

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19458

研究課題名(和文) 遺伝子変異由来スプライスペプチドの同定

研究課題名(英文) Identification of mutation-derived spliced peptides

研究代表者

鳥越 俊彦(Torigoe, Toshihiko)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20301400

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)：HLA Ligandome解析法を改良し、de novoシークエンス法によって野生型タンパク由来スプライスペプチドの同定に成功した。健康人末梢血T細胞を刺激したところ、スプライスペプチド特異的CTLが誘導され、2種類のCTLクローンを樹立した。野生型タンパク由来スプライスペプチドは、高い免疫原性を有していることが証明された。

スプライスペプチドの産生機序を解析するために、minigeneを遺伝子導入してスプライスペプチドの産生を検証した。また、プロテアソーム阻害剤を用いてスプライスペプチドの産生を解析した。その結果、スプライスペプチドはプロテアソーム依存性に産生されているとの結論を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で最大の学術的意義は、ヒト大腸がん細胞から新規スプライスペプチドを同定し、抗原特異的CTLクローンの樹立に成功した点にある。親タンパクはがん細胞だけでなく、正常組織にも発現しているハウスキーピング分子である。それにも関わらず、スプライスペプチドの高い免疫原性が確認されたことは、この分子のスプライスががん細胞特異的に生じている可能性を示唆する結果であり、遺伝子変異に依存しない新しいネオアンチゲンの産生メカニズムとして大きな細胞生物学的意義がある。また、患者に共通して適応されるネオアンチゲンワクチン創薬に貢献することが期待され、今後がん予防ワクチンの実用化にも道が拓かれる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：We could successfully develop the de novo sequencing technology for HLA ligandome analysis, and discovered three spliced peptides derived from wild-type proteins in HCT15 colon cancer cells. Spliced peptide-specific cytotoxic T-cells (CTLs) were induced from peripheral blood lymphocytes of healthy donors by mixed lymphocyte-peptide culture. Two CTL clones were established and analyzed for the cytotoxic potentials, indicating that the novel spliced peptides were highly immunogenic. Then, we analyzed the mechanism of peptide splicing, indicating that the splicing was dependent on the activity of proteasome in the cells. Our data revealed the novel category of neoantigens, which might contribute to the development of a prophylactic cancer vaccine as well as a therapeutic cancer vaccine.

研究分野：分子免疫病理学

キーワード：がん抗原 スプライスペプチド プロテアソーム 抗原提示 がんワクチン がん免疫療法 T細胞 HLA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞が有するゲノム遺伝子に非同義変異があり、それにコードされた変異タンパク由来の変異ペプチドが抗原提示されると、極めて高い免疫原性を発揮することが知られている。このような遺伝子変異によって生じる変異抗原はネオアンチゲンと呼ばれ、正常細胞にはなく、がん細胞でしか発現しないため、「非自己」を排除する免疫システムにとって最適の標的抗原となる。がん細胞が発現する変異タンパクは、プロテアソームを介してペプチドに断片化され、抗原提示分子 HLA と複合体を形成し、細胞表面上に提示される。T 細胞はこのペプチド・HLA 複合体を認識して、標的がん細胞を識別する。近年、プロテアソームで断片化された 2 つの連続しないペプチド断片が癒合し、ひとつのペプチドを形成する、いわゆるスプライスペプチドが細胞表面上に提示されることが報告されているが、ヒトのがん細胞からがん抗原として直接的に証明された報告は極めて少ない。がん細胞に特異的なスプライスペプチドを同定することができれば、異なるがん種に共通して発現するネオアンチゲンとなり得る可能性があり、がん抗原特異的免疫療法の開発に大きく貢献することが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、がん細胞表面上に提示される遺伝子変異由来のスプライスペプチドを同定し、免疫治療の標的として広く利用できることを証明することである。

具体的には、以下の 4 項目を証明・検証することを目標とする。

- (1) がん細胞表面上に提示されるがん特異的なスプライスペプチドを同定。
- (2) スプライスペプチド特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) が誘導され、がん細胞を特異的に障害することを証明。
- (3) 抗原特異的免疫療法の標的抗原としての有用性を検証。
- (4) スプライスペプチドが産生されるメカニズムの解析。

