

2019年度シニア・リサーチフェロー  
研究成果報告書

2020年 6月 22日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 高柳 大輔



研究課題：ゲノム解析に基づく宿主における発がんリスクに関わる免疫応答ネットワーク機構の解明

研究期間： 自 2019年4月1日  
至 2020年3月31日

研究指導者：氏名 河野 隆志



公益財団法人 がん研究振興財団

## (1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

### 1) 要旨

多くのがん組織で認められる HLA (Human Leukocyte Antigen) 領域の遺伝子変異や欠失が、発がんにおけるドライバー変異の一つとして考えられている。一方、生まれながらもつ HLA 遺伝子の多様性は人種により大きく異なり、その多様性ゆえに HLA アリルと発がんリスクとの関連についてはあまり検討されてこなかった。

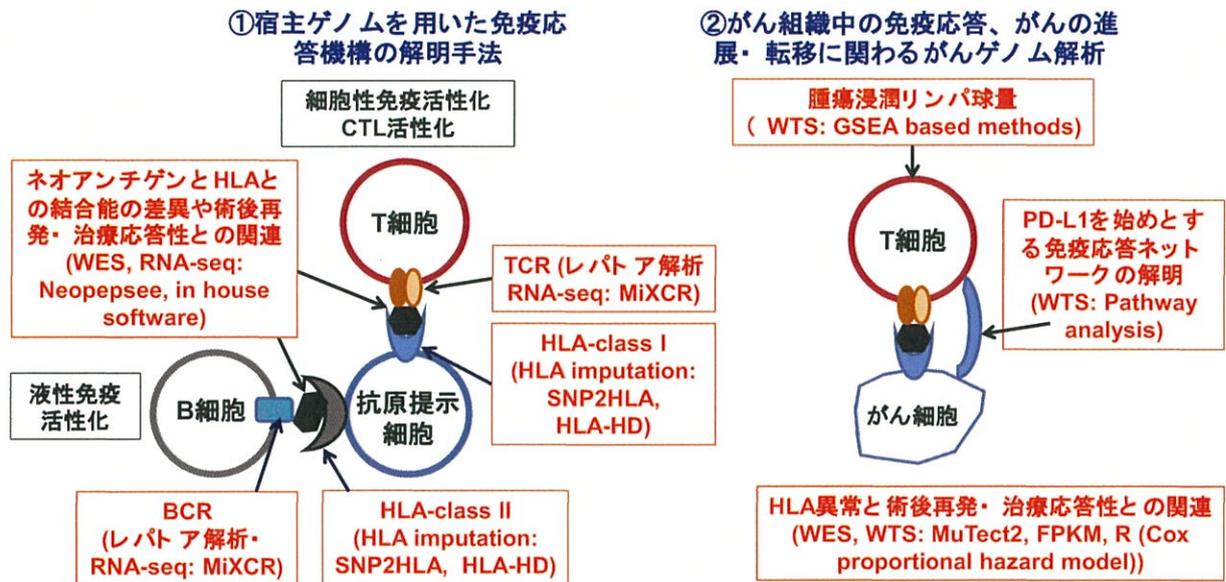
本研究では、国立がん研究センター並びにバイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) 等の公開データベースに登録もしくは申請者らが既取得している SNP チップデータを用いて、日本人 HLA 参照配列を用いた HLA imputation を実施し、がん種における発がんリスクに関わる HLA アリルもしくは外来ペプチド (ネオアンチゲン) との結合に関わるアミノ酸置換に関わる HLA バリエントを同定する。さらに発がんリスクに関わる HLA アリルやバリエントが治療応答性や術後再発予後に関連するか、またがん種特異的な HLA リスクアリルが認められたがん組織を用いて全エクソン・RNA シークエンスを実施し、ネオアンチゲンと HLA アリルもしくはバリエントとの相関を明らかにする。また RNA シークエンスデータを基にがん組織中での浸潤性 T 細胞量や免疫応答に関わる遺伝子、がんの進展・転移に関わる遺伝子発現量との統合的な解析を行った。その結果、発がんリスクにかかわる HLA アリルは他の HLA アリルに比べてネオアンチゲン数が有意に少なく、また HLA 領域のヘテロ接合性の消失 (LOH) の有無を検討したところ、発がんリスクに関わるリスクアリルで優位に LOH が起きにくいことを明らかにした。

