

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14979

研究課題名（和文）イヌMHCペプチドーム解析に基づくがんペプチド同定法の確立

研究課題名（英文）Development of tumor antigen peptide identification method based on MHC immunopeptidome in dogs

研究代表者

宮前 二郎（Miyamae, Jiro）

岡山理科大学・獣医学部・助教

研究者番号：40846143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：イヌMHCクラス（DLA-I）分子を対象としたMHCペプチドーム解析を行い、DLA-I分子に提示されるペプチド配列の解明を試みた。イヌで頻度の高い3種類のDLA-I分子において、DLA-I分子結合ペプチドを同定することができた。さらに、得られたペプチド配列情報を基に、DLA-I分子に提示されるペプチドの予測システムの構築も試みた。MHC結合ペプチドを予測するための機械学習のアルゴリズムを実装したオープンソースのツールを一部改変し、本研究で得られたペプチド情報を用いて再トレーニングすることで、DLA-I結合ペプチドを予測可能なツールを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では3種類のDLA分子を対象としてDLA結合ペプチドを解明し、さらに、同定したDLA結合ペプチドを用いて、DLA結合ペプチド予測システムを構築することができた。この予測システムにより、Neoantigen（がん特異的な遺伝子変異に起因するがん抗原）や腫瘍関連抗原のアミノ酸配列から、DLA分子に結合するがん抗原ペプチドの候補を瞬時に選択することが可能となった。よって、本ツールは今後のイヌのがんワクチン研究の進展に大きく貢献すると考えられる。また、本研究の手法を用いて、他のDLA分子に提示されるペプチド配列を解明することで、イヌ全体を網羅可能ながんワクチン開発基盤の構築に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Major histocompatibility complex (MHC) immunopeptidome analysis for dog MHC (Dog leukocyte antigen: DLA) class I (DLA-I) molecules was performed to elucidate peptides that are presented by these molecules. Consequently, in three DLA-I molecules that are common in dogs, the peptides presented by those molecules were identified. In addition, by retraining a published tool for predicting MHC-binding peptides in humans using DLA-I binding peptides identified in this study, we established the system for predicting DLA-binding peptides.

研究分野：免疫学

キーワード：がん免疫療法 イヌ MHC ペプチドワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年の獣医療の発展によりイヌの寿命が延びたことに伴い、悪性腫瘍の発症例は増加し、現在イヌの死因のトップとなっている。これらの中には、外科療法、放射線療法、化学療法及びそれらを組み合わせた集学的治療で寛解しない症例も多く、効果的な治療法の確立は医学のみならず獣医学領域においても重要な命題の一つである。

悪性腫瘍への新規治療法として、がん免疫療法への期待度は高いが、獣医領域は医学領域と比較すると研究開発が遅れている。特に、がんペプチドワクチンの開発に関しては、ほとんど進んでいない状況である。がんペプチドワクチンは、主要組織適合性複合体 (Major histocompatibility complex: MHC) 分子に提示されるがん抗原タンパク質由来の 9~30 アミノ酸からなるペプチド (がんペプチド) をアジュバントと共に投与することで、がん特異的 T 細胞を迅速かつ協力的に誘導可能であり、安価かつ副作用も少なく安全性の高い治療法である。生体内でがん特異的 T 細胞を活性化するためには、①抗原提示細胞によるがん抗原の取り込み、②MHC 分子を介したがんペプチドの提示、③抗原提示細胞上の MHC 分子で提示されたがんペプチドを認識したがん特異的 T 細胞の活性化、というプロセスが必要である。がんペプチドを投与することで、MHC 分子を介した抗原提示細胞によるがんペプチドの提示が促進され、より効率的にがん特異的 T 細胞のみを誘導することが可能となる。

