

令和 6 年 7 月 4 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21556

研究課題名（和文）個別化がんワクチン療法に向けた統合プロテオミクスによる新規がん抗原同定法の開発

研究課題名（英文）Development of an innovative platform for identification of immunogenic cancer antigens

研究代表者

田口 歩（Taguchi, Ayumu）

愛知県がんセンター（研究所）・分子診断TR分野・分野長

研究者番号：50817567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：がんワクチン療法を含む、効果の高い複合的個別化がん免疫療法を実現するためには、より多くの高免疫原性がん抗原を同定する必要がある。本研究では、プロテオゲノミクスを応用したHLAクラスI分子結合ペプチド（HLA-Iリガンドーム）解析に、HLAクラスIIリガンドによる液性免疫応答誘導の帰結としての高感度血漿自己抗体結合抗原プロテオーム（イミュノーム）解析を開発する。これらの統合的な解析により、生体で実際に免疫応答を引き起こしている抗原タンパク質でかつ実際にHLAクラスI分子結合ペプチドとしてがん細胞表面に提示されている、高免疫原性がん抗原を高精度に同定可能な革新的がん抗原同定システムを構築する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんワクチン療法は、従来のがん治療法と比較して副作用が少ないことから、本研究で開発する革新的ながん抗原同定システムによってより効果の高い完全個別化がんワクチン療法が可能になれば、肺がん、食道がん、胃がんなどでは免疫チェックポイント阻害剤と併用した複合的個別化がん免疫療法による治療成績向上が期待でき、また膵がんなど免疫チェックポイント阻害剤単独では奏功しない難治がんにおいても、複合的免疫治療のパラダイムシフトにつながる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to develop effective personalized cancer immunotherapy, it is crucial to identify a greater number of highly immunogenic cancer antigens. In this study, we will develop a highly sensitive analytical pipeline for HLA class I molecule-binding peptides (HLA-I ligandome) based on proteogenomics and in-depth proteome analysis for plasma immunoglobulin (Ig)-bound proteins as a consequence of humoral immune response induced by HLA class II ligands. Through integrating these two platforms, we will construct an innovative cancer antigen identification system that can accurately identify highly immunogenic cancer antigens, which are presented on the surface of cancer cells as HLA class I molecule-binding peptides, and which can induce humoral immune responses in vivo.

研究分野：分子診断学

キーワード：難治がん がん抗原 個別化がんワクチン プロテオミクス HLAクラスI結合ペプチド 自己抗体結合抗原 PDXモデル 患者由来細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤(ICI)の登場により、生体の免疫が、がんを拒絶し得ることが明らかとなった。一方で、多くのがん種において、ICI 単独の奏効率は 10~40%と、その効果は限定的である。ICI の治療効果には、細胞傷害性 T 細胞が認識する、HLA クラス I 分子に結合したがん抗原ペプチド(HLA-I リガンド)が関与している。すなわち、がんの遺伝子突然変異によって生じる変異タンパク質(ネオアンチゲン)が多い患者集団で ICI の効果が高いことが観察された。これらの結果に基づいて、ネオアンチゲン由来がんワクチンを用いた個別化がんワクチン療法の臨床試験が欧米で行われ、ICI の併用、さらには ICI/化学療法の併用などにおいて、良好な結果が示されている。このことは、まさに、ネオアンチゲンを標的ながん免疫のアクセラを踏みつつ(個別化がんワクチン) がん免疫のブレーキを解除する(ICI)という、複合的個別化がん免疫療法が、がんの克服に極めて有望であることを示唆している。

効果の高い複合的個別化がん免疫療法を実現するためには、より多くの免疫原性の高いがん抗原を同定する必要があるが、現状ではいくつかの課題がある。第一に、次世代シーケンサーによるゲノム・トランスクリプトーム情報に基づいて予測されたネオアンチゲン由来 HLA-I リガンドの免疫原性に関連するパラメーターは徐々に明らかになりつつあるものの、依然そのわずか数%が免疫応答を誘導するに過ぎず、より網羅的に HLA-I リガンドを同定する方法が求められている。第二に、高免疫原性と予測された HLA-I リガンドに対する免疫応答の検証は、同一症例から単離培養された末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を用いたマルチマーアッセイが広く行われている。この方法では、培養操作によるクロナリティの変化に加えて、ペアとなる T 細胞受容体(TCR)の配列についての解析がなされないことから、TCR との結合において免疫原性を左右するパラメーターの解明が不十分であるだけでなく、TCR 遺伝子導入 T 細胞療法などへの展開が困難である。第三に、多様なサブセットの B 細胞が腫瘍内に存在し(TIL-B) 自己抗体の産生、サイトカインの分泌、T 細胞への抗原提示など様々な機能を持ち、ICI の効果にも密接に関連するという知見が集積しつつあり、液性免疫応答の起点として、ヘルパー T 細胞に認識される HLA クラス II 分子に結合するがん抗原ペプチド(HLA-II リガンド)にも注目が集まっている。しかし、腫瘍内の HLA クラス II 分子は HLA クラス I 分子より微量であること、HLA-II リガンドは 13~28 アミノ酸残基と長く HLA クラス II 分子へ結合する条件も緩やかであることから、HLA-II リガンドの同定や免疫原性の評価はより困難かつ複雑とならざるを得ず、HLA-I リガンドに比較して解析は進んでいない。

