

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21528

研究課題名（和文）pHLA立体構造モデリングによる新規ネオアンチゲン免疫原性予測アルゴリズム開発

研究課題名（英文）Prediction of immunogenic neoantigens based on pHLA structure

研究代表者

金関 貴幸（KANASEKI, Takayuki）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50531266

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）：T細胞はHLA提示された体細胞変異由来ネオアンチゲンを認識しがん細胞を識別する。しかし、どのような変異が免疫原性を生じるのかよくわかっていない。本研究ではプロテオゲノミクスHLAリガンドーム解析により大腸がん細胞からネオアンチゲンを検出し、ネオアンチゲン間で抗原性が異なることを確認した。さらにネオアンチゲンの変異アミノ酸を置換したバリエーションパネルを作成し、それぞれの抗原性を検証した。その結果、抗原性の高いネオアンチゲンほど、ペプチドHLA複合体（pHLA）の立体構造が野生型と異なることを見出した。この構造差を数値化し、ネオアンチゲンの免疫原性を予測する新しい指標を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の体細胞遺伝子変異量（TMB）は免疫チェックポイント阻害剤の効果バイオマーカーである。しかし、多くのがん種で奏効率は20%程度にとどまっている。今回、免疫応答を惹起する変異を予測する新しい方法を開発できた。pHLAの立体構造差に基づくアルゴリズムである。つまり、従来バイオマーカーである変異「量」に変異の「質」的評価を上乘せすることが出来る。本法は新しい免疫チェックポイントバイオマーカーとして役立つ可能性があり、免疫チェックポイント阻害剤患者コホートをを用いた検証を検討している。臨床応用による社会貢献を目指す。

研究成果の概要（英文）：CD8 T cells recognize neoantigens that arise from somatic mutations, discriminating cancer cells. However, the nature of neoantigens that confer immunogenicity on wild-type peptides remains unclear. Here, we conducted proteogenomic HLA ligandome analysis and identified a series of neoantigens naturally displayed by a human colon cancer line. We found that the antigenicity to induce healthy donor-derived CD8 T cells varies among the identified neoantigens. Further, we prepared a panel of neoantigen variants that differed in substituted amino acids, and assessed their antigenicity. As a result, we found that the antigenicity was positively associated with the difference between the neoantigen variants and wild-type peptides in their pHLA 3D structure. Delta ASA (accessible surface area of pHLAs between neoantigen and wild type) scores based on 3D structure may benefit immunogenicity prediction of neoantigens.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 腫瘍抗原 ネオアンチゲン HLA CD8 T細胞

1. 研究開始当初の背景

患者 T 細胞免疫系はがん細胞 HLA に提示された体細胞変異由来ネオアンチゲンを認識する。そのためがん細胞の遺伝子変異量は免疫チェックポイント阻害剤効果のバイオマーカーとして利用されている。しかし実際には、免疫原性ネオアンチゲンとなり患者体内で T 細胞反応を惹起する変異はごくわずかである。CD8 と CD4+T 細胞反応を惹起しうる変異はそれぞれ変異全体の 1%弱と報告されている(Tran E 2015 Science, Parkhurst MR 2019 Cancer Discovery)。NetMHC に代表される HLA 結合性の *in silico* アルゴリズムを用いて変異アミノ酸を含むネオアンチゲン候補配列を予測することは可能である。しかし、HLA 結合性と T 細胞誘導を惹起する免疫原性は必ずしもイコールではない。どのような変異が免疫原性ネオアンチゲンとなるのかよくわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞から検出されたナチュラルな免疫原性ネオアンチゲンをモデルに、免疫原性を付与する変異の特徴を探る。原則的に、免疫寛容のため、患者免疫系は野生型には反応しないはずである。変異によるアミノ酸置換が生じたことで免疫原性がうまれている。そこで本研究では変異アミノ酸による野生型との立体構造差に着目し、抗原性との相関性を探る。配列毎に、反応を惹起しやすい、あるいはしにくい変異があるはずである。結果を可及的に数値化し、免疫原性を予測するアルゴリズムを確立する。

