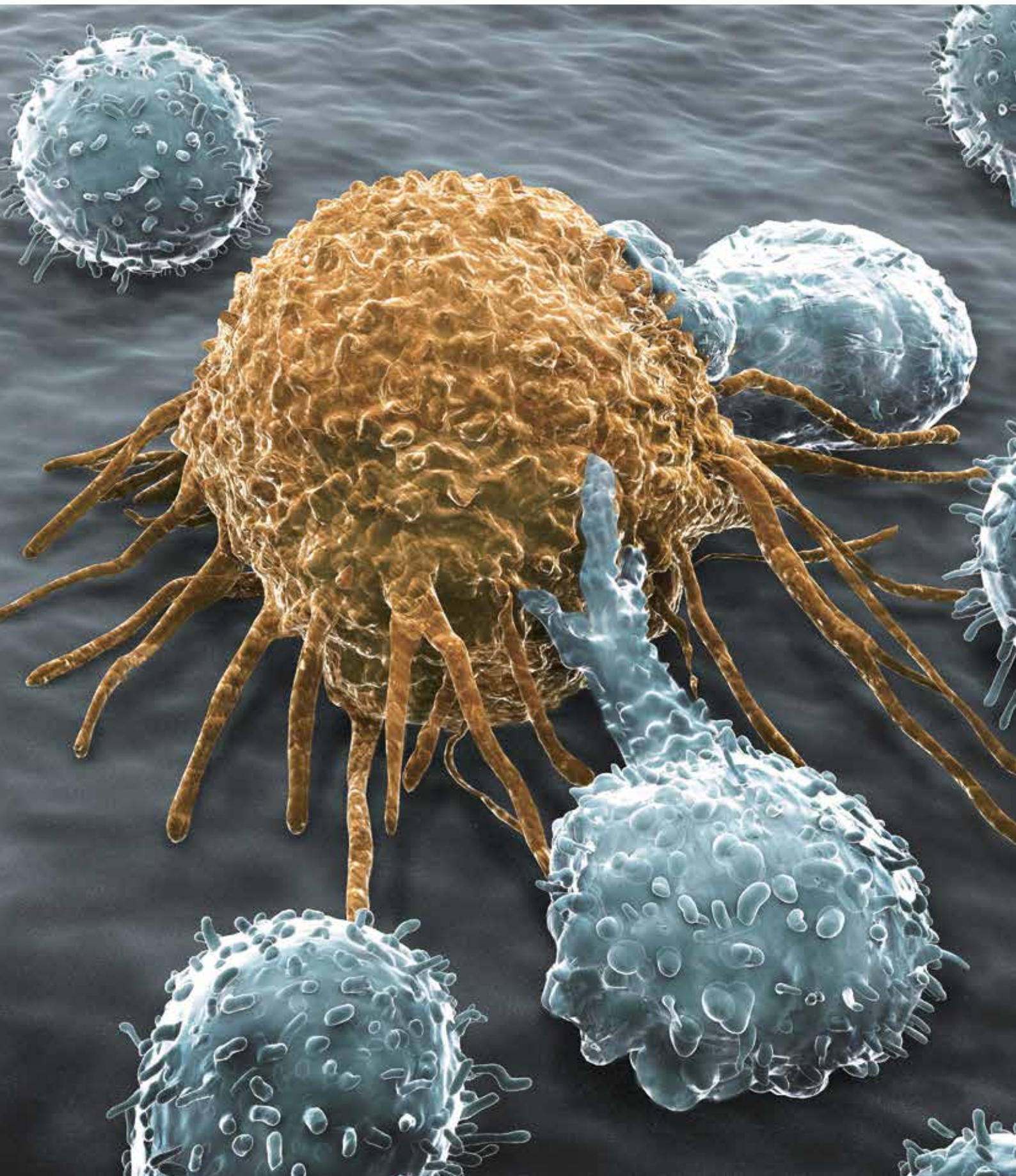


# 腫瘍および免疫系

イルミナテクノロジーを使用した研究論文の概要





## 目次

- 4 はじめに
- 5 免疫チェックポイント阻害剤
- 8 T細胞レパートリー
- 11 抗体レパートリー
- 13 癌エピトープ
- 16 癌免疫エディティング
- 18 腫瘍微小環境
- 19 腫瘍内T細胞
- 20 癌免疫療法
- 23 樹状細胞
- 25 血液系腫瘍
- 28 単一細胞とTCRシーケンス
- 30 参考文献一覧

本書では、イルミナの技術を使用した腫瘍および免疫学研究に関する最新の論文をクローズアップしています。  
引用されているプラットフォームおよびアッセイについての詳細は [www.illumina.com](http://www.illumina.com) をご覧ください。

## はじめに

悪性黒色腫<sup>1</sup>に有効な免疫チェックポイント阻害剤を適用したことにより、免疫系の機構や制御に関する数十年にわたる基礎研究はその全盛ともいえる傑出した成果を挙げました。この研究により、チェックポイント阻害剤応答の正確なレプリケートとなるマウスモデルなどの研究材料が開発され、癌治療の課題を克服する取り組みが続いています<sup>2</sup>。皮肉にも、イピリムマブ<sup>3</sup>やニボルマブ<sup>4</sup>のようなチェックポイント阻害剤は、それ自身がモノクローナル抗体です。黒色腫に集中した現在の治療法ではすべての患者が平等に恩恵を受けられていない一方で、科学的な知見の基礎も次第に固められ、組合せ療法や標的療法の適用における比較的急速で論理的な進展が可能になってきています<sup>5</sup>。

ハイスループットのシーケンスは、癌や免疫の研究、さらには個別化された免疫療法の開発においてもその実用性を顕著に示しました。例として、ハイスループットのシーケンスにより、癌の進行に関連する癌ゲノムや細胞内機構に関する知識は劇的に改善されました。加えて、癌ゲノムの解析を慎重に行うことで、免疫系が標的とし得る新たなエピトープを解明することも可能です<sup>6</sup>。シーケンスは、腫瘍の成長や治療に反応して起こる細胞集団のクローン増殖や縮小のリアルタイムで高精度なモニターとして、免疫レパートリーの特定に使用することもできます<sup>7,8,9</sup>。

### 総説

Robinson W. H. (2015) Sequencing the functional antibody repertoire--diagnostic and therapeutic discovery. *Nat Rev Rheumatol* 11: 171-182

Chaudhary B., Abd Al Samid M., al-Ramadi B. K. and Elkord E. (2014) Phenotypic alterations, clinical impact and therapeutic potential of regulatory T cells in cancer. *Expert Opin Biol Ther* 14: 931-945

Giraldo N. A., Becht E., Remark R., Damotte D., Sautes-Fridman C., et al. (2014) The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Curr Opin Immunol* 27: 8-15

Linnemann C., Mezzadra R. and Schumacher T. N. (2014) TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev* 257: 72-82

Perez-Gracia J. L., Labiano S., Rodriguez-Ruiz M. E., Sanmamed M. F. and Melero I. (2014) Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr Opin Immunol* 27: 89-97

Rosenberg S. A. (2014) Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 21: 45-47

1. Chapman P. B., D' Angelo S. P. and Wolchok J. D. (2015) Rapid eradication of a bulky melanoma mass with one dose of immunotherapy. *N Engl J Med* 372: 2073-2074
2. Spranger S., Bao R. and Gajewski T. F. (2015) Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523: 231-235
3. Ribas A. (2012) Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med* 366: 2517-2519
4. Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., et al. (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366: 2443-2454
5. Leavy O. (2015) Tumour immunology: A triple blow for cancer. *Nat Rev Immunol* 15: 265
6. Kreiter S., Vormehr M., van de Roemer N., Diken M., Lower M., et al. (2015) Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520: 692-696
7. Robinson W. H. (2015) Sequencing the functional antibody repertoire--diagnostic and therapeutic discovery. *Nat Rev Rheumatol* 11: 171-182
8. Ribas A. and Wolchok J. D. (2013) Combining cancer immunotherapy and targeted therapy. *Curr Opin Immunol* 25: 291-296
9. Kvistborg P., van Buuren M. M. and Schumacher T. N. (2013) Human cancer regression antigens. *Curr Opin Immunol* 25: 284-290
10. Pardoll D. M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252-264
11. Chapman P. B., D' Angelo S. P. and Wolchok J. D. (2015) Rapid eradication of a bulky melanoma mass with one dose of immunotherapy. *N Engl J Med* 372: 2073-2074
12. Postow M. A., Chesney J., Pavlick A. C., Robert C., Grossmann K., et al. (2015) Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 372: 2006-2017

## 免疫チェックポイント阻害剤

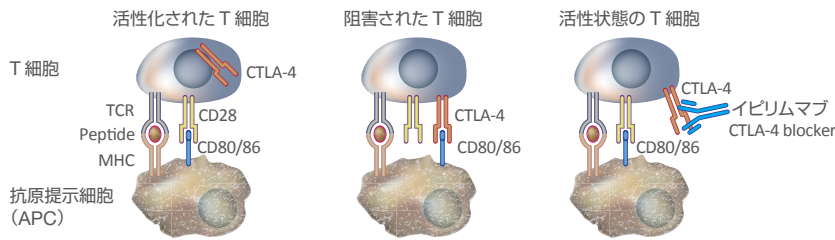
免疫阻害受容体を遮断する有効な治療方針の適用により、癌治療は革命的に進歩しています<sup>10</sup>。細胞傷害性のTリンパ球抗原4 (CTLA-4)、プログラム細胞死1 (PD-1)、およびプログラム細胞死1リガンド (PD-L1) に有効なモノクローナル抗体を使用して制御性免疫応答を阻害することにより、画期的で持続性のある反応が得られました<sup>11, 12, 13, 14</sup>。しかし、患者の反応を決定する要因についてはまだ明らかになっていません<sup>15, 16</sup>。ホスホイノシチド3キナーゼ/プロテインキナーゼB (PI3K/AKT) のパスウェイ<sup>17, 18</sup>やプロモドメイン含有プロテイン4 (BRD4)<sup>19</sup>などを標的としたこれらの反応を改善する薬剤の可能性も探索されています (表1)。

私たちがここに来て、非常に活発な抗黒色腫反応の可能性を危惧するのは、皮肉なことである Chapman<sup>20</sup>

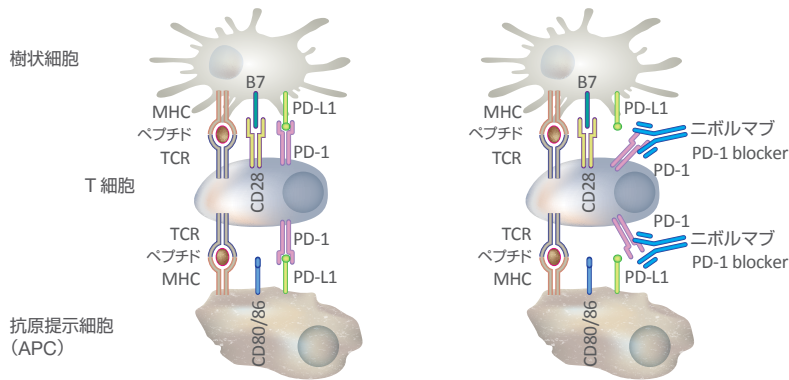
表1: 免疫チェックポイント阻害剤とその標的

薬剤名	商標	標的	スポンサー	参照
ダブラフェニブ	Tafinlar	BRAF V600E 変異体	グラクソ・スミスクライン株式会社	21
ベムラフェニブ	Zelboraf	BRAF V600E 変異体	第一三共株式会社	22
イピリムマブ	Yervoy	CTLA-4	プリストル・マイヤーズ株式会社	23
トレメリムマブ	未定	CTLA-4	ファイザー株式会社	24
ペンブロリズマブ	Keytruda	PD-1	メルク株式会社	25
ニボルマブ	Opdivo	PD-1	プリストル・マイヤーズ株式会社	26

13. Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., et al. (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366: 2443-2454
14. Hodi F. S., O' Day S. J., McDermott D. F., Weber R. W., Sosman J. A., et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-723
15. Delyon J., Mateus C., Lefeuvre D., Lanoy E., Zitvogel L., et al. (2013) Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol* 24: 1697-1703
16. Wolchok J. D., Kluger H., Callahan M. K., Postow M. A., Rizvi N. A., et al. (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369: 122-133
17. Chen G., Chakravarti N., Aardalen K., Lazar A. J., Tetzlaff M. T., et al. (2014) Molecular profiling of patient-matched brain and extracranial melanoma metastases implicates the PI3K pathway as a therapeutic target. *Clin Cancer Res* 20: 5537-5546
18. Kim K., Skora A. D., Li Z., Liu Q., Tam A. J., et al. (2014) Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11774-11779
19. Segura M. F., Fontanals-Cirera B., Gaziel-Sovran A., Guijarro M. V., Hanniford D., et al. (2013) BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy. *Cancer Res* 73: 6264-6276
20. Chapman P. B., D' Angelo S. P. and Wolchok J. D. (2015) Rapid eradication of a bulky melanoma mass with one dose of immunotherapy. *N Engl J Med* 372: 2073-2074
21. Gibney G. T. and Zager J. S. (2013) Clinical development of dabrafenib in BRAF mutant melanoma and other malignancies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9: 893-899
22. Bollag G., Hirth P., Tsai J., Zhang J., Ibrahim P. N., et al. (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467: 596-599
23. Ribas A. (2012) Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med* 366: 2517-2519
24. Reuben J. M., Lee B. N., Li C., Gomez-Navarro J., Bozon V. A., et al. (2006) Biologic and immunomodulatory events after CTLA-4 blockade with ticilimumab in patients with advanced malignant melanoma. *Cancer* 106: 2437-2444
25. Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F. S., Hwu W. J., et al. (2013) Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369: 134-144
26. Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., et al. (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366: 2443-2454