## 2) 序

一生のうちに2人に1人は何かしらのがんに罹患することから、がんは身近な疾患の1つであり、また免疫チェックポイント阻害薬やドライバー変異に対する分子標的薬の開発により、がんの発症=死という病気ではなくなりつつある。しかし、厚生労働省が公表している2017年人口動態統計月報年計によるとがんによる死亡割合は、全体の27.8%と3.6人に1人ががんで亡くなっている。その多くは、根治目的とした治療後の再発もしくは進行期で根治が難しい状態に陥った患者であり、またその多くは治療抵抗性を示すことから、早期がんの発見・治療並びに根治可能な治療法の開発が重要である。

一方がん細胞がもつ宿主免疫からの回避を阻害する免疫チェックポイント阻害剤は、一部の症例に対して進行期における長期の延命を可能にした。この現象は、宿主免疫自体が正常に機能すれば進行期のがんの進展を抑えられることを示している。一方がん細胞は、HLA領域の欠失や遺伝子変異等の蓄積や免疫応答に関わる遺伝子群の発現異常が認められ、複合的な遺伝子異常の蓄積によりがん細胞は宿主免疫から回避している (McGranahan et al., Cell 2017)。一方で、がん細胞がもつがんの進展・転移に関わる遺伝子発現異常やドライバー変異を初めとする遺伝子異常もがん細胞が生き残るために重要な因子であると考えられる。すなわち、HLAの多様性とがん細胞におけるHLAの機能喪失との関連、そしてRNAシーケンスデータに基づく免疫活性化・抑制に関わる免疫応答のモニタリングやがんの進行度に関わる遺伝子発現異常といった統合的なネットワークの解析も重要であると考えられる。多くのがん組織で認められるHLA (Human Leukocyte Antigen) 領域の遺伝子変異や欠失が、発がんにおけるドライバー変異の一つとして考えられている。一方、生まれながらもつHLA遺伝子の多様性は人種により大きく異なり、その多様性ゆえにHLAアリルと発がんリスクとの関連についてはあまり検討されてこなかった。本研究では、国立がん研究センター並びにバイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) 等の公開データベースに登録もしくは申請者らが既取得している約18万人のSNPチップデータを用いて、日本人HLA参照配列を用いたHLA imputationを実施し、主に肺がん、大腸・直腸がんにおける発がんリスクに関わるHLAアリルもしくは外来ペプチド (ネオアンチゲン) との結合に関わるアミノ酸置換に関わるHLAバリエーションを同定する。さらに発がんリスクに関わるHLAアリルやバリエーションが治療応答性や術後再発予後に関連するか、またがん種特異的なHLAリスクアリルが認められたがん組織を用いて全エクソン・RNAシーケンスを実施し、ネオアンチゲンとHLAアリルもしくはバリエーションとの相関を明らかにする。またRNAシーケンスデータを基にがん組織中での浸潤性T細胞量や免疫応答に関わる遺伝子、がんの進展・転移に関わる遺伝子発現量を統合的に解析することで、新たながん治療開発や予防に繋がる

