

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19485

研究課題名(和文) 翻訳後修飾により生じるネオセルフ抗原はがん免疫療法の治療標的となりうるか？

研究課題名(英文) Investigation of neo-self antigens derived from proteins with post-translational modification

研究代表者

清谷 一馬 (Kiyotani, Kazuma)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター 免疫ゲノム医療開発プロジェクト・主任研究員

研究者番号：30433642

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)：本研究では、翻訳後修飾を受けたタンパク質由来の抗原がT細胞の標的となりうるかを検証することを目的として、メチル化修飾を受けるがん遺伝子由来タンパク質のメチル化部分に着目し、予想されるペプチドを情報解析により解析した。HLAに対する親和性を推定し、2種類のペプチドを同定した。これらペプチドについて、健康人末梢血を用いた抗原特異的T細胞の誘導実験、ELISPOTアッセイによるスクリーニングを行い、1種類のメチル化ペプチドが特異的CD8+ T細胞を誘導することを明らかにした。このメチル化ペプチド特異的CD8+ T細胞のTCRレパトア解析を行い、TCRalpha/betaの配列を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、翻訳後修飾(特にメチル化)を受けたタンパク質由来の抗原がT細胞の標的となりうるかを検証した。これまでに翻訳後修飾を受けたペプチドがHLA上に提示されていることは報告されていた。本研究では、実際に初めて翻訳後修飾を受けたペプチドを特異的に認識するT細胞の同定に成功した。本研究の成果は、学術的にも、また新たながん免疫療法の標的としても大変重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether neo-self peptides derived from mutilated proteins encoded by oncogenes. We generated all possible peptides with methylated amino acid using bioinformatic approach and predicted their binding affinities to HLA class I molecules. Through the analysis, we obtained two possible candidates of methylated proteins which can be presented on HLA molecules. From HLA-matched healthy donor's blood sample, we successfully induced methylated peptide-specific T cells for one of them. We also identified the TCRalpha/beta sequences of the T cells, and generated TCR-engineered T cells.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：翻訳後修飾 ネオセルフ抗原 T細胞受容体 ネオアンチゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (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は劇的な治療効果を示すが、依然として半数以上の患者では臨床効果が得られないのが現状である。したがって、がん免疫療法の効果のバイオマーカー、さらに、新規がん特異的標的が求められる。我々は、体細胞変異由来の抗原である neoantigen (ネオ抗原) を標的とした免疫治療開発のため、エクソームおよび RNA シーケンスのゲノムデータからパイオインフォマティクスにより neoantigen を予測するパイプライン、抗原特異的 T 細胞の迅速誘導法などを開発してきた。しかしながら、neoantigen を予測するパイプラインの予測率は 5~20% である。実際に、がんを高頻度に浸潤している T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) 解析を行い、その腫瘍反応性を検討した報告では、その抗原は不明であるが半分以上の T 細胞ががんを認識することが報告されている。また、プロテオーム解析手法を用いて、ヒト白血球抗原 (HLA) 上に提示されているペプチドを網羅的に解析した結果、リン酸化などの翻訳後修飾を受けたタンパク質由来のペプチドが検出されたことも報告されている。しかしながら、実際にこれらの HLA 上に提示された翻訳後修飾抗原が T 細胞に特異的に認識されるか否かは報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、がんの発生・進展に関与しているがん特異的なタンパク質の翻訳後修飾 (リン酸化、メチル化、糖鎖修飾など) を受けたタンパク質由来の抗原が T 細胞の標的となりうるか、さらには、がん特異的な治療標的となりうるかを検証することを目的とした。特に、これまでがんで重要な機能をしていることが分かっているがん遺伝子のメチル化に注目し検討を行った。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、以下の実験を行った。