イピリムマブの作用機序。イピリムマブは、CTLA-4 と結合して CTLA-4 とそのリガンドである CD80/CD86 との相互作用を遮断するモノクローナル抗体です。CTLA-4 が遮断されると、腫瘍浸潤性 T エフェクター細胞が活性化され増殖するなど、T 細胞の活性化および増殖が増強されます。(www.hcp.yervoy.com)



ニボルマブの作用機序。主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 抗原の結合により T 細胞が腫瘍を認識すると、腫瘍細胞表面で PD-L1 が上方制御されます。PD-1/PD-L1 の相互作用により、T 細胞が媒介する腫瘍の死滅が阻害されます。PD-1/PD-L1 の相互作用が遮断されると、T 細胞が媒介する腫瘍の死滅が再び活性化されます。

## 総説

Leavy O. (2015) Tumour immunology: A triple blow for cancer. *Nat Rev Immunol* 15: 265

Chaudhary B., Abd Al Samid M., al-Ramadi B. K. and Elkord E. (2014) Phenotypic alterations, clinical impact and therapeutic potential of regulatory T cells in cancer. *Expert Opin Biol Ther* 14: 931-945

Gubin M. M., Zhang X., Schuster H., Caron E., Ward J. P., et al. (2014) Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515: 577-581

## 参考文献

Chen G., Chakravarti N., Aardalen K., Lazar A. J., Tetzlaff M. T., et al. (2014) Molecular profiling of patient-matched brain and extracranial melanoma metastases implicates the PI3K pathway as a therapeutic target. *Clin Cancer Res* 20: 5537-5546

イピリムマブとダブラフェニブは、FDA より認可された転移性黒色腫に有効な 2 つの新規治療剤ですが、脳転移の患者にはわずかな有効性しか示しません。著者らは、患者にマッチした脳と頭蓋の外への転移とを比較し、類似性が極めて高いことを明らかにしました。しかし、ターゲットとすることができる脳転移のパスウェイには顕著な相違もあることもわかっています。特に、PI3K/AKT パスウェイが腫瘍の活性化に重要な役割を果たしていると考えられています。

イルミナ技術 : HumanHT12 v4 BeadChip アレイ

**Kim K., Skora A. D., Li Z., Liu Q., Tam A. J., et al. (2014) Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 11774-11779**

免疫原性の低い癌は、免疫療法に良好な応答を示しません。著者らは、エピジエネティック修飾剤およびチェックポイント阻害剤で治療した、免疫チェックポイントモジュレーターに耐性を示すマウスで著しく治療転帰が改善し、癌に罹患したマウスの80%以上で治癒が確認されたことを明らかにしました。エピジエネティック修飾剤の第一標的は骨髄系由来サブレッサー細胞 (MDSC) でした。循環するMDSCを低減するPI3K阻害剤を免疫チェックポイント阻害剤と併用すると、80%のマウスで4T1腫瘍が根絶しました。

イルミナ技術: Genome Analyzer<sub>IIx</sub> および HiSeq

**Robert L., Tsoi J., Wang X., Emerson R., Homet B., et al. (2014) CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. Clin Cancer Res 20: 2424-2432**

著者らは、患者21人の末梢血単核細胞にある、再配列したT細胞受容体 (TCR) 変異性ベータ (V-beta) 鎖由来の相補性決定領域3 (CDR3) のシーケンスを、ベースライン時とトレメリムマブでCTLA4を阻害後30~60日経過時に行いました。CDR3配列の多様性に拡大が認められましたが、多様性に関して臨床反応群と無反応群との相関はありませんでした。

イルミナ技術: Genome Analyzer

**Snyder A., Makarov V., Merghoub T., Yuan J., Zaretsky J. M., et al. (2014) Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. N Engl J Med 371: 2189-2199**

著者らは、CTLA-4遮断処理を行った64人の患者由来の悪性黒色腫エクソームをシーケンスし、CTLA-4遮断に強い反応を示す腫瘍シグネチャーを開発しました。抗CTLA-4抗体で処理した黒色腫の患者39人を対象に第II相試験でこのシグネチャーを検証したところ、予測した新生抗原がイビリムマブを投与した患者のT細胞を活性化したことが明らかとなりました。

イルミナ技術: HiSeq 2000 を用いてエクソームライブラリーをシーケンス

**Tumeh P. C., Harview C. L., Yearley J. H., Shintaku I. P., Taylor E. J., et al. (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature 515: 568-571**

著者らは、侵襲性腫瘍境界に明確に位置する先在のCD81 T細胞は、PD-1/PD-L1免疫抑制軸の発現と関連し、治療に対する応答を予測する場合があることを示しました。著者らは、治療としてPD-1を阻害した後に腫瘍が退縮するには、PD-1/PD-L1が媒介する適応免疫耐性によってネガティブに制御されている先在のCD81 T細胞が必要であると結論付けています。

イルミナ技術: HiSeq

Rochman Y., Yukawa M., Kartashov A. V. and Barski A. (2015) Functional characterization of human T cell hyporesponsiveness induced by CTLA4-Ig. PLoS One 10: e0122198

Spranger S., Bao R. and Gajewski T. F. (2015) Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. Nature 523: 231-235

Johnson D. B., Smalley K. S. and Sosman J. A. (2014) Molecular pathways: targeting NRAS in melanoma and acute myelogenous leukemia. Clin Cancer Res 20: 4186-4192

Sengsayadeth S., Wang T., Lee S. J., Haagenson M. D., Spellman S., et al. (2014) Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 single nucleotide polymorphisms are not associated with outcomes after unrelated donor transplantation: a center for international blood and marrow transplant research analysis. Biol Blood Marrow Transplant 20: 900-903

Westin J. R., Chu F., Zhang M., Fayad L. E., Kwak L. W., et al. (2014) Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol 15: 69-77

# T細胞レパートリー

人間には、非常に多様な病原体や腫瘍から体を保護する免疫系が備わっています。この保護機能は、B細胞およびT細胞の表面で病原抗原または病原体由来の抗原に結合する受容体の膨大な数のレパートリーによって媒介されています<sup>27</sup>。T細胞は、MHCに結合する異種性抗原提示細胞に関するヘテロ二量体 ( $\alpha\beta$  または  $\gamma\delta$ ) の細胞表面受容体 (TCR) を発現させて、細胞性免疫を媒介しています<sup>28</sup>。

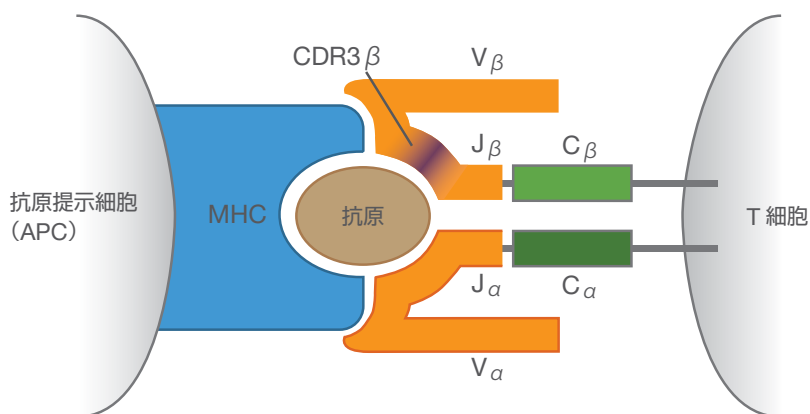
- 
- 27. Robins H. (2013) Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Curr Opin Immunol* 25: 646-652
  - 28. Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98
- 

## 総説

Calis J. J. and Rosenberg B. R. (2014) Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol* 35: 581-590

Linnemann C., Mezzadra R. and Schumacher T. N. (2014) TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev* 257: 72-82

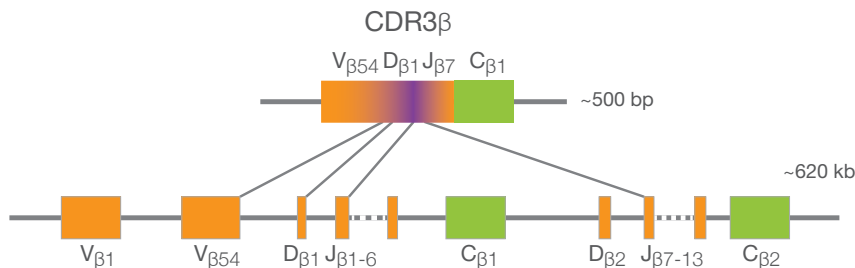
Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98



TCR - 抗原 - ペプチド - MHC 相互作用および TCR 遺伝子組換え。a) 抗原提示細胞から MHC に結合するペプチド抗原が生じます。TCR (オレンジ色で表示) は、抗原と MHC の両方に結合します。結合能が十分に高ければ、T細胞が活性化されます。相補決定領域3 (CDR3) ドメインを紫で表示しています。



B 細胞受容体 (BCR) および TCR の両方にあり非常に可変性のある CDR3 領域は、15 から 60 ヌクレオチドまでと短いため、とりわけ次世代シーケンサー (NGS) に適しています。NGS は T 細胞集団の解明に広く利用されています<sup>29, 30, 31, 32</sup>。このプロセスでは、一般的に TCRβ 鎖をマーカーとして使います<sup>33</sup>。



TCR の多様性につながる TCR-β 鎖可変部 (V)、多様性 (D)、および結合部 (J) の遺伝子組み換えを簡略化して表示したものです。染色体 7 の TCR-β 部位の長さはおおよそ 620kb です。最初に D 領域の 1 つが 13J 領域の 1 つと結合し (どちらも無作為に選択)、次にこの DJ 領域に無作為に選ばれた 50 以上の V 領域が結合して、最終的に長さ約 500bp の VDJ 領域を生成します。遺伝子断片を結合するこの機構は、これら遺伝子断片の組み合わせを選択しながら、TCR の多様性へとつながる塩基対の可変部も導入します。D 遺伝子断片のない、完全に相似したプロセスが TCR-α 鎖にも適用されます。

フローサイトメトリー<sup>34</sup> や spectratyping<sup>35</sup> のような従来技術では、その分解能の低さから同じ TCR-Vβ 断片や同じ長さの CDR3 で TCR のクローン型を区別することはできませんでした<sup>36, 37</sup>。幸い、NGS では上記 T 細胞集団内に存在するすべての TCRβ CDR3 配列のヌクレオチド配列を、非常に低頻度<sup>38</sup> であっても、解明することが可能です。TCRβ CDR3 レパートリーは非常に多様であるため、得られる配列のほとんどはそれぞれ個別の TCR クローン型を提示します<sup>39</sup>。NGS は、T 細胞集団の正確な特定を可能にしなが、治療への反応を予測し、モニターすることを目的とするツールです<sup>40</sup>。

機能 TCR は、α 鎖および β 鎖の両方で構成されるヘテロ二量体のタンパク質です。T 細胞の α 鎖および β 鎖の組み合わせはすべて固有のものであり、その機能を正確に解析するためには両方のサブユニットを一緒にシーケンスする必要があります。細胞融解によって α 鎖と β 鎖の対合が中断されないよう<sup>41</sup>、幾つかのシングルセルシーケンス法が開発されています<sup>42</sup>。詳しくは、「単一細胞と TCR シーケンス」をご参照ください。

29. van Heijst J. W., Ceberio I., Lipuma L. B., Samilo D. W., Wasilewski G. D., et al. (2013) Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* 19: 372-377
30. Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98
31. Meier J., Roberts C., Avent K., Hazlett A., Berrie J., et al. (2013) Fractal organization of the human T cell repertoire in health and after stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 19: 366-377
32. La Gruta N. L. and Thomas P. G. (2013) Interrogating the relationship between naive and immune antiviral T cell repertoires. *Curr Opin Virol* 3: 447-451
33. Linnemann C., Heemskerck B., Kvistborg P., Kluin R. J., Bolotin D. A., et al. (2013) High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med* 19: 1534-1541
34. Langerak A. W., van Den Beemd R., Wolvers-Tettero I. L., Boor P. P., van Lochem E. G., et al. (2001) Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalphabeta T-cell proliferations. *Blood* 98: 165-173
35. Gorski J., Yassai M., Zhu X., Kissella B., Kissella B., et al. (1994) Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J Immunol* 152: 5109-5119
36. Linnemann C., Heemskerck B., Kvistborg P., Kluin R. J., Bolotin D. A., et al. (2013) High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med* 19: 1534-1541
37. Sherwood A. M., Emerson R. O., Scherer D., Habermann N., Buck K., et al. (2013) Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal tumors display a diversity of T cell receptor sequences that differ from the T cells in adjacent mucosal tissue. *Cancer Immunol Immunother* 62: 1453-1461
38. Robins H., Desmarais C., Matthis J., Livingston R., Andriesen J., et al. (2012) Ultra-sensitive detection of rare T cell clones. *J Immunol Methods* 375: 14-19
39. Robins H. S., Campregheer P. V., Srivastava S. K., Wachter A., Turtle C. J., et al. (2009) Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood* 114: 4099-4107
40. Fridman W. H., Pages F., Sautes-Fridman C. and Galon J. (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12: 298-306
41. Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98
42. Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515

