

機関番号：82708

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20700419

研究課題名 (和文) 癌免疫治療におけるタンパク質間相互作用解析に基づいた創薬インターフェースの開発

研究課題名 (英文) Development of bioinformatic tools for cancer immunotherapy

研究代表者 中村 洋路 (NAKAMURA YOJI)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・水産遺伝子解析センター・研究員

研究者番号：90463182

研究成果の概要 (和文)：

がん免疫関連遺伝子のアミノ酸配列とその文献情報を網羅したデータベース Cancer-related Immunological Gene Database (CIG-DB) を構築した。このデータベースにある論文文献情報を用いてテキストマイニングを行った結果、現在までに報告されているがんに関連する免疫遺伝子の文献は、免疫治療や抗体医薬関連の文献と血液がん関連の文献の二つに大別できることを発見した。この知見に基づいて、がん・免疫関連文献の自動分類アルゴリズムを開発しデータベースの品質を向上させることができた。本データベースは、ウェブ上で一般公開されている (<http://www.scchr-cigdb.jp/>)。

また、がん抗原エピトープペプチドを挟んだヒト白血球型抗原 (HLA) と T 細胞受容体の結合アフィニティを予測することを目的として、まず始めに HLA タンパク質に対するがん抗原エピトープの結合アフィニティおよび立体配座を計算機で推定する「インシリコアッセイ系」を開発した。がん胎児性抗原やメラノーマ抗原などのエピトープ候補に対して、インシリコアッセイ系は従来までの予測手法と比べて高い性能を示した。さらに、他の研究者が簡単に利用できることを目的として、HLA タンパク質に対して任意のエピトープ候補ペプチドの予測アフィニティを自動で取得することができるパイプラインを構築した。

研究成果の概要 (英文)：

I developed an integrated database of immunoglobulin (Ig or antibody) and T-cell receptor (TCR) data reported in cancer studies (the Cancer-related Immunological Gene Database [CIG-DB]). This database is designed as a platform to explore public human and murine Ig/TCR genes sequenced in cancer studies, and a total of 2,081 cancer-related Ig and TCR entries are tabularized. The CIG-DB is equipped with search engines for amino acid sequences and MEDLINE references, sequence analysis tools, and a 3D viewer. This database is accessible without charge or registration at <http://www.scchr-cigdb.jp/>, and the search results are freely downloadable.

In addition, I developed an *in silico* docking simulation assay system of binding affinity between HLA-A24 protein and A24-restricted peptides using two softwares, AutoDock and MODELLER, and a crystal structure of HLA-A24 protein in the Protein Data Bank (PDB). I compared the current assay system with the previous method in terms of the prediction capability using MHC stabilization and peptide-stimulated CTL induction assays for carcinoembryonic antigen (CEA) and other HLA-A24 peptides. The result suggested that the current *in silico* assay system have potential advantages in efficiency

of epitope prediction over the previous method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成21年度	900,000	270,000	1,170,000
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用システム

キーワード：医療情報システム、免疫治療

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍免疫学の進歩とあいまって免疫系の細胞や分子をがん治療に利用する免疫療法が注目されている。これは本来ヒト生体に備わっている免疫系タンパク質の活性を強化し、これらにがん抗原を認識させて患者体内のがん細胞の増殖・進展を抑制する治療法である。免疫療法においては、個々の患者が持つ抗体（免疫グロブリン）と TCR（T 細胞受容体）のレパトワ配列、これらが認識するがん抗原のエピトープ配列を迅速に知ることが重要となる。それにより、遺伝子工学的な手法でがん細胞特異的な抗体・TCR あるいは抗原エピトープの改変によるテーラーメイドの免疫治療が可能となることが期待されている。

2. 研究の目的

バイオインフォマティクスの手法に基づいた全く新しい免疫治療支援システムの構築を行う。抗体・TCR および抗原エピトープの情報を世界中の公共データベースから収集し、その情報に基づいてがん患者の腫瘍細胞から利用可能な抗体・TCR あるいは抗原エピトープのアミノ酸配列を検索・予測するシステムを開発する。これらを統合し、免疫治療のための解析プラットフォームを構築する。

3. 研究の方法

研究は以下の3つのフェーズからなる。

(1) 抗体および TCR の抗原エピトープ予測システムを開発する最初の段階として、十分な数の対象アミノ酸配列および文献情報を収集し、これらをまずはデータベース化し、効率的なデータ整理と検索システムを整備する。

(2) タンパク質ドッキングとモデリングのソフトウェアを用いて、免疫タンパク質の相互作用を計算機で予測するシステム（インシリコアッセイ系）を開発する。抗体に関してはがんエピトープとの直接的な相互作用を予測することを試みる。TCR に関しては、まずはヒト白血球型抗原（HLA）によって抗原ペプチドが提示されることから、HLA と抗原エピトープとの相互作用を予測することを試みる。