最適ながんペプチドワクチンを開発するためには、1つの MHC 分子上に提示されるペプチド群を正確に把握する必要がある。ヒトでは質量分析計によるヒト MHC (Human leukocyte antigen: HLA) 分子と結合するペプチド群の網羅解析が行われており、各 HLA 分子に提示されるペプチド配列データが蓄積されている。さらに、これらの膨大なデータを活用し、機械学習をベースとした HLA 結合ペプチド予測システムが構築されており、目的のがん抗原タンパク質の中で HLA 分子に提示される抗原ペプチド配列の候補を瞬時に選択することが可能となっている。ヒトではこのシステムにより予測されたがん抗原ペプチドを用いて、臨床研究を含む数多くのがんワクチン研究が進行している。一方、イヌ MHC (Dog leukocyte antigen: DLA) では、各 DLA 分子に提示されるペプチド群を解析した報告は非常に少なく、DLA 結合ペプチド予測システムも確立されていない状況である。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、①DLA 分子により提示されるペプチドの網羅解析 (MHC ペプチドーム解析) を実施し、②得られたペプチド情報から DLA 結合ペプチドの予測システムを構築することを目的とした。

MHC 遺伝子は高度な多型性を有しており、ヒトでは 17,000 種類以上、イヌでは 500 種類以上の対立遺伝子 (アレル) が報告されている。これらのうち、集団内で頻度の高い対立遺伝子を対象として研究を遂行することで、より汎用性の高いがんワクチンの開発が可能となる。研究代表者はこれまで DLA 遺伝子の多型解析に従事し、イヌ MHC 多型の特徴を明らかにしてきた。そこで、これまでの研究データを基に、イヌで頻度の高い 3 種類の DLA アレルを対象とし、本研究を実施した。

## 3. 研究の方法

イヌメラノーマ由来株 (Kmec) に *DLA-88\*004:02*, *DLA-88\*501:01* もしくは *DLA-88\*508:01* をそれぞれ組み込んだ発現ベクターを導入し、各 DLA 分子を高発現する細胞集団をソーティングにより濃縮した。次に、これらの各細胞株からタンパク質を抽出し、免疫沈降により各 DLA 分子を濃縮した後、酸乖離法によって濃縮した DLA 分子からペプチドを単離した。続いて、疎水性相互作用 (C18 カラム) もしくは限外濾過により、タンパク質分画とペプチド分画分離し、ペプチド分画をエバポレーターで濃縮した後、再度 C18 カラムにより精製した。精製したペプチド溶液を質量分析計により解析し、各 DLA 分子に結合するペプチド配列を同定した。

同定した DLA 結合ペプチド配列を用いて、HLA 結合ペプチド予測ツールの一つである ACME (Bioinformatics, 35:4946-4954, 2019) を再トレーニングすることで、独自の DLA 結合ペプチド予測ツール (ACME-DLA) を構築した。既に *DLA-88\*508:01* との結合親和性が実験的に解析されているイヌジステンパーウイルス (Canine distemper virus: CDV) 由来の 9~12-mer のペプチド 22 個について (Vet Immunol Immunopathol. 197:76-86, 2018) ACME-DLA で予測結合スコアを算出することで、ACME-DLA の予測精度を評価した。

## 4. 研究成果

DLA-88\*004:02, DLA-88\*501:01 および DLA-88\*508:01 の3分子において、9~11-merのDLA結合ペプチドをそれぞれ154個、788個および898個同定できた。同定されたペプチドを9,10,11-merごとに分け、シーケンスロゴ解析を行ったところ、DLA分子ごとに結合するペプチド群の性状に違いが確認された(図1)。これらのうち、9-merのペプチドについて詳細に比較すると、いずれの分子においても、2残基目は疎水性ペプチドが80%以上を占めていた。また、DLA-88\*501:01においては、9残基目も90%以上が疎水性ペプチドであった。3残基目については、DLA-88\*501:01 および DLA-88\*508:01は40-50%が疎水性ペプチドである一方で、DLA-88\*004:02については、酸性ペプチドであるアスパラギン酸が50%以上を占めていた。

