

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) 日本人の HLA に至適化したネオアンチゲンの迅速同定法の開発
(英語) Development of rapid identification method of neo-antigen optimized for Japanese HLA

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 助教 小澤龍彦
所属 役職 氏名： (英語) National University Corporation, University of Toyama, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research (Medicine) Assistant Professor Tatsuhiko Ozawa

実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 日本人の HLA に至適化したネオアンチゲンの迅速同定法の開発
開発課題名： (英語) Development of rapid identification method of neo-antigen optimized for Japanese HLA

研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 助教 小澤龍彦
所属 役職 氏名： (英語) National University Corporation, University of Toyama, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research (Medicine) Assistant Professor Tatsuhiko Ozawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

TCR の抗原をスクリーニングする方法として、酵母に抗原であるペプチドをランダムな配列にしてライブラリー化したペプチド MHC を発現させ、可溶化した TCR を用いて特異的なペプチド MHC を発現している酵母をパニングする系の開発を行っている。そのモデルとして我々が以前までに作製した EBV 由来抗原である BRLF1 ペプチド MHC を認識する TCR を可溶化 TCR として作製した。TCR の細胞外領域と抗体の Fc 領域を融合させ、Fc 領域の C 末端にビオチンを付加し、ストレプトアビジンを介して、4 量体の可溶化 TCR を作製した。酵母に作製した TCR が認識する BRLF1 ペプチド MHC を発現させた。この酵母に発現させた BRLF1 ペプチド MHC と可溶化 TCR が結合するかをフローサイトメーターにより検証した結果、特異的に結合することが示された。

次にランダムペプチドライブラリーの作製とそこからのスクリーニングの予備検討を行った。始めに、ペプチド部分を 1×10^4 の規模でランダム化したライブラリーを酵母に発現させ、BRLF1 ペプチド MHC を発現する酵母と混合した。BRLF1 ペプチド MHC を発現する酵母が 0.1% 程度なるように調整し、BRLF1 可溶化 TCR を用いてパニングを 3 回行った。各パニング後にフローサイトメーターにより BRLF1 ペプチド MHC を発現している酵母の割合を解析した。パニングを行うにつれて、BRLF1 ペプチド MHC を発現している酵母の割合が 1 回目は 7.3%、2 回目は 14.3%、3 回目は 29.6% と増加している事が確認できた。

各パニング後の酵母よりプラスミド DNA を抽出し、ペプチド部分の塩基配列を次世代シーケンシングにより解析を行った。パニングを行うにつれて、BRLF1 ペプチドの塩基配列を持つ酵母の割合が 1 回目は 3.5%、2 回目は 18.0%、3 回目は 74.9% と増加している事が確認できた。これらの結果より、0.1% の低頻度でも目的とするペプチドを発現している酵母を濃縮できる事が示された。

To screen the antigen of TCR, we are developing screening system using solubilized TCR and yeast that express randomizing peptide MHC library on yeast surface with solubilized TCR. As a model, we used EB virus derived antigen, BRLF1 peptide MHC and TCR that recognized them. We generated Fc-fusion TCR protein composed of the TCR V and C regions of the TCR linked to the immunoglobulin (Ig) Fc region. Next, we conjugate biotin on C-term of Fc-fusion TCR protein, then we generated tetramer form of Fc-fusion TCR protein via biotin/streptavidin. We also transduced and expressed BRLF1 peptide MHC recognized TCR on yeast. To clarify whether the tetramer form of Fc-fusion TCR protein bind to BRLF1 peptide MHC expressed on yeast, we performed flow cytometry analysis. Fc-fusion TCR protein specifically bound to BRLF1 peptide MHC expressed on yeast, but not to control sTCR-Fc and peptide MHC.

Next, we constructed a randomizing peptide MHC library and preliminary examined of the screening. A library in which the peptide portion was randomized on the scale of 1×10^4 was expressed in yeast, then yeast that expressed BRLF1 peptide MHC was mix to them. The yeast that expressed BRLF1 peptide MHC was adjusted to about 0.1% and was screened 3 times

using BRLF1 Fc-fusion TCR protein. The frequency of yeast that express BRLF1 peptide MHC after each screening steps were investigated by flow cytometry analysis using BRLF1 Fc-fusion TCR protein. The frequency after each screening steps were 7.3%, 14.3%, and 29.6% after 1, 2, and 3 times screening-steps, respectively.

Plasmid DNA was isolated from yeast after each screening steps, then DNA sequence of peptide region was investigated by next-generation sequencing. The frequency of DNA sequence that contain BRLF1 peptide at after each screening steps were 3.5%, 18.0%, and 74.9% after 1, 2, and 3 times screening-steps, respectively. These results demonstrate that yeast expressing the objective peptide can be obtained even at low frequency of 0.1% by our screening-steps.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

- 1) Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Tamai T, Hamana H, Ozawa T, Kishi H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Iida N, Fushimi K, Muraguchi A, Kaneko S. Association Between High-Avidity T-Cell Receptors, Induced by alpha-Fetoprotein-Derived Peptides, and Anti-Tumor Effects in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 2017 in press
- 2) Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S. Identification of an HLA class I allele closely involved in the auto-antigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood*, 2017 in press
- 3) Lo CY, Strobl SL, Dunham K, Wang W, Stewart L, Misplon JA, Jin Gao G, Ozawa T, Price GE, Navidad J, Gradus S, Bhattacharyya S, Viboud C, Eichelberger MC, Weiss CD, Gorski J, Epstein SL. Surveillance study of influenza occurrence and immunity in a Wisconsin cohort during the 2009 pandemic. *Open Forum Infect Dis* 2017 in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

- 1) Rapid generation of monoclonal antibodies using lymphocyte-microarray chip. 口頭発表（招待講演）. Ozawa T, Kishi H., and Muraguchi A. 第 68 回日本生物工学会大会国際シンポジウム；2016/9/28-30；国内.
- 2) 関節リウマチ患者由来モノクローナル抗 CCP 抗体の取得と抗原の解析. 口頭発表（招待講演）. 岸裕幸, 津田玲奈, 小澤龍彦, 村口篤. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会；2016/9/29-30；国内

- 3) ISAAC 法を用いた抗原特異的 T 細胞検出法の開発. ポスター発表 小澤龍彦, 岸 裕幸, 浜名 洋, 田尻和人, 呂福蓮, 村口篤. 第 39 回日本分子生物学会年会 ; 2016/11/30-12/2 ; 国内
- 4) TCR repertoire of CD4+CD25+CD137+Foxp3+ tumor infiltrating lymphocytes in mice. 口頭発表 Kishi H, Hamana H, Shitaoka K, Lyu F, Ozawa T, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 国内.
- 5) Single-T-cell manipulation method using microwell array chip (T-ISAAC) allows rapid and efficient cloning of antigen-specific TCRs. ポスター発表 Ozawa T, Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 国内.
- 6) A rapid and easy system for cDNAs cloning of antigen specific TCRs from single human and mouse T-cells within 4 days. ポスター発表 Hamana H, Kishi H, Shitaoka K, Ozawa T, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 国内.
- 7) T cell receptor obtained from tumor-infiltrating lymphocytes without using tumor-specific antigens exhibits cytotoxicity to tumors in vitro and in vivo. ポスター発表 Shitaoka K, Kishi H, Hamana H, Hayakawa Y, Ozawa T, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
期間内 (2016/9/1-2017/3/31) には取り組み無し

(4) 特許出願
公開対象なし