(3) がん患者から単離された細胞等を用いて、さまざまな抗原ペプチドのサンプルに対して、免疫化学・分子生物学実験を行い、(2) で開発されたアッセイ系の検証・改善、および他の解析ツールとの比較を行う。最終的には、(1) のデータベースと連携して研究者が誰でも使用できるような解析パイプラインプログラムを構築する。

4. 研究成果

がん免疫関連遺伝子およびエピトープのアミノ酸配列とその文献情報を網羅したデータベースを構築した（図1）。

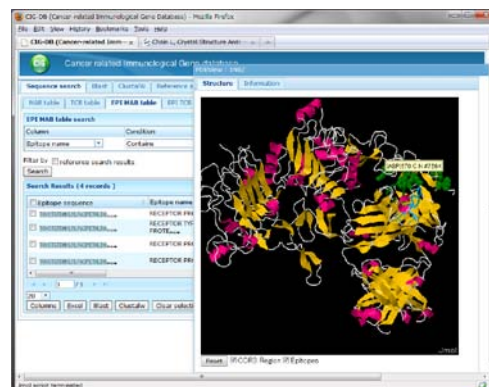


図1 がん・免疫データベース（検索結果の例）

データベースにはヒトまたはマウス由来の抗体・TCRのアミノ酸配列を2081本、エピトープ配列を920本格納し、世界最大のコンテナとなった(表1)。

表1. がん・免疫データベースの内訳

タンパク質配列	Ig	TCR	計
エンタリー数	1,605	476	2,081
ヒト由来	879	318	1,197
マウス由来	726	158	884
グループ I	397	214	611
グループ II	1,208	262	1,470
サブユニット			
軽鎖	791		
重鎖	814		
α鎖		185	
β鎖		288	
γ鎖		3	
エピトープ配列	772	148	920

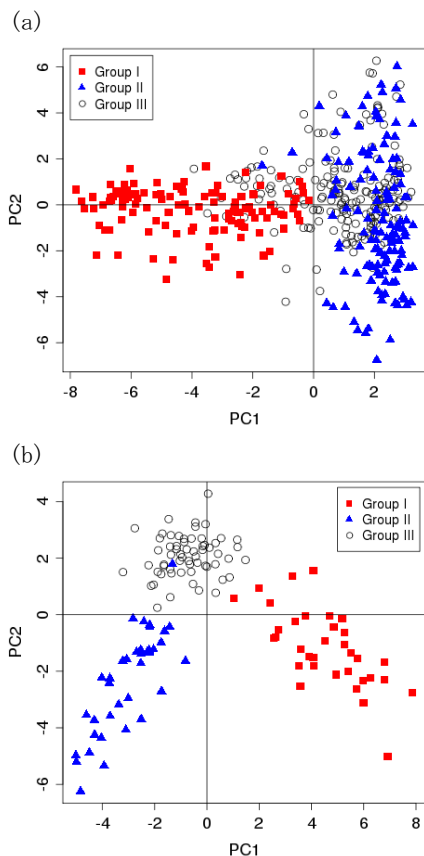


図2 がん免疫関連文献の主成分分析結果。(a) 抗体、(b) TCR。グループ I: 免疫療法・抗体医薬関連、グループ II: 血液がん関連、グループ III: その他

さらに文献のアブストラクトをテキストマイニングの手法でクラスタリングすることにより、2081 エンタリーを免疫治療や抗体医薬に関連したエンタリー (グループ I) と血液がん関連のエンタリー (グループ II) に分類できることを発見した(表1、図2)。この知見に基づいて、アブストラクト内に出現する単語ベクトル間のマハラノビス距離による自動分類アルゴリズムを開発し、がん・免疫関連文献を効率的に分類することに成功した。

また、タンパク質ドッキングとモデリングのソフトウェアを組み合わせ、エピトープ結合能を予測するインシリコアッセイ系を開発した。ドッキングソフトには AutoDock、モデリングソフトには MODELLER を用いた。アッセイのプロトコルは、まず始めに任意のエピトープペプチドに対してモデリングソフトで初期三次元構造を構築し、その構造を用いて抗体、TCR (または HLA) の三次元構造にドッキングさせるというものである。

抗体と抗原エピトープのインシリコアッセイ系においては、PDB に登録されている既知の構造を用いて検討したところ、エピトープを4~5 ペプチドに断片化した場合に既知結合構造をよく再現することができた。

TCR に関連した HLA のエピトープのケースでは、米国国立衛生研究所で提供されている一般的なエピトープ予測プログラム BIMAS と感度および特異度を比較した。その結果、インシリコアッセイのほうが受信者操作特性において、高い有効性を示した(図3)。

