

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03490

研究課題名(和文) Long non-coding RNA由来がん抗原のHLA提示メカニズム解明

研究課題名(英文) HLA presentation mechanisms of long non-coding RNA-derived cancer antigens

研究代表者

金関 貴幸 (KANASEKI, Takayuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50531266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：プロテオゲノミクスHLAリガンドーム解析法を用い、ヒト大腸がん組織HLAに提示される抗原ペプチドを網羅的に探索した。興味深いことに、全体の5%近くが既知プロテオームに登録のないユニークな配列であった。さらに正常粘膜ではなくがん組織でHLA提示される「がん抗原」を探索し、lncRNAがん遺伝子PVT1に由来するペプチドを同定した。同抗原は免疫原性が高く、患者と健常人T細胞反応を誘導した。PVT1抗原に対するT細胞反応は、がん細胞のNonsense mediated RNA decay (NMD) 経路を阻害すると、さらに増強した。新しいがん抗原クラスと新しい抗原制御メカニズムを発見できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞はHLA提示された抗原ペプチドを認識し、腫瘍を拒絶する。抗原ペプチドはT細胞反応を導くカギの役割を果たす。既存の免疫チェックポイント阻害剤はどれも対象腫瘍のMHC提示ペプチド配列を考慮しない治療法である。しかし、適切な抗原配列を取得し標的として治療に組み込むことができれば、免疫治療効果の改善・上乗せを期待できる。本研究では世界に先駆けてlncRNAにコードされる新しいがん抗原クラスを発見し、その抗原提示メカニズムを明らかにした。免疫治療の新しい標的として、標準治療の創出につながる発見と考える。

研究成果の概要(英文)：We developed proteogenomic HLA ligandome analysis employing mass spectrometry and RNA-seq, and found that cryptic peptides, which were not registered in the present proteome databases, accounted for approximately 5% of the immunopeptidome of human colon cancer tissues. We identified a peptide that originated from the oncogenic long non-coding RNA (lncRNA), PVT1. The PVT1 peptide was enriched in cancer tissues compared with normal mucosa, and was immunogenic to induce specific T cell responses in both patients and healthy donors. Interestingly, the peptide was encoded by a short ORF, which was followed by a premature termination codon. We found that the inhibition of nonsense mediated RNA decay (NMD) enhanced T cell responses to cancer cells that endogenously expressed the PVT1 gene. These results indicate the presence of a novel class of tumor antigens encoded by lncRNAs, and demonstrate a potential mechanism that regulate their antigen presentation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍免疫 抗原 HLA T細胞 免疫治療 ノンコーディングRNA

## 1. 研究開始当初の背景

HLA 提示ペプチドはタンパク質の分解産物と考えられていた。しかし我々は、マスマスペクトロメトリーを用いた新規プロテオゲノミクス技術を用いて大腸がん組織を解析し、long non-coding RNA (lncRNA) に由来する HLA 提示ペプチドを検出した。lncRNA 由来のがん抗原は世界的にも新しい発見であった。

## 2. 研究の目的

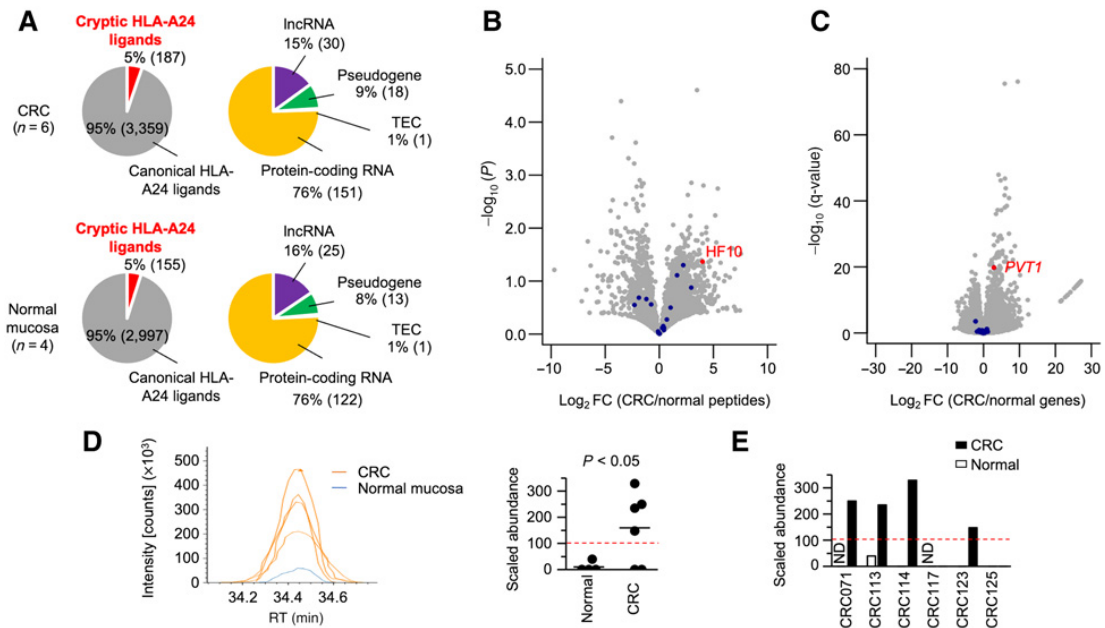
我々が発見した lncRNA がん抗原 (PVT1) と特異的な T 細胞反応をモデルとし、lncRNA がん抗原に対する CTL 免疫監視の実像を明らかにする。Nonsense mediated RNA decay (NMD) 制御と lncRNA がん抗原 HLA 提示関連性を検証する。