2. 研究の目的

愛知県がんセンター分子診断 TR 分野では、ゲノム情報やトランスクリプトーム情報からは得られない、タンパク質の局在情報に重点を置いた空間プロテオーム解析を行ってきた。そこで、本研究では、プロテオゲノミクスを応用した HLA-I リガンドーム解析に、HLA-II リガンドによる液性免疫応答誘導の帰結としての自己抗体結合抗原プロファイル(イミュノーム)を統合し、実際にがん細胞表面に提示されている抗原ペプチドと、生体で実際に免疫応答を引き起こしている抗原タンパク質を同定し、その統合的な解析から、真に免疫原性の高いがん抗原を同定する

3. 研究の方法

(1) 難治がん PDX マウスモデルの作成

微量な HLA クラス I 結合ペプチドを高感度に同定するために、本研究では難治がん患者由来の臨床検体から、患者腫瘍組織移植(PDX)モデルを作成し、PDX 腫瘍を用いて HLA-I リガンドーム解析を行う。

(2) PDX 腫瘍のゲノム・トランスクリプトーム解析

PDX 腫瘍は、移植後約 3~6 ヶ月で解析に十分な大きさである 1 立方 cm の腫瘍を複数個得ることができる。PDX 腫瘍のエクソーム解析、RNA シーケンス解析を行い、HLA 解析アルゴリズム ALPHARD を用いた HLA タイピングとゲノム・トランスクリプトーム情報に基づいたネオアンチゲン同定を行う。

(3) HLA-I リガンドーム解析

PDX 腫瘍を用いて、抗 HLA クラス I 抗体による免疫沈降を行い、質量分析によって 8-11 アミノ酸長の HLA クラス I 結合ペプチドを同定する(HLA-I リガンドーム)。本研究では、遺伝子変異配列を含むネオアンチゲンや lncRNA がコードするマイクロペプチドなど、未知のアミノ酸配列を持つペプチドを同定するために、既存のアミノ酸配列データベースに基づく解析、各症例のゲノム・トランスクリプトーム情報から構築した症例固有の予測アミノ酸配列データベースに基づく解析、データベース非依存性の MS/MS スペクトルに基づく de novo シーケンシング、の 3 つの方法を用いてアミノ酸配列を決定する。各症例の HLA タイプに基づき、NetMHCpan を用いた HLA アリルへの各ペプチドの結合親和性を解析し、免疫原性の高い HLA クラス I 結合ペプチドを同定する。

(4) 血漿抗原 自己抗体複合体(イミュノーム)解析

血漿から免疫グロブリンを回収し、質量分析によって、自己抗体に結合した抗原タンパク質を

同定する。タンパク質同定は、HLA リガンドーム解析と同様、上記 ~ の手法を応用して解析する。

(5) がん抗原解析

HLA-I リガンドーム解析と免疫ノーム解析から同定された、免疫原性の高いペプチドについては、同一症例由来腫瘍浸潤 CD8+T 細胞のシングルセル解析(遺伝子発現解析(scRNA-seq)、TCR 解析(TCR-seq))から同定された、Tex (exhausted T cells)クラスターにおいて頻度の高い TCR との反応性を、TCR 遺伝子導入 Jurkat 細胞を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 難治がん PDX マウスモデルの作成

高度免疫不全モデルである Rag-2/Jak3 二重欠損マウスを用いて、膵、大腸、肺、胃、食道、肝臓の各がんとサルコーマにおいて約 300 例の PDX と約 100 個の患者由来細胞 (PDC) を作成した。このうち、同一症例から腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) が単離できた非小細胞肺癌 PDC 4 例と胃がん PDX 10 例で下記の HLA-I リガンドーム解析を行った。