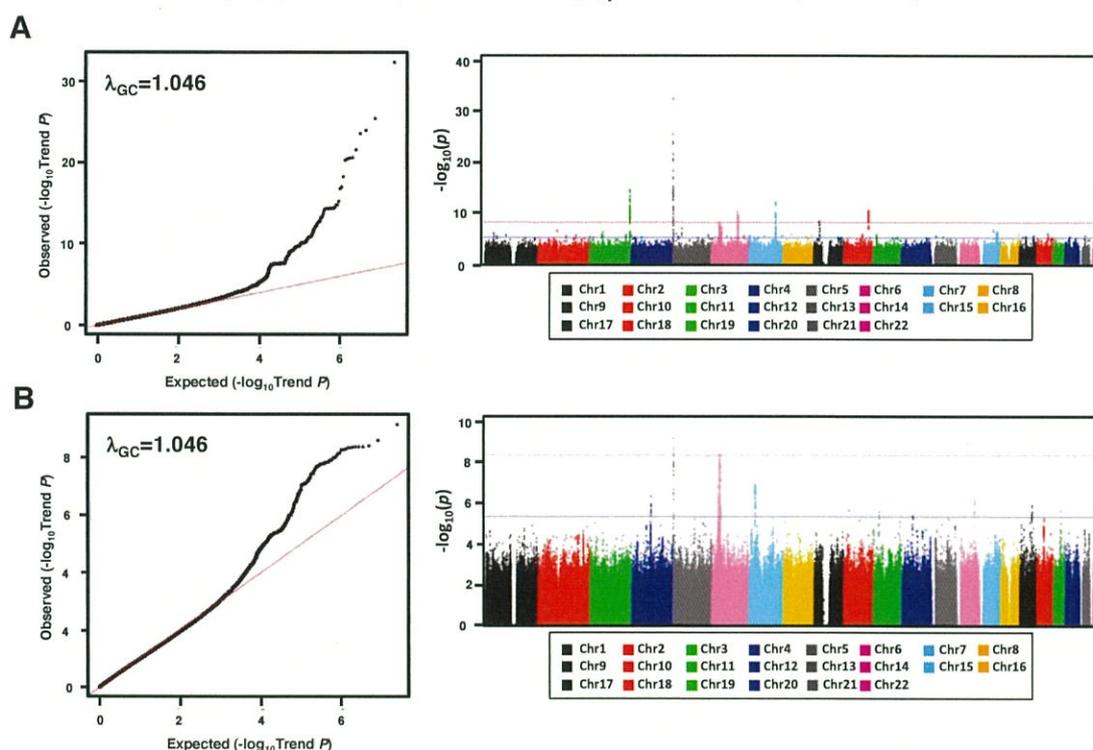
宿主免疫並びにがん細胞との統合的なネットワーク解明に資する基盤研究を創出する。  
 (下図)。



### 3) 研究方法

本研究では、多施設共同研究により国立がん研究センターが中心となり収集された肺腺がん症例並びにバイオサイエンスデータベースセンター（NBDC）等の公開データベースに登録もしくは当研究室で既取得しているSNPチップデータを用いた。全ゲノム関連解析を行う前にサンプル並びにSNPに対する品質管理（QC）を実施した。まず、性別の不一致や近親者の除外、SNPのコールが悪かった症例（99%以上の精度で遺伝子型が確定できていない症例）の除外等を行うため、PLINKやEIGENSTRATを用いて実施した。さらに各SNPに着目し、コールが悪かったSNPを除外した。得られたデータに偏りがいないかQ-Q plotで確認したところ、 $\lambda_{GC} < 1.10$ であったことから、このまま解析を続けた（図1）。

図1. 各研究スタディーにおけるQQ plotとマンハッタンプロット



さらにHLA領域に着目し、SNP2HLAを使用して日本人HLA参照配列（Okada et al., Nat Genet 2016）を用いてHLAアリル・HLAバリエーションのimputationを実施した。本研究に用いたインピュテーション法とは、連鎖不平衡ハプロタイプブロックにおけるSNPの相関を利用することで、ジェノタイピングされていない遺伝子型を推測する方法である。インピュテーションを行うために、BeagleとSNP2HLA（Broad institute）（インピュテーション）およびPlink（関連解析）を用いて実施した。本研究に関わる解析は、国立がん研究所ゲノム生物学研究分野に設置されているワークステーションで実施した。

さらに全エクソンシーケンス解析により、コーディング領域に位置するアミノ酸変

化を伴う体細胞変異を抽出し、NetMHCpanを用いてネオアンチゲンを推定するとともに、既存のゲノムデータを用いて HLA 領域にある遺伝子多型と各血球での遺伝子発現量との相関を検討した。

#### 4) 結果

全肺腺がんリスクに関わる感受性遺伝子座を同定するため、16,103例の肺腺がん症例と151,656例の非がんコントロールからなる検証研究並びに検出研究を行ったところ、新規感受性遺伝子座を複数同定した。その中でも特にHLA領域に複数の感受性遺伝子座を同定した(図2)。そこで、HLA-imputation法を用いてHLA型を推定し、plinkを用いて関連解析を実施したところ、複数のHLAアレルを同定した。

