ、およびIGS3 (プライミングと活性化) の計算結果

11例で活性化樹状細胞が有意に多く浸潤しており、この11例は第1軸(IGS1)の評価においてT cell-rich (inflamed) 型 (LK001, LK013, LK047, LK051, LK053, LK066, LK070, LK071) またはT cell-intermediate型 (LK029, LK059, LK075) と判定された症例だった。IGS3の算出はIGS1と同様に行った。

第4軸 (IGS4) T細胞の遊走・浸潤

T細胞の遊走・浸潤を反映する既報の遺伝子群は、調べ得る範囲では存在しなかった。Cancer-Immunity Cycleについて論じた総説(文献[22])を参考とし、CXCL9, CXCL10, CCL5, CXCL1, LFA1, ICAM1, SELEの7つの遺伝子を含む遺伝子リストを作成し、T細胞の遊走・浸潤に関連する蛋白やケモカインとして解析に用いた。各症例において、腫瘍における遺伝子の発現量が正常肺組織における発現量の平均値と比較して2倍以上だった場合($\log_2FC \geq 1$)に、発現亢進と判定した。発現亢進遺伝子の数についてZ変換した後、これまでの軸と同様にしてIGS4を算出した。ヒートマップおよびIGS4の計算結果を図12に示す。

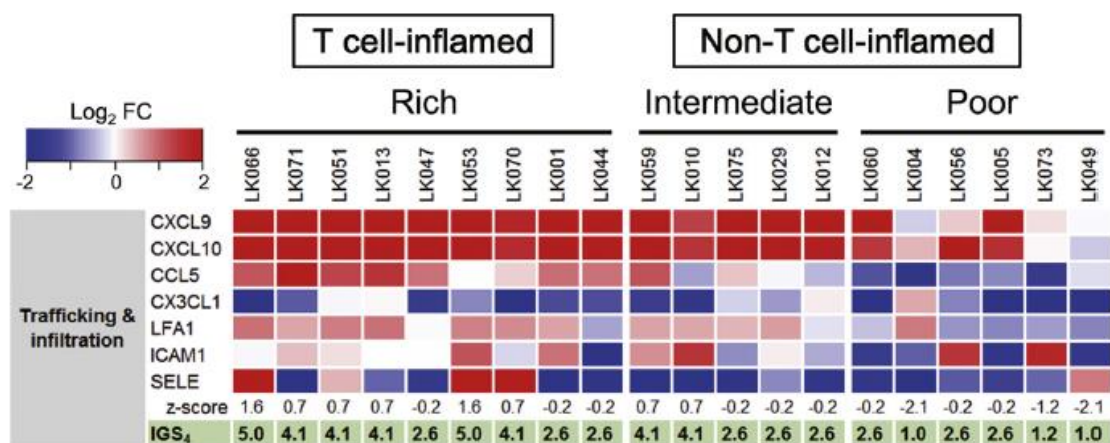


図12 IGS4 (遊走と浸潤)に関連する遺伝子発現、およびIGS4の計算結果

第5軸 (IGS5) T細胞による腫瘍の認識・抗原提示

T細胞が腫瘍を認識するためには antigen processing および antigen presentation に関連する遺伝子の発現が正常に保たれていることが必要である。Antigen processing に必要な TAP1, TAP2 および antigen presentation に必要な HLA-A、B、C、そして β 2microglobulin (B2M) を含む遺伝子リストを作成した。遺伝子発現のヒートマップを図13に示す。

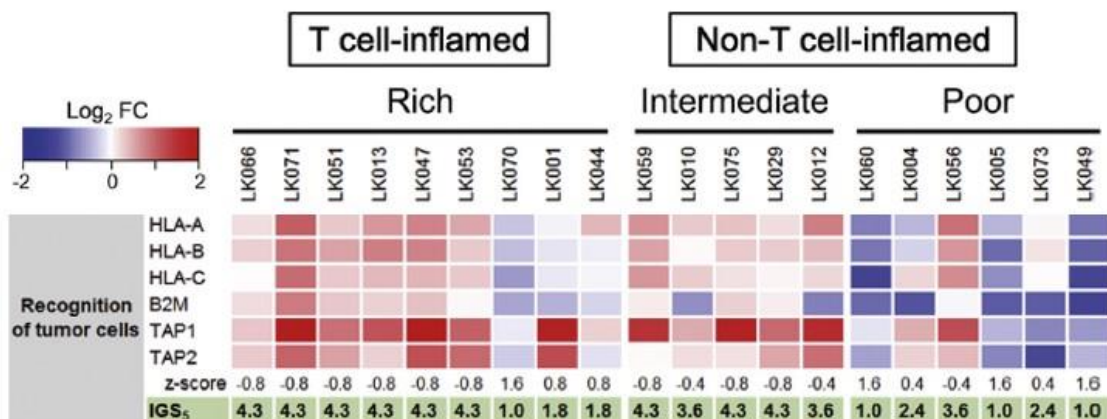


図13 IGS5 (T細胞による腫瘍の認識) に関連する遺伝子の発現および IGS5 の計算結果

抗原提示に必要なこれらの遺伝子は、正常組織においても本来一定量発現しているが、腫瘍によってはこれらの遺伝子の発現が低下することで癌免疫が機能しにくくなることが知られている。そこで、これらの遺伝子の腫瘍における発現

量が正常肺組織における発現量の平均値と比較して低下している場合 ($\log_2FC \leq 0$) に発現低下と判定し、発現低下している遺伝子の数について Z 変換を行った。Antigen processing および presentation に関連した遺伝子が発現低下している場合、Cancer-Immunity Cycle の状態としては不利であると考えられる。したがって、第 5 軸については以下の式で IGS を定義した。

$$IGS5 = 3 - 1.5 * Z$$

IGS5 の値が大きいことは、すなわち antigen processing および presentation に関連した遺伝子の発現低下が少ないことを表わすことに注意する。

第 6 軸 (IGS6) 抑制性免疫細胞 (Treg、MDSC) の有無

第 6 軸から第 8 軸では、Cancer-Immunity Cycle における最終ステップである「T 細胞による腫瘍細胞への攻撃」において、抑制的に作用する因子を評価した。まず、第 6 軸では、腫瘍微小環境において免疫抑制的に作用する細胞として、制御性 T 細胞 (Treg) および骨髄性抑制細胞 (MDSC) の浸潤を評価した。Treg および MDSC の浸潤の多寡については、既報の遺伝子群を用いて、GSEA 法で NES を算出した [35, 36]。関連する遺伝子発現のヒートマップを図 1 4 に示す。

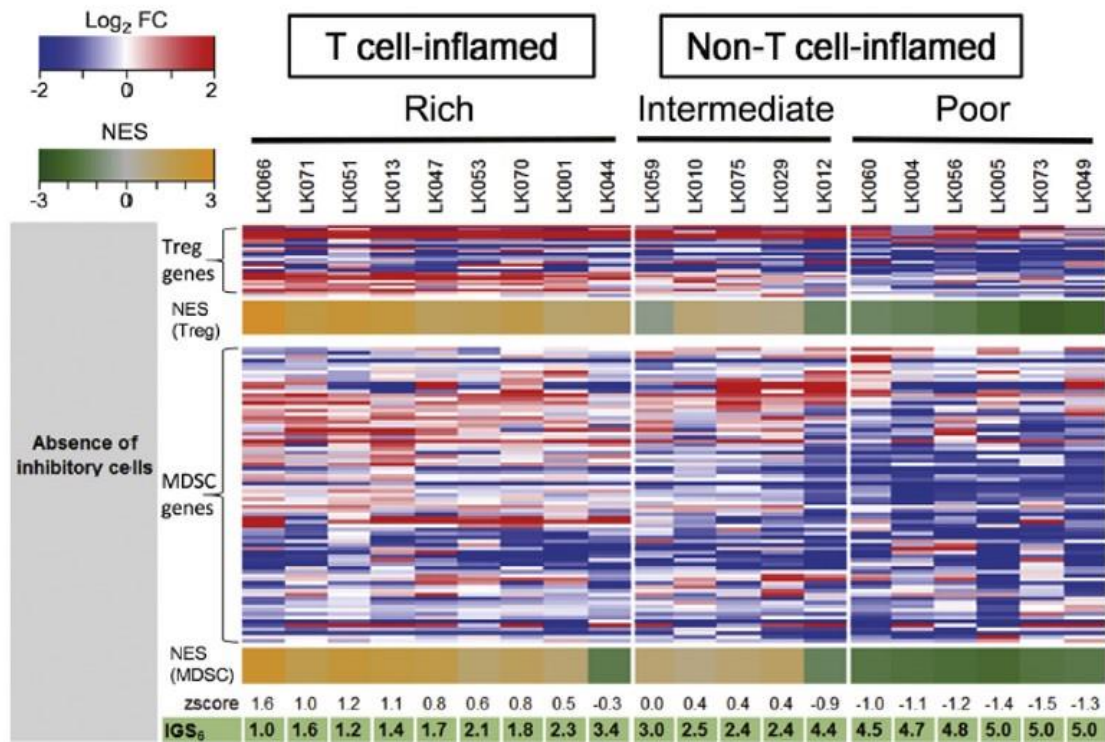


図14 Treg gene set およびMDSC gene set に含まれる各遺伝子の発現を表したヒートマップおよび IGS6 の計算結果

Treg の NES と MDSC の NES の和を求め、その値を Z 変換したのち、IGS6 を以下の式で定義した。

$$IGS6 = 3 - 1.5 * Z$$

IGS6 の値が小さいことは、Treg や MDSC という抑制性細胞の浸潤が多いことによって、癌免疫が抑制されていることを表わす。IGS6 計算結果を図 14 下段に示した。