### (1) がん特異的メチル化タンパク質由来ペプチドの探索

当研究室で同定してきたものを中心に、これまでに報告されているがん特異的にメチル化されたタンパク質のメチル化部位周辺のアミノ酸情報を取り出し、netMHC を用いて HLA との親和性を計算した。HLA は日本人で頻度の高い HLA-A24:02、HLA-A02:01 および HLA-A02:06 に絞り検討した。メチル化ペプチドに対応した予測ツールはないため、メチル化を擬似しているアミノ酸に置換したペプチドを用いて親和性予測を行った。

### (2) メチル化ペプチド反応性 T 細胞の誘導

HLA 上に提示されることが予測されたメチル化ペプチドおよびその野生型ペプチドを合成した。HLA-A02:06/A24:02 の健常人より末梢血を採取し、末梢血単核細胞 (PBMC) を分離した。Dynabeads CD8 Positive Isolation Kit を用いて、PBMC より CD8+ および CD8- 細胞を分離し、CD8- 細胞中の単球 (monocyte) より、樹状細胞への分化を誘導し、その樹状細胞 (dendritic cells) にメチル化または野生型ペプチドをパルスした。ペプチドパルスした樹状細胞と CD8+ T 細胞を共培養し、ELISPOT アッセイにより INF- $\gamma$  の産生量を測定した。

### (3) メチル化ペプチド特異的 T 細胞の TCR の同定

(2) でペプチドパルスした樹状細胞と CD8+ T 細胞を共培養した後の細胞を回収し、total RNA を抽出した。その total RNA より、SMART 法を用いて TCR シーケンスライブラリを作製した。同様に、ペプチドパルスしていない樹状細胞と CD8+ T 細胞を共培養したものを陰性コントロールとして用いた。作製した TCR シーケンスライブラリを Illumina MiSeq を用いてシーケンスし

た。TCR レパトア解析には Tcrip ソフトウェアを用い、メチル化ペプチド特異的な T 細胞の TCR $\alpha\beta$  ペアを決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) がん特異的メチル化タンパク質由来ペプチドの探索

当研究室で同定してきたものを中心に、これまでに報告されているがん特異的にメチル化されたタンパク質のメチル化部位周辺のアミノ酸情報を取り出し、netMHC を用いて HLA との親和性を計算したところ、Me ペプチド#1 および Me ペプチド#2 のメチル化ペプチドを候補として同定した。

##### (2) メチル化ペプチド反応性 T 細胞の誘導

Me ペプチド#1 および Me ペプチド#2 とそれらに対応する野生型ペプチド Wt ペプチド#1 および Wt ペプチド#2 を合成した。HLA-A02:06/A24:02 の健康人より得た PBMC を用いて、各ペプチド反応性 T 細胞の誘導を行った後の ELISPOT アッセイの結果、Me ペプチド#1 では、 $763 \pm 137$  spots/ $2 \times 10^4$  T cells であり、Wt ペプチド#1 の  $213 \pm 81$  spots/ $2 \times 10^4$  T cells と比較して有意に高かった (Fig. 1; *t*-test  $P = 0.0073$ )。以上の結果より、Me ペプチド#1 は特異的 T 細胞が存在することが明らかになった。

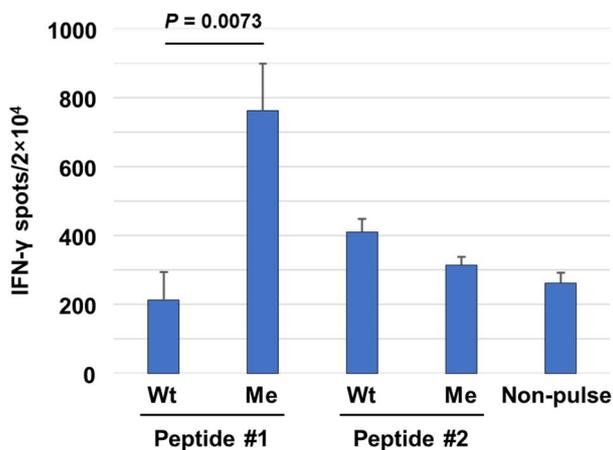


Fig. 1. IFN- $\gamma$  ELISPOT assay on wild-type (Wt) or methylated (Me) peptide-reactive CD8 T cells isolated from an HLA-match healthy donor's blood.