3. 研究の方法

全エクソーム解析とマスマスペクトロメトリー解析を組み合わせたプロテオゲノミクス HLA リガンドーム解析 (図 1) を用いて dMMR 大腸がん細胞の HLA クラス I 提示ペプチドームを網羅的に解析したところ、8 種類のネオアンチゲンが検出された。

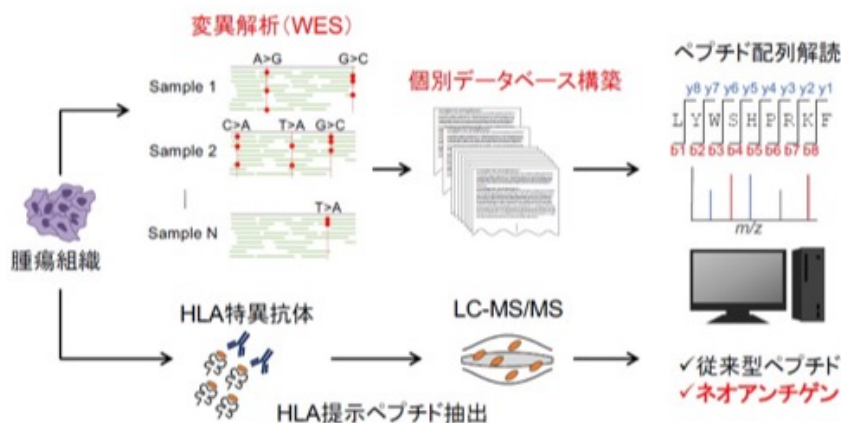


図1 プロテオゲノミクス HLA リガンドーム解析ワークフロー。本研究では $\beta 2$ マイクログロブリン遺伝子導入したヒト dMMR 大腸がん細胞株 HCT15 を解析した。

検出したネオアンチゲンをモデルに、置換アミノ酸と抗原性の相関性を検証した。具体的には、実際に生じたアミノ酸置換に加えそれ以外の仮想アミノ酸置換それぞれについて抗原性を検証した。

さらに置換アミノ酸ごとにペプチド-HLA 複合体 (pHLA) の立体構造をモデリングし、構造を数値化した。野生型 pHLA の構造とそれぞれのアミノ酸置換で生じる pHLA 構造を比較し、その差を数値化し評価した。

4. 研究成果

(1) 上記のとおりプロテオゲノミクス HLA リガンドーム法にて検出した 8 種類のネオアンチゲンはいずれも、HLA にナチュラル提示された「HLA と結合する」ネオアンチゲンといえる。しかし、複数の健常人 PBMC を用いて検証したところ、反応 T 細胞の誘導効率がネオアンチゲン間で異なっていた。即ち、HLA に提示されたネオアンチゲンでも抗原性を確認できたもの、あるいは確認できなかったものが存在していた (図 2)。

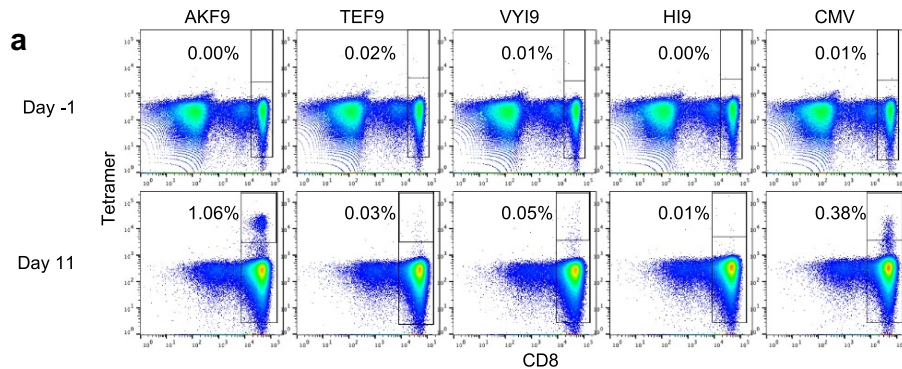


図 2 各種ネオアンチゲンの抗原性比較。健常人 PBMC を表記したネオアンチゲンで刺激し 11 日後にそれぞれのネオアンチゲンを認識する CD8+T 細胞の割合を評価した (Shinkawa T et al. 2021 Oncoimmunology)。