本研究で同定したペプチド配列(8~13-mer)およびこれまでに報告されているヒトMHC(HLA)結合ペプチドのデータを用いて、MHC結合ペプチドの予測アルゴリズムを実装したツールであるACMEを再トレーニングし、研究代表者独自のDLA結合ペプチド予測システムを構築した(ACME-DLA)。ACME-DLAの予測精度を確認するため、既に、他の研究者らによってDLA-88\*508:01との親和性が確認されているイヌジステンパーウイルス(CDV)由来のペプチド22個を用いて結合予測を行った。ACMEでは、結合予測スコアが0.42以上を示す場合、そのペプチドとMHC分子が結合すると判定される。また、CDVペプチドとDLA-88\*508:01との親和性の実測値は0.011以上の場合、結合親和性があると判定されているため、この解析でもこれらの値を閾値として評価した。その結果、ACME-DLAの予測結合スコアと、DLA-ペプチド結合親和性の実測値が矛盾するペプチドは22個中3個のみであり、両者の結果には相関が確認された(相関係数:  $r=0.635$ ,  $p<0.01$ )。このことから、我々の構築したDLA結合ペプチド予測システムは各DLA分子に結合する抗原ペプチドを比較的高い精度で予測可能であり、がんワクチン研究に有用なツールになると考えられた。

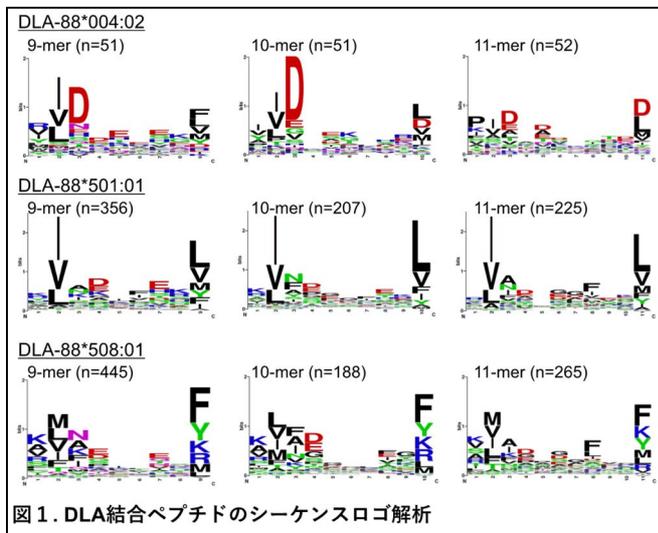


図1. DLA結合ペプチドのシーケンスロゴ解析

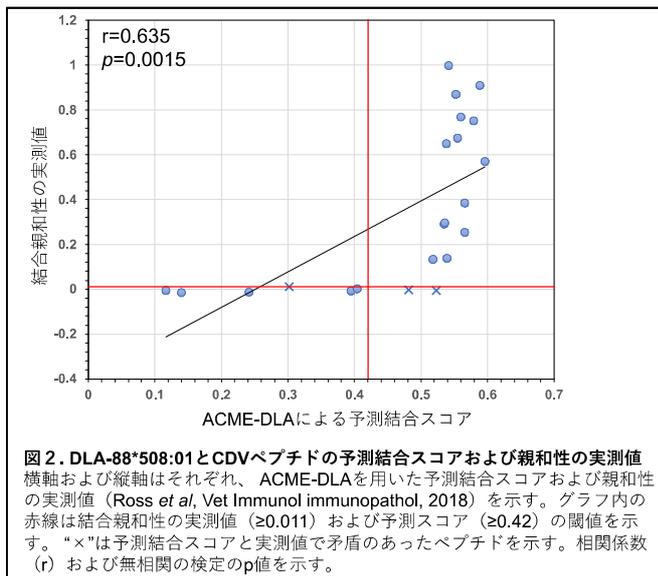


図2. DLA-88\*508:01とCDVペプチドの予測結合スコアおよび親和性の実測値。横軸および縦軸はそれぞれ、ACME-DLAを用いた予測結合スコアおよび親和性の実測値(Ross *et al*, *Vet Immunol immunopathol*, 2018)を示す。グラフ内の赤線は結合親和性の実測値( $\geq 0.011$ )および予測スコア( $\geq 0.42$ )の閾値を示す。“x”は予測結合スコアと実測値で矛盾のあったペプチドを示す。相関係数( $r$ )および無相関の検定の $p$ 値を示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyamae Jiro, Okano Masaharu, Nishiya Kohei, Katakura Fumihiko, Kulski Jerzy K., Moritomo Tadaaki, Shiina Takashi	4. 巻 74
2. 論文標題 Haplotype structures and polymorphisms of dog leukocyte antigen (DLA) class I loci shaped by intralocus and interlocus recombination events	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunogenetics	6. 最初と最後の頁 245 ~ 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00251-021-01234-5	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 該当する