また、Treg の浸潤については、免疫染色を行い Foxp3 陽性染色面積と GSEA 法による NES(Treg) の値を比較した。それぞれの一例を図 1 5 に示す。

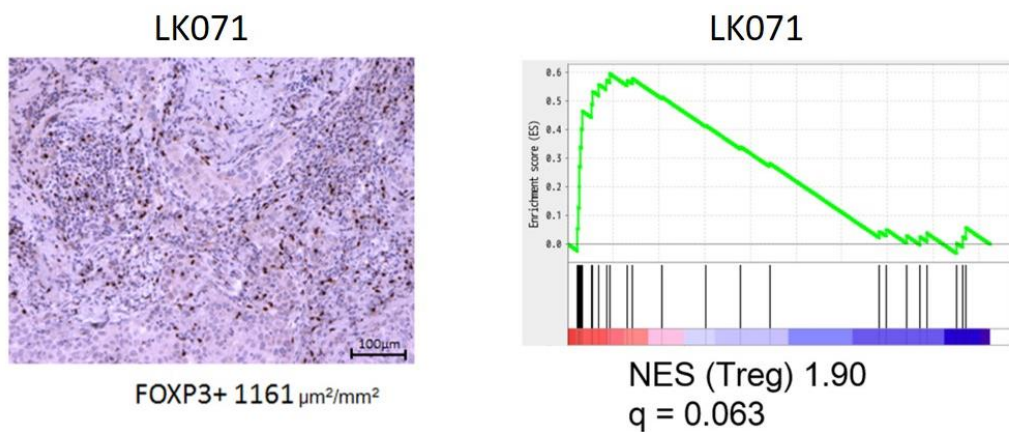


図 1 5 抗 Foxp3 抗体染色 (左) および Treg enrichment plot (右)

20 例で NES (Treg) の値と Foxp3⁺染色面積を比較したところ、これらは高度に相関することが確認された ($r = 0.75$, $p = 0.0002$) (図 1 6)。

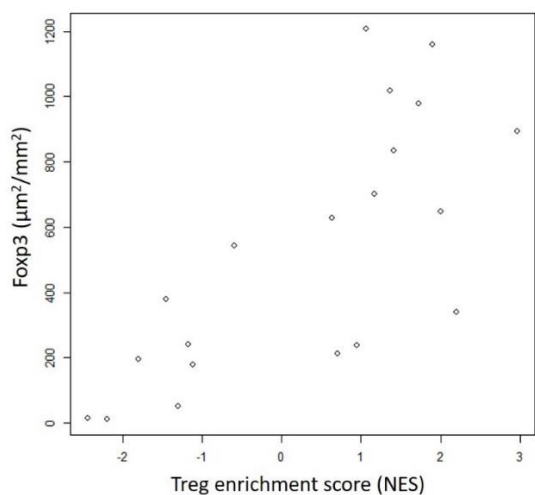


図 1 6 GSEA 法による Treg 浸潤スコア (NES) と抗 Foxp3 抗体染色の比較

NES と CD3⁺ 面積は高度に相関した ($r = 0.75$, $p = 0.0002$)

第7軸 (IGS7) チェックポイント分子発現による免疫抑制

T 細胞による免疫応答はチェックポイント分子の発現によって抑制される。第4軸と同様に文献 [22]に提示された分子をベースとし、PD-1、BTLA、TIM-3、LAG3、CTLA-4、PD-L1、VISTA を含むチェックポイント分子からなる遺伝子リストを作成し、第7軸の評価に用いた。ヒートマップを図17に示す。

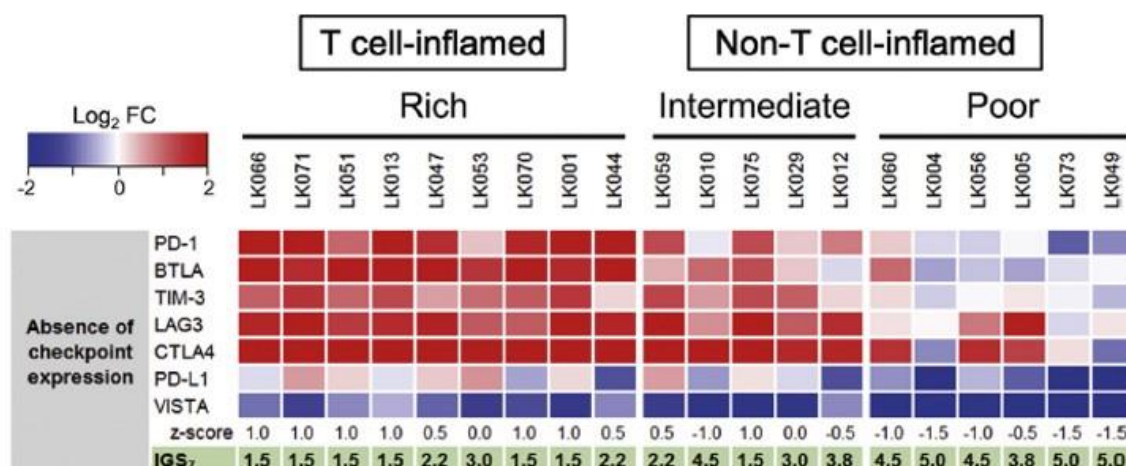


図17 IGS7 (チェックポイント分子による抑制) に関連する遺伝子の発現、および IGS7 の計算結果

各症例において、腫瘍における遺伝子発現量が正常肺組織における発現量の平均値と比較して2倍以上だった場合 ($\log_2 FC \geq 1$) に、発現亢進と判定した。発現亢進した遺伝子の数をZ変換し、IGS7を以下の式で定義した。

$$\text{IGS7} = 3 - 1.5 * Z$$

腫瘍においてチェックポイント分子の発現が亢進している場合、IGS7 は小さい値となり、癌免疫が抑制されていることを反映する。IGS7 の計算結果を図 17 下段に示した。

第 8 軸 (IGS8) その他の抑制性分子の発現による免疫抑制

腫瘍微小環境において、チェックポイント分子以外にも抑制的に働く分子がいくつか存在する。ARG1、IDO1、INOS などの分子は、代謝に関与して免疫抑制的に作用する。また、IL-10 や TGF β などの可溶性分子も免疫抑制的に作用する。CTNFB1 の過剰発現が免疫抑制性の微小環境構築に影響することも注目されている。第 4 軸、第 7 軸と同様に文献 [22] に提示された分子をベースとしつつ、癌免疫研究における最近の知見を統合し、チェックポイント分子以外の免疫抑制性分子に関する遺伝子リストを作成した。これら免疫抑制性分子に関するヒートマップを図 18 に示す。