図2. 肺がんGWASによって同定された19箇所の肺腺がん感受性遺伝子座

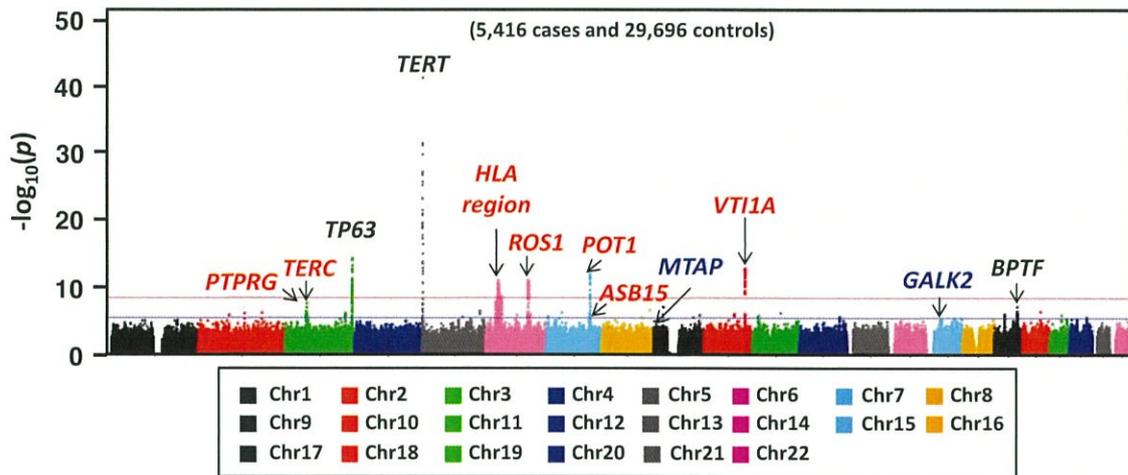
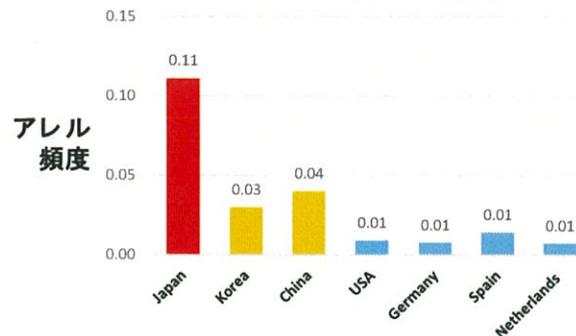
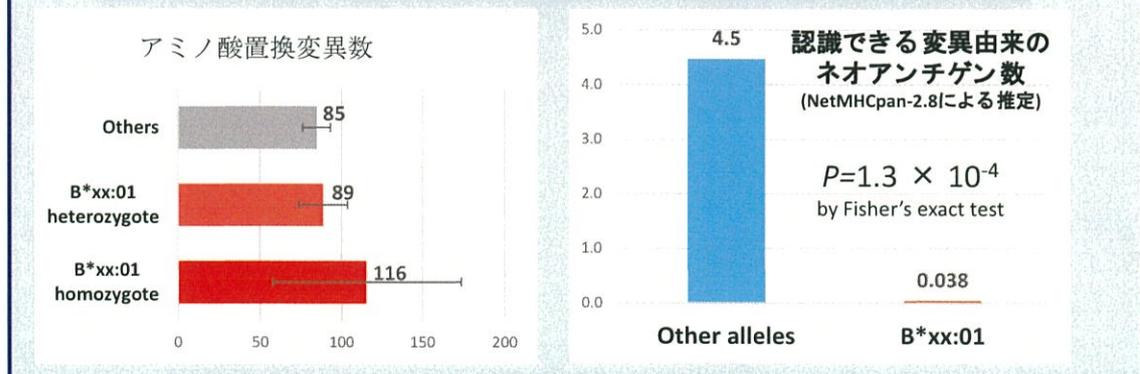


図3. 発がんリスクにかかわるHLAアレルとネオアンチゲン数との相関

GWAS⇒HLAアレルimputation  
 HLA-A \*xx:02 (アレルOR=1.10)  
 HLA-B \*xx:01 (アレルOR=1.19)  
 HLA-C \*xx:02 (アレルOR=1.18)