### 3. 研究の方法

#### (1) スプライスペプチド探索用レファレンスデータベースの作成

がん細胞が細胞表面に提示するペプチドを網羅的に同定するには、抗原提示分子を免疫沈降し、提示されるペプチドを抽出・回収し、質量分析によってその配列を検出する HLA Ligandome 解析が有用である。しかしながら質量分析において、その配列が正しいかどうかを判定するために、予想されるアミノ酸配列を網羅したレファレンスデータベースの作成が必須である。従来のデータベースにはスプライスペプチドのアミノ酸配列は含まれないため、新たなスプライスペプチドデータベースを作成する必要がある。本研究のために申請者は、独自に遺伝子変異由来スプライスペプチド検出用レファレンスデータベースを作成する。

具体的には、がん細胞株あるいはがん患者から得られた手術材料を用いて正常組織とがん組織の全エクソームシーケンシングを行い、がんゲノムの遺伝子変異を解析。ミスセンス変異およびフレームシフト変異由来スプライスペプチド検出用データベースを作成する。

#### (2) HLA Ligandome 解析によるスプライスペプチドの同定

がん細胞株あるいは患者がん組織から、イムノアフィニティーカラム法によって HLA class I 結合ペプチドを抽出し、LC-MS-MS 法による質量分析を行って、HLA 結合ナチュラルペプチドの網羅的探索を行う。(1)で作成する遺伝子変異由来スプライスペプチド検出用データベースを用いて HLA 結合ペプチドのスクリーニングを実施。

#### (3) スプライスペプチドの免疫原性評価

以上によって同定されたスプライスペプチドを用いて、CTL の誘導試験 (MLPC) と CTL クローンの樹立を行ない、免疫原性の評価を実施する。ELISPOT アッセイやテトラマーアッセイなどの T 細胞抗原特異性試験によって、ペプチド特異的 CTL 誘導効果を検証する。その後、標的がん細胞を認識・傷害することを細胞障害アッセイにて確認し、がんワクチンの治療標的と

して適しているかどうかを検証する。

(4) スプライスペプチドが産生されるメカニズムの解析

プロテアソーム依存性にスプライスペプチドが産生されるかどうかを検証するために、minigene construct 発現実験とプロテアソーム阻害実験を実施する。スプライスペプチドの産生と HLA 提示については、(3)において樹立されるペプチド特異的 CTL クローンをプローブとして用いて検出する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子変異由来スプライスペプチドの同定

遺伝子変異由来スプライスペプチド・レファレンスデータベースを作成し、DNA ミスマッチ修復機構欠損のある大腸がん細胞株 HCT15 細胞を用いて HLA Ligandome 解析を実施。スクリーニングの結果、2種類の遺伝子変異型スプライスペプチドの同定に成功した(図1、図2)。CTL 誘導試験によって、それらの免疫原性を評価したが、スプライスペプチド特異的な CTL 誘導は確認されなかったため、がん抗原としての意義は不明のままであった。