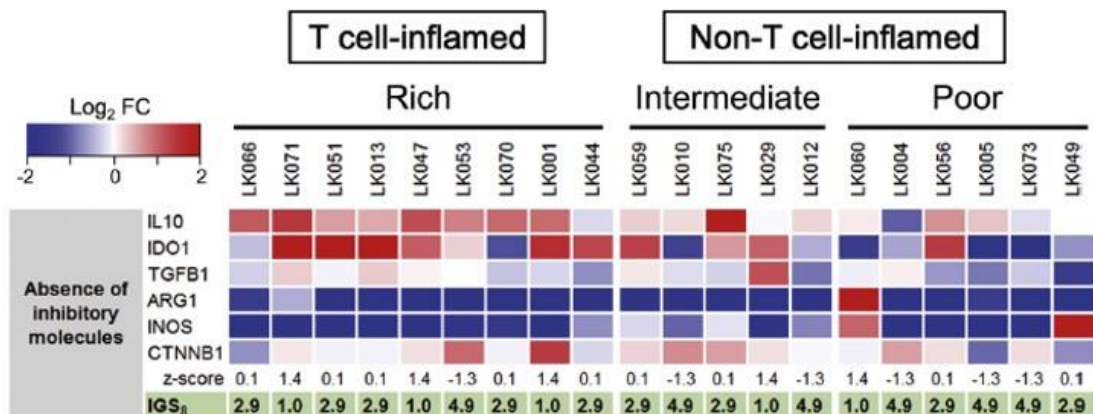


図 1 8 IGS8（その他の抑制性分子による抑制）に関連する遺伝子の発現および IGS8 の計算結果

これらの免疫抑制性分子について、腫瘍において過剰発現 ($\log_2FC > 1$) している数を計上し Z 変換した後、IGS6 や IGS7 と同様に

$$IGS8 = 3 - 1.5 * Z$$

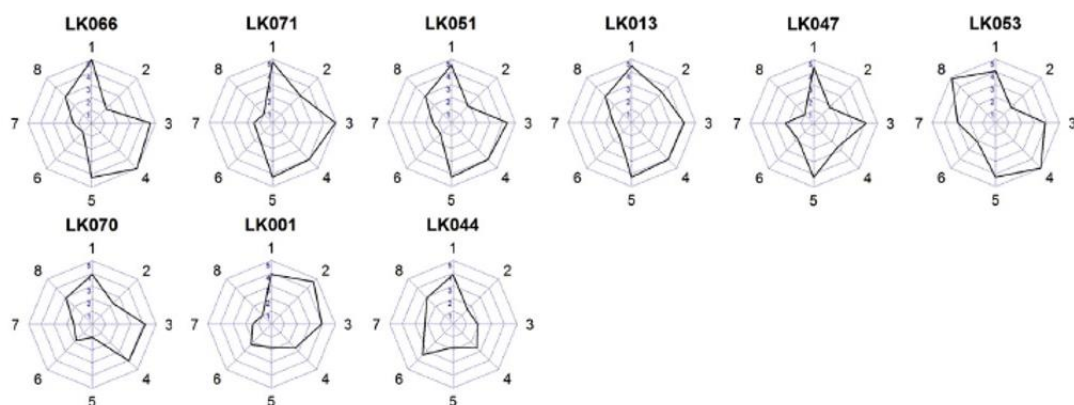
の式で IGS8 を定義した。IGS8 の計算結果を図 1 8 下段に示した。

肺癌患者全 20 例の immunogram

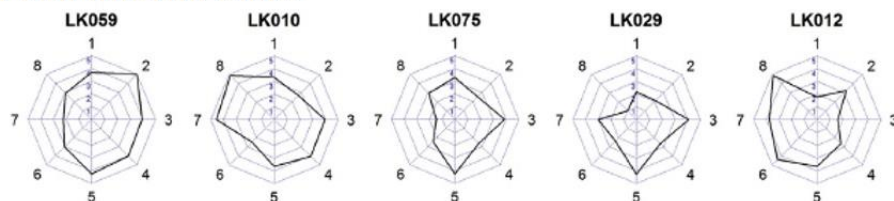
Cancer-Immunity Cycle の各ステップに関連した以上の 8 本の評価軸 (IGS1-8) からなるレーダーチャートを描画し、一人一人の患者の Cancer-Immunity Cycle の状態を表現する “Immunogram for the Cancer-Immunity

cycle”を作成した。全20例のimmunogramを図19に示す。20例の患者におけるimmunogramはそれぞれ多様なパターンを示しており、患者毎に多彩な腫瘍内免疫応答が生じていることが確認された。

T cell-rich



T cell-intermediate



T cell-poor

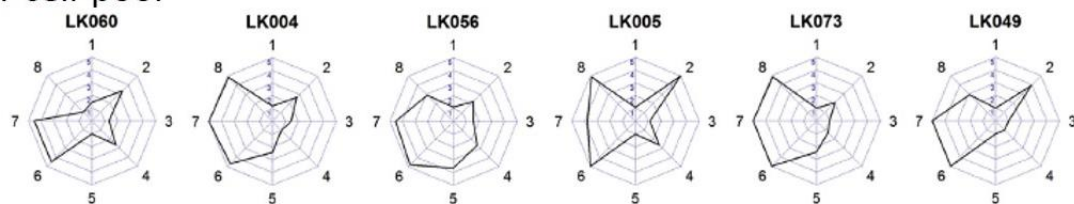


図19 非小細胞肺癌患者20例のimmunogram

誰一人として同じimmunogramを呈することはなく、腫瘍内における免疫応答は一人一人異なることが示唆された。1, T細胞の多寡; 2, 腫瘍の抗原性; 3, T細胞のプライミング・活性化; 4, T細胞の遊走・浸潤; 5, T細胞による腫瘍の認識; 6, 抑制性免疫細胞の有無; 7, チェックポイント分子の発現の有無; 8, その他の抑制性因子の有無

Immunogram を用いた腫瘍内免疫応答の解析

一人一人の immunogram は皆異なる形を示したが、その中でも特徴的なパターンや共通点の有無について探索した。その結果、T 細胞浸潤の多寡 (IGS1) に注目して腫瘍を分類したところ、いくつかの特徴的なパターンが描出された。

(図 20)。

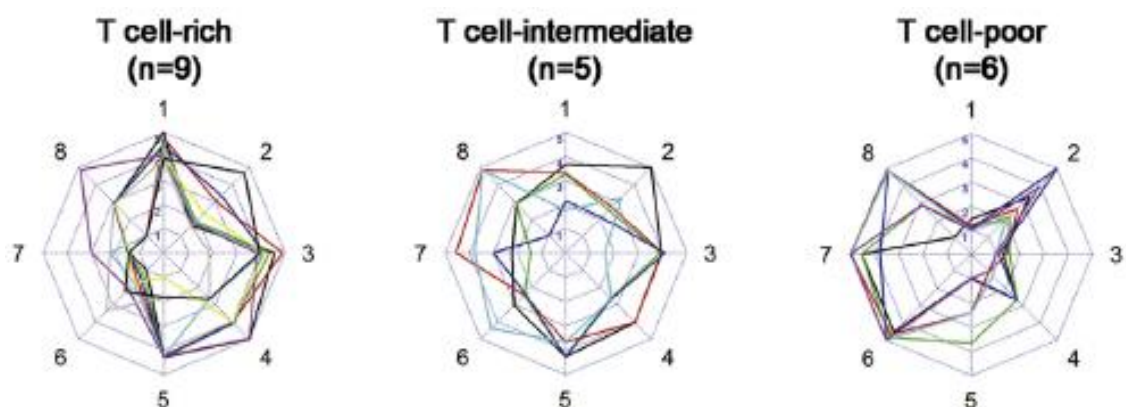


図 20 T 細胞浸潤の多寡で症例を分類した場合の immunogram の重ね合わせ

1, T 細胞の多寡; 2, 腫瘍の抗原性; 3, T 細胞のプライミング・活性化; 4, T 細胞の遊走・浸潤; 5, T 細胞による腫瘍の認識; 6, 抑制性免疫細胞の有無; 7, チェックポイント分子の発現の有無; 8, その他の抑制性因子の有無

T cell-rich (inflamed)型では、IGS1(T cell の多寡)が高いことに加えて、IGS3(活性化樹状細胞の浸潤)、IGS4 (T 細胞遊走・浸潤)、IGS5 (腫瘍抗原の認

識)が高かった。一方で、IGS6(抑制性免疫細胞による抑制),IGS7(チェックポイント分子による抑制)のスコアが低く、抑制性細胞の浸潤やチェックポイント分子の発現亢進によって腫瘍免疫応答が拮抗性に抑制されていた。反対に、T cell-poor 型では IGS3(活性化樹状細胞の浸潤)、IGS4(T細胞遊走・浸潤)、IGS5(腫瘍抗原の認識)が総じて低く、IGS6(抑制性免疫細胞による抑制),IGS7(チェックポイント分子による抑制)、IGS8(その他の抑制性因子による抑制)のスコアは比較的高く保たれていた。このタイプでは IGS2(抗原性)は比較的高く保たれている症例が多かったものの、IG3(プライミング・活性化)が全例で低値であり、T細胞のプライミングの段階で Cancer-Immunity Cycle が障害されることが予測された。T cell-intermediate 型では、rich 型と poor 型の症例が混ざっていた。

IGS の計算過程で算出したそれぞれの Z スコアを用いて階層的クラスタ解析を行ったところ、20 例の患者は 2 つのクラスターに分かれた(図 2 1)。T cell-rich 型と T cell-poor 型の症例は、別個のクラスターに含まれていた。また、評価項目も 2 つのクラスターに分かれた。一つは IGS2(抗原性)と IGS5(腫瘍細胞の認識)という腫瘍側の抗原提示に関連した性質を反映するクラスターであり、もう一つは T 細胞側の性質を反映するクラスターだった。

