

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22551

研究課題名(和文)「新規HLA結合モチーフ」の同定によるがんペプチドワクチン開発基盤の再構築

研究課題名(英文) Analysis of cancer antigens through novel HLA assay

研究代表者

宮寺 浩子 (Miyadera, Hiroko)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40361464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はHLA(ヒト白血球抗原)クラスII(HLA II)を対象として、HLA II-ペプチド結合測定と結合予測(ドッキング・シミュレーション)を行い、HLA IIが結合するペプチドの配列情報と結合能についてのデータを収集し、新規結合モチーフの同定を目指す研究課題である。既知の外来抗原を対象として手法の評価、既存手法との比較を行い(投稿中)、マウス腫瘍抗原の解析(共同研究により実施、投稿中)を行った。その結果、本研究の手法では、HLA IIのペプチド結合スペクトラムを、既存手法および結合予測アルゴリズムよりも高感度に定量化できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA(ヒト白血球抗原)は獲得免疫応答をつかさどるタンパク質である。HLAが、がん特異的な変異を含むペプチド断片を結合し、細胞表面に提示すると、がん細胞を標的とした免疫応答が起こりうる。そのような免疫応答を引き起こすペプチドを見出すことが出来れば、効果の高いペプチドワクチンの設計につながるが、現状では、がんペプチドワクチンは少数の著効例がある一方、全体の奏効率は低い。この現状を打開するため研究代表者はHLAクラスIIが提示するペプチド探索手法を開発し、測定系の評価、がん抗原への適用を行った。本研究は、がんペプチドワクチンをすべての患者に対して設計できる体制の構築に貢献する。

研究成果の概要(英文)：We developed a protocol to measure the ability of each HLA allele to present peptide on cell-surface. In the present study, we validated the protocol, analyzed the binding data for known T-cell epitopes, and compared the binding spectra obtained from in silico prediction. In addition, we improved the method to construct expression plasmids to enable large scale analysis at relatively low-cost. The preliminary data suggest that our method is superior than known assays in terms of its ability to predict potential epitopes. We then utilized this method to analyze the interaction of murine MHC and cancer neoepitopes. These data are under submission, or under preparation for submission.

研究分野：生化学、免疫学

キーワード：HLA MHC がん抗原 ワクチン

### 1. 研究開始当初の背景

MHC (Major Histocompatibility Complex: 主要組織適合性抗原) は、病原体に対して防御反応を行う仕組み (獲得免疫応答) をつかさどるタンパク質であり、免疫応答の開始を担う。生体が外来微生物に感染すると、外来微生物は免疫系の細胞にとりこまれ、細菌、ウイルス由来のタンパク質 (外来抗原) は、免疫系細胞の中で断片化される。MHC は、この断片化されたペプチド (9-25 残基長) を MHC 分子内の溝 (ペプチド結合溝) に結合し、細胞表面に移行する。細胞表面に移行した MHC-ペプチド複合体を、T 細胞が T 細胞受容体を介して認識すると、感染細胞に対する免疫応答が起こる (図 1)。ヒトの MHC は、HLA (Human Leukocyte Antigens、ヒト白血球抗原) と呼ばれ、HLA 遺伝子にコードされる。HLA 遺伝子は個人間で配列が異なり、特に、ペプチドの結合に関わるアミノ酸残基に多型が多い。HLA が提示できるペプチドの種類は個人間で異なるため、同じワクチンを投与しても、効果が高い人、低い人など免疫応答の個人間の違いが生じる。