## 3. 研究の方法

- (1) プロテオゲノミクス解析基盤によるがん組織 HLA 提示ペプチドドームの網羅解析
- (2) 抗原をコードするユニークな sORF の同定
- (3) NMD 阻害による lncRNA がん抗原 CTL 反応の制御と非典型翻訳メカニズムの解明

## 4. 研究成果

(1) ヒト大腸がん 6 症例のがん・正常組織をプロテオゲノミクス HLA リガンドドーム解析し、提示ペプチドを網羅的に検出した。HLA-A24 提示ペプチドの約 5% が既知プロテオームに登録のない cryptic なペプチド配列であった (図 1A)。さらに、がん組織と正常組織で HLA 提示量を比較した。がん組織に優位な lncRNA 遺伝子 (PVT1) 由来ペプチド (HF10) を同定できた (図



1B-E)。  
 図 1. ヒト大腸がん組織 HLA-A24 提示ペプチドドーム

(2) PVT1 がん抗原ペプチドをコードする PVT1 トランスクリプトバリエーションと sORF を特定した (図 2A, B)。さらに HF10 ペプチドを特異的に認識する CD8+T 細胞クローン (H3) を樹立した。HF10 に対する H3 反応は特定した PVT1-sORF 存在下で生じ、同トランスクリプトをノックダウンすると消失する (図 2C, D)。各種がん細胞株に対する CD8+T 細胞反応は PVT1 遺伝子発現量と相関している (図 2E)。