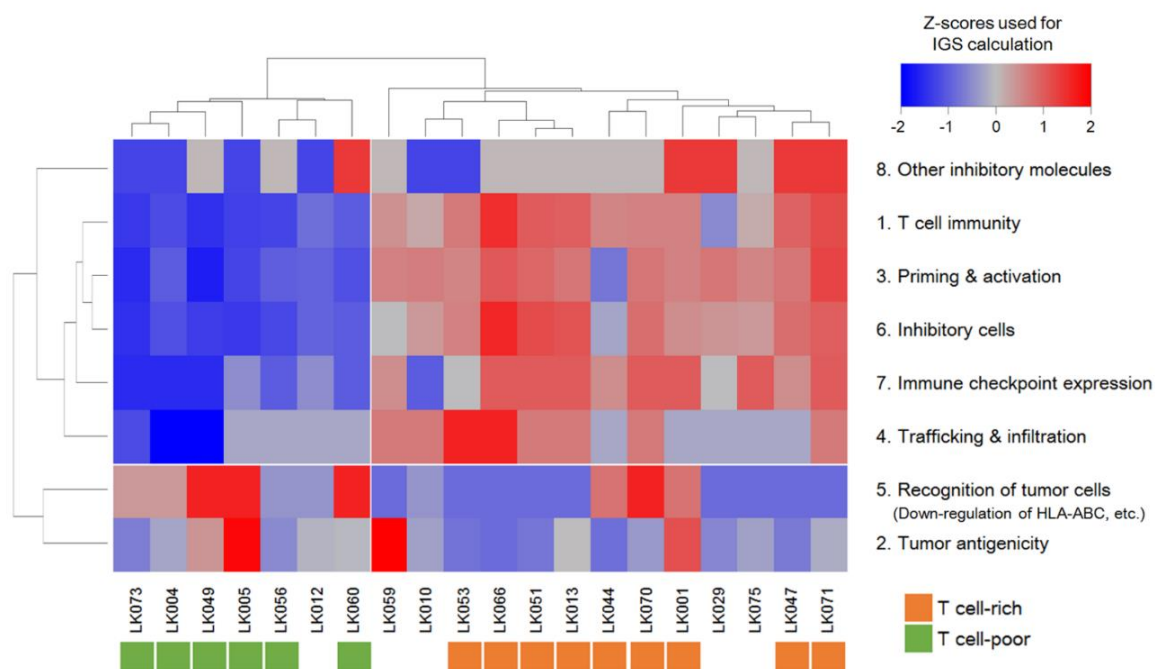


図 2 1 Immunogram score 計算過程で生じた Z スコアを用いたクラスター解析

なお、図 2 1 のクラスター解析に用いた Z スコアは各 IGS を計算する過程で算出された数値であり、その値の大小が各評価軸で扱う分子の発現量や免疫細胞の浸潤量と正に相関するわけではないことに注意する。例えば、IGS7(チェックポイント分子の発現による免疫抑制の有無)を評価する際には、チェックポイント発現が高い場合に Z スコアが大きくなり、IGS は小さい値になるように計算式を定義した ($IGS7=3 - 1.5 * Z$)。また、IGS5(腫瘍細胞の認識)を評価する際は、正常肺と比較して発現低下した抗原提示関連遺伝子の数を計上し、Z スコアに変換した上で、 $IGS5=3 - 1.5 * Z$ の式によって IGS を算出しており、抗原提示関連遺伝子発現の高さと Z スコアは逆相関していることに留意する。

一方、組織型ごとに immunogram を重ねた場合は、いずれの組織型においても T cell-rich 型 および-poor 型が混在していた (図 2 2)。

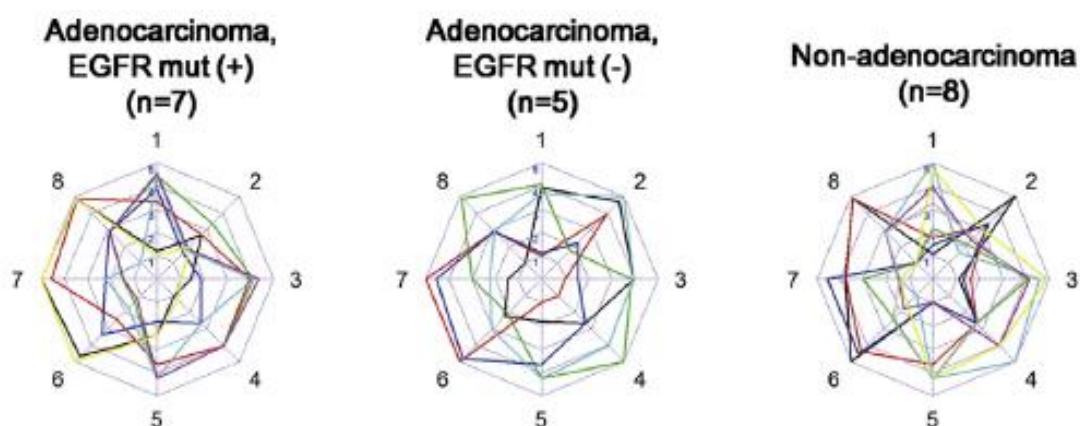


図 2 2 組織型ごとに症例を分類した場合の immunogram の重ね合わせ

1, T 細胞の多寡; 2, 腫瘍の抗原性; 3, T 細胞のプライミング・活性化; 4, T 細胞の遊走・浸潤; 5, T 細胞による腫瘍の認識; 6, 抑制性免疫細胞の有無; 7, チェックポイント分子の発現の有無; 8, その他の抑制性因子の有無

これまでの臨床試験において、チェックポイント阻害剤を含む癌免疫治療の効果は組織型のみでは予測しにくいとされている。いずれの組織型の腫瘍においても T cell-rich 型と-poor 型が混在しているという今回の解析結果は、これまでの臨床試験から得られた知見と矛盾しないと考えられた。また、図 2 2 において、EGFR 遺伝子変異陽性の症例では IGS2 (抗原性) が他の症例群と比較してやや低めであった。EGFR 変異陽性肺腺癌では腫瘍特異的遺伝子変異数が少ないこ

とが知られており、それに伴って neoantigen load も小さい値を呈することが反映されていた。

また、年齢、喫煙歴の有無や性別ごとに immunogram を重ね合わせた場合、「喫煙歴なし」または「女性」における immunogram においても、IGS2（抗原性）が低い傾向が確認された（図 2 3）。これは、EGFR 変異陽性腺癌は喫煙歴のない女性に多いという患者背景が反映された結果であると考えられた。

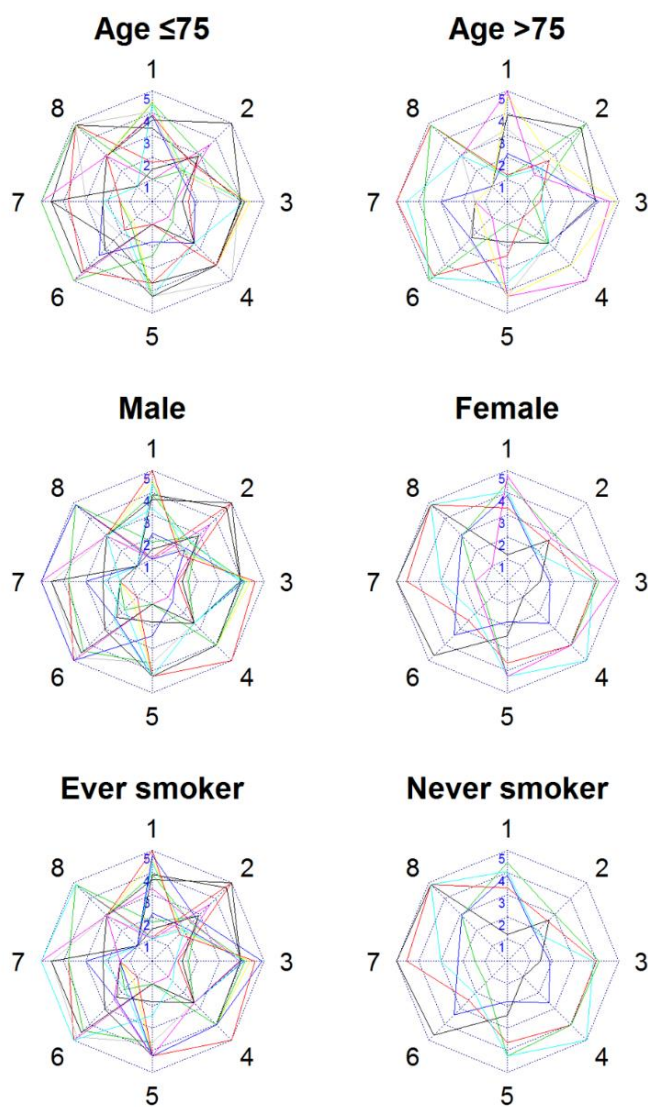


図 2 3 年齢、性別、喫煙歴で分けた場合の immunogram の重ね合わせ

1, T 細胞の多寡; 2, 腫瘍の抗原性; 3, T 細胞のプライミング・活性化; 4, T 細胞の遊走・浸潤; 5, T 細胞による腫瘍の認識; 6, 抑制性免疫細胞の有無; 7, チェックポイント分子の発現の有無; 8, その他の抑制性因子の有無

病期 (T 因子、N 因子) と immunogram パターンの関連性についても検討を行った。T 1 症例と T 2-3 症例、および N 0 症例と N 1-2 症例で分けてそれぞれ immunogram を重ね合わせたところ、T 1 症例において IGS 6 のスコアが低く、抑制性免疫細胞の浸潤による免疫抑制が強い傾向を認めた。T 1 症例は全例が T cell-rich または-intermediate 症例のいずれかであり、T cell-poor 症例が一人も含まれなかったことが、このようなパターンを呈した背景と考えられた。T 2-3 症例、N 0 症例、N 1-2 症例で分けた場合では、いずれの場合分けにおいても T cell-rich 症例と T cell-poor 症例が混在しており、特記すべきパターンを認めなかった (図 2 4)。

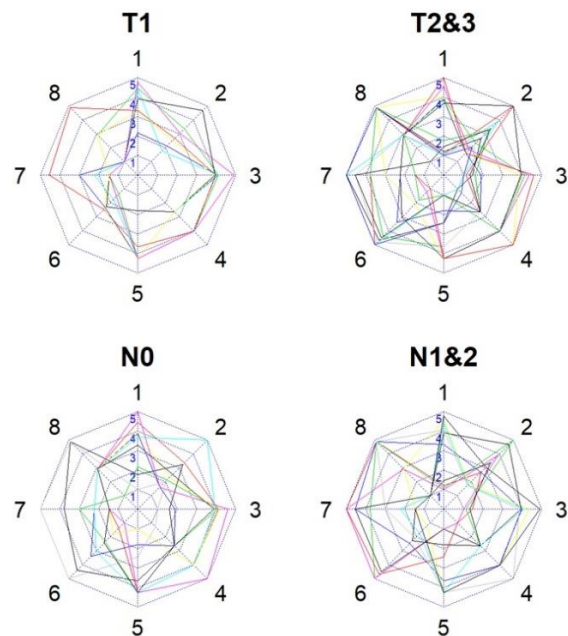


図 2 4 T 因子および N 因子で分けた場合の immunogram の重ね合わせ

1, T 細胞の多寡; 2, 腫瘍の抗原性; 3, T 細胞のプライミング・活性化; 4, T 細胞の遊走・浸潤; 5, T 細胞による腫瘍の認識; 6, 抑制性免疫細胞の有無; 7, チェックポイント分子の発現の有無; 8, その他の抑制性因子の有無