1. 著者名 Miyamae Jiro, Okano Masaharu, Katakura Fumihiko, Kulski Jerzy K., Moritomo Tadaaki, Shiina Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Large-Scale Polymorphism Analysis of Dog Leukocyte Antigen Class I and Class II Genes (DLA-88, DLA-12/88L and DLA-DRB1) and Comparison of the Haplotype Diversity between Breeds in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 809 ~ 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12050809	査読の有無 無
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 Nakazawa Meg, Miyamae Jiro, Okano Masaharu, Kanemoto Hideyuki, Katakura Fumihiko, Shiina Takashi, Ohno Koichi, Tsujimoto Hajime, Moritomo Tadaaki, Watari Toshihiro	4. 巻 237
2. 論文標題 Dog leukocyte antigen (DLA) class II genotypes associated with chronic enteropathy in French bulldogs and miniature dachshunds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 110271 ~ 110271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2021.110271	査読の有無 無
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 OSHIMA Ayaka, ITO Daisuke, KATAKURA Fumihiko, MIYAMAE Jiro, OKANO Masaharu, NAKAZAWA Megu, KANAZONO Shinichi, MORITOMO Tadaaki, KITAGAWA Masato	4. 巻 85
2. 論文標題 Dog leukocyte antigen class II alleles and haplotypes associated with meningoencephalomyelitis of unknown origin in Chihuahuas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 62 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0116	査読の有無 無
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 Murakami Kohei, Miyatake Saki, Miyamae Jiro, Saeki Kanna, Shinya Mizutani, Akashi Natsuki, Mitsui Ikki, Kobayashi Kosuke, Saeki Kohei, Maeta Noritaka, Kanda Teppei, Okamura Yasuhiko, Henmi Hiroaki	4. 巻 253
2. 論文標題 Expression profile of immunoregulatory factors in canine tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 110505 ~ 110505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2022.110505	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 宮前二郎、岡野雅春、森友忠昭、椎名隆
2. 発表標題 イヌMHC遺伝子 (DLA-88, -88L/12および-DRB1) 多型の解明と獣医療への展開
3. 学会等名 第五回日本ワンヘルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桜井 公平、岡野 雅春、宮前 二郎、山口 卓哉、片倉 文彦、森友 忠昭
2. 発表標題 コIT細胞受容体 (TCR) / 遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋 龍一、中澤 慈、山崎 敦史、宮前 二郎、岡野 雅春、片倉 文彦、亘 敏広、枝村 一弥、森友 忠昭
2. 発表標題 ダックスフントにおける多発性免疫介在性関節炎 (IMPA) とイヌMHCクラスII遺伝子 (DRB1) との関連解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上康平、宮武咲妃、宮前二郎、佐伯巨平、前田憲孝、神田鉄平、邊見弘明、岡村泰彦
2. 発表標題 犬の悪性腫瘍は免疫チェックポイントリガンドGalectin-9を発現する
3. 学会等名 日本獣医臨床病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Murakami, Daichi Hanai, Ryusei Kimura, Ikki Mitsui, Jiro Miyamae, Akira Matsuda, Hiroaki Hemmi
2. 発表標題 Down-regulation of PD-L2 is a poor prognostic marker in dogs with high-grade mast cell tumor
3. 学会等名 第10回アジア獣医病理学会 / 第10回日本獣医病理学専門家協会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮前 二郎、岡野 雅春、片倉 文彦、坂井 学、森友 忠昭、椎名 隆
2. 発表標題 イヌMHC多型の特徴と幹細胞他家移植への展望
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮前 二郎、岡野 雅春、森友 忠昭、椎名 隆
2. 発表標題 イヌとネコのMHC多型の特徴と小動物臨床への展開
3. 学会等名 第166回日本獣医学会 (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 DLA適合のイヌドナーを選択する方法	発明者 宮前 二郎、菅原 広隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2023-011344	出願年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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			