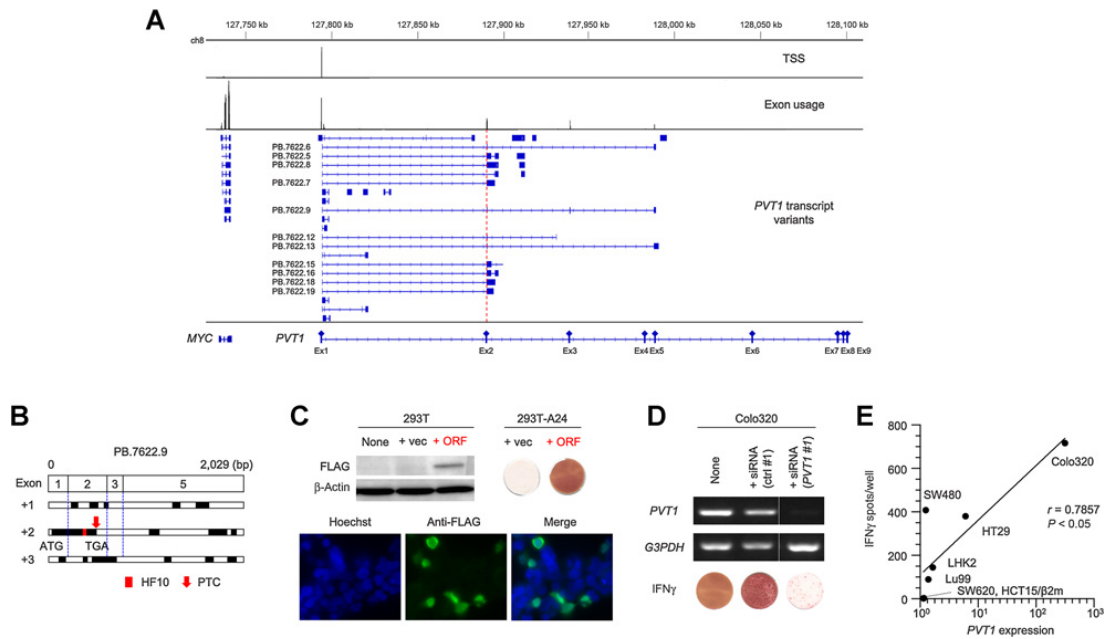


図2. 新規がん抗原ペプチド HF10 は lncRNA 遺伝子 PVT1 にコードされる

(3) 発見した PVT1-sORF は premature termination codon (PTC) を有している (図 2B)。まず、siRNA を用いて大腸がん細胞株 SW480 の nonsense mediated RNA decay (NMD) 関連遺伝子 (UPF1, UPF2, SMG1) をそれぞれノックダウンした。PVT1 がん抗原に対する T 細胞反応を検証したところ、3つの NMD 関連遺伝子いずれのノックダウンでも T 細胞反応が有意に増強した。また、がん細胞を NMD 阻害剤 (NMDI14) 処理すると同様に T 細胞反応が増強した。即ち、PVT1 がん抗原 RNA は NMD 制御されていると考える。さらに、T 細胞反応は conventional translation 阻害剤 (4EGI-1) で消失せず、むしろ増強することを見出した。以上より、PVT1 がん抗原遺伝子の発現・翻訳・抗原提示プロセスは通常抗原のものとは異なっている。PVT1 を始めとするまだ未知のノンコーディング RNA がん抗原の発現を介し、NMD 阻害剤は新しいタイプの抗腫瘍免疫増強剤となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shinkawa Tomoyo, Tokita Serina, Nakatsugawa Munehide, Kikuchi Yasuhiro, Kanaseki Takayuki, Torigoe Toshihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of CD8+ T-cell responses to non-anchor-type HLA class I neoantigens with single amino-acid substitutions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 1870062 ~ 1870062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2020.1870062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanaseki Takayuki, Tokita Serina, Torigoe Toshihiko	4. 巻 69
2. 論文標題 Proteogenomic discovery of cancer antigens: Neoantigens and beyond	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 511 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanaseki Takayuki, Torigoe Toshihiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Proteogenomics: advances in cancer antigen research	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 65 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2019.1640500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirama Tomomi, Tokita Serina, Nakatsugawa Munehide, Murata Kenji, Nannya Yasuhiro, Matsuo Kazuhiko, Inoko Hidetoshi, Hirohashi Yoshihiko, Hashimoto Shinichi, Ogawa Seishi, Takemasa Ichiro, Sato Noriyuki, Hata Fumitake, Kanaseki Takayuki, Torigoe Toshihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Proteogenomic identification of an immunogenic HLA class I neoantigen in mismatch repair-deficient colorectal cancer tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 146356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.146356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Yasuhiro, Tokita Serina, Hiram Tomomi, Kochin Vitaly, Nakatsugawa Munehide, Shinkawa Tomoyo, Hirohashi Yoshihiko, Tsukahara Tomohide, Hata Fumitake, Takemasa Ichiro, Sato Noriyuki, Kanaseki Takayuki, Torigoe Toshihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 CD8+ T?cell Immune Surveillance against a Tumor Antigen Encoded by the Oncogenic Long Noncoding RNA <i>PVT1</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1342 ~ 1353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-20-0964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Koyu, Kanaseki Takayuki, Tokita Serina, Torigoe Toshihiko, Hirasawa Noriyasu, Ogasawara Kouetsu	4. 巻 12
2. 論文標題 Palladium-Induced Temporal Internalization of MHC Class I Contributes to T Cell-Mediated Antigenicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 736936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.736936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金関貴幸
2. 発表標題 プロテオゲノミクスによるHLA提示ペプチド解析と非コード領域遺伝子に由来する新しいがん抗原クラスの同定
3. 学会等名 日本がん免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金関貴幸
2. 発表標題 基礎研究視点から考えるネオアンチゲン免疫原性の重要性
3. 学会等名 日本がん免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金関貴幸
2. 発表標題 遺伝子変異由来ネオアンチゲンの実像と患者T細胞応答
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------