最後に、予後と immunogram パターンの関連性について検討を行った。手術時に Stage IV だった症例と術後 19 カ月の時点で無再発ながら肺炎で他病死した症例は本検討から除外した。Stage I の 5 例は術後 3 年の時点で全例無再発生存していたことを考慮し、術後 3 年以内に無再発生存だった Stage I 症例 (n=5)、術後 3 年以内に無再発生存だった Stage II-III 症例 (n=8)、術後 3 年以内に再発した Stage II-III 症例 (n=5) の 3 群に分類して、immunogram を重ね合わせ

た(図25)。その結果、術後3年の時点における転帰ごとに患者を分類しても、特徴的な immunogram のパターンは描出されなかった。

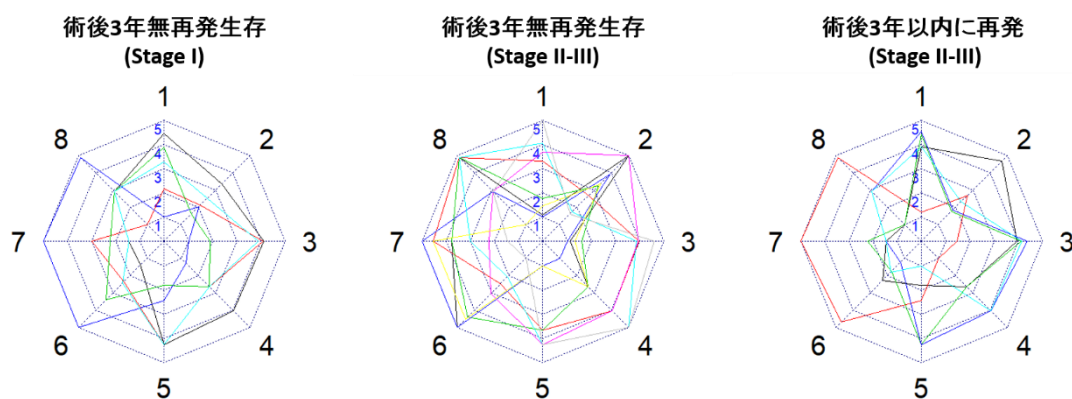


図25 術後3年での転帰で分けた場合の immunogram の重ね合わせ

1, T細胞の多寡; 2, 腫瘍の抗原性; 3, T細胞のプライミング・活性化; 4, T細胞の遊走・浸潤; 5, T細胞による腫瘍の認識; 6, 抑制性免疫細胞の有無; 7, チェックポイント分子の発現の有無; 8, その他の抑制性因子の有無

以上のように、immunogram のパターンに関する検討において、最も特徴的であったのは T cell-rich 型や-poor 型という、T細胞の多寡に応じて腫瘍を分類した場合だった。症例が少ないため、臨床データと immunogram パターンの関連性について、本研究の結果を一般化することは難しいが、今後データを蓄積することで、immunogram を用いた新たな患者プロファイリングが可能となるかもしれない。一方で、今回の解析結果で最も注目すべきは、前述のごとく肺癌20例の immunogram を個々に見比べた時、一人として同じ immunogram を呈した症

例はいなかったという点である。今回の研究で一人一人の immunogram を描いたことで、肺癌に対する免疫応答は一人一人異なっており、最適な癌免疫治療の展開に向けて、Cancer-Immunity Cycle のどのステップが障害されているかを患者毎に評価することの重要性が、あらためて認識された。

考察

チェックポイント阻害剤の開発によってがん免疫治療は今注目されているが、肺癌に対するチェックポイント阻害剤の奏効率は20-30%に過ぎず、チェックポイント阻害剤の効果を予測するための有効なバイオマーカーは確立していない。抗PD-1抗体の一つである pembrolizumab の臨床試験では、腫瘍細胞におけるPD-L1の発現率が50%以上である症例において奏効率が40-50%であったが、このような症例は非小細胞肺癌の20-30%程度に過ぎないと言われている[5, 16]。また、腺癌においてはPD-L1の発現率と奏効率の関連性が認められたが、扁平上皮癌では関連性が低いことがわかっている。

Cancer-Immunity Cycle という考え方が近年注目されているように、腫瘍内の免疫応答をダイナミックな一連のステップとして理解することが重要である。そして、チェックポイント阻害剤の適応評価のみならず、最適な癌免疫治療を考える上では、癌免疫応答に関するシステム全体を評価することが必要であり、多角的・複合的な評価法そのものがバイオマーカーとして活用される時代が来ると予測される。また一方で、次世代シーケンサーなどの大量で膨大なデータへのアクセスも日々進歩している。つい十数年前、2003年に完了したヒトゲノムプロジェクトでは、ヒト全遺伝子配列の決定に13年の歳月を要し、3000億

円が費やされた。それが今や技術革新により、一人当たり 10 万円/1 日で全エクソン解析が可能な時代に突入している。オミクスデータはこれまでは主として集団に対する解析に用いられてきたが、今後はこれらの技術と情報をどのようにして症例レベルで活用していくのかということも求められている。このような背景のもと、我々は患者毎の癌免疫状態を適切に評価するための手法として、次世代シーケンスデータに基づく Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle を考案した。そして一人一人の患者について immunogram を作成したところ、様々なパターンが描出され、癌免疫が抑制されている原因を個々の症例ごとに評価するべきであることがあらためて認識された。

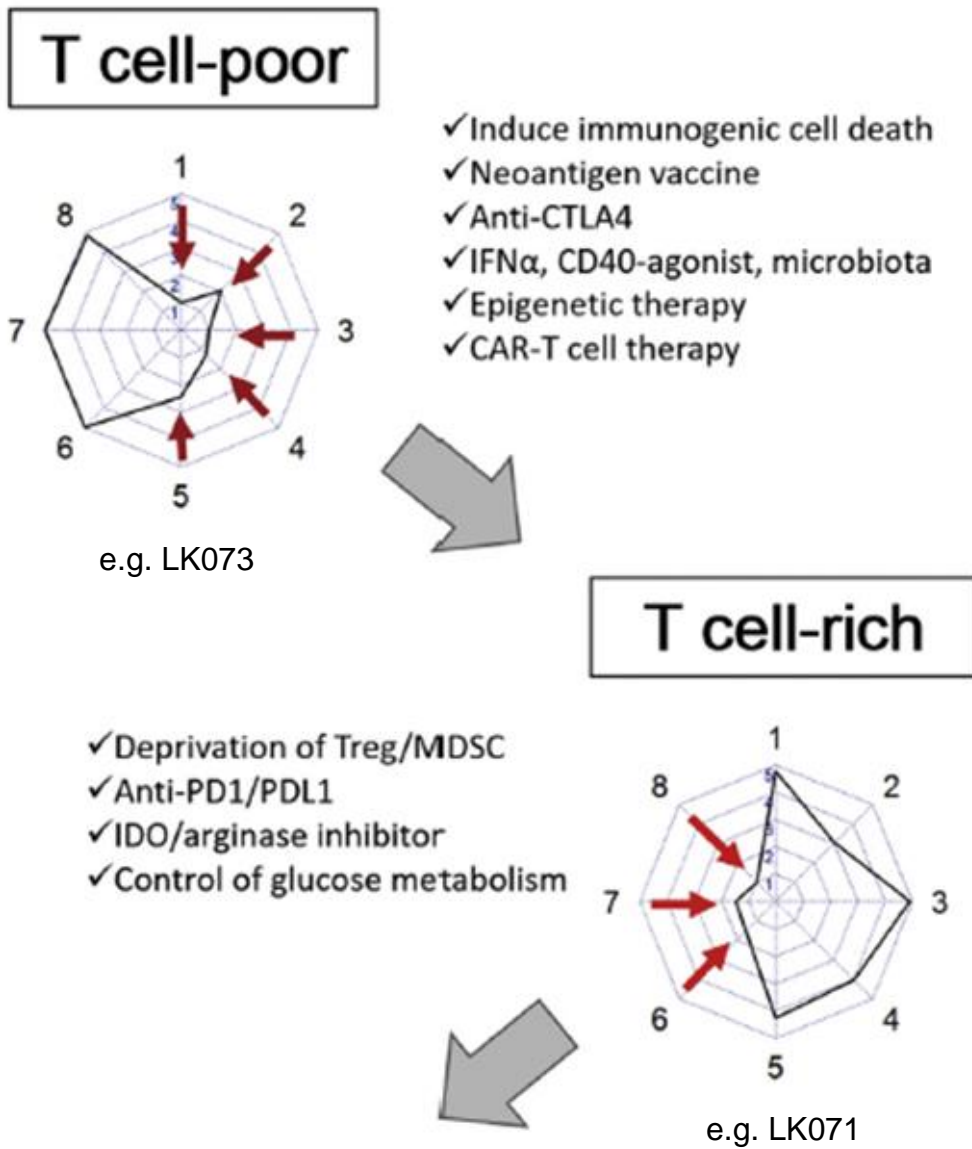
また、その中でも T cell 浸潤の多寡(IGS1)に注目すると、いくつかの特徴的なパターンが描出された。T cell-rich 型、つまり T 細胞性の免疫応答がすでに存在する症例では、IGS3 (プライミング・活性化)、IGS4 (遊走・浸潤)、IGS5 (腫瘍の認識)が高かったものの、IGS6 (抑制性免疫細胞による抑制)、IGS7 (チェックポイント分子による抑制)のスコアが低く、抑制性因子による癌免疫の抑制が大きい傾向を認めた。このことは、T 細胞性の免疫応答が、Cancer-Immunity Cycle 終盤において、抑制性細胞浸潤やチェックポイント分子等の抑制性分子の発現によって拮抗性に抑制されていることを反映していると考えられた。例えば T cell-rich 型である症例 LK071 の immunogram を参照すると、T