## 参考文献

Qi Q., Liu Y., Cheng Y., Glanville J., Zhang D., et al. (2014) Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 13139-13144

著者らは、NGS およびノンパラメトリックな統計解析により、ヒトのレパートリーに存在する異なる TCR- $\beta$  配列総計の下限を予測しました。著者らの予測した、若年成人のナイーブな CD4 および CD8T 細胞にみられる固有の TCR- $\beta$  配列数の最小値は 10 億と高い値でした。

イルミナ技術：MiSeq

Robert L., Tsoi J., Wang X., Emerson R., Homet B., et al. (2014) CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res* 20: 2424-2432

著者らは、21 人の患者の PBMC において再配列した TCR-V $\beta$  鎖由来の CDR3 領域を、ベースライン時とトレメリブマブで CTLA4 を阻害して 30~60 日経過時にシーケンスしました。CDR3 配列の多様性に拡大が認められましたが、多様性に関する臨床反応群と無反応群との相関はありませんでした。

イルミナ技術：Genome Analyzer

Tumeh P. C., Harview C. L., Yearley J. H., Shintaku I. P., Taylor E. J., et al. (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515: 568-571

著者らは、侵襲性腫瘍境界に明確に位置する先在の CD81 T 細胞は、PD-1/PD-L1 免疫抑制軸の発現と関連し、治療に対する応答を予測する場合があることを示しました。著者らは、治療として PD-1 を阻害した後に腫瘍が退縮するには、PD-1/PD-L1 が媒介する適応免疫耐性によってネガティブに制御されている先在の CD81T 細胞が必要であると結論付けています。

イルミナ技術：HiSeq

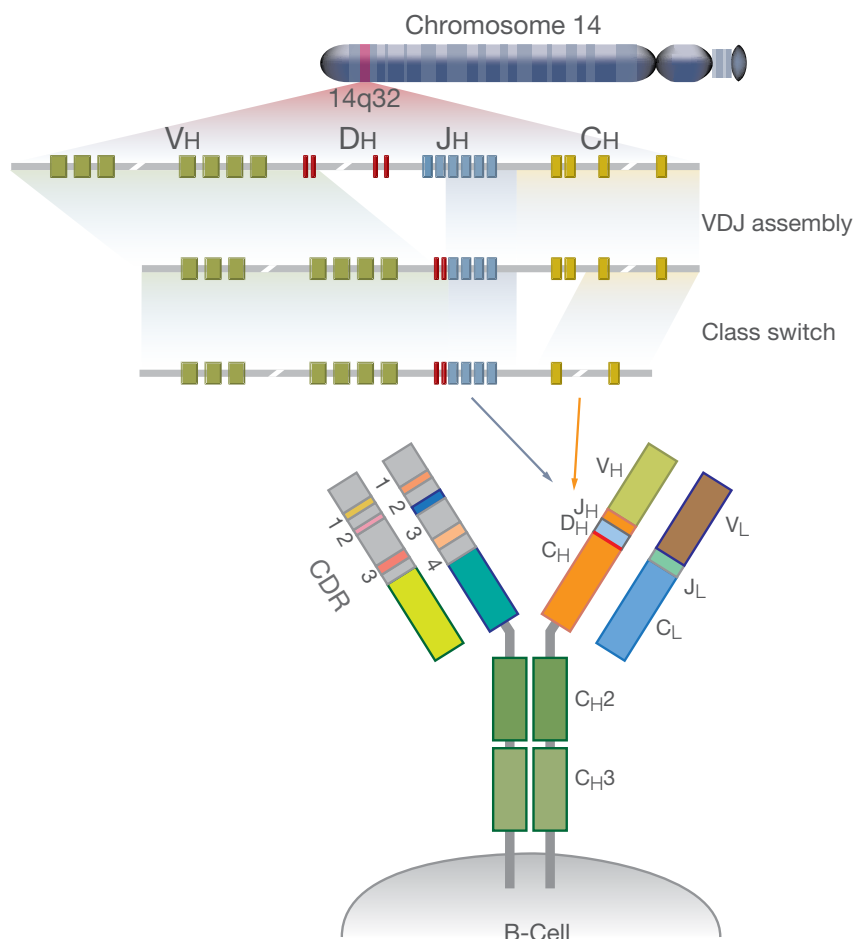
Bajor D. L., Xu X., Torigian D. A., Mick R., Garcia L. R., et al. (2014) Immune activation and a 9-year ongoing complete remission following CD40 antibody therapy and metastasectomy in a patient with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Res* 2: 1051-1058

Madi A., Shifrut E., Reich-Zeliger S., Gal H., Best K., et al. (2014) T-cell receptor repertoires share a restricted set of public and abundant CDR3 sequences that are associated with self-related immunity. *Genome Res* 24: 1603-1612

## 抗体レパートリー

抗体レパートリーのシーケンスにより、自己免疫、ワクチン接種、感染症、および癌への免疫応答に関する理解は変わりつつあります。この潜在能力の高い技術によって、リウマチ性疾患などのさまざまな疾患に対する、次世代バイオマーカー、診断用ツール、そして治療用抗体が開発されることが期待されます。

43. Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., et al. (2014) The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol* 32: 158-168



一次抗体の重鎖 (IgH) レパートリーのほとんどは、V、D、およびJ 遺伝子断片の体細胞組換えで形成されます。鋳型のないヌクレオチド (赤で表示) を付加することもできます。重鎖の抗原結合部位は、高頻度可変性の相補性決定領域 (CDR-H1、H2、および H3) およびフレームワーク 3 領域 (FR3) が並列して形成されています。IgH が再配列されると、続いて軽鎖 (IgL) が組み換えられ、H 鎖および L 鎖がヘテロ二量体対合して、新規に形成された未成熟 B 細胞の表面に発現する IgM アイソタイプの完全抗体を形成します<sup>43</sup>。

## 総説

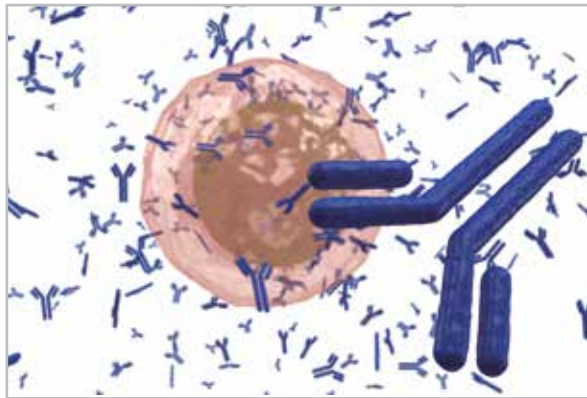
Robinson W. H. (2015) Sequencing the functional antibody repertoire--diagnostic and therapeutic discovery. *Nat Rev Rheumatol* 11: 171-182

Calis J. J. and Rosenberg B. R. (2014) Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol* 35: 581-590

Dhelly N. M., Adema C., Raftos D. A., Gourbal B., Grunau C., et al. (2014) No more non-model species: the promise of next generation sequencing for comparative immunology. *Dev Comp Immunol* 45: 56-66

Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., et al. (2014) The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol* 32: 158-168

Shugay M., Britanova O. V., Merzlyak E. M., Turchaninova M. A., Mamedov I. Z., et al. (2014) Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods* 11: 653-655



B細胞が生成する抗体

## 参考文献

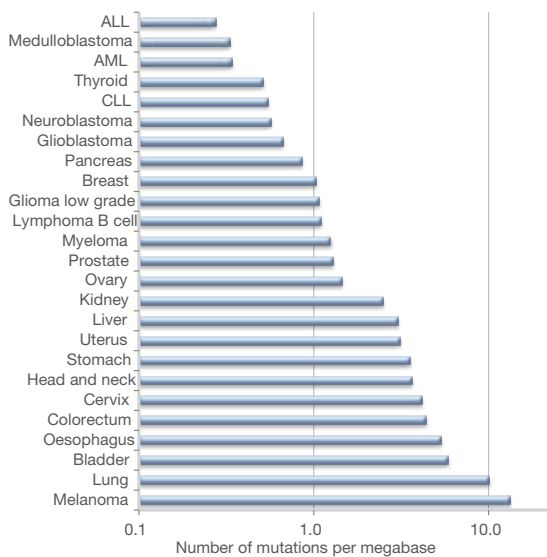
Birnbaum M. E., Mendoza J. L., Sethi D. K., Dong S., Glanville J., et al. (2014) Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. *Cell* 157: 1073-1087

Menzel U., Greiff V., Khan T. A., Haessler U., Hellmann I., et al. (2014) Comprehensive evaluation and optimization of amplicon library preparation methods for high-throughput antibody sequencing. *PLoS One* 9: e96727

## 癌エピトープ

さまざまな遺伝的およびエピジェネティックな変化により、腫瘍細胞は正常細胞にはないタンパク質を大量に生成します。これらのタンパク質は、MHC クラス I 関連ペプチドのレパートリーを変化させることもあります。これらのエピトープには、腫瘍細胞内に異常発現する遺伝子由来のペプチドだけでなく、腫瘍細胞内の体細胞変異が直接もたらす結果として“新生抗原”も含まれます。したがって、これらの新生抗原は腫瘍に特異的であり、患者固有のものとなります。T 細胞は、ヒトの腫瘍細胞表面に存在する抗原を認識し、それによって癌の退縮を媒介することができます<sup>44, 45</sup>。

癌ゲノムの特性を明らかにするためにここ数年で NGS の利用が急増したことにより、有力な腫瘍特異的抗原の特性を明らかにする独自の機会も得られています<sup>46, 47, 48</sup>。動物モデル<sup>49, 50</sup>やヒトの癌<sup>51, 52, 53</sup>のエクソームシーケンスにより得られたデータで、腫瘍特異的な変異により形成された新生抗原に対する T 細胞の反応性を予測することが可能になりました。効果的な免疫療法における抗原の主要な標的を理解することは、最終的により正確な予後や治療につながると考えられます<sup>54, 55</sup>。



ヒトの癌タイプによる体細胞変異の発生率<sup>56</sup>

44. Kvistborg P., van Buuren M. M. and Schumacher T. N. (2013) Human cancer regression antigens. *Curr Opin Immunol* 25: 284-290
45. Walter S., Weinschenk T., Stenzl A., Zdrojowy R., Pluzanska A., et al. (2012) Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 18: 1254-1261
46. Garraway L. A. and Lander E. S. (2013) Lessons from the cancer genome. *Cell* 153: 17-37
47. Yates L. R. and Campbell P. J. (2012) Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13: 795-806
48. Dong H. and Wang S. (2012) Exploring the cancer genome in the era of next-generation sequencing. *Front Med* 6: 48-55
49. Matsushita H., Vesely M. D., Koboldt D. C., Rickert C. G., Uppaluri R., et al. (2012) Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482: 400-404
50. Castle J. C., Kreiter S., Diekmann J., Lower M., van de Roemer N., et al. (2012) Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 72: 1081-1091
51. Robbins P. F., Lu Y. C., El-Gamil M., Li Y. F., Gross C., et al. (2013) Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 19: 747-752
52. Segal N. H., Parsons D. W., Peggs K. S., Velculescu V., Kinzler K. W., et al. (2008) Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* 68: 889-892
53. van Rooij N., van Buuren M. M., Philips D., Velds A., Toebes M., et al. (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 31: e439-442
54. Heemskerk B., Kvistborg P. and Schumacher T. N. (2013) The cancer antigenome. *EMBO J* 32: 194-203
55. Lu Y. C., Yao X., Li Y. F., El-Gamil M., Dudley M. E., et al. (2013) Mutated PPP1R3B is recognized by T cells used to treat a melanoma patient who experienced a durable complete tumor regression. *J Immunol* 190: 6034-6042
56. Alexandrov L. B., Nik-Zainal S., Wedge D. C., Aparicio S. A., Behjati S., et al. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500: 415-421