##### (3) メチル化ペプチド特異的 T 細胞の TCR の同定

Me ペプチド#1 または Wt ペプチド#1 でパルスした樹状細胞、または、ペプチドパルスしていない樹状細胞と CD8 $^+$  T 細胞を共培養した後の細胞を回収し、TCR レパトア解析を行い、Me ペプチド#1 特異的に増加している TCR 配列を探索した (Fig. 2)。

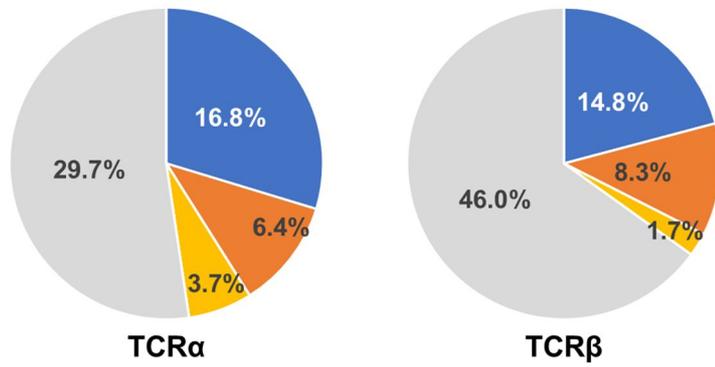


Fig. 2. Pie charts illustrating the frequency of unique TCRα and TCRβ sequences of CD8 T cells specifically induced by the peptide #1.

TCRα および TCRβ とも 3 つの dominant な TCR 配列を同定した。さらに、レトロウイルス発現系を用いて、メチル化ペプチド特異的 T 細胞の TCRα/β を健常人由来 T 細胞に導入した TCR 導入 T 細胞を作製した。

以上の結果より、がん細胞での翻訳後修飾を T 細胞が特異的に認識できること、さらに新たながんの治療標的として有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 12件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Paula Bottinger, Karin Schreiber, Kazuma Kiyotani, Matthias Leisegang, Hans Schreiber, et al.	4. 巻 .
2. 論文標題 Cooperation of genes in HPV16 E6/E7-dependent cervicovaginal carcinogenesis trackable by endoscopy and independent of exogenous estrogens or carcinogens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/carcin/bgaa027	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 Karin Schreiber, Theodore G. Karrison, Steven P. Wolf, Kazuma Kiyotani, Madeline Steiner, Eric R. Littmann, Eric G. Pamer, Thomas Kammertoens, Hans Schreiber, Matthias Leisegang.	4. 巻 8
2. 論文標題 Impact of TCR Diversity on the Development of Transplanted or Chemically Induced Tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 192 ~ 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0567	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 Charles Van Slambrouck, Jooryung Huh, Cheolwon Suh, Joo Y. Song, Madhu P. Menon, Aliyah R. Sohani, Amy S. Duffield, Reva C. Goldberg, Paola Dama, Kazuma Kiyotani, James Godfrey, Carrie Fitzpatrick, Justin Kline, Sonali M. Smith, Elaine S. Jaffe, Sylvia Hartmann, Girish Venkataraman.	4. 巻 33
2. 論文標題 Diagnostic utility of STAT6YE361 expression in classical Hodgkin lymphoma and related entities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 834 ~ 845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41379-019-0428-0	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 該当する

1. 著者名 Matthew P. Goetz, Vera J. Suman, Yusuke Nakamura, Kazuma Kiyotani, V. Craig Jordan, James N. Ingle.	4. 巻 37
2. 論文標題 Tamoxifen Metabolism and Breast Cancer Recurrence: A Question Unanswered by CYPTAM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1982 ~ 1983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/JCO.19.00504	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 該当する