細胞が多く T 細胞性免疫応答が潜在する一方で、抑制性細胞浸潤が多くチェックポイント分子の発現も高めであり、免疫応答が抑制されていることが推測された。さらに、本文中には提示しなかったが、抑制性分子について LK071 の発現データを見直すと、IDO1 の発現が比較的高値であり、本症例における免疫抑制の鍵を握っている可能性も示唆された。このような症例に対しては、チェックポイント阻害剤のみならず、抑制性細胞の除去や IDO1 などの免疫抑制性分子の阻害によって T 細胞性免疫応答を再賦活化することが有効かもしれない。

逆に、T cell-poor 型では IGS3 (プライミング・活性化)、IGS4 (遊走・浸潤)、IGS5 (腫瘍の認識) が低く、Cancer-Immunity Cycle が序盤で障害されていると考えられた。その一方で IGS6 (抑制性免疫細胞による抑制)、IGS7 (チェックポイント分子による抑制)、IGS8 (その他の抑制性分子による抑制) のスコアは高く保たれており、抑制性因子による癌免疫の抑制は乏しい傾向を認めた (注 IGS6-8 のスコアが高い = 抑制性因子による抑制が小さい を表わす)。

このタイプでは、樹状細胞の活性化や腫瘍の抗原提示の段階ですでに Cancer-Immunity Cycle が障害されており、十分な T 細胞性免疫応答が惹起されていない可能性が示唆された。このような症例では、チェックポイント阻害剤単剤での治療効果は乏しいと予測される。例えば症例 LK073 では、腫瘍の抗原性は低くないが、プライミング・活性化の段階がすでに十分機能していないと評価され

る。このような症例に対しては、例えば immunogenic cell death を惹起する類の化学療法や放射線治療によって T 細胞の遊走を促進することや、neoantigen を標的としたワクチン刺激によって直接樹状細胞を活性化することが有効かもしれない。そして、治療介入によって T cell-poor 型の腫瘍が T cell-rich 型に変化したとき、今度はチェックポイント阻害剤などによる抑制性因子の解除が必要となると予想される（図 2 6）。このような経時的評価においても immunogram の有用性が期待される。



Cancer control

図 2 6 Immunogram を用いた最適な複合免疫治療戦略

Cancer-Immunity Cycle の状態をその都度評価し、Cancer-Immunity Cycle を回すための適切な介入を行うことを目指すことが重要である。時間・空間的マルチサンプリングを行い、変化や多様性を評価する上でも、immunogram の有用性が期待される。

なお、今回の解析では、T1 症例の中に T cell-poor 症例が 1 例も含まれなかった。病期の違いによって T cell-rich または T cell-poor の症例の割合が変化するかどうかを検証するために、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の肺癌データ (n=993) を用いて追加解析を行った [37, 38]。ssGSEA 法を用いて enrichment score を計算し [39]、T 因子および N 因子ごとに分類して enrichment score を比較した (図 2 7、図 2 8)。

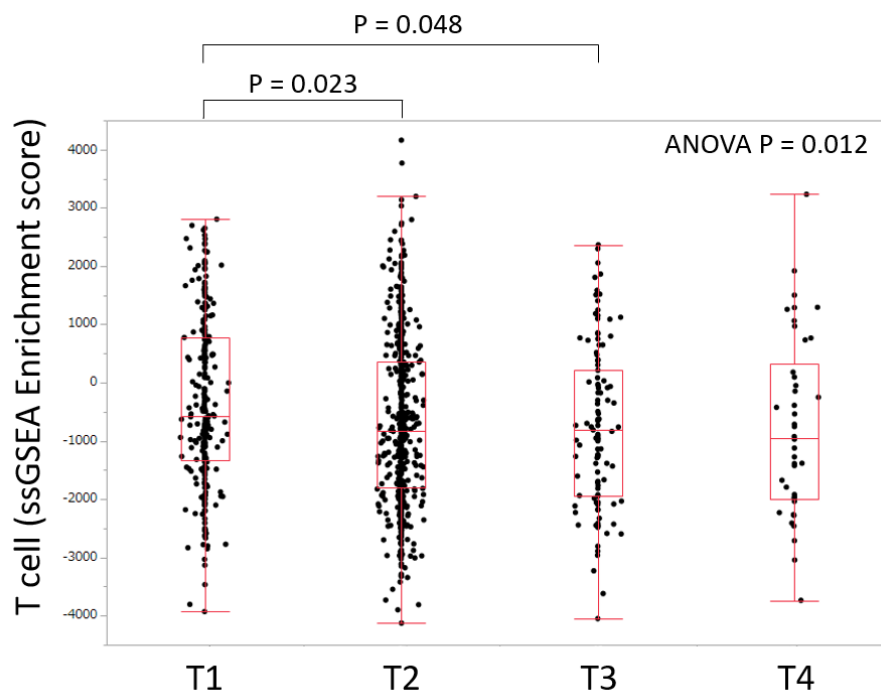


図 2 7 T 因子と T cell 浸潤スコアの関係 (TCGA コホート)

T1 と比較して T2、T3 の症例は、T cell enrichment score が有意に小さかった

(T1 vs T2, P=0.023; T1 vs T3, P=0.048; Tukey-Kramer test)

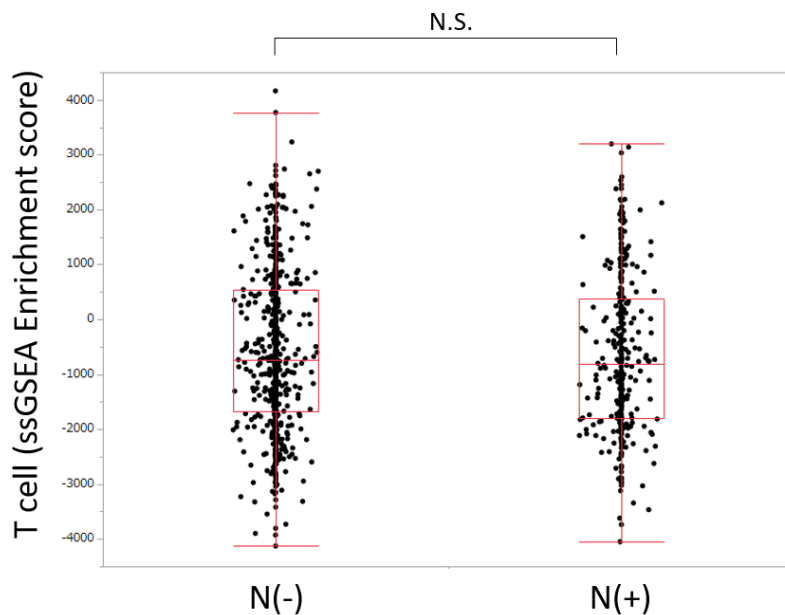


図 2 8 N 因子と T cell 浸潤スコアの関係 (TCGA コホート)

リンパ節転移陰性例と陽性例の比較において、T cell enrichment score は有意差を認めなかった ($P=0.48$, Student's t-test)。

T1 と比較して T2、T3 の症例は、T cell enrichment score が有意に小さかった (T1 vs T2, $P=0.023$; T1 vs T3, $P=0.048$; Tukey-Kramer test)。一方、リンパ節転移の有無によって症例を分類した場合には、T cell enrichment score に関して有意差を認めなかった ($P=0.48$, Student's t-test)。自験例 20 例の解析でも、T1 症例のほうが T2-3 症例よりも T cell-rich 型の割合が高く、N 因子については T cell-rich/-poor 型に関して特に偏りを認めなかった。自験例で認められたこのような傾向は、TCGA データの解析結果と矛盾しないことが確

認された。T 因子が進行することと T cell-poor 症例が増えることの因果関係までは、ここでは明らかにすることができない。癌の進行とともに免疫から癌細胞が逃避しやすくなっていき、もともと T cell-rich 型だった腫瘍が徐々に T cell-poor 型へ変化していくという現象を見ている可能性がある。一方で、癌発生の初期から免疫から逃避しやすい特性を獲得した癌ほど、より進展した病期で発見されやすい、という仮説も考えられる。