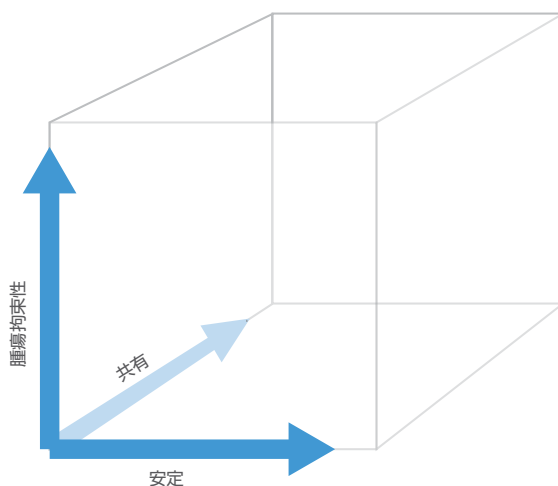
## 総説

Rosenberg S. A. (2014) Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 21: 45-47

抗腫瘍活性によるリンパ球の発生は、現在の癌免疫療法の研究で得られた主要な成果となりました。しかし、ターゲットとなる癌細胞表面のタンパク質は、低レベルではあっても依然として健常組織に発現し、治療によって重篤な毒性効果のリスクを引き起こす場合があります。主に障害となっているのは、癌細胞上にある適切な免疫性ターゲットの同定です。遺伝子改変したリンパ球を使ってターゲットにする抗原の理想的なソースとは、各癌タイプに固有であり、正常組織には見られない、共有型の突然変異体です。例として、黒色腫にみられる B-RAF や膀胱がんやその他の癌に見られる K-RAS などの共通変異体は、細胞移入の免疫療法に理想的なターゲットを代表するものであり、上記の適切な抗原受容体の同定も可能です。リンパ球の遺伝子編集により、この遺伝子治療分野に新たな可能性が開かれようとしています。

Kvistborg P, van Buuren M. M. and Schumacher T. N. (2013) Human cancer regression antigens. *Curr Opin Immunol* 25: 284-290

細胞傷害性 T 細胞は、ヒトの腫瘍細胞の表面に存在する抗原を認識することで癌の退縮を媒介することができます。この可能性を癌治療に利用するためには、1) 患者群で共有される腫瘍抗原、2) 腫瘍にしか発現しない抗原、3) 選択圧下の抗原損失の可能性が低い腫瘍抗原、を同定するという課題が残されています。NGS の開発によって、個別の腫瘍内の腫瘍特異的な変異レパートリーを比較的容易に説明できるようになり、これらの基準に適合する、患者に特異な変異抗原を予測することが可能となっています。



ヒトの腫瘍関連抗原の特長を 3D 表示しています。安定:T 細胞から圧力を受けた時の抗原保持の可能性; 腫瘍拘束性: 正常との比較による腫瘍の固有度; 共有: 患者間の共有度<sup>57</sup>。

Heemskerk B., Kvistborg P. and Schumacher T. N. (2013) The cancer antigenome. *EMBO J* 32: 194-203

Haen S. P. and Rammensee H. G. (2013) The repertoire of human tumor-associated epitopes--identification and selection of antigens and their application in clinical trials. *Curr Opin Immunol* 25: 277-283

van Rooij N., van Buuren M. M., Philips D., Velds A., Toebes M., et al. (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 31: e439-442

57. Kvistborg P, van Buuren M. M. and Schumacher T. N. (2013) Human cancer regression antigens. *Curr Opin Immunol* 25: 284-290

## 参考文献

Green M. R., Kihira S., Liu C. L., Nair R. V., Salari R., et al. (2015) Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E1116-1125

著者らは、NGSを利用して、22人の濾胞性リンパ腫患者の濃縮された生検体で変異階層の再構築を行いました。著者らは、同一腫瘍の野生型 B 細胞と比較すると、CREBBP 変異型 B 細胞の刺激により生体内 T 細胞の増殖が低下したことを明らかにしました。転写シグネチャーは、腫瘍浸潤性 CD4 ヘルパー T 細胞や CD8 記憶細胞傷害性 T 細胞の数の減少を示唆しました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Kreiter S., Vormehr M., van de Roemer N., Diken M., Lower M., et al. (2015) Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520: 692-696

この研究では、変異の発現レベルおよび MHC クラス II の結合能に基づいた生物情報工学の優先順位化のみにより、エクソームシーケンスで同定された変異型がワクチンのターゲットとして選択可能であるプロセスを説明しています。この情報を利用して、合成高分子新生エペトープメッセンジャー RNA (mRNA) ワクチンを迅速に作製することができます。著者らは、この“ポリトープ” mRNA ワクチンを接種することにより、マウスに定着して活発に増殖を続ける腫瘍の完全な拒絶および有効な腫瘍制御が誘発されることを示しています。

イルミナ技術: HiSeq 2000 を用いたエクソームおよび mRNA シーケンス

Yadav M., Jhunjunwala S., Phung Q. T., Lupardus P., Tanguay J., et al. (2014) Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 515: 572-576

著者らは、全エクソームシーケンスとトランスクリプトームシーケンスを質量分析法と組み合わせて解析を行う手法を開発し、新生エペトープを同定しました。マウスにワクチンを接種して、この手法により、予測した免疫原性ペプチドそれぞれが治療に有効な T 細胞反応を生じていることが確認されました。この手法は、T 細胞反応の薬力学的なモニタリングや癌患者固有のワクチン開発に利用することが可能です。

イルミナ技術: HiSeq 2000

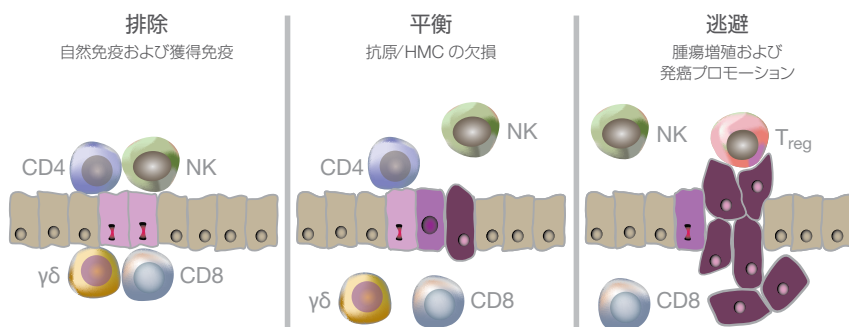
van Buuren M. M., Dijkgraaf F. E., Linnemann C., Toebes M., Chang C. X., et al. (2014) HLA micropolymorphisms strongly affect peptide-MHC multimer-based monitoring of antigen-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 192: 641-648

Robbins P. F., Lu Y. C., El-Gamil M., Li Y. F., Gross C., et al. (2013) Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 19: 747-752

van Rooij N., van Buuren M. M., Philips D., Velds A., Toebes M., et al. (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 31: e439-442

## 癌免疫エディティング

癌免疫エディティングとは、獲得免疫系および自然免疫系の両方が腫瘍の成長を制御し、腫瘍の免疫原性を形作るプロセスです<sup>58, 59, 60, 61, 62</sup>。このプロセスは、排除相、平衡相、逃避相の3つのフェーズで構成されています<sup>63</sup>。排除相は、癌の免疫サーバランスとも称され、獲得免疫と自然免疫の両方が新たに形成された癌細胞を同定し破壊するプロセスです。最も長いフェーズである平衡では、腫瘍成長の阻止と、数少ない新生細胞の免疫原性が形を変えることが均衡状態にあります。逃避段階では、最少の免疫原性腫瘍細胞が成長を進行させ、腫瘍と確認できる状態で広がっていきます。



免疫エディティングでは、腫瘍増殖からの保護と腫瘍増殖の促進のどちらも行われます。排除段階とは、組織内に発生した腫瘍を獲得免疫応答と自然免疫応答が認識して排除するプロセスをいいます。平衡段階は、腫瘍増殖の阻止と死滅に耐性を示す癌細胞が存在するという均衡状態を表します。この段階では、外来抗原や MHC を発現しない新生細胞による免疫原性の低下が転帰となります。逃避段階とは、変異した癌細胞が免疫根絶機序を逃れて、癌細胞を保護する免疫制御性細胞を産出するプロセスをいいます。

エクソームシーケンスにより、研究者は、腫瘍エピトープを実験的に同定して未編集の腫瘍からエピトープを特異的に同定することが可能になりました。このプロセスは、超並列シーケンスと cDNA をキャプチャーするシーケンス (cDNA CapSeq) とを組み合わせで行った最新の研究でも実証されています。この研究から、T 細胞依存の免疫エディティングは、強い拒絶抗原の存在しない腫瘍細胞の増殖に潜在する機構であることが明らかとなっています<sup>64</sup>。

58. Schreiber R. D., Old L. J. and Smyth M. J. (2011) Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-1570
59. Dunn G. P., Koebel C. M. and Schreiber R. D. (2006) Interferons, immunity and cancer immunoeediting. *Nat Rev Immunol* 6: 836-848
60. Gajewski T. F., Woo S. R., Zha Y., Spaapen R., Zheng Y., et al. (2013) Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25: 268-276
61. Dunn G. P., Old L. J. and Schreiber R. D. (2004) The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol* 22: 329-360
62. Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., et al. (2001) IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111
63. Mittal D., Gubin M. M., Schreiber R. D. and Smyth M. J. (2014) New insights into cancer immunoeediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27: 16-25
64. Matsushita H., Vesely M. D., Koboldt D. C., Rickert C. G., Uppaluri R., et al. (2012) Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoeediting. *Nature* 482: 400-404



## 総説

Mittal D., Gubin M. M., Schreiber R. D. and Smyth M. J. (2014) New insights into cancer immunoeediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27: 16-25

Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V. E., Zhou S., Diaz L. A., Jr., et al. (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546-1558

65. Illingworth R. S., Gruenewald-Schneider U., Webb S., Kerr A. R., James K. D., et al. (2010) Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 6: e1001134

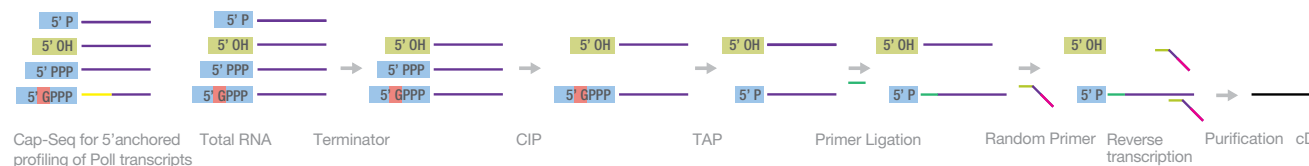
## 参考文献

Rooney M. S., Shukla S. A., Wu C. J., Getz G. and Hacohen N. (2015) Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 160: 48-61

著者らは、RNA をベースにした免疫細胞溶解活性反応の指標を開発し、癌ゲノムアトラス (The Cancer Genome Atlas-TCGA) の数千に及ぶ固形癌サンプルを基にその算出を行いました。著者らは、DNA 増幅が、PDL1/2 および ALOX12B/15B などの免疫抑制因子を含む高い細胞溶解活性反応に関連して起こるという所見や、免疫エディティングに関するエビデンスとなる所見も得ました。

イルミナ技術 : Genome Analyzer および HiSeq で得られたデータ

## Cap-Seq



CXXC 親和性精製シーケンス (CAP-Seq) <sup>65</sup> では、RNA ポリメラーゼ II に固定された RNA の 5' 末端をマップします。この手法で RNA 転写産物は、ターミネーター、仔午の腸粘膜由来のアルカリホスファターゼ (CIP)、およびタバコ酸ピロホスファターゼ (TAP) による処理、リンカーライゲーションの後 cDNA に逆転写されます。cDNA のディープシーケンスにより高解像度の RNA ポリメラーゼ II 転写産物配列が得られます。

## 腫瘍微小環境

腫瘍微小環境は腫瘍が存在する細胞環境として定義されています。腫瘍微小環境には、腫瘍周囲の血管、免疫細胞、線維芽細胞、その他細胞、シグナル伝達分子、および細胞外基質（ECM）が含まれます。さまざまな研究で腫瘍とその微小環境のダイナミックな関係性が報告されており、この関係性には、腫瘍が細胞外シグナルを放出して微小環境をコントロールできるもの（すなわち、腫瘍の血管新生）や、免疫エディティングなど微小環境が癌細胞の成長を促進させるもの（詳細は「癌免疫エディティング」を参照）、などがあります。腫瘍微小環境は、原発腫瘍と転移性腫瘍の間で再現性がありながら、転移巣でも予後を決定づける主な因子の一つとなっています。それにも拘わらず、Th1/細胞傷害性T細胞浸潤の予後への影響は、一次腫瘍の発症部位によって異なります<sup>66</sup>。

免疫回避の異なるカテゴリーを反映する、腫瘍の明確なサブセットが存在する可能性があることを示唆する新たな証拠も得られています。ケモカインが媒介する輸送の欠如、自然免疫細胞の活性化不良、および特異的な免疫抑制機構の存在などが腫瘍のサブセットを特徴づける例として挙げられます。

得られた所見をまとめると、慢性炎症が腫瘍にとって好都合な微小環境をつくる機序がさまざまに示されています。炎症反応は、細胞応答シグナルを増やして細胞（分裂）周期を早めることができるため、それによって変異率を上げ、最終的には腫瘍の増殖を促します<sup>67</sup>。