1. 著者名 7.Bo Gong, Kazuma Kiyotani, Seiji Sakata, Seiji Nagano, Shun Kumehara, Satoko Baba, Benjamin Besse, Noriko Yanagitani, Makoto Nishio, Kengo Takeuchi, Hiroshi Kawamoto, Naoya Fujita, Ryohei Katayama.	4. 巻 216
2. 論文標題 Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 982 ~ 1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1084/jem.20180870	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 該当する

1. 著者名 Tatsuo Matsuda, Eisaku Miyauchi, Yu-Wen Hsu, Satoshi Nagayama, Kazuma Kiyotani, Makda Zewde, Jae-Hyun Park, Taigo Kato, Makiko Harada, Shimpei Matsui, Masashi Ueno, Kazumasa Fukuda, Nobuaki Suzuki, Shoichi Hazama, Hiroaki Nagano, Hiroya Takeuchi, Wickii T. Vigneswaran, Yuko Kitagawa, Yusuke Nakamura	4. 巻 8
2. 論文標題 TCR sequencing analysis of cancer tissues and tumor draining lymph nodes in colorectal cancer patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 e1588085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2019	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 Lili Ren, Matthias Leisegang, Boya Deng, Tatsuo Matsuda, Kazuma Kiyotani, Taigo Kato, Makiko Harada, Jae-Hyun Park, Vassiliki Saloura, Tanguy Seiwert, Everett Vokes, Nishant Agrawal, Yusuke Nakamura.	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of neoantigen-specific T cells and their targets: implications for immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 e1568813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2019.1568813	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 該当する

1. 著者名 Eisaku Miyauchi, Tatsuo Matsuda, Kazuma Kiyotani, Siew-Kee Low, Yu-Wen Hsu, Yoko Tsukita, Masakazu Ichinose, Akira Sakurada, Yoshinori Okada, Ryoko Saito, Yusuke Nakamura.	4. 巻 110
2. 論文標題 Significant differences in T cell receptor repertoires in lung adenocarcinomas with and without epidermal growth factor receptor mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 867 ~ 874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13919	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 該当する

1. 著者名 Makda Zewde, Kazuma Kiyotani, Jae-Hyun Park, Hua Fang, Kai Lee Yap, Poh Yin Yew, Houda Alachkar, Taigo Kato, Tu H. Mai, Yuji Ikeda, Tatsuo Matsuda, Xiao Liu, Lili Ren, Boya Deng, Makiko Harada, Yusuke Nakamura.	4. 巻 63
2. 論文標題 The era of immunogenomics/immunopharmacogenomics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 865 ~ 875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0468-1	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 Tai-Ming Ko, Kazuma Kiyotani, Jeng-Sheng Chang, Jae-Hyun Park, Poh Yin Yew, Yuan-Tsong Chen, Jer-Yuarn Wu, Yusuke Nakamura.	4. 巻 27
2. 論文標題 Immunoglobulin profiling identifies unique signatures in patients with Kawasaki disease during intravenous immunoglobulin treatment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 2671 ~ 2677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddy176	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 Cesar August Santa-Maria, Taigo Kato, Jae-Hyun Park, Kazuma Kiyotani, Alfred Rademaker, Ami N. Shah, Leeaht Gross, Luis Z. Blanco, Sarika Jain, Lisa Flaum, Claudia Tellez, Regina Stein, Regina Uthe, William J. Gradishar, Massimo Cristofanilli, Yusuke Nakamura, Francis J. Giles.	4. 巻 9
2. 論文標題 A pilot study of durvalumab and tremelimumab and immunogenomic dynamics in metastatic breast cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 18985 ~ 18996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24867	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 Tatsuo Matsuda, Matthias Leisegang, Jae-Hyun Park, Lili Ren, Taigo Kato, Yuji Ikeda, Makiko Harada, Kazuma Kiyotani, Ernst Lengyel, Gini F Fleming, Yusuke Nakamura.	4. 巻 24
2. 論文標題 Induction of Neoantigen-Specific Cytotoxic T Cells and Construction of T-cell Receptor?Engineered T Cells for Ovarian Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5357 ~ 5367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-0142	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