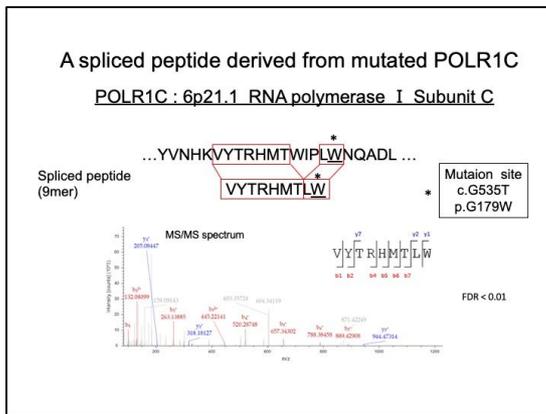


図1 変異型 POLR1C 由来 splice peptide

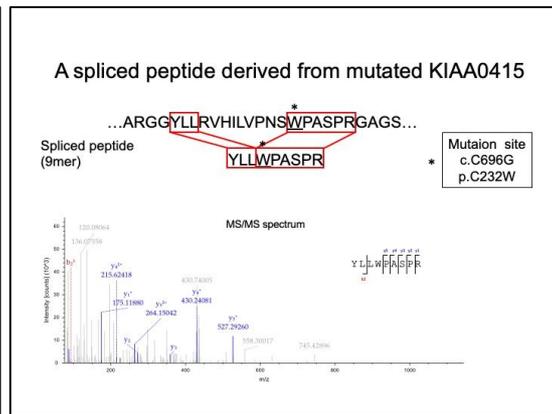


図2 変異型 KIAA0415 由来 splice peptide

(2) 野生型タンパク由来スプライスペプチドの同定

次に、HLA Ligandome 解析法を改良し、レファレンスデータベースを用いることなく HLA Ligand を同定できる de novo シークエンス法を確立したことによって、野生型タンパク由来スプライスペプチドのスクリーニングが可能となった(図3)。

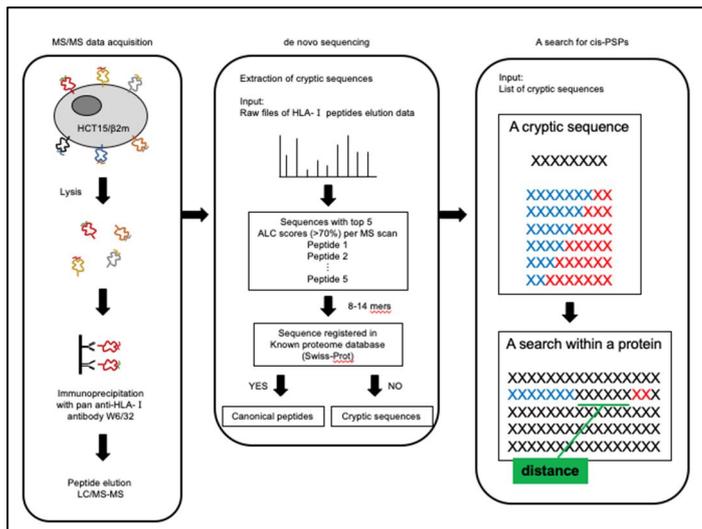


図3 野生型タンパク由来 splice peptide の探索法

HCT15 細胞株を用いた HLA Ligandome 解析の結果、3種類の野生型タンパク由来スプライスペプチドの同定に成功した。うち2種類のペプチドは、同一の親タンパク由来のスプライスペプチドであった(図4)。

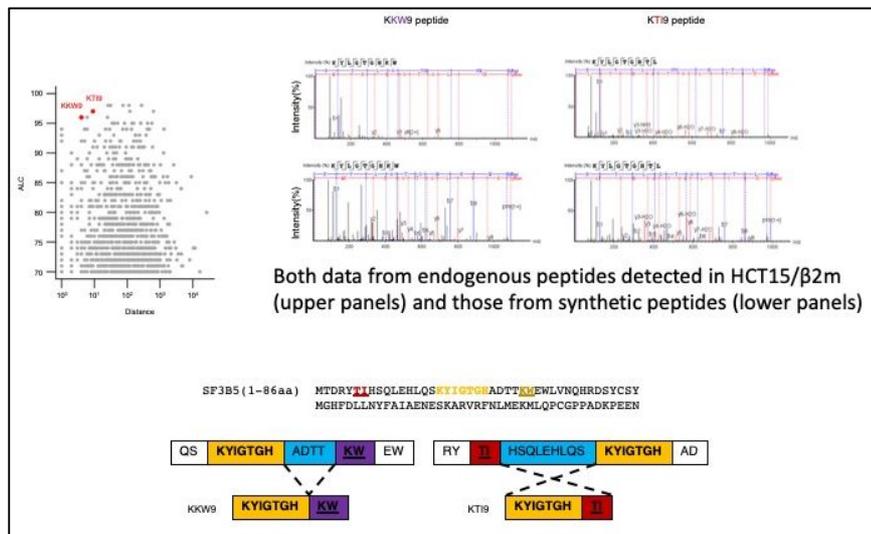


図4 野生型 SF3B5 由来 splice peptides (2種類)