### 総説

**Perez-Gracia J. L., Labiano S., Rodriguez-Ruiz M. E., Sanmamed M. F. and Melero I. (2014) Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr Opin Immunol* 27: 89-97**

免疫療法剤により癌治療の開発に新たな機会が得られています。癌細胞に対する免疫応答を強化するために、免疫系細胞上の抑制受容体（チェックポイント）は阻害剤の標的となることができます。モノクローナル抗体（mAb）は、チェックポイント阻害剤のこの分類に属します。幾つかの mAb は臨床試験の段階にあり、mAb を化学療法および放射線療法と組み合わせた治療計画の可能性を実証する研究も報告されています。

Giraldo N. A., Becht E., Remark R., Damotte D., Sautes-Fridman C., et al. (2014) The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Curr Opin Immunol* 27: 8-15

Gajewski T. F., Woo S. R., Zha Y., Spaapen R., Zheng Y., et al. (2013) Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25: 268-276

Galon J., Angell H. K., Bedognetti D. and Marincola F. M. (2013) The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 39: 11-26

### 参考文献

**Zhou P., Shaffer D. R., Alvarez Arias D. A., Nakazaki Y., Pos W., et al. (2014) *In vivo* discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment. *Nature* 506: 52-57**

組織としての微小環境で免疫機能の制御因子を見つけるため、著者らは、低分子ヘアピン型 RNA（shRNA）の生体内スクリーニングを開発しました。shRNA がターゲットとする負の制御因子は、腫瘍抗原を認識すると、マウスの腫瘍内で高度に濃縮されました。得られた結果は、腫瘍内の Ppp2r2d ノックダウンが T 細胞アポトーシスを抑制し、T 細胞増殖やサイトカイン生成を促進したことを示しています。

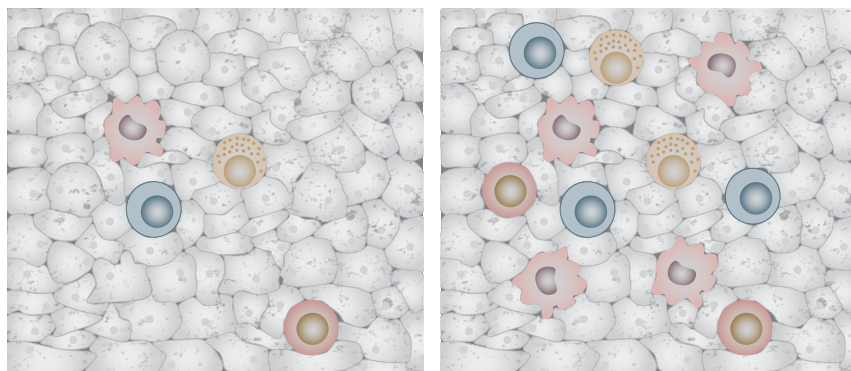
イルミナ技術：Genome Analyzer

- 
66. Giraldo N. A., Becht E., Remark R., Damotte D., Sautes-Fridman C., et al. (2014) The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Curr Opin Immunol* 27: 8-15
  67. Kundu J. K. and Surh Y. J. (2008) Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 659: 15-30
-

## 腫瘍内 T 細胞

ヒトの腫瘍が T 細胞により浸潤されるのは共通した現象です。浸潤の範囲や細胞内 T 細胞集団の反応性から疾患の経過や転帰が予測できます<sup>68</sup>。この所見を活用しようと、転移性黒色腫患者に、リンパ球を除去した前処置療法の後、自己腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) とインターロイキン 2 を使った治療を行いました<sup>69</sup>。この手法では、20~40% の転移性黒色腫患者に持続的な癌退縮がみられ、そのうちのほとんどは既存の治療計画では効果のなかった患者でした<sup>70</sup>。この手法の拡大・浸透には、TIL およびそれらのターゲットの同定や遺伝子改変も必要となります<sup>71</sup>。

初期の実験では、NGS を利用した腫瘍内の免疫細胞集団の定量化が可能であることが示されています<sup>72</sup>。



ヒトの腫瘍が T 細胞により浸潤されるのは共通した現象です。腫瘍組織内にある T 細胞集団の性質により疾患の経過や転帰の予測が可能です。

### 参考文献

Ohnuki H., Jiang K., Wang D., Salucci O., Kwak H., et al. (2014) Tumor-infiltrating myeloid cells activate Dll4/Notch/TGF- $\beta$  signaling to drive malignant progression. *Cancer research* 74: 3118-3128.

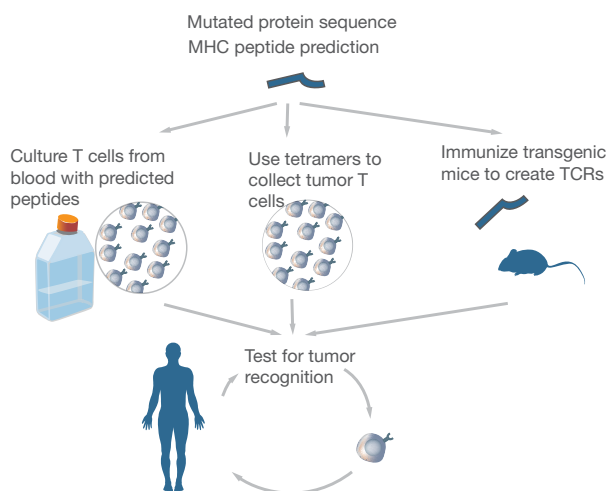
Emerson R. O., Sherwood A. M., Rieder M. J., Guenthoer J., Williamson D. W., et al. (2013) High-throughput sequencing of T-cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumour-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Pathol* 231: 433-440

Sherwood A. M., Emerson R. O., Scherer D., Habermann N., Buck K., et al. (2013) Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal tumors display a diversity of T cell receptor sequences that differ from the T cells in adjacent mucosal tissue. *Cancer Immunol Immunother* 62: 1453-1461

- 
68. Fridman W. H., Pages F., Sautes-Fridman C. and Galon J. (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12: 298-306
  69. Rosenberg S. A. (1986) The adoptive immunotherapy of cancer using the transfer of activated lymphoid cells and interleukin-2. *Semin Oncol* 13: 200-206
  70. Rosenberg S. A., Yang J. C., Sherry R. M., Kammula U. S., Hughes M. S., et al. (2011) Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17: 4550-4557
  71. Rosenberg S. A. (2014) Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 21: 45-47
  72. Angell H. and Galon J. (2013) From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol* 25: 261-267
-

## 癌免疫療法

腫瘍内 T 細胞は、T 細胞移入療法の臨床試験で利用されています<sup>73</sup>。転移性黒色腫の患者では、TIL ベースの免疫細胞を移入すると、腫瘍をおよそ 50% 縮小することができます<sup>74</sup>。反対に、TIL の不在は免疫療法の有効性が低いことを示す指標になると考えられます<sup>75</sup>。治療耐性には、炎症レベルの低さに起因する T 細胞遊走の欠如、および、主要な免疫抑制の 2 つの機構が関与しています。サイトカインインターロイキン 2 (IL-2) による療法で T 細胞の成長や増殖を刺激すると、黒色腫や腎癌患者に持続性のある応答が得られますが、残念なことに、この療法はごく一部の患者にしか有効ではありません<sup>76</sup>。



高度に個別化された医療。ある患者の腫瘍から発現した遺伝子のシーケンスを行って変異 T 細胞エピトープの候補を同定することができます。変異タンパク質由来のペプチドは 3 つのうち 1 つの方法で使うことができます。最初の方法では、関連抗原を発現する T 細胞を四量体類似の試薬を使って選別します。2 番目では、候補ペプチドを使って、すでに患者の腫瘍や末梢血まで循環している T 細胞を刺激します。第 3 の方法では、抗原を使ってヒト化マウスの腫瘍特異的な T 細胞をプライムし、ヒト由来である場合は養子性に移植します<sup>77</sup>。

腫瘍免疫原性は、腫瘍特異抗原 (TSA) を生成する変異が起こることで生まれます。これはほとんどの癌に共通する特性ですが、すべての癌にみられるわけではありません<sup>78</sup>。しかし、TSA をターゲットとすることで、腫瘍に対する特異性が得られ、自己免疫反応を誘発するリスクが減らせます。抗原欠失による腫瘍の免疫逃避を不可能にし、ドライバー変異をターゲットにすることもできます。ハイスループットのシーケンスでは、腫瘍別の変異を迅速に同定し、T 細胞応答を最も刺激するペプチドを計算的に予測して、患者の腫瘍に固有の TSA に有効なワクチン接種を可能にします<sup>79, 80, 81</sup>。

73. Linnemann C., Mezzadra R. and Schumacher T. N. (2014) TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev* 257: 72-82
74. Darcy P. K., Neeson P., Yong C. S. and Kershaw M. H. (2014) Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 27: 46-52
75. Gajewski T. F. and Schumacher T. (2013) Cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 25: 259-260
76. Skrombolas D. and Frelinger J. G. (2014) Challenges and developing solutions for increasing the benefits of IL-2 treatment in tumor therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 10: 207-217
77. Restifo N. P., Dudley M. E. and Rosenberg S. A. (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12: 269-281
78. Matsushita H., Vesely M. D., Koboldt D. C., Rickert C. G., Uppaluri R., et al. (2012) Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482: 400-404
79. Segal N. H., Parsons D. W., Peggs K. S., Velculescu V., Kinzler K. W., et al. (2008) Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* 68: 889-892
80. Castle J. C., Kreiter S., Diekmann J., Lower M., van de Roemer N., et al. (2012) Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 72: 1081-1091
81. Lu Y. C., Yao X., Li Y. F., El-Gamil M., Dudley M. E., et al. (2013) Mutated PPP1R3B is recognized by T cells used to treat a melanoma patient who experienced a durable complete tumor regression. *J Immunol* 190: 6034-6042

樹状細胞 (DC) をベースとする癌ワクチンは、副作用の少ない良好な耐容性を示します。樹状細胞は抗腫瘍免疫応答を誘導しますが、全体として樹状細胞が誘導する抗腫瘍免疫応答の利点には限りがあります。最新のさまざまな研究では、CD141+DC の抗腫瘍応答における重要な役割が実証されています。現在、生体内 DC を直接ターゲットとするワクチンは開発段階にあります<sup>82</sup>。

---

82. Radford K. J., Tullett K. M. and Lahoud M. H. (2014) Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27: 26-32

---

## 総説

**Perez-Gracia J. L., Labiano S., Rodriguez-Ruiz M. E., Sanmamed M. F. and Melero I. (2014) Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr Opin Immunol* 27: 89-97**

免疫療法剤により癌治療の開発に新たな機会が得られています。癌細胞に対する免疫応答を強化するために、免疫系細胞上の抑制受容体 (チェックポイント) は阻害剤の標的となることができます。モノクローナル抗体 (mAb) は、チェックポイント阻害剤のこの分類に属します。幾つかの mAb は臨床試験の段階にあり、mAb を化学療法および放射線療法と組み合わせた治療計画の可能性を実証する研究も報告されています。

Choi W., Porten S., Kim S., Willis D., Plimack E. R., et al. (2014) Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 25: 152-165

Darcy P. K., Neeson P., Yong C. S. and Kershaw M. H. (2014) Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 27: 46-52

Hinrichs C. S. and Rosenberg S. A. (2014) Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev* 257: 56-71

Nishikawa H. and Sakaguchi S. (2014) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27: 1-7

Couzin-Frankel J. (2013) Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342: 1432-1433

Gajewski T. F. and Schumacher T. (2013) Cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 25: 259-260

Galon J., Angell H. K., Bedognetti D. and Marincola F. M. (2013) The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 39: 11-26

Hutchinson E. (2014) Towards individualized cancer therapy: Challenges and prospects. *Molecular Oncology* 8: 1-8

Kvistborg P., van Buuren M. M. and Schumacher T. N. (2013) Human cancer regression antigens. *Curr Opin Immunol* 25: 284-290

Phan G. Q. and Rosenberg S. A. (2013) Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy. *Cancer Control* 20: 289-297

## 参考文献

Linnemann C., van Buuren M. M., Bies L., Verdegaal E. M., Schotte R., et al. (2015) High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med* 21: 81-85

該当腫瘍内の非同義体細胞変異に対する腫瘍内 CD4+T 細胞応答の発生を評価するため、著者らは、全エクソームシーケンスおよび RNA シーケンスで得られたデータを基に、発現した遺伝子内にみられる腫瘍特異的で非同義な一連の変異をすべて同定しました。この癌の CD4+ 新生抗原反応性は、主として個別化免疫療法の有力な候補となるプライベート変異を対象としたものです。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Garralda E., Paz K., Lopez-Casas P. P., Jones S., Katz A., et al. (2014) Integrated next-generation sequencing and avatar mouse models for personalized cancer treatment. *Clin Cancer Res* 20: 2476-2484