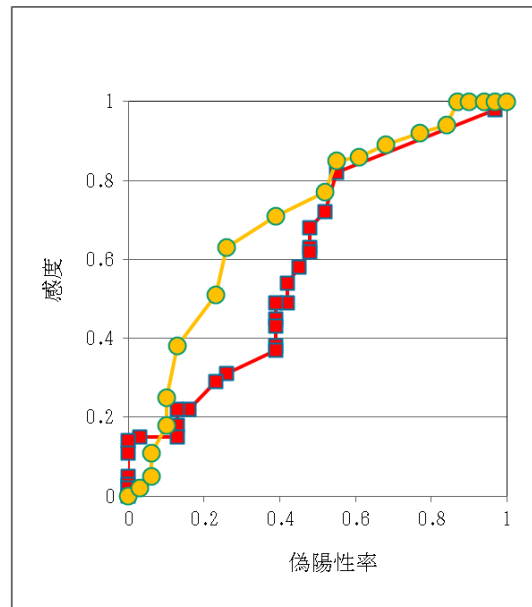


図3 HLA-A2402 タンパクを用いたエピトープ予測の受信者操作特性曲線。赤: BIMAS によるエピトープ予測結果、黄: インシリコアッセイ

さらに、より実際的な検証実験として、がん胎児性抗原、メラノーマ抗原、サイトメガロウイルス(CMV)などのアミノ酸配列からエピトープ候補のペプチドを選抜し、これらのペプチドに対して(i)HLA A24 を発現している培養細胞を用いたMHC安定化アッセイ、および(ii)HLA A24+のがん患者から得られた末梢血単核球を用いたCTL誘導能の検査を行った。これら二つの結果と、インシリコアッセイ系からの予測結果(図4)を比較したところ、インシリコアッセイ系の結果は前述のBIMASのスコアに比べてCTL誘導能との相関は同程度であったが、MHC安定化能に関してはBIMASスコアよりも高い相関を示した。

インシリコアッセイを他の研究者が簡便に利用できることを目的として、HLA A24 とHLA A2 タンパク質に対して任意のエピトープ候補ペプチドの予測アフィニティを自動で計算・取得することができるパイプラインを構築した。こうしてインシリコアッセイ系のインターフェースのプロトタイプが完成し、静岡がんセンター研究所において試験的運用を開始した。

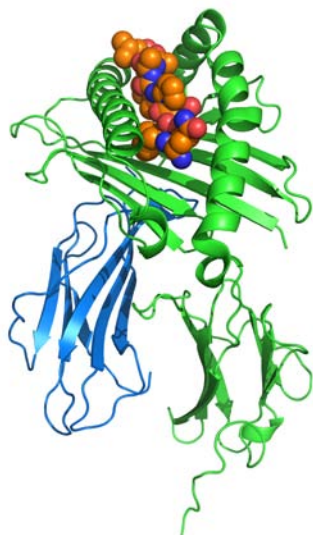


図4 インシリコアッセイによって予測されたCMVpp65ペプチドとHLA-A24タンパク質のドッキング構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Suzuki A, Iizuka A, Komiyama M, Takikawa M, Kume A, Tai S, Ohshita C, Kurusu A, Nakamura Y, Yamamoto A, Yamazaki

N, Yoshikawa S, Kiyohara Y, Akiyama Y. Identification of melanoma antigens using a Serological Proteome Approach (SERPA). Cancer Genomics Proteomics. Vol.7. 2010. pp.17-23. 2010

② Nakamura Y, Komiyama T, Furue M, Gojobori T, Akiyama Y
CIG-DB: the database for human or mouse immunoglobulin and T cell receptor genes available for cancer studies. BMC Bioinformatics. Vol.11. 2010. 398

③ Nakamura Y, Tai S, Oshita C, Iizuka A, Ashizawa T, Saito S, Yamaguchi S, Kondo H, Yamaguchi K, Akiyama Y.
Analysis of HLA-A24-restricted peptides of carcinoembryonic antigen using a novel structure-based peptide-HLA docking algorithm. Cancer Science. Vol.102. 2011. pp.690-696.

[学会発表] (計1件)

飯塚 明、久米 亜希子、小宮山 優、中村洋路、来栖 亜弓、清原 祥夫、山口 建、秋山 靖人
血清中のMAGE抗原及びCMV-pp65抗原に対する抗体価の測定及び標準化
第68回日本癌学会学術総会、2009年、10月3日

[その他]

ホームページ等
<http://www.scchr-cigdb.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村洋路 (NAKAMURA YOJI)
独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・水産遺伝子解析センター・研究員
研究者番号：90463182

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：