### (3) スプライスペプチドの免疫原性評価

HLA-A\*2402 陽性の健常人末梢血 T 細胞を合成ペプチドとともに共培養する MLPC 法を用いて、スプライスペプチド特異的 CTL の誘導を証明し、さらに2種類の CTL クローンを樹立して(図5) スプライスペプチドの抗原提示を検出するプローブとした。2種類の野生型 SF3B5 由来スプライスペプチドは、高い免疫原性を有していることが証明された。

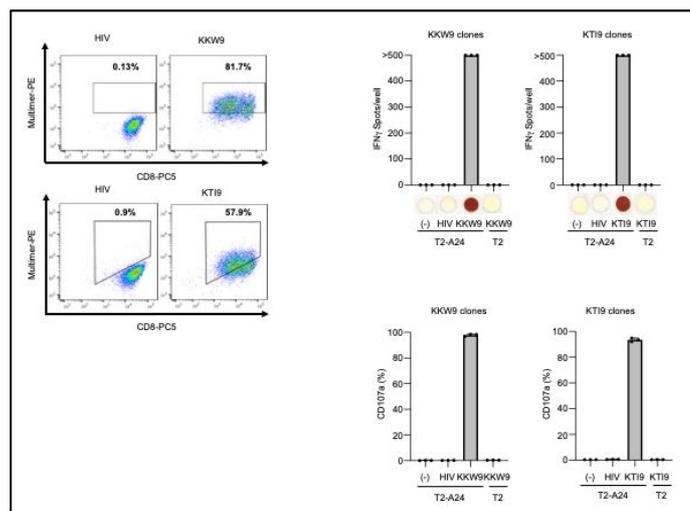


図5 野生型 SF3B5 由来 splice peptide に特異的な HLA-A24 拘束性 CTL クロンの樹立

### (4) スプライスペプチド産生のメカニズム解析

プロテアソーム依存性にスプライスペプチドが産生されるかどうかを検証するために、まず6種類の minigene construct を作成し、293T-A24 細胞に遺伝子導入して、スプライスペプチドの抗原提示を検証した。スプライスされたペプチドを強制的に小胞体内に送達した場合にはスプライスペプチドの強い抗原提示が確認されたが、野生型非スプライスペプチドを強制的に小胞体内に送達した場合には抗原提示は認められなかった(図6)。したがって、スプライスペプチドの産生には細胞質プロテアソーム・TAP 経路の関与が示唆された。