アクションナブルであると推定される腫瘍特異的なゲノムの変化を同定するために、著者らは、25 人の進行した固形腫瘍患者を対象に全エクソームシーケンスによる解析を行いました。患者 14 人から、マウスへの異種移植片 (Avatar) 10 モデルの作成に成功しました。候補となる治療法を事前にこれらの Avatar モデルで試験したところ、臨床反応と相関性があり、アクションナブルな変異のみられない一部の患者に経験的治療を選択するのに役立ちました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Yadav M., Jhunjunwala S., Phung Q. T., Lupardus P., Tanguay J., et al. (2014) Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 515: 572-576

著者らは、全エクソームシーケンスとトランスクリプトームシーケンスを質量分析法と組み合わせて解析を行う手法を開発し、ネオエピトープを同定しました。マウスにワクチンを接種して、この手法により、予測した免疫原性ペプチドそれぞれが治療に有効な T 細胞反応を生じていることが確認されました。この手法は、T 細胞反応の薬力学的なモニタリングや癌患者に個別化されたワクチンの開発に使うことができます。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Zhou P., Shaffer D. R., Alvarez Arias D. A., Nakazaki Y., Pos W., et al. (2014) *In vivo* discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment. *Nature* 506: 52-57

著者らは、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) スクリーニングにより、治療用のターゲットを生体内に見つける可能性を示しました。この手法により、著者らは、腫瘍のあるマウスで腫瘍浸潤性 CD8T 細胞の作用を修正する遺伝子を同定しました。

イルミナ技術: Genome Analyzer

Bajor D. L., Xu X., Torigian D. A., Mick R., Garcia L. R., et al. (2014) Immune activation and a 9-year ongoing complete remission following CD40 antibody therapy and metastasectomy in a patient with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Res* 2: 1051-1058

Robbins P. F., Lu Y. C., El-Gamil M., Li Y. F., Gross C., et al. (2013) Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 19: 747-752

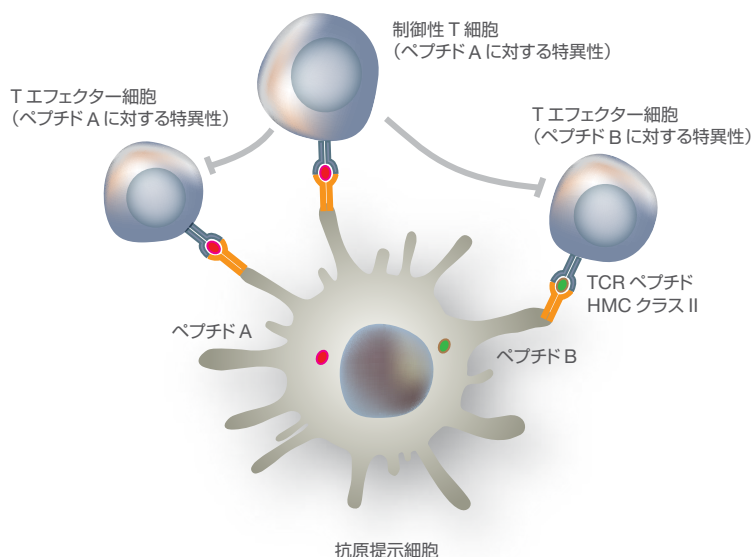
## 樹状細胞

樹状細胞は、免疫応答を制御して一部の腫瘍を根絶する役割を果たします。樹状細胞は、ワクチン開発のターゲットとして利用されていますが、その成功は限られています。今日、未成熟の樹状細胞は免疫性を刺激するのではなく、一般的に免疫寛容を誘発することが知られているため、ほとんどの試験では Toll 様受容体 (TLR) リガンドやサイトカインを組み入れて樹状細胞を特異的に活性化しています。樹状細胞サブセットもそれぞれ部位、表現型、および機能が異なります。このような複雑性をよりよく理解することで、最終的に樹状細胞をベースとした癌ワクチンの開発へとつながることが期待されます<sup>83</sup>。

- 
83. Radford K. J., Tullett K. M. and Lahoud M. H. (2014) Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27: 26-32
- 



樹状細胞とリンパ球、カラスキャンした電子顕微鏡写真。



樹状細胞は、幅広い抗原を提示する能力を持つ重要な抗原提示細胞です。樹状細胞はとりわけ T ヘルパー細胞を強力に活性化させますが、結合した抑制部は、制御性 T (TREG) 細胞が局所的な自己免疫寛容を補助する方法を示しています。TREG 細胞は、抗原提示細胞がコグネイト抗原を提示するのを阻害します。TREG 細胞は、可溶性の抑制因子により、同一のおよび異なる抗原特異性を持つバイスタンダー T 細胞を阻害することもできます。

## 総説

Darcy P. K., Neeson P., Yong C. S. and Kershaw M. H. (2014) Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 27: 46-52

Radford K. J., Tullett K. M. and Lahoud M. H. (2014) Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27: 26-32

Kawakami Y., Yaguchi T., Sumimoto H., Kudo-Saito C., Iwata-Kajihara T., et al. (2013) Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therapy. *Front Oncol* 3: 136

Tesone A. J., Svoronos N., Allegrezza M. J. and Conejo-Garcia J. R. (2013) Pathological mobilization and activities of dendritic cells in tumor-bearing hosts: challenges and opportunities for immunotherapy of cancer. *Front Immunol* 4: 435

## 参考文献

**Sundarasetty B. S., Chan L., Darling D., Giunti G., Farzaneh F., et al. (2015) Lentivirus-induced 'Smart' dendritic cells: Pharmacodynamics and GMP-compliant production for immunotherapy against TRP2-positive melanoma. *Gene Ther* in press:**

従来の単球由来樹状細胞 (ConvDCs) は、その生成の難しさや性能の低さがネックとなっていました。この研究で、著者らは、レンチウイルスベクター (LV) プログラム樹状細胞のより高い性能を実証しました。品質検査および組み込み部位の検証にイルミナの MiSeq システムを使用しました。

イルミナ技術: MiSeq

**Ma Y., Mattarollo S. R., Adjemian S., Yang H., Aymeric L., et al. (2014) CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res* 74: 436-445**

アントラサイクリンの癌化学療法での治療有効性は、DC や Tリンパ球依存性の抗がん免疫応答の誘導によって決まります。この研究では、癌を発症したマウスのケモカイン CCL2 およびその受容体 CCR2 で、アントラサイクリンを使用した化学療法の効果を調べました。著者らは、イルミナの Mouse BeadArray を使って差別的遺伝子発現の特性付けを行いました。著者らの所見では、アントラサイクリンをベースとする化学療法は、抗原提示を媒介する細胞など骨髄性細胞の腫瘍内蓄積を促進します。これらの所見は、免疫原性細胞死に誘発される抗がん免疫応答についての理解を増補するものです。

イルミナ技術: Mouse WG-6 V.2 Expression Bead-Chips

Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublot J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498: 236-240

Su X., Qian C., Zhang Q., Hou J., Gu Y., et al. (2013) miRNomes of haematopoietic stem cells and dendritic cells identify miR-30b as a regulator of Notch1. *Nat Commun* 4: 2903



## 血液系腫瘍

正常な造血細胞から癌細胞への進展には、一連の体細胞突然変異によって起こる多段階に及ぶクローン進化のプロセスが関与しています。これらの突然変異は、正常な成長から前癌状態に、最終的には癌化へと細胞を形質転換させ、細胞の成長を制御するよう設計されたすべてのチェックポイント機能を止めてしまいます。

癌化（悪性形質転換）の誘発には、惹起や促進など複数のフェーズが関与すると思われ、惹起はゲノム内の変化に作用しますが、ゲノム内で悪性形質転換は起こりません。悪性形質転換には促進と呼ばれる第二のステップが必要です。促進は、惹起段階に続く活発な細胞分裂中に起こり得ます。これは、一般的に癌原遺伝子（前癌遺伝子）、癌抑制遺伝子、またはアポトーシス遺伝子で知られ、未制御の細胞成長をもたらしている新規 DNA の変化の蓄積に起因しています。

ディープシーケンスによって希少なクローン型や細胞での変異を検出する性能を誇る NGS は、血液系腫瘍の病原（因）における免疫エフェクター機能の役割に関する研究を可能にしています。特筆すべき例として、骨髄異形成症候群（MDS）や再生不良性貧血（AA）などの幹細胞疾患の病因において自己反応性の T 細胞クローンの存在を示唆する報告が数多くあります<sup>84</sup>。これらの研究は、T 細胞の生理学的な媒介によって抗腫瘍免疫に欠損が生じると、血液系腫瘍に罹患しやすくなるという知見によって裏付けられています。T 細胞レパートリーに関するこれらの研究や急性リンパ芽球性白血病（ALL）のクローン進化における免疫グロブリン重鎖の再編成を示唆する新たな報告は総じて、血液学で最も活況を呈する研究分野の一つへと急速に発展しました<sup>85, 86, 87</sup>。

- 
84. Fozza, C., and Longinotti, M. (2013) T-cell receptor repertoire usage in hematologic malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology* 86: 201–211
  85. Faham, M., Zheng, J., Moorhead, M., Carlton, V. E. H., Stow, P., et al. (2012) Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120: 5173–5180
  86. Gawad, C., Pepin, F., Carlton, V. E. H., Klinger, M., Logan, A. C., et al. (2012) Massive evolution of the immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120: 4407–4417
  87. Jan, M., Snyder, T. M., Corces-Zimmerman, M. R., Vyas, P., Weissman, I. L., et al. (2012) Clonal Evolution of Preleukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia. *Science Translational Medicine* 4: 149ra118–149ra118
-

ハイスループットなシーケンスの前例のない精度と特異性により、悪性 B 細胞および T 細胞が保持する CDR3 配列の検出にはリシーケンスが有効です。例えば、IGH<sup>88-94</sup> および TCRβ/γ<sup>95</sup> 遺伝子をシーケンスした結果を診断時に使用して、B リンパ球および T リンパ球悪性腫瘍患者の悪性クローンを同定します。その後この情報を、治療中および治療後の悪性クローンの追跡に使用します。小児 B-ALL で行った IGH 部位の一連のシーケンスにより、一部の患者の部位で驚くほどダイナミックな進化が明らかになったことで<sup>92</sup>、この技術により、B 細胞および T 細胞が癌にどのように関与するかについての貴重な洞察が可能であることも実証されました。

抗原受容体部位のディープシーケンスは、リンパ性腫瘍の経過観察に多くの利点をもたらします。代替手法と比較すると、優れた精度を誇るディープシーケンスは<sup>92, 93, 95</sup>、より短い時間とより少ない労力で悪性の細胞集団を構成するすべてのクローンを同時に追跡することができます。慢性リンパ性白血球<sup>89, 90, 91</sup>、小児 B 細胞性 ALL<sup>92, 93</sup> および T 細胞性 ALL<sup>95</sup> 患者での疾患障害の観察においてその有用性が証明されたことから、その他のリンパ性腫瘍の観察にも有用であることに疑いの余地はありません。

## 総説

Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123

Fozza C. and Longinotti M. (2013) T-cell receptor repertoire usage in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 86: 201-211

Warren E. H., Matsen F. A. t. and Chou J. (2013) High-throughput sequencing of B- and T-lymphocyte antigen receptors in hematology. *Blood* 122: 19-22

88. Campbell, P. J., Pleasance, E. D., Stephens, P. J., Dicks, E., Rance, R., et al. (2008) Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13081-13086
89. Boyd, S. D., Marshall, E. L., Merker, J. D., Maniar, J. M., Zhang, L. N., et al. (2009) Measurement and clinical monitoring of human lymphocyte clonality by massively parallel VDJ pyrosequencing. *Science Translational Medicine* 1: 12ra23
90. Logan, A. C., Gao, H., Wang, C., Sahaf, B., Jones, C. D., et al. (2011) High-throughput VDJ sequencing for quantification of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia and immune reconstitution assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 21194-21199
91. Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., et al. (2011) T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science Translational Medicine* 3: 95ra73
92. Gawad, C., Pepin, F., Carlton, V. E. H., Klinger, M., Logan, A. C., et al. (2012) Massive evolution of the immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120: 4407-4417
93. Faham, M., Zheng, J., Moorhead, M., Carlton, V. E. H., Stow, P., et al. (2012) Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120: 5173-5180
94. Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., et al. (2013) CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science Translational Medicine* 5: 177ra38-177ra38
95. Wu, D., Sherwood, A., Fromm, J. R., Winter, S. S., Dunsmore, K. P., et al. (2012) High-Throughput Sequencing Detects Minimal Residual Disease in Acute T Lymphoblastic Leukemia. *Science Translational Medicine* 4: 134ra63-134ra63

## 参考文献

Dose M., Emmanuel A. O., Chaumeil J., Zhang J., Sun T., et al. (2014) beta-Catenin induces T-cell transformation by promoting genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 391-396

癌細胞は、成長の制御を不可能にする細胞の調節機構の機能障害を特徴とします。この調節機能不全により、一部の癌では、組み換え（再結合）不良などのゲノムの不安定性を引き起こします。この研究では、βカテニンの調節解除とゲノムの不安定性との関係について調べました。著者らは、βカテニンを標的活性化したマウスモデルを使って、クロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-Seq）により転写（制御）因子の結合部位と転座部位間の関連を特定しました。著者らは、βカテニンがT細胞リンパ腫の起因となるゲノム不安定性を促進すると結論付けています。