#### 腫瘍組織の全エクソームシーケンスデータとの統合解析



得られた結果をもとに、602 例の肺腺がん由来のがん組織検体を用いて全エクソンシーケンスを実施した。体細胞変異の同定は、GATK Best Practices に従って解析を実施した (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/sections/360007226651-Best-Practices-Workflows>)。次に発がんリスクに関わる HLA アリルに着目して、NetMHCpan ver2.7 を用いた HLA アリルと変異を伴うペプチドとの親和性を検討した。ネオアンチゲンの親和性のある変異ペプチドは、 $IC_{50} < 500\text{nM}$  を示した場合とした。その結果、発がんリスクにかかわる HLA アリルは、他の HLA アリルに比べて認識できるネオアンチゲン数が少ないことが明らかとなった (図 3)。またこれらの HLA アリルは、アジア人で多く認められる HLA アリルであった。さらに HLALOH プログラムを用いた HLA 領域のヘテロ接合性の消失 (LOH) の有無を検討したところ、HLA-A のリスクアリルで優位に LOH が起きにくいことを明らかにした (図 4)。以上の結果より、発がんリスクにかかわる HLA-class I アリルは、LOH が起きにくいことからがんにとっては免疫逃避に影響を与えておらず、またネオアンチゲン数も少ないことから免疫の認識能が弱いと考えられた。一方で、RNA シークエンスを用いた種瘍浸潤性 T 細胞のフラクションの割合と HLA アリルとの相関について検討したところ、統計学的な有意差は得られなかった。