また、今回の解析では我々の予想に反して、neoantigen load および imCG-Ag load で推測した腫瘍の抗原性が、T cell-rich 型において低い傾向を認めた。このことについても、TCGA データを用いて検証を行った (図 29)。TCGA データにおいて neoantigen load を予測することはできなかったため、腫瘍特異的遺伝子変異数 (mutational load) と T cell enrichment score について相関解析を行った。その結果、Spearman 相関係数は -0.12 と小さいものの、有意に逆相関することが確認された ($P < 0.0001$)。腫瘍特異的遺伝子変異の数が大きければ、そこから予測される neoantigen load も大きくなりやすい。従って、仮に TCGA データに対して neoantigen load と T cell enrichment score を比較した場合でも、今回図 29 で表した結果とほぼ同じ傾向となることが予測される。

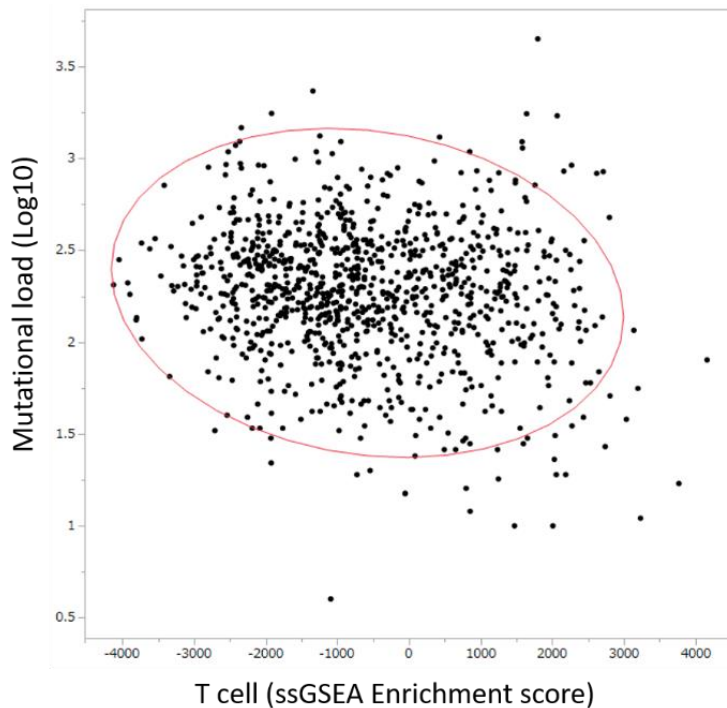


図 2 9 T cell 浸潤スコアと腫瘍特異的遺伝子変異数の関係 (TCGA コホート)

T cell enrichment score と腫瘍特異的遺伝子変異数は、弱いながらも有意な逆相関の関係にあることが確認された ($r=-0.12$, $P<0.0001$)

T cell-rich 型では抗原性が総じて低かったという、自験例で認められた傾向は、TCGA データの解析結果と矛盾しないことが確認された。

最後に、TCGA 肺癌データにおいて、pStage ごとに患者を層別化した上で T cell 浸潤スコアと腫瘍特異的遺伝子変異数の相関解析を行った。Stage I (n=508) では相関係数 $r=-0.18$ ($P<0.0001$) だったのに対し、Stage II (n=287) では $r=-0.098$ ($P=0.099$) であり、Stage III-IV (n=198) では $r=-0.017$ ($P=0.81$)

だった。このことから、病期の進行とともに、抗原性と T 細胞浸潤の関係性も変化する可能性が示唆された。病期、抗原性、T 細胞浸潤の相互の関係について、背景にある生物現象や因果関係を明らかにすることは、本検討のみでは困難である。一方で、抗原性と T 細胞浸潤の関係性に、病期によって真に偏りが存在するのであれば、自験例および TCGA コホートのよう手術採取検体をベースにした解析データから得られる知見と、切除不能・再発進行癌を対象としたチェックポイント阻害剤の臨床試験をベースにした解析データから得られた知見を解釈する際には、注意が必要であると言えよう。

今後の展望と課題

患者ごとの最適な癌免疫治療を提供するために、immunogram のような症例ベースの多角的評価ツールの開発が重要と考える。また、治療前後、初発と再発時、原発巣と転移巣など、様々な時間・空間的評価を行うことは、依然として多くのベールに包まれた癌免疫機構を解明していくにあたり、不可欠である。そのような時間・空間的な癌免疫状態の変化を可視化する上でも、immunogram のようなツールは今後役立つと期待される。臨床応用に向けてはまだ数多くの課題を残しているものの、今後の改良と発展が期待される。

今回採用した GSEA 法のように、網羅的遺伝子解析データの中から遺伝子群を抽出して解析することの一つの利点は、低発現遺伝子のデータも有効活用できる点にある。一方で、コストや手間の問題から、解析に使用する遺伝子数を合理的に減らしていくことも望まれる。解析に使用する遺伝子数を減らすことができれば、exome/RNA-seq とった網羅的遺伝子解析ではなく、target sequencing や liquid biopsy を利用した解析が可能となる。特に、liquid biopsy で immunogram が作図できれば患者にとっても非常に恩恵が大きい。一方、そのためには liquid biopsy における解析精度の向上など、さらなる技術革新も求められる。

本研究では Cancer-Immunity Cycle に注目して評価軸を設定したが、最適な評価軸の組み合わせやスコアリング方法、使用する遺伝子リストについては、注意深く検証していく必要がある。今回の解析ではコホート内での平均・偏差によって IGS を計算したが、コホート外の症例とスコア比較をするためには、スコアの標準化が必要である。それをふまえた改善策の一つとして、TCGA データという世界中からアクセス可能な公開データにおける平均・標準偏差を用いる方法が挙げられる。また、今回の解析では既存の gene set が存在しない項目については、文献[22]をベースに作成した独自の遺伝子リストを採用したが、リストの妥当性も含めて今後の検証を要する。

軸同士の相関を考慮し、どのように軸の取捨選択を行っていくか、あるいは一つの軸の中でどのように遺伝子ごとの重みづけを行っていくかということにも、これから取り組んで行かなければならない。例えば、IGS の計算過程で算出したそれぞれの Z スコアを用いて相関係数行列のヒートマップを作図すると図 30 のようになる。現在の 8 本の軸は、Cancer-Immunity cycle のそれぞれのステップを評価することに対しては合目的だが、実臨床への応用に向けては、高度に相関する軸に関して今後減らしていくことも考慮される。

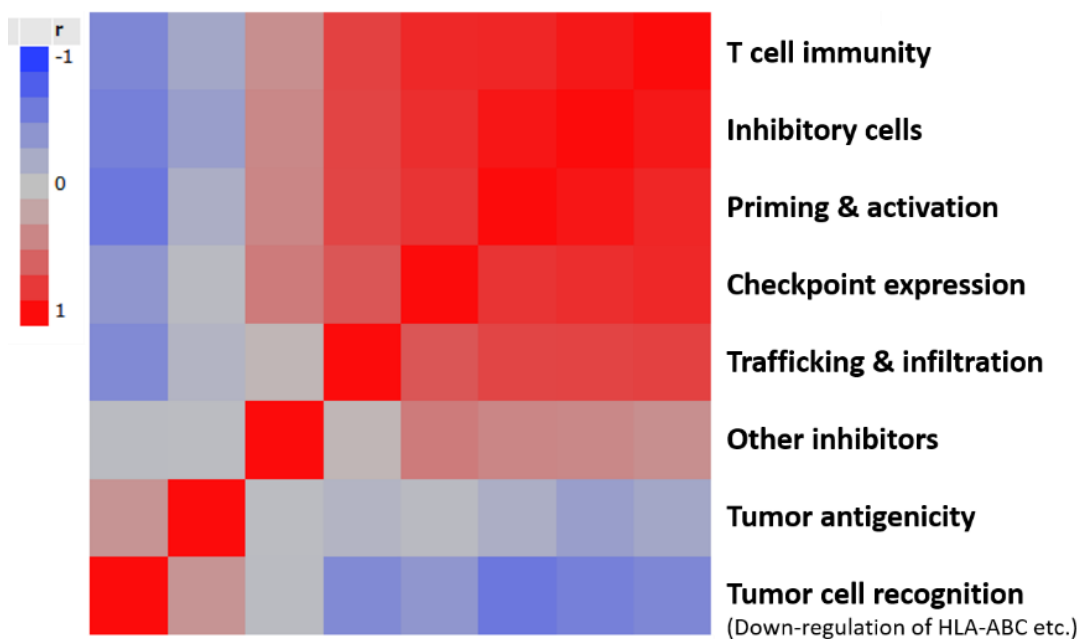


図 30 Immunogram score 計算過程で生じた Zscores を用いた相関係数行列のヒートマップ

一方で、一人一人の癌免疫状態が異なることもまた確かである。最適な

癌免疫治療を考える上で重要なのは個別評価であり、集団で見た場合に軸同士が相関しているからといって、安易に軸を減らしてよいわけではない。

腫瘍内免疫応答と腫瘍微小環境における代謝異常の関連性が最近特に注目されており、今後は代謝や増殖に関する評価も考慮する必要がある[40, 41]。2011年に Hanahan と Weinberg が米国の Cell 誌で発表した“Hallmarks of Cancer: the next generation”では、増殖シグナルの維持、増殖抑制の回避、免疫からの逃避、細胞死への抵抗、無制限な複製による不死化、腫瘍促進的な炎症、血管新生の誘導、ゲノム不安定および遺伝子変異、浸潤能および転移能の活性化、無秩序な代謝の10項目が、癌細胞が獲得する特性として挙げられた[42]。次世代シーケンサーによるデータを個人の解析に適用するという、本研究と同様の解析手法を用いることで、これらの項目を評価することが可能となるかもしれない。“Onco-immunogram for Hallmarks of Cancer”（仮）と題して、現在研究開発を進めている（図31）。