次にプロテアソーム阻害剤の有無でスプライスペプチドの産生を解析したところ、阻害剤に

よって抗原提示が阻害された。以上の結果から、スプライスペプチドはプロテアソーム依存性に産生されているとの結論を得た（図7）

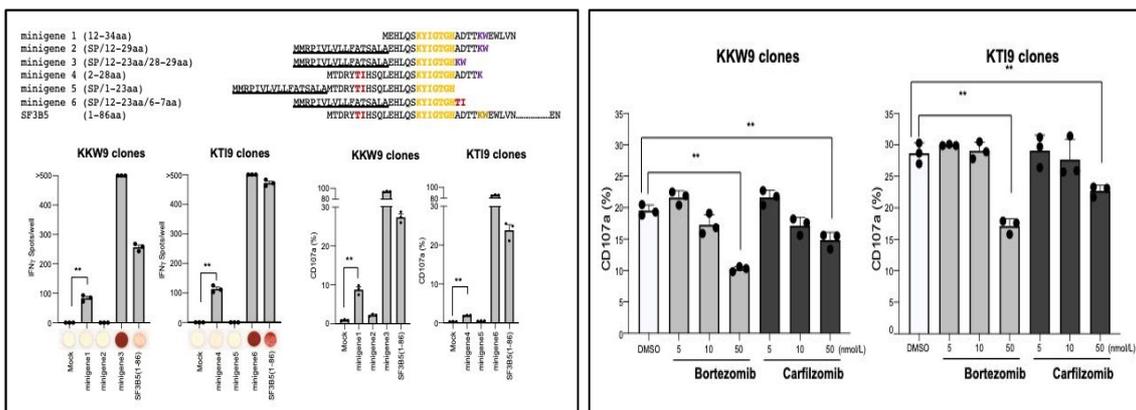


図6 Minigene 発現実験

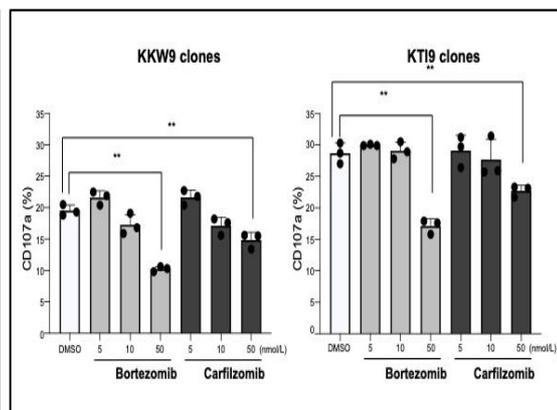


図7 プロテアソーム阻害実験

### (5) 考察と今後の展開：抗原特異的ながん免疫療法に向けて

本研究成果として、我々は野生型タンパク由来のスプライスペプチドを同定することに成功し、ペプチドががん細胞の HLA-A24 分子に提示され、健常人の CTL に対して強い免疫原性を発揮することを証明した。親タンパク SF3B5 は Pre-mRNA splicing factor で、がん細胞だけでなく、正常組織にも発現しているハウスキーピング分子である。それにも関わらず、スプライスペプチドの高い免疫原性が確認されたことは、この分子のスプライスががん細胞特異的に生じている可能性を示唆する結果であり、遺伝子変異に依存しない新しいネオアンチゲンの産生メカニズムとして極めて興味深い。実際に、正常組織の HLA Ligandome 解析からは、今回の 2 種類のスプライスペプチドは検出されていない。新規ネオアンチゲンとして確立するためには、がん細胞特異的なペプチドスプライス機序を解明する必要がある。また、pHLA テトラマーを用いて健常人およびがん患者末梢血中 T 細胞におけるペプチド特異的 CTL precursor 頻度を詳細に解析する必要もある。

本研究の限界は、1 種類の大腸がん細胞株 HCT15 の解析に留まっている点である。したがって、他の細胞株や新鮮手術材料を用いた検証を実施することは最重要課題である。必須である。

次世代のがん免疫療法を展望する上で、本研究成果の意義は大きい。従来知られている遺伝子変異に伴うネオアンチゲンは患者一人一人異なる究極の private antigen であったために、多数の患者で有効なネオアンチゲンワクチンを創成することは不可能であった。しかし、野生型タンパク由来のスプライスペプチドが新たなネオアンチゲンとなるならば、患者に共通して適応されるネオアンチゲンワクチン創薬が可能となる。また、がん治療ワクチンだけでなく、がん予防ワクチンの実用化に道が拓かれる可能性がある。