検証した 8 種類のうち、AKF9 が最も抗原性の強いネオアンチゲンであることがわかった。AKF9 配列は以下の通り。

野生型 (ANF9), AYLEAIHNF ; 変異型 (AKF9), AYLEAIHKF

(2) AKF9 で生じた 8 番目アミノ酸 (p8) の N>K アミノ酸置換は野生型に抗原性を付与することがわかった。そこで、N>K 以外のアミノ酸についてもペプチドパネルを準備して抗原性を検証した (図 3)。

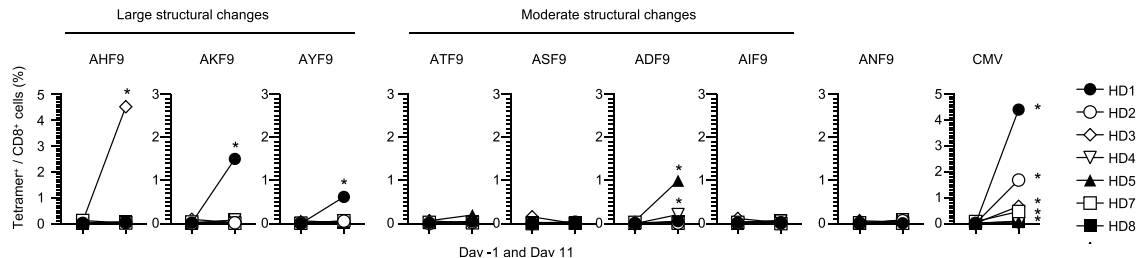


図 3 ネオアンチゲン AKF9 (p8, N>K) のバリエント AXF9 (p8, N>X) の抗原性 (Shinkawa T 2021 Oncoimmunology)

興味深いことに、AKF9 以外にも、特定の AKF9 バリエント (AHF9 と AYF9 および ADF9) がそれぞれ pHLA に特異的な健常人 CD8+T 細胞を誘導した。一方、他の AKF9 バリエントでは抗原性を全く確認できなかった。

抗原性を確認できた AKF9 バリエントの置換アミノ酸の構造をみると、K, H, Y はいずれも側鎖の構造が大きいグループ (large structural change) に属することがわかった。

(3) そこで *in silico* ですべての AKF9 バリエントを 3D 立体構造モデリングし、pHLA の TCR 側表面積 (Accessible Surface Area, ASA) を具体的に計算した。ASA 値と野生型と比較し、野生型との差を指標化した (Δ ASA) (図 4)。