(2) HLA-I リガンドーム解析

液体クロマトグラフィーと気相分離システムを組み合わせることで、網羅的かつ高感度な HLA-I リガンドームデータ取得が可能な質量分析システムを構築した。これにより、既存法で 3,000 個程度であった HLA-I リガンドの同定数を、世界トップレベルと比肩しうる、検体当たり 15,000 ~ 20,000 個にまで増加させることに成功した(未発表)。同定されたペプチドのうち、40 ~ 70% が HLA クラス I 分子への結合親和性スコア上位 1% 未満であったことから、極めて高い効率で HLA クラス I 結合ペプチドが HLA-I リガンドームデータに濃縮できていることが確認された。次に、データベース非依存性の MS/MS スペクトルに基づく de novo シーケンシングを用いたペプチドのアミノ酸配列決定法を導入した。これにより、既知のデータベースには存在しない、未知のペプチドを検体あたり約 4,000 ~ 10,000 個同定できた。驚くべきことに、これら未知のペプチドのうち、20 ~ 30% が HLA クラス I 複合体への結合親和性スコア上位 1% 未満を示しており、de novo ペプチドシーケンスデータから、未知のがん特異的抗原が大規模に同定可能であることが示唆された(図 1)。

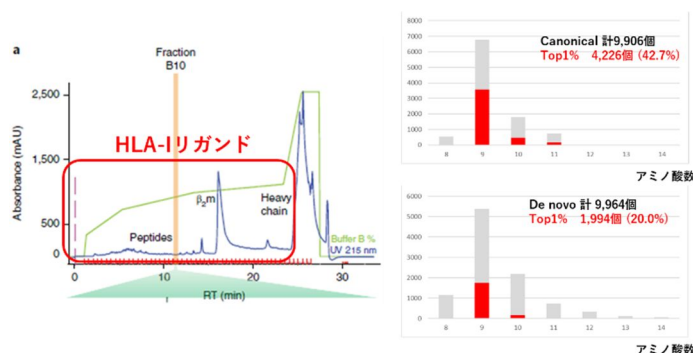


図 1 HLA-I リガンドーム解析

さらに、各がん症例のゲノム・トランスクリプトームデータから構築した患者固有予測アミノ酸配列データベースに、遺伝子変異公開データベースや lncRNA 由来マイクロペプチドデータベースを統合したプロテオゲノム解析系を構築した。2023 年 2 月に導入が完了し、現在解析を進めているが、各検体において 2 ~ 6 個の lncRNA 由来マイクロペプチドが、HLA クラス I 分子と極めて高い結合親和性を示しており、新規がん抗原候補として期待される。現在、腫瘍浸潤 CD8+T 細胞のシングルセル解析(遺伝子発現解析(scRNA-seq)、TCR 解析(TCR-seq))を進めている。scRNA データから同定された腫瘍浸潤 CD8+T 細胞内の Tex (exhausted T cells)クラスターにおいて頻度の高い TCR 種を選択し、TCR 遺伝子導入 Jurkat 細胞を用いてがん抗原ペプチド候補との反応性を検討している。

(3) 血漿抗原 自己抗体複合体 (免疫ノーム) 解析

自己抗体の網羅的な探索同定には、従来 SEREX 法や、プロテインアレイ、ペプチドアレイなどが行われてきたが、多数の抗原を用いたスクリーニングが容易にできる一方で、癌特異的翻訳後修飾を受けたタンパク質や未知のタンパク質・ペプチドに対する抗体についての情報は得られない。我々は、マススペクトロメトリーを用いて自己抗体に結合した抗原タンパク質を解析することで、これらの問題の解決に取り組んできた。我々が開発した当初のプロトコルでは、抗原自己抗体複合体分画に含まれる微量な抗原と大量に存在する免疫グロブリンを精度よく分離することができず、十分な感度を達成できずとも言えなかった。しかし、pH 勾配液体クロマトグラフィーを応用して抗原を溶出することで、1,000 個超の抗原同定が可能なハイスループット自己抗体結合抗原解析法を開発した(特願 2022-152089)(図 2)。