MHC を介した免疫応答は、がん細胞に対しても起こりうるが、多くの場合、免疫応答が弱くなっているために癌細胞が増殖する。免疫応答を増強することで、がんの治療を行うのが、がん免疫療法であり、がん細胞に特異的に発現するタンパク質のペプチドをワクチンとして用いる。がんペプチドワクチン設計では、多くの場合、結合予測ツール (NetMHCIIpan などの配列予測アルゴリズム) でワクチン候補領域を絞り込みワクチン候補となる配列を設計する。結合予測アルゴリズムの精度は、HLA (ヒト白血球抗原) クラス I では比較的高いと考えられているが、HLA クラス II の場合は予測ツールの精度は低く、ワクチン開発の妨げとなっている (Editorial, Nature Biotechnology 2017.2)。近年、多くの研究者が新たな予測アルゴリズム開発を行っているが、有力な代替手段は確立されていない。予測精度が低い要因として、従来の結合測定法での測定値の誤差が比較的大きいこと、研究グループ間で測定系が標準化されていないことが推測される。このような背景から、従来法よりも精度の高い測定手法を開発することにより、がんペプチドワクチン設計をより効果的に行える可能性があると考えた。

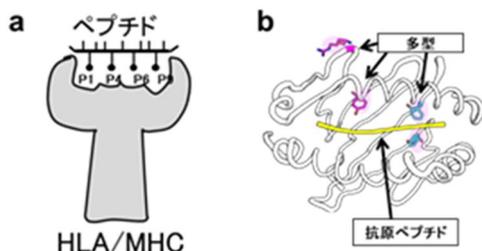


図1 HLA/MHCの模式図(a)、分子構造(b)  
HLA/MHCクラスIIIは通常、外来抗原ペプチドをT細胞に提示し、獲得免疫応答を開始する。MHCとペプチド間の相互作用には、特定の位置のアミノ酸残基(P1, P4, P6, P9)が関わる。

### 2. 研究の目的

代表者は、これまでに HLA クラス II-ペプチド結合を定量的に測定する系を開発した。既知の外來抗原などを対象とした結合解析の結果、本手法では「HLA に強く結合するが、従来の結合アッセイでは検出できない領域」を見出せる可能性が示唆された (未発表データ)。このことから、従来の手法では検出できない「未知の HLA 結合モチーフ」が存在し、これまでの結合データベースではこれらを網羅できていない可能性が推測される。そこで本研究では、結合測定およびドッキング・シミュレーションを併用し、新規 HLA 結合モチーフを見出すことを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

HLA の本来の特性として、HLA にペプチドが結合すると、そのタンパク質複合体が安定化し細胞表面発現量が上昇することが知られている (図 2)。本手法はこの点を利用して HLA-ペプチド相互作用を評価する。具体的には、まず HLA サブユニットを安定発現する培養細胞株を作成し、この細胞株に HLA サブユニットとペプチドとの融合タンパク質を発現させる。HLA サブユニットおよびペプチドの複合体は細胞表面に移行する。本測定系では、細胞表面の HLA 発現量をフローサイトメトリーで定量し、内部コントロール (GFP) に対する発現量比として定量化する (図 3) (宮寺、実験医学 2019; Miyadera et al. 投稿中)。

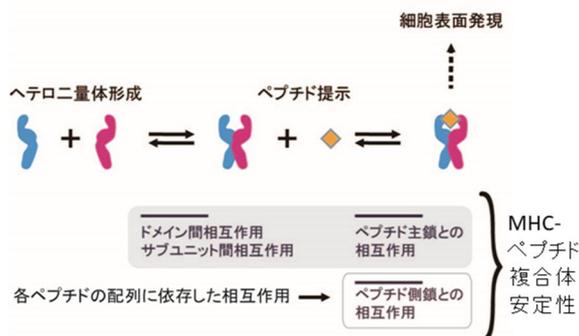


図2 MHCIIタンパク質安定化のプロセス

MHC IIIはα、βサブユニット間相互作用と、ペプチドとの相互作用で安定化される。

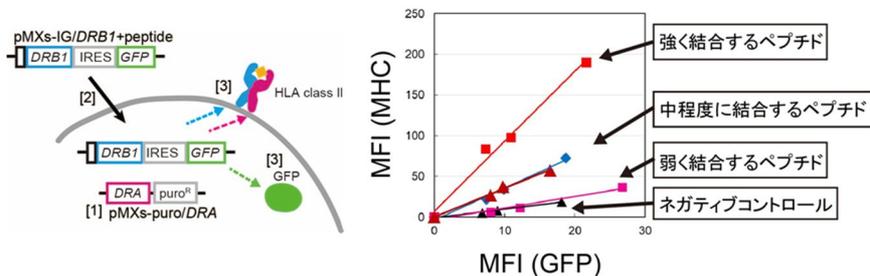


図3 本研究で用いた測定系の概要  
(宮寺浩子、実験医学2019)