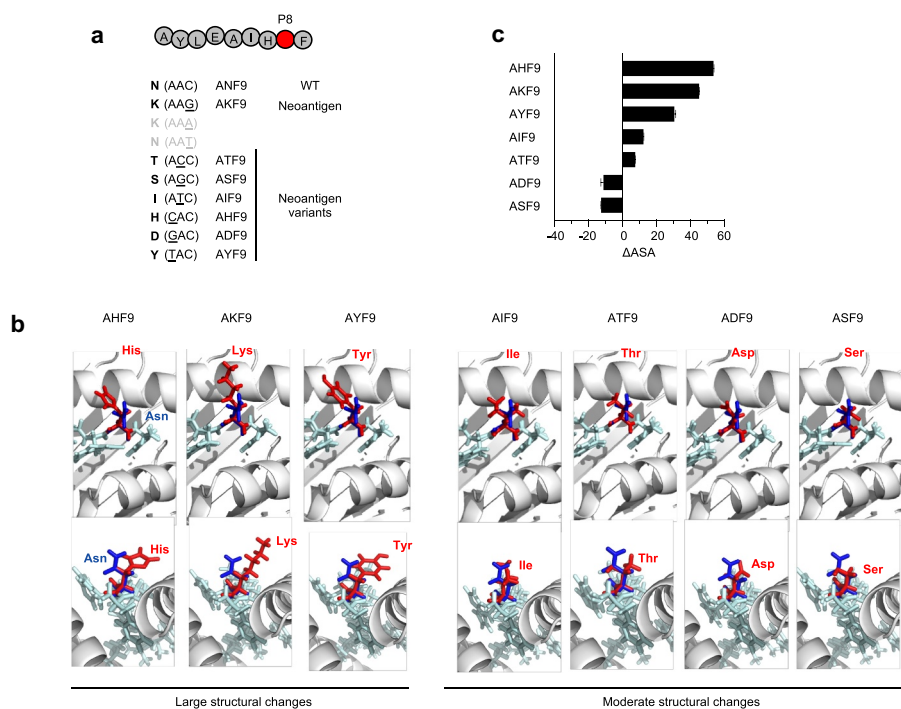


図 4 各種 AKF9 バリエントの pHLA 立体構造モデリングおよびそれぞれの Δ ASA (Shinkawa T 2021 Oncoimmunology)

その結果、 Δ ASA が抗原性とよく相関していることが明らかになった。即ち、野生型との立体構造が異なれば異なるほど、抗原性が増加していることになる。

この事実は患者体内でも同様と推測され、 Δ ASA は患者での免疫原性を生む変異の予測の精度向上に貢献できる可能性がある。pHLA 立体構造に基づいて免疫原性ネオアンチゲンを予測する新しいアルゴリズムを確立することができたと考えている。

一方、本研究では健常人 8 名の PBMC を用いて検証を行ったが、誘導性には個人間でばらつきがあった。即ち、今回 pHLA 立体構造の重要性を発見できたものの、抗原性は決して抗原側要素だけで決定されるわけではないことも同時に強調した。TCR レパートリーを始めとした宿主側の要素も重要な要素と考える。本研究の次のステージとして、今回確立したアルゴリズムが免疫チェックポイント阻害剤の効果予測バイオマーカーとなりうるかどうかを患者コホートを用いて検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kikuchi Yasuhiro, Tokita Serina, Hiram Tomomi, Kochin Vitaly, Nakatsugawa Munehide, Shinkawa Tomoyo, Hirohashi Yoshihiko, Tsukahara Tomohide, Hata Fumitake, Takemasa Ichiro, Sato Noriyuki, Kanaseki Takayuki, Torigoe Toshihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 CD8+ T?cell Immune Surveillance against a Tumor Antigen Encoded by the Oncogenic Long Noncoding RNA <i>PVT1</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1342 ~ 1353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-20-0964	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 Hiram Tomomi, Tokita Serina, Nakatsugawa Munehide, Murata Kenji, Nannya Yasuhito, Matsuo Kazuhiko, Inoko Hidetoshi, Hirohashi Yoshihiko, Hashimoto Shinichi, Ogawa Seishi, Takemasa Ichiro, Sato Noriyuki, Hata Fumitake, Kanaseki Takayuki, Torigoe Toshihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Proteogenomic identification of an immunogenic HLA class I neoantigen in mismatch repair?deficient colorectal cancer tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 146356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.146356	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 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 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 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 ~ 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金関貴幸
2. 発表標題 ネオアンチゲンと 免疫チェックポイント阻害剤
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金関貴幸
2. 発表標題 プロテオゲノミクスによるHLA提示ペプチド解析と非コード領域遺伝子に由来する新しいがん抗原クラスの同定
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金関貴幸
2. 発表標題 がん免疫療法とプレジジョン医療
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------