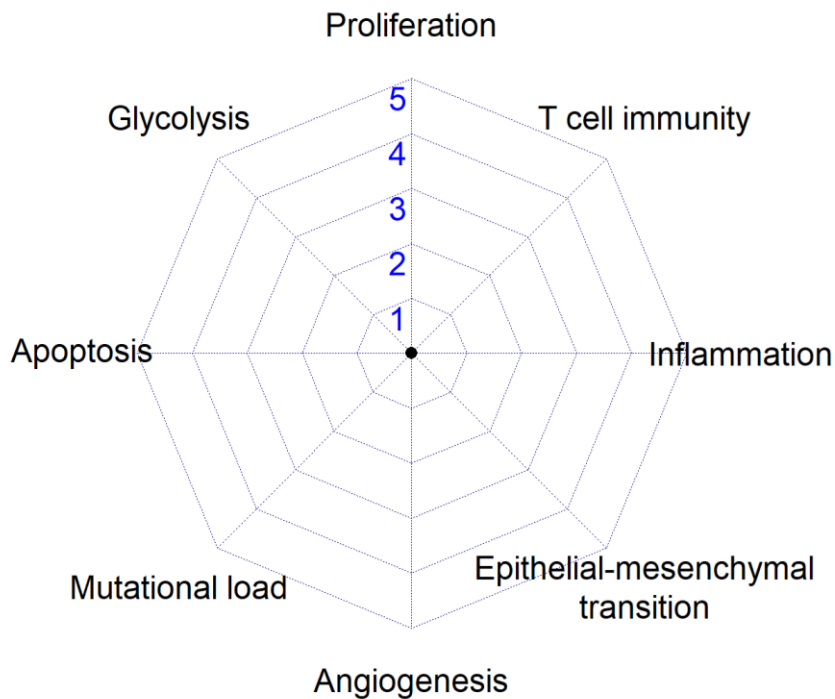


図 3 1 個々の症例における癌の特性を評価する “Onco-immunogram for Hallmarks of Cancer” (仮)

“Hallmarks of Cancer: the next generation” [42]で挙げられた癌の特性を症例ごとにスコア化し、可視化するレーダーチャート

いずれにせよ、実臨床における治療選択・治療効果判定のためのツールとして活用するためには、臨床試験データや動物実験モデルを用いた検証と最適化が必須である。そこでは、今回のような exome/RNA-seq データのみでなく、epigenome に関連するデータやマルチプレックスな免疫染色データなど、あらゆるデータを集約し、癌免疫研究におけるこれまでのあらゆる知見に基づいて検

証していくことが望まれる。扱うデータが大きくなればなるほど、人工知能や機械学習が有効となるかもしれないが、そこでもサンプル数の確保と質の高い臨床データ収集が不可欠である。

今回は 20 例の自験例を用いた後方視的解析であり、今回の手法と解析結果を一般化して論ずることはできない。それでも、仮想患者ではなく現実の症例を用いて immunogram を描出する一つの手法を提示したという点において、本研究の成果には一定の意義があると考ええる。

結語

肺癌に対する免疫応答を解析するにあたり、次世代シーケンスデータを活用して個々の症例における癌免疫状態を評価する immunogram (“Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle”) を考案した。実臨床での利用に向けてはまだ課題も多いが、今後のさらなる発展と応用が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻呼吸器外科学講座 中島淳 教授にはひとかたならぬ御指導御鞭撻を賜りました。謹んで御礼申し上げます。

免疫細胞学治療講座 垣見和宏 特任教授には、本研究の遂行にあたり多岐に渡る直接的な御指導を頂きました。深く感謝申し上げます。

また、様々な点で本研究の遂行に御尽力下さった免疫細胞治療学講座の皆様へ深謝致します。

引用文献

1. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 711-23.
2. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatriin A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515: 563-7.
3. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhaufl M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crino L, Blumenschein GR, Jr., Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 1627-39.
4. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Aren Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 123-35.
5. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, Molina J, Kim JH, Arvis CD, Ahn MJ, Majem M, Fidler MJ, de Castro G, Jr., Garrido M, Lubiniecki GM, Shentu Y, Im E, Dolled-Filhart M, Garon EB. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387: 1540-50.
6. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893; 105: 487-510.
7. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical orthopaedics and related research* 1991: 3-11.
8. Ehrlich P. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd*

1909; 5: 273-90.

9. De Plaen E, Lurquin C, Van Pel A, Mariame B, Szikora JP, Wolfel T, Sibille C, Chomez P, Boon T. Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 2274-8.
10. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-7.
11. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2016.
12. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 2013; 342: 1432-3.
13. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014; 515: 568-71.
14. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, Stankevich E, Pons A, Salay TM, McMiller TL, Gilson MM, Wang C, Selby M, Taube JM, Anders R, Chen L, Korman AJ, Pardoll DM, Lowy I, Topalian SL. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3167-75.
15. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2443-54.
16. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, Carcereny E, Ahn MJ, Felip E, Lee JS, Hellmann MD, Hamid O, Goldman JW, Soria JC, Dolled-Filhart M, Rutledge RZ, Zhang J, Luceford JK, Rangwala R, Lubiniecki GM, Roach C, Emancipator K, Gandhi L. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 2018-28.
17. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmir B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN,

Chan TA. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348: 124-8.

18. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, Sucker A, Hillen U, Foppen MH, Goldinger SM, Utikal J, Hassel JC, Weide B, Kaehler KC, Loquai C, Mohr P, Gutzmer R, Dummer R, Gabriel S, Wu CJ, Schadendorf D, Garraway LA. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 2015; 350: 207-11.

19. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015; 348: 69-74.

20. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Lubner BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA, Jr. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372: 2509-20.

21. Takahashi Y, Harashima N, Kajigaya S, Yokoyama H, Cherkasova E, McCoy JP, Hanada K, Mena O, Kurlander R, Tawab A, Srinivasan R, Lundqvist A, Malinzak E, Geller N, Lerman MI, Childs RW. Regression of human kidney cancer following allogeneic stem cell transplantation is associated with recognition of an HERV-E antigen by T cells. *J Clin Invest* 2008; 118: 1099-109.

22. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013; 39: 1-10.

23. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. CANCER IMMUNOLOGY. The "cancer immunogram". *Science* 2016; 352: 658-60.

24. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; 25: 1754-60.

25. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; 20: 1297-303.

26. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012; 22: 568-76.

27. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, Gabriel S, Meyerson M, Lander ES, Getz G. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 213-9.

28. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-

Seq. *Bioinformatics* 2009; 25: 1105-11.

29. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 511-5.

30. Major E, Rigó K, Hague T, Bérces A, Juhos S. HLA Typing from 1000 Genomes Whole Genome and Whole Exome Illumina Data. *PloS one* 2013; 8: e78410.

31. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, Arthur CD, White JM, Chen YS, Shea LK, Hundal J, Wendl MC, Demeter R, Wylie T, Allison JP, Smyth MJ, Old LJ, Mardis ER, Schreiber RD. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 2012; 482: 400-4.

32. 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* 2016; 11: 324-33.

33. Hoof I, Peters B, Sidney J, Pedersen LE, Sette A, Lund O, Buus S, Nielsen M. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics* 2009; 61: 1-13.

34. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 15545-50.

35. Angelova M, Charoentong P, Hackl H, Fischer ML, Snajder R, Krogsdam AM, Waldner MJ, Bindea G, Mlecnik B, Galon J, Trajanoski Z. Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome biology* 2015; 16: 64.

36. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, Hoang CD, Diehn M, Alizadeh AA. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* 2015; 12: 453-7.

37. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; 489: 519-25.

38. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014; 511:543-50.

39. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Meylan E, Scholl C, Fröhling S, Chan EM, Sos ML, Michel K, Mermel C, Silver SJ, Weir

BA, Reiling JH, Sheng Q, Gupta PB, Wadlow RC, Le H, Hoersch S, Wittner BS, Ramaswamy S, Livingston DM, Sabatini DM, Meyerson M, Thomas RK, Lander ES, Mesirov JP, Root DE, Gilliland DG, Jacks T, Hahn WC. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009; 462: 108-12.

40. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, Gindin M, Gubin MM, van der Windt GJ, Tonc E, Schreiber RD, Pearce EJ, Pearce EL. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 2015; 162: 1229-41.

41. Ho PC, Bihuniak JD, Macintyre AN, Staron M, Liu X, Amezquita R, Tsui YC, Cui G, Micevic G, Perales JC, Kleinstein SH, Abel ED, Insogna KL, Feske S, Locasale JW, Bosenberg MW, Rathmell JC, Kaech SM. Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell* 2015; 162: 1217-28.

42. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.

*本研究の内容は、以下の原著論文として公表された（2017年5月）

Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori JI, Sato M, Anraku M, Hosoi A, Matsushita H, Morishita Y, Kashiwabara K, Takazawa M, Ohara O, Kakimi K, Nakajima J. An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2017;12:791-803.