イルミナ技術：Genome AnalyzerII

Joseph C. G., Darrach E., Shah A. A., Skora A. D., Casciola-Rosen L. A., et al. (2014) Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science* 343: 152-157

強皮症は、限られた自己抗原群に対して抗体をつくる、結合組織に影響する自己免疫疾患です。強皮症患者にみられるRPC1に対する抗体は癌罹患のリスクを高めます。著者らは、16人の患者においてPOLR3A、TOP1、およびCENPB遺伝子の腫瘍正常コーディング配列をシーケンスしました。得られた結果は、POLR3A変異が細胞免疫および交差反応性の（体）液性免疫応答を誘発することを示唆しています。

イルミナ技術：Genome AnalyzerIIx

Palomero T., Couronne L., Khiabani H., Kim M. Y., Ambesi-Impiombato A., et al. (2014) Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet* 46: 166-170

末梢T細胞リンパ腫（PTCL）は、非ホジキンリンパ腫の一種としては異種であり、ほとんど解明されていません。この研究では、全ゲノムシーケンスを使って12対の腫瘍正常DNAサンプルを解析し、フォローアップとしてイルミナのHiSeq 2000でRNAシーケンスを行った後、イルミナのMiSeqでターゲットのディープシーケンスを行って同定した遺伝子変異を検証しました。著者らは、SRCシグナル伝達を暗示するFYN、ATM、B2MおよびCD58での変異、障害性のDNA損傷応答、および免疫サーバランス機構から逃避するPTCLなどの新規および再発の遺伝子異常を同定しました。

イルミナ技術：HiSeq 2000、MiSeq

Papaemmanuil E., Rapado I., Li Y., Potter N. E., Wedge D. C., et al. (2014) RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46: 116-125

4分の1以上のALL事例がETV6-RUNX1融合遺伝子を持っています。この融合遺伝子は上記疾患に特徴的でありながら、顕性白血病の発症には更なる変異を必要とします。この研究では、エクソームおよび低カバレッジの全ゲノムシーケンスを用いて、白血病の変化に関連する二次発症の特性を明らかにしました。著者らは、ALL内の2つの新規腫瘍抑制遺伝子としてATF7IPおよびMGA aを特定し、ETV6-RUNX1陽性のリンパ芽球細胞が白血病へと変性する簡潔な変異プロセスを説明しました。

イルミナ技術：Genome Analyzer

Sakata-Yanagimoto M., Enami T., Yoshida K., Shiraishi Y., Ishii R., et al. (2014) Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 46: 171-175

血管免疫芽球性T細胞リンパ腫（AITL）は、明確となっているPTCLサブタイプの一つです。この研究では、このリンパ腫サブタイプに特異的な分子特性を検討しました。著者らは、イルミナのHiSeqおよびMiSeqでの全エクソームシーケンス、ターゲットシーケンス、およびRNAシーケンスを利用して、腫瘍細胞に特異的に存在する体細胞RHOA突然変異を同定しました。著者らは、RHOA機能の障害が、先行するTET2機能の欠如と協働して、AITL特異的な発症に寄与することを示唆しています。

イルミナ技術：100bpのリード数に対応したMiSeqおよびHiSeq 2000

Sherwood A. M., Emerson R. O., Scherer D., Habermann N., Buck K., et al. (2013) Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal tumors display a diversity of T cell receptor sequences that differ from the T cells in adjacent mucosal tissue. *Cancer Immunol Immunother* 62: 1453-1461

## 単一細胞と TCR シーケンス

機能性 TCR は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の両方で構成されるヘテロ二量体のタンパク質です。すべての T 細胞はそれぞれ固有の  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖の組み合わせを持ち、その機能を正確に解析するためには、両サブユニットを一緒にシーケンスする必要があります。細胞溶解によって  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の対合が阻害されないよう<sup>96</sup>、数種類のシングルセルシーケンス法が開発されました<sup>97</sup>。

### Smart-Seq



Smart-Seq は、転写産物を網羅するようリードカバレッジを改良した、シングルセルシーケンスプロトコールとして開発されました<sup>98</sup>。このプロトコールでは、細胞を溶解して、RNA をオリゴ (dT) プライマーにハイブリダイズします。一本目の鎖は、鋳型のない数個の C ヌクレオチドを付加してつくられます。その後、オリゴヌクレオチドプライマーが poly (C) オーバーハンクにハイブリダイズされて 2 本目の鎖の合成に使われます。全長の cDNA を PCR 増幅してナノグラム量の DNA を獲得します。PCR 産物を精製してシーケンスを行います<sup>99</sup>。

96. Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98
97. Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515
98. Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., Li R., Deng Q., et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777-782
99. Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublomme J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498: 236-240
100. Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515

### TCR 鎖ペアリング



TCR  $\alpha$ - $\beta$  鎖の対合を同定する細胞ベースのエマルジョン RT-PCR 技術。遊離した TCR $\alpha$  mRNA および TCR $\beta$  mRNA は逆転写されて増幅され、各エマルジョン内で重なって伸長します。生成物はエマルジョンから抽出され、興味のある融合分子が選択的に増幅されます。非融合分子を blocking プライマーが抑制します<sup>100</sup>。

## 参考文献

Ma Y., Mattarollo S. R., Adjemian S., Yang H., Aymeric L., et al. (2014) CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res* 74: 436-445

アントラサイクリンの癌化学療法での治療有効性は、DC や Tリンパ球依存性の抗がん免疫応答の誘導によって決まります。この研究では、癌を発症したマウスのケモカイン CCL2 およびその受容体 CCR2 で、アントラサイクリンを使用した化学療法の効果を調べました。著者らは、イルミナの Mouse BeadArray を使って差別的遺伝子発現の特性付けを行いました。著者らの所見では、アントラサイクリンをベースとする化学療法は、抗原提示を媒介する細胞など骨髄性細胞の腫瘍内蓄積を促進します。これらの所見は、免疫原性細胞死に誘発される抗がん免疫応答についての理解を増補するものです。

イルミナ技術：マウス (Gene Expression - BeadArray)

Papaemmanuil E., Rapado I., Li Y., Potter N. E., Wedge D. C., et al. (2014) RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46: 116-125

4分の1以上の ALL 事例が ETV6-RUNX1 融合遺伝子を持っています。この融合遺伝子は上記疾患に特徴的でありながら、顕性白血病の発症には更なる変異を必要とします。この研究では、エクソームおよび低カバレッジの全ゲノムシーケンスを用いて、白血病の変化に関連する二次発症の特性を明らかにしました。著者らは、ALL 内の2つの新規腫瘍抑制遺伝子として ATF7IP および MGA a を特定し、ETV6-RUNX1 陽性のリンパ芽球細胞が白血病へと変性する簡潔な変異プロセスを説明しました。

イルミナ技術：Genome Analyzer

Bolotin D. A., Shugay M., Mamedov I. Z., Putintseva E. V., Turchaninova M. A., et al. (2013) MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nat Methods* 10: 813-814

Gao C., Kozłowska A., Nechaev S., Li H., Zhang Q., et al. (2013) TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy. *Cancer Res* 73: 7211-7221

Linnemann C., Heemskerk B., Kvistborg P., Kluijn R. J., Bolotin D. A., et al. (2013) High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med* 19: 1534-1541

Mamedov I. Z., Britanova O. V., Zvyagin I. V., Turchaninova M. A., Bolotin D. A., et al. (2013) Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* 4: 456

Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublot J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498: 236-240

Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515

## 参考文献一覽

- Alexandrov L. B., Nik-Zainal S., Wedge D. C., Aparicio S. A., Behjati S., et al. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500: 415-421
- Angell H. and Galon J. (2013) From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol* 25: 261-267
- Bajor D. L., Xu X., Torigian D. A., Mick R., Garcia L. R., et al. (2014) Immune activation and a 9-year ongoing complete remission following CD40 antibody therapy and metastasectomy in a patient with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Res* 2: 1051-1058
- Birnbaum M. E., Mendoza J. L., Sethi D. K., Dong S., Glanville J., et al. (2014) Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. *Cell* 157: 1073-1087
- Bollag G., Hirth P., Tsai J., Zhang J., Ibrahim P. N., et al. (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467: 596-599
- Bolotin D. A., Shugay M., Mamedov I. Z., Putintseva E. V., Turchaninova M. A., et al. (2013) MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nat Methods* 10: 813-814
- Calis J. J. and Rosenberg B. R. (2014) Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol* 35: 581-590
- Castle J. C., Kreiter S., Diekmann J., Lower M., van de Roemer N., et al. (2012) Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 72: 1081-1091
- Chapman P. B., D' Angelo S. P. and Wolchok J. D. (2015) Rapid eradication of a bulky melanoma mass with one dose of immunotherapy. *N Engl J Med* 372: 2073-2074
- Chaudhary B., Abd Al Samid M., al-Ramadi B. K. and Elkord E. (2014) Phenotypic alterations, clinical impact and therapeutic potential of regulatory T cells in cancer. *Expert Opin Biol Ther* 14: 931-945
- Chen G., Chakravarti N., Aardalen K., Lazar A. J., Tetzlaff M. T., et al. (2014) Molecular profiling of patient-matched brain and extracranial melanoma metastases implicates the PI3K pathway as a therapeutic target. *Clin Cancer Res* 20: 5537-5546
- Choi W., Porten S., Kim S., Willis D., Plimack E. R., et al. (2014) Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 25: 152-165
- Couzin-Frankel J. (2013) Breakthrough of the year 2013. *Cancer immunotherapy. Science* 342: 1432-1433
- Darcy P. K., Neeson P., Yong C. S. and Kershaw M. H. (2014) Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 27: 46-52
- Delyon J., Mateus C., Lefeuvre D., Lanoy E., Zitvogel L., et al. (2013) Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol* 24: 1697-1703
- Dheilly N. M., Adema C., Raftos D. A., Gourbal B., Grunau C., et al. (2014) No more non-model species: the promise of next generation sequencing for comparative immunology. *Dev Comp Immunol* 45: 56-66
- Dong H. and Wang S. (2012) Exploring the cancer genome in the era of next-generation sequencing. *Front Med* 6: 48-55
- Dose M., Emmanuel A. O., Chaumeil J., Zhang J., Sun T., et al. (2014) beta-Catenin induces T-cell transformation by promoting genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 391-396
- Dunn G. P., Old L. J. and Schreiber R. D. (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22: 329-360
- Dunn G. P., Koebel C. M. and Schreiber R. D. (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6: 836-848
- Emerson R. O., Sherwood A. M., Rieder M. J., Guenthoer J., Williamson D. W., et al. (2013) High-throughput sequencing of T-cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumour-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Pathol* 231: 433-440
- Fozza C. and Longinotti M. (2013) T-cell receptor repertoire usage in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 86: 201-211
- Fridman W. H., Pages F., Sautes-Fridman C. and Galon J. (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12: 298-306
- Gajewski T. F. and Schumacher T. (2013) Cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 25: 259-260
- Gajewski T. F., Woo S. R., Zha Y., Spaapen R., Zheng Y., et al. (2013) Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25: 268-276
- Galon J., Angell H. K., Bedognetti D. and Marincola F. M. (2013) The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 39: 11-26
- Gao C., Kozłowska A., Nechaev S., Li H., Zhang Q., et al. (2013) TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy. *Cancer Res* 73: 7211-7221
- Garralda E., Paz K., Lopez-Casas P. P., Jones S., Katz A., et al. (2014) Integrated next-generation sequencing and avatar mouse models for personalized cancer treatment. *Clin Cancer Res* 20: 2476-2484
- Garraway L. A. and Lander E. S. (2013) Lessons from the cancer genome. *Cell* 153: 17-37
- Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., et al. (2014) The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol* 32: 158-168
- Gibney G. T. and Zager J. S. (2013) Clinical development of dabrafenib in BRAF mutant melanoma and other malignancies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9: 893-899
- Giraldo N. A., Becht E., Remark R., Damotte D., Sautes-Fridman C., et al. (2014) The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Curr Opin Immunol* 27: 8-15
- Gorski J., Yassai M., Zhu X., Kissella B., Kissella B., et al. (1994) Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J Immunol* 152: 5109-5119
- Green M. R., Kihira S., Liu C. L., Nair R. V., Salari R., et al. (2015) Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E1116-1125
- Gubin M. M., Zhang X., Schuster H., Caron E., Ward J. P., et al. (2014) Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515: 577-581
- Haen S. P. and Rammensee H. G. (2013) The repertoire of human tumor-associated epitopes--identification and selection of antigens and their application in clinical trials. *Curr Opin Immunol* 25: 277-283

- Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F. S., Hwu W. J., et al. (2013) Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369: 134-144
- Heemskerck B., Kvistborg P. and Schumacher T. N. (2013) The cancer antigenome. *EMBO J* 32: 194-203
- Hinrichs C. S. and Rosenberg S. A. (2014) Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev* 257: 56-71
- Hodi F. S., O' Day S. J., McDermott D. F., Weber R. W., Sosman J. A., et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-723
- Hutchinson E. (2014) Towards individualized cancer therapy: Challenges and prospects. *Molecular Oncology* 8: 1-8
- Illingworth R. S., Gruenewald-Schneider U., Webb S., Kerr A. R., James K. D., et al. (2010) Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 6: e1001134
- Johnson D. B., Smalley K. S. and Sosman J. A. (2014) Molecular pathways: targeting NRAS in melanoma and acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 20: 4186-4192
- Joseph C. G., Darrach E., Shah A. A., Skora A. D., Casciola-Rosen L. A., et al. (2014) Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science* 343: 152-157
- Kawakami Y., Yaguchi T., Sumimoto H., Kudo-Saito C., Iwata-Kajihara T., et al. (2013) Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therapy. *Front Oncol* 3: 136
- Kim K., Skora A. D., Li Z., Liu Q., Tam A. J., et al. (2014) Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11774-11779
- Kreiter S., Vormehr M., van de Roemer N., Diken M., Lower M., et al. (2015) Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520: 692-696
- Kundu J. K. and Surh Y. J. (2008) Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 659: 15-30
- Kvistborg P., van Buuren M. M. and Schumacher T. N. (2013) Human cancer regression antigens. *Curr Opin Immunol* 25: 284-290
- La Gruta N. L. and Thomas P. G. (2013) Interrogating the relationship between naive and immune antiviral T cell repertoires. *Curr Opin Virol* 3: 447-451
- Langerak A. W., van Den Beemd R., Wolvers-Tettero I. L., Boor P. P., van Lochem E. G., et al. (2001) Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha T-cell proliferations. *Blood* 98: 165-173
- Leavy O. (2015) Tumour immunology: A triple blow for cancer. *Nat Rev Immunol* 15: 265
- Linnemann C., Heemskerck B., Kvistborg P., Kluin R. J., Bolotin D. A., et al. (2013) High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med* 19: 1534-1541
- Linnemann C., Mezzadra R. and Schumacher T. N. (2014) TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev* 257: 72-82
- Linnemann C., van Buuren M. M., Bies L., Verdegaaal E. M., Schotte R., et al. (2015) High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med* 21: 81-85
- Lu Y. C., Yao X., Li Y. F., El-Gamil M., Dudley M. E., et al. (2013) Mutated PPP1R3B is recognized by T cells used to treat a melanoma patient who experienced a durable complete tumor regression. *J Immunol* 190: 6034-6042
- Ma Y., Mattarollo S. R., Adjemian S., Yang H., Aymeric L., et al. (2014) CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res* 74: 436-445
- Madi A., Shifrut E., Reich-Zeliger S., Gal H., Best K., et al. (2014) T-cell receptor repertoires share a restricted set of public and abundant CDR3 sequences that are associated with self-related immunity. *Genome Res* 24: 1603-1612
- Mamedov I. Z., Britanova O. V., Zvyagin I. V., Turchaninova M. A., Bolotin D. A., et al. (2013) Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* 4: 456
- Matsushita H., Vesely M. D., Koboldt D. C., Rickert C. G., Uppaluri R., et al. (2012) Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoeediting. *Nature* 482: 400-404
- Meier J., Roberts C., Avent K., Hazlett A., Berrie J., et al. (2013) Fractal organization of the human T cell repertoire in health and after stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 19: 366-377
- Menzel U., Greiff V., Khan T. A., Haessler U., Hellmann I., et al. (2014) Comprehensive evaluation and optimization of amplicon library preparation methods for high-throughput antibody sequencing. *PLoS One* 9: e96727
- Mittal D., Gubin M. M., Schreiber R. D. and Smyth M. J. (2014) New insights into cancer immunoeediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27: 16-25
- Nishikawa H. and Sakaguchi S. (2014) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27: 1-7
- Ohnuki H., Jiang K., Wang D., Salvucci O., Kwak H., et al. (2014) Tumor-infiltrating myeloid cells activate Dll4/Notch/TGF- $\beta$  signaling to drive malignant progression. *Cancer research* canres. 3118.2013
- Palomero T., Couronne L., Khiabani H., Kim M. Y., Ambesi-Impiombato A., et al. (2014) Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet* 46: 166-170
- Papaemmanuil E., Rapado I., Li Y., Potter N. E., Wedge D. C., et al. (2014) RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46: 116-125
- Pardoll D. M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252-264
- Perez-Gracia J. L., Labiano S., Rodriguez-Ruiz M. E., Sanmamed M. F. and Melero I. (2014) Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr Opin Immunol* 27: 89-97
- Phan G. Q. and Rosenberg S. A. (2013) Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy. *Cancer Control* 20: 289-297
- Postow M. A., Chesney J., Pavlick A. C., Robert C., Grossmann K., et al. (2015) Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 372: 2006-2017
- Qi Q., Liu Y., Cheng Y., Glanville J., Zhang D., et al. (2014) Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 13139-13144
- Radford K. J., Tullett K. M. and Lahoud M. H. (2014) Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27: 26-32
- Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., Li R., Deng Q., et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777-782
- Restifo N. P., Dudley M. E. and Rosenberg S. A. (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12: 269-281

- Reuben J. M., Lee B. N., Li C., Gomez-Navarro J., Bozon V. A., et al. (2006) Biologic and immunomodulatory events after CTLA-4 blockade with ticilimumab in patients with advanced malignant melanoma. *Cancer* 106: 2437-2444
- Ribas A. (2012) Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med* 366: 2517-2519
- Ribas A. and Wolchok J. D. (2013) Combining cancer immunotherapy and targeted therapy. *Curr Opin Immunol* 25: 291-296
- Robbins P. F., Lu Y. C., El-Gamil M., Li Y. F., Gross C., et al. (2013) Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 19: 747-752
- Robert L., Tsoi J., Wang X., Emerson R., Homet B., et al. (2014) CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res* 20: 2424-2432
- Robins H., Desmarais C., Matthis J., Livingston R., Andriesen J., et al. (2012) Ultra-sensitive detection of rare T cell clones. *J Immunol Methods* 375: 14-19
- Robins H. (2013) Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Curr Opin Immunol* 25: 646-652
- Robins H. S., Campregher P. V., Srivastava S. K., Wacher A., Turtle C. J., et al. (2009) Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood* 114: 4099-4107
- Robinson W. H. (2015) Sequencing the functional antibody repertoire--diagnostic and therapeutic discovery. *Nat Rev Rheumatol* 11: 171-182
- Rochman Y., Yukawa M., Kartashov A. V. and Barski A. (2015) Functional characterization of human T cell hyporesponsiveness induced by CTLA4-Ig. *PLoS One* 10: e0122198
- Rooney M. S., Shukla S. A., Wu C. J., Getz G. and Hacohen N. (2015) Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 160: 48-61
- Rosenberg S. A. (1986) The adoptive immunotherapy of cancer using the transfer of activated lymphoid cells and interleukin-2. *Semin Oncol* 13: 200-206
- Rosenberg S. A., Yang J. C., Sherry R. M., Kammula U. S., Hughes M. S., et al. (2011) Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17: 4550-4557
- Rosenberg S. A. (2014) Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 21: 45-47
- Sakata-Yanagimoto M., Enami T., Yoshida K., Shiraishi Y., Ishii R., et al. (2014) Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 46: 171-175
- Schreiber R. D., Old L. J. and Smyth M. J. (2011) Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-1570
- Segal N. H., Parsons D. W., Peggs K. S., Velculescu V., Kinzler K. W., et al. (2008) Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* 68: 889-892
- Segura M. F., Fontanals-Cirera B., Gazieli-Sovran A., Guijarro M. V., Hanniford D., et al. (2013) BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy. *Cancer Res* 73: 6264-6276
- Sengsayadeth S., Wang T., Lee S. J., Haagenson M. D., Spellman S., et al. (2014) Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 single nucleotide polymorphisms are not associated with outcomes after unrelated donor transplantation: a center for international blood and marrow transplant research analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 20: 900-903
- Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublotte J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498: 236-240
- Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., et al. (2001) IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111
- Sherwood A. M., Emerson R. O., Scherer D., Habermann N., Buck K., et al. (2013) Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal tumors display a diversity of T cell receptor sequences that differ from the T cells in adjacent mucosal tissue. *Cancer Immunol Immunother* 62: 1453-1461
- Shugay M., Britanova O. V., Merzlyak E. M., Turchaninova M. A., Mamedov I. Z., et al. (2014) Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods* 11: 653-655
- Skrombolas D. and Frelinger J. G. (2014) Challenges and developing solutions for increasing the benefits of IL-2 treatment in tumor therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 10: 207-217
- Snyder A., Makarov V., Merghoub T., Yuan J., Zaretsky J. M., et al. (2014) Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 371: 2189-2199
- Spranger S., Bao R. and Gajewski T. F. (2015) Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523: 231-235
- Su X., Qian C., Zhang Q., Hou J., Gu Y., et al. (2013) miRNomes of haematopoietic stem cells and dendritic cells identify miR-30b as a regulator of Notch1. *Nat Commun* 4: 2903
- Sundarasetty B. S., Chan L., Darling D., Giunti G., Farzaneh F., et al. (2015) Lentivirus-induced 'Smart' dendritic cells: Pharmacodynamics and GMP-compliant production for immunotherapy against TRP2-positive melanoma. *Gene Ther* in press:
- Tesone A. J., Svoronos N., Allegrezza M. J. and Conejo-Garcia J. R. (2013) Pathological mobilization and activities of dendritic cells in tumor-bearing hosts: challenges and opportunities for immunotherapy of cancer. *Front Immunol* 4: 435
- Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., et al. (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366: 2443-2454
- Tumeh P. C., Harview C. L., Yearley J. H., Shintaku I. P., Taylor E. J., et al. (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515: 568-571
- Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515
- van Buuren M. M., Dijkgraaf F. E., Linnemann C., Toebes M., Chang C. X., et al. (2014) HLA micropolymorphisms strongly affect peptide-MHC multimer-based monitoring of antigen-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 192: 641-648
- van Heijst J. W., Ceberio I., Lipuma L. B., Samilo D. W., Wasilewski G. D., et al. (2013) Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* 19: 372-377
- van Rooij N., van Buuren M. M., Philips D., Velds A., Toebes M., et al. (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 31: e439-442
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V. E., Zhou S., Diaz L. A., Jr., et al. (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546-1558
- Walter S., Weinschenk T., Stenzl A., Zdrojowy R., Pluzanska A., et al. (2012) Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 18: 1254-1261
- Warren E. H., Matsen F. A. T. and Chou J. (2013) High-throughput sequencing of B- and T-lymphocyte antigen receptors in hematology. *Blood* 122: 19-22
- Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123



Westin J. R., Chu F., Zhang M., Fayad L. E., Kwak L. W., et al. (2014) Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15: 69-77

Wolchok J. D., Kluger H., Callahan M. K., Postow M. A., Rizvi N. A., et al. (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369: 122-133

Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98

Yadav M., Jhunjhunwala S., Phung Q. T., Lupardus P., Tanguay J., et al. (2014) Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 515: 572-576

Yates L. R. and Campbell P. J. (2012) Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13: 795-806

Zhou P., Shaffer D. R., Alvarez Arias D. A., Nakazaki Y., Pos W., et al. (2014) In vivo discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment. *Nature* 506: 52-57





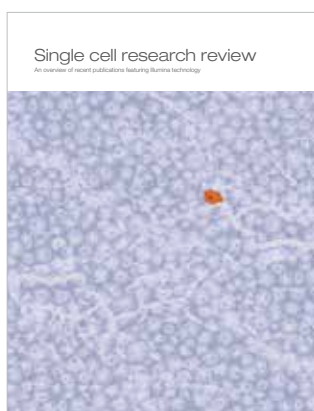
www.illumina.com/pubreviews で研究論文集を掲載しています。



### 免疫学研究論文集

免疫レパートリーのシーケンスにより、血液がん、自己免疫疾患、アレルギー反応など疾患感受性の高い人にみられる受容体固有の遺伝子変異の同定が可能になっています。

イルミナの次世代シーケンサーは、ヒトの免疫反応研究で高解像度のマッピングを行うために求められる品質、スループット、リード長をご提供します。フェージング（相化）シーケンスやシングルセルシーケンスなどの新たなアプローチにより、この知識の基盤が大きく進展することが期待されます。



### シングルセル研究論文集

シングルセルシーケンスの推進力はほとんどが、細胞系譜や残存病変の検出が最重要課題となるがん研究に由来しています。神経発達や免疫系など複雑かつ膨大な生物学的システムの理解を深めるために、同様のアプローチが用いられています。

本書では、シングルセルのシーケンスおよび超微量サンプルの解析にイルミナテクノロジーを応用できることを実証する最近の発表に焦点を当てています。

本研究論文集は Illumina, Inc. によりご提供しています。

## イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階

Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810

[www.illumina.co.jp](http://www.illumina.co.jp)



[www.facebook.com/illumina](https://www.facebook.com/illumina)

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2015 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, Design Studio, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. 腫瘍および免疫系論文集 05OCT2015

**illumina**<sup>®</sup>