#### 4. 研究成果

これまでに新規手法の評価および、既存手法との比較を行った。その結果、本研究の手法では、HLA II のペプチド結合スペクトラムを、既存手法よりも正確に定量化できることを確認した。さらにT細胞エピートプ判別における有用性も示唆された。現在、これらの成果について論文投稿中である。また、多数のペプチドとHLAアレルとの組み合わせについて、なるべく安価に測定を行うため、測定に用いる発現プラスミドの設計を改良し、作成プロトコルを確立した。これにより当初よりも1/5 ~ 1/3程度の費用で結合測定用のプラスミド構築を行うことが可能となった。また、既に測定済の外来・内在抗原を対象とした結合測定から、本手法では既存の測定法では困難な「弱く結合するペプチド」、「疎水性ペプチド」の結合を精度よく検出できることが示唆されている。また、既知のアンカー残基3か所を固定し、残り1か所を20通りのアミノ酸に置換したライブラリ配列の設計を行い、これらの測定用のプラスミド構築を完了した。

本手法を用いて、マウス腫瘍抗原の結合解析をマウスMHC (I-A, I-E)を対象として行った結果、がん特異的変異による結合性の変化を捉えることが出来た(投稿中)。また、本手法での解析結果が結合予測アルゴリズムの結果(結合順位)と概ね一致することを、マウスMHCにおいても確認した(マウス腫瘍抗原を対象とした解析は当初の研究計画には含まれなかったが、共同研究により実施した。)測定手法開発について論文投稿を行った結果、追加実験が必要となったため、当初予定していたヒト腫瘍抗原解析を開始する前に、多数の外来抗原(既知T細胞エピートプ)を対象とした測定を行う必要が生じた。そのため、ヒト腫瘍抗原解析については研究期間内に当初予定数を達成することが出来なかったが、測定系開発および応用への進捗は順調に展開しているため、ヒトがんペプチドワクチン開発に向けた基盤整備は整いつつある。今後の展望としては、本研究の長期的な目標である、「理論に基づいたペプチドワクチン設計」および、「有効ながんペプチドワクチンをすべての患者に対して設計できる体制」を実現することが可能になると期待される。

#### 引用文献

宮寺浩子「HLA クラス II の安定性測定によるペプチド結合能の評価」、*実験医学* 37, 2270-2274(2019).

*Editorial* 「The problem with neoantigen prediction」*Nat Biotechnol* 35, 97 (2017)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 宮寺 浩子	4. 巻 37
2. 論文標題 HLAクラスIIの安定性測定によるペプチド結合能の評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2270-2274
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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮寺 浩子、杉山 真也、西田 奈央、溝上 雅史
2. 発表標題 HLA-DPとHBs抗原結合解析：肝がんに関連するウイルス変異による抗原提示能への影響
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮寺 浩子、Jiang Nian、野口 恵美子
2. 発表標題 HLAクラスI発現系とペプチド結合アッセイ系の構築
3. 学会等名 第28回 日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮寺浩子、吉山崇徳、永井英明、徳永勝士、星野仁彦
2. 発表標題 HLAクラスII - ペプチド結合測定系の開発と評価
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Miyadera, H. Nagai, T. Yoshiyama, K. Tokunaga and Y. Hoshino
2. 発表標題 Measurement of MHC-peptide interaction through cell-surface expression and stability assay improves screening of potential CD4+ T-cell epitopes
3. 学会等名 米国免疫学会 (IMMUNOLOGY 2019) (国際学会)
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
研究分担者	平山 令明 (Hirayama Noriaki)  (70238393)	東海大学・先進生命科学研究所・教授  (32644)	

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		
米国	University of Connecticut		