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kiyotani K, Matsuda T, Miyauchi E, Hsu Y, Nagayama S, Zewde M, Park JH, Kato T, Harada M, Suzuki N, Nagano H, Hazama S, Nakamura Y.
2. 発表標題 Comparison of TCR repertoires between cancer tissues and lymph nodes in colorectal cancer patients.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyotani K
2. 発表標題 Identification of cancer-reactive/neoantigen-specific T cells in peripheral blood and tumor tissues of cancer patients.
3. 学会等名 6th Annual Meeting of Colegio Mexicano para la Investigacion del Cancer (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyotani K
2. 発表標題 Progress and future of cancer immunotherapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyotani K, Nakamura Y.
2. 発表標題 Screening of cancer-reactive/neoantigen-specific T cells in peripheral blood and tumor tissues of cancer patients.
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gong B, Kiyotani K, Sakata S, Nishio M, Takeuchi K, Kawamoto H, Fujita N, Katayama R.
2. 発表標題 Secreted PD-L1 variants caused by aberrant splicing mediate antiPD-L1 antibody resistance.
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyuchi E, Matsuda T, Kiyotani K, Low SK, Tsukita Y, Ichinose M, Sakurada A, Okada Y, Saito R, Nakamura Y.
2. 発表標題 TCR repertoires in lung adenocarcinomas with and without EGFR mutation.
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chan HT, Nagayama S, Chin YM, Hayashi R, Kiyotani K, Nakamura Y, Low SK.
2. 発表標題 Clinical significance of clonal hematopoiesis in the interpretation of blood liquid biopsy.
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清谷一馬
2. 発表標題 NGSデータからのネオアンチゲン予測アルゴリズム開発および特異的T細胞の誘導
3. 学会等名 第31回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyotani K, Matsuda T, Nagayama S, Miyauchi E, Hsu Y, Zewde M, Park JH, Kato T, Harada M, Suzuki N, Nagano H, Hazama S, Nakamura Y
2. 発表標題 TCR sequencing analysis of cancer tissues and lymph nodes in colorectal cancer patients
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ren L, Matsuda T, Deng B, Kiyotani K, Kato T, Park JH, Agrawal N, Nakamura Y
2. 発表標題 Establishment of T-cell receptor-engineered T cells: Implications for head and neck squamous carcinoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyauchi E, Matsuda T, Hsu Y, Tsukita Y, Ichinose M, Sakurada A, Okada Y, Saito R, Kiyotani K, Nakamura Y
2. 発表標題 T cell receptor repertoire analysis of lung adenocarcinoma harboring EGFR mutations
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 キョウ 博、清谷 一馬、坂田 征士、永野 誠治、佐原 俊、馬場 郷子、柳谷 典子、西尾 誠人、竹内 賢吾、河本 宏、藤田 直也、片山 量平。
2. 発表標題 分泌型PD-L1スプライシングバリエントを介した免疫チェックポイント治療薬耐性機構の発見
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山 量平、キョウ ハク、清谷 一馬、竹内 賢吾、西尾 誠人、藤田 直也。
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬抵抗腫瘍の多様性と治療抵抗性機構の解析
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 大悟、植村 元秀、洪 陽子、松下 慎、中野 剛佑、林 裕次郎、石津谷 祐、王 聡、山本 致之、河嶋 厚成、氏家 剛、永原 啓、藤田 和利、清谷 一馬、後藤 邦仁、今村 亮一、野々村祝夫。
2. 発表標題 次世代シーケンスを用いた免疫チェックポイント阻害剤によるirAE免疫応答機構の解明
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019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