図4. リスクにかかわるHLAアリルはLOHが起きにくい

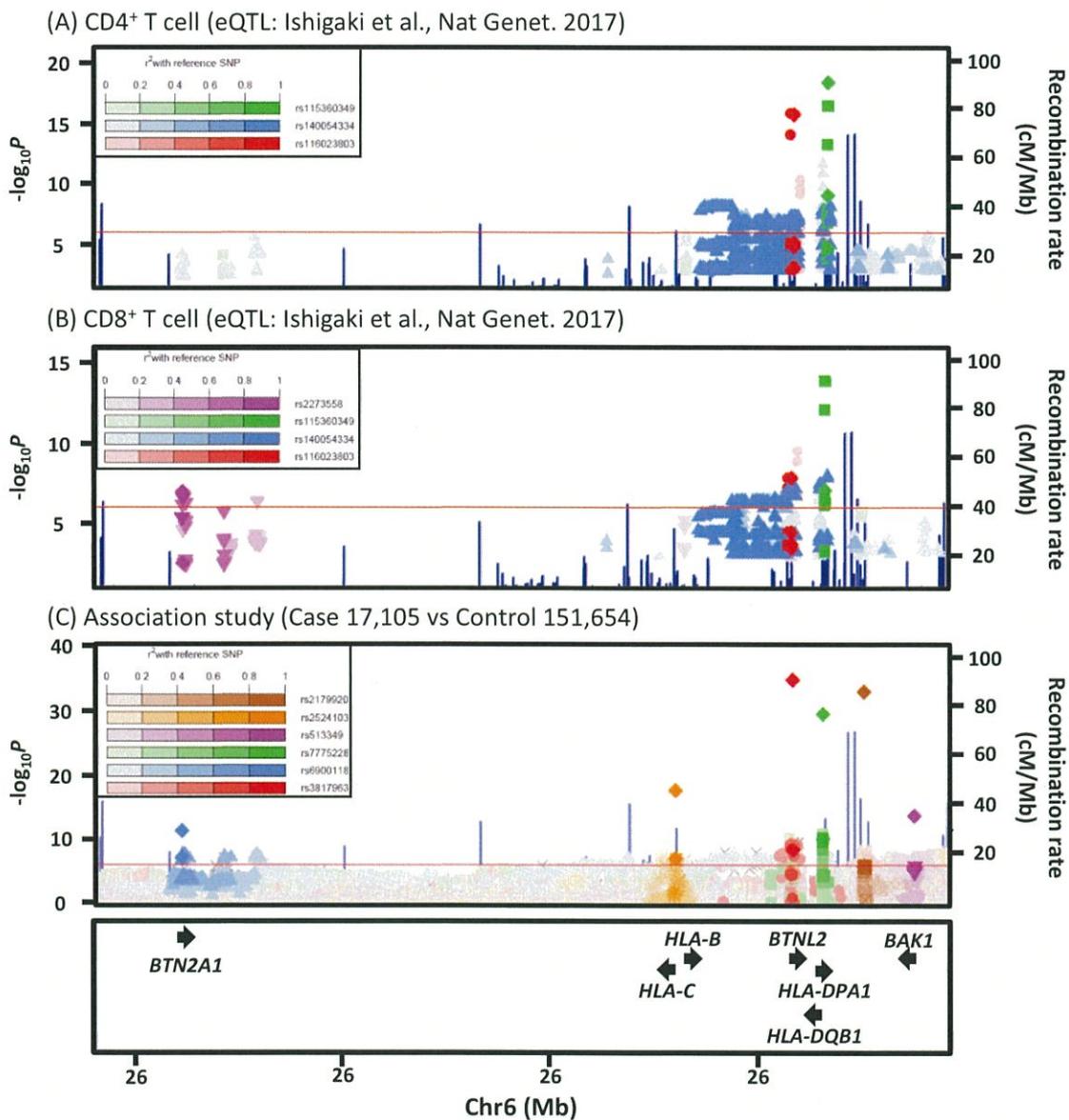


AD17-030症例 (75歳, 女性, 非喫煙者)を例としたHLALOHプログラム解析

遺伝子	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
アレル	*xx:02	*11:01	*xx01	*35:01	*xx:02	*03:03
認識可能な ネオ抗原	1	8	0	10	1	6
がん組織	Retain	LOH	Retain	LOH	Retain	LOH
複数例での 2項検定P値	0.016		0.090		0.0053	

次に HLA 領域には複数の感受性遺伝子座が認められ、それぞれに対して機能的意義の評価を行った。まず HLA 領域に位置するバリエントと血球別での発現量との相関を検討したところ、発がんリスクと関連する *BTN2A1* バリエントの違いにより、特に CD8<sup>+</sup> T cell (HLA-class I)において *BTN2A1* 遺伝子の発現量と相関しており、Butyrophilin Subfamily に関わる関連遺伝子群は MHC class I に抗原提示やプロセッシングに関わることが知られていることから、恐らく抗原提示に重要な役割を果たしている可能性が示唆された (図 5)。また *BTNL2* に位置するバリエントは、抗原提示を安定して提示する際に重要な役割を果たしている HSP70 ファミリーである *HSPA1A*、*HSPA1B* の発現変動に関

図5. HLA領域に位置するバリエントと肺腺がんリスクとの関連/周辺遺伝子の発現量との相関解析



わり、異なる機構で抗原提示能に影響を与える可能性も示唆している。一方で HLA-DQB1 近傍にあるバリエーションは、HLA-DQB1 自身の発現変動に影響を与えることで、安定的に抗原提示に寄与している可能性が示唆された。一方で、HLA-class I に位置するバリエーションは、自身の遺伝子発現には変動しないことから、恐らく HLA アレルとネオアンチゲンとの親和性が重要な役割を果たしていると考えられた。以前の報告で、肺腺がんを対象に全エクソンシーケンスを実施し、ドライバー遺伝子異常別での体細胞変異数を比較したところ、融合遺伝子を伴う肺腺がんでは体細胞変異数が他のドライバー変異に比べて少ないことを申請者らは報告している (Saito, Shiraishi, Kohno et al., Cancer Res. 2016)。そこで、EGFR 変異陽性肺腺がん症例と健常群との症例対象研究を実施したところ、今回発がんリスクにかかわる HLA アレルは、EGFR 変異陽性肺腺がん強い関連を認めた。

## 5) 考察

本研究により、肺腺がんの発症リスクにはHLA アリルやその周辺の遺伝子多型が関わっており、さらにこれらの遺伝子多型が様々な血球において複雑に遺伝子発現量に影響を与えることで、発がんリスクにかかわることを見出した。この結果は、他のがん種や治療応答性についても同様の現象が起きている可能性があり、大腸がんの多がん種などについても引き続き検討する予定である。

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

この1年間の研究期間を通して、臨床検体の取り扱い並びに DNA/RNA の抽出、次世代シーケンサーのためのライブラリ作成など wet 解析手技を行うと共に、胚細胞系列変異やがんの体細胞変異のデータ解析や TCGA などの公開データの解析を主体的に行い、バイオインフォマティクス技術の習得を行うことができた。

肺腺がんにおいて認められた現象を他のがん種にもおいても同様の結果が期待できるため、がん種横断的な発がんリスクの同定を引き続き行なっていきたいと考えている。さらに発がんリスクと術後再発や治療抵抗性などの臨床にも応用できるような形でも本研究を引き続き行なっていきたいと考えている。