本研究成果の知財については、がん免疫療法への応用を目指した特許出願を準備中である。また、研究成果は国際医学雑誌に投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8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 Kubo T, Hirohashi Y, Keira Y, Akimoto M, Ikeda T, Kikuchi N, Iwaki H, Kikuchi T, Obata M, Morita R, Kasai K, Segawa K, Tsukahara T, Kanaseki T, Murata K, Kikuchi Y, Shinkawa T, Hasegawa T, Torigoe T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Identification of characteristic subepithelial surface granulomatosis in immune related adverse event associated enterocolitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1320-1325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14773	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 Kubo T, Hirohashi Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Murata K, Hasegawa T, Torigoe T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Epithelioid granulomatous lesions express abundant programmed death ligand-1 (PD-L1): a discussion of adverse events in anti-PD-1 antibody-based cancer immunotherapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Vaccin Immunother.	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21645515.2020.1870364.	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 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
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 Mlecnik B, Scripcariu DV, Popivanova B, Xu M, Hazama S, Suzuki N, Nagano H, Okuno K, Torigoe T, et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Multicenter International Society for Immunotherapy of Cancer Study of the Consensus Immunoscore for the Prediction of Survival and Response to Chemotherapy in Stage III Colon Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 3638-3651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/JCO.19.03205.	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 Tsukahara T, Watanabe K, Murata K, Takahashi A, Mizushima E, Shibayama Y, Kameshima H, Hatae R, Ohno Y, Kawahara R, Murai A, Nakatsugawa M, Kubo T, Kanaseki T, Hirohashi Y, Terui T, Asanuma H, Hasegawa T, Sato N, Torigoe T.	4. 巻 69
2. 論文標題 Peptide vaccinations elicited strong immune responses that were reboosted by anti-PD1 therapy in a patient with myxofibrosarcoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 189-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-019-02455-0	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 Hongo, A. Kanaseki, T. Tokita, S. Kochin, V. Miyamoto, S. Hashino, Y. Codd, A. Kawai, N. Nakatsugawa, M. Hirohashi, Y. Sato, N. Torigoe, T.	4. 巻 202
2. 論文標題 Upstream Position of Proline Defines Peptide-HLA Class I Repertoire Formation and CD8(+) T Cell Responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of immunology	6. 最初と最後の頁 2849-2855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900029	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, T. Tokita, S. Torigoe, T.	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, T. Torigoe, T.	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 宮田遥、廣橋良彦、鳥越俊彦	4. 巻 12
2. 論文標題 免疫チェックポイント阻害剤とリンパ節	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊泌尿器科	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 渡部裕人、塚原智英、鳥越俊彦	4. 巻 26
2. 論文標題 がん免疫療法の現状と今後の潮流	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 4-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 中津川宗秀、金関貴幸、鳥越俊彦	4. 巻 34
2. 論文標題 遺伝子変異由来がん抗原：ネオアンチゲンとは？	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 111-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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14件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 がん免疫療法における病理組織学的バイオマーカーの重要性
3. 学会等名 第66回日本病理学会秋期特別総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 がん幹細胞と免疫治療
3. 学会等名 第27回四国四大学皮膚科講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 腫瘍微小環境の免疫病理学的解析
3. 学会等名 Angiogenesis & Immunology Research in Osaka（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤投与に伴うirAEの特徴及び対応について
3. 学会等名 第61回日本神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 がん組織微小環境の免疫組織学的類型化
3. 学会等名 The 10th Meeting of Basic and Translational Research in Oncology and Respiratology（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 がん幹細胞を標的とする複合免疫療法の開発
3. 学会等名 第11回千葉癌免疫治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 基礎から考える複合がん免疫療法－免疫病理学の観点から－
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会Best of ASCO 2020 in Japan（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤－免疫病理学の観点から－
3. 学会等名 泌尿器病理研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 プロテオゲノミクスによるがん抗原の解明と免疫療法の開発
3. 学会等名 日本医学会総会2019中部（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥越俊彦
2. 発表標題 Proteogenomics によるネオアンチゲンの探索
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナー：がんシリーズ第7回がん微小環境（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanaseki T, Hongo A, Tokita S, Torigoe T.
2. 発表標題 HLA ligandome analysis reveals an antigen processing signature required for HLA class I presentation and CD8+ T cell responses.
3. 学会等名 CRI-EATI-CIMT-AACR 5th International Cancer Immunotherapy Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato K, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tokita S, Torigoe T.
2. 発表標題 Identification of a new type of neoantigen derived from splice peptides.
3. 学会等名 CRI-EATI-CIMT-AACR 5th International Cancer Immunotherapy Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Torigoe T, Kanaseki T, Hirohashi Y, Tsukahara T, Nakatsugawa M, Kubo T, Shinkawa T
2. 発表標題 Proteogenomic approach for natural HLA class I ligand peptides of cancer cells.
3. 学会等名 EMBL Conference: Cancer Genomics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiko Torigoe
2. 発表標題 Landscape of natural HLA class I ligand peptides of cancer cells
3. 学会等名 The 45th Naito Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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