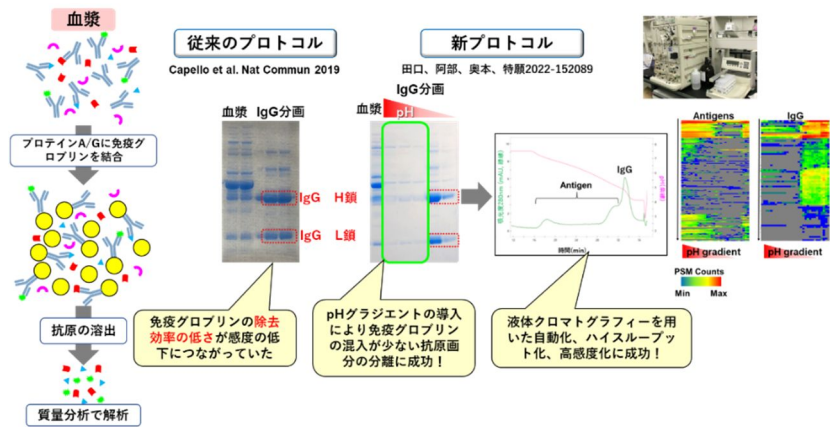


図2 血中抗原 自己抗体複合体の網羅的プロファイリング

同一症例で HLA-I リガンドームと免疫ノームの解析ができた非小細胞肺がんの 1 例を示す。HLA-I リガンドームにおいて同定されたタンパク質数は 4,550 個(ペプチド数は約 20,000 個)であった。免疫ノームと比較したところ、997 タンパク質(21.9%)が共通して同定された(図 3)。

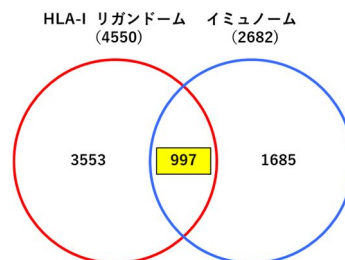


図3 HLA-I リガンドームと免疫ノームのオーバーラップ

この 997 タンパク質は高免疫原性であると考えられたが、特に、がん精巣抗原 X は HLA-I リガンドームと免疫ノーム両方で同定され、かつ複数のペプチドが Top1%未満の結合親和性を示したことから治療標的として有望ながん抗原と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuichi Abe, Hisanori Isomura, Zhou Shuang, Taisuke Kajino, Rui Yamaguchi, Waki Hosoda, Kazuo Hara, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 A proteogenomic approach for identification of novel IgG-bound antigens in pancreatic cancer
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi, Shuang Zhou, Yuichi Abe, Taisuke Kajino, Hisanori Isomura
2. 発表標題 Systems-approach based molecular profiling of mouse models for translational cancer research
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi
2. 発表標題 In-depth proteomics to decipher the complexity of the blood cancer proteome
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi
2. 発表標題 In-depth Plasma Proteomics for Cancer Biomarker Discovery
3. 学会等名 HUPO 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部雄一, 磯村久徳, 田口 歩
2. 発表標題 免疫グロブリン結合抗原の高深度プロテオーム解析による新規がんバイオマーカー探索
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi, Yuichi Abe, Taisuke Kajino, Hisanori Isomura
2. 発表標題 In-depth proteomic analysis of cancer models
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部 雄一、磯村 久徳、田口 歩
2. 発表標題 免疫グロブリン結合タンパク質の高深度プロテオーム解析と、新規がんバイオマーカー探索研究への応用
3. 学会等名 第42回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部雄一、磯村久徳、田口 歩
2. 発表標題 免疫グロブリン結合タンパク質の高深度プロテオーム解析と、新規がんバイオマーカー探索研究への応用
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 治樹, 阿部雄一, 梶野泰祐, 夏目誠治, 木下敬史, 大内 晶, 水野和幸, 三宅 亨, 飯田洋也, 細田和貴, 小森康司, 清水泰博, 谷 眞至, 田口 歩
2. 発表標題 Physician scientistを志して ~新しい外科の地平線を切り拓くために~
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 光濃縮による血中がんバイオマーカーの超高感度測定法の開発および新規バイオマーカー探索
3. 学会等名 第48回 光科学異分野横断セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 血液は何を語るのか: 光濃縮によるがん早期診断への挑戦
3. 学会等名 LAC-SYS 研究所第3回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 クリニカルプロテオミクスが拓くがん研究の近未来
3. 学会等名 第53回藤田医科大学医学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 がん早期診断に「光」を！
3. 学会等名 第10回光科学異分野横断萌芽研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗原分子の単離方法	発明者 田口 歩、阿部雄一、奥本泰秀	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-152089	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	松下 博和 (Matsushita Hirokazu) (80597782)	愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫制御TR分野・分野長 (83901)	
研究分担者	山口 類 (Yamaguchi Rui) (90380675)	愛知県がんセンター(研究所)・システム解析学分野・分野長 (83901)	

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
---------	---------