

レパトア解析を用いた新規抗原反応評価法による「真のネオアンチゲン」の同定
 神戸大学医学部附属病院 船越 洋平

【研究の背景と目的】

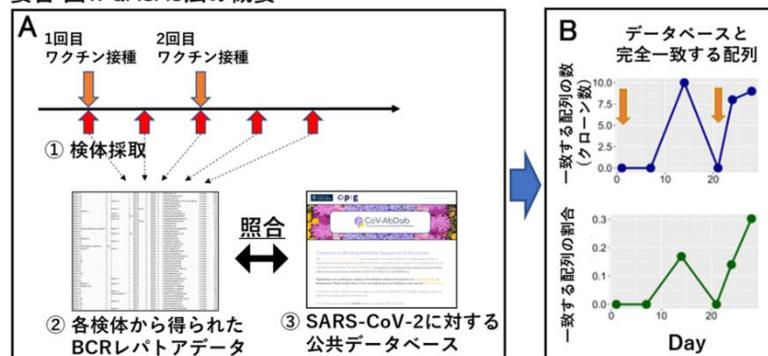
ネオアンチゲン(がん抗原)は患者固有のがん免疫療法のターゲットであり、それを正確に同定することが出来れば、個別化がんワクチン療法など、オーダーメイドの免疫療法が可能となる。現在、ネオアンチゲンは、正常および腫瘍組織から抽出した DNA/RNA シーケンスデータの *in silico* 解析により、候補ペプチド配列として予測される。近年、機械学習を含めたバイオインフォマティクスの発展に伴い、数多くのネオアンチゲン候補が予測されるようになったが、予測はあくまでも予測であり、これら候補の中で、どのアンチゲンが臨床的にがん免疫のターゲットとなる「真のネオアンチゲン」であるか、検証することは出来ていない。

本研究は、我々が独自に開発した、「特定の抗原に対する免疫反応を抗原受容体レパトア解析を用いて評価する方法“Quantification of Antigen-specific Antibody Sequence(QASAS 法)(図 1)”」を進展させ、ネオアンチゲンを同定するプラットフォームを構築するものである。QASAS 法は本来、“B 細胞受容体(BCR)レパトア解析を用いた SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種後の免疫反応の評価方法”として開発した。具体的な方法としては(図 1A)、①ワクチン接種から獲得免疫が活性化する時期(接種から1~2週間)にわたり、経時的に血液検体(単核球)を採取し、②それぞれ BCR レパトア解析を行う。この解析により、各検体から数十万リードの膨大な BCR 配列データを得ることが出来る。最近、“特定の抗原(SARS-CoV-2)に結合可能な抗原受容体(BCR)配列のデータベース(CoV-AbDab)(図 1A ③)”が公開されており、これには約1万種類の BCR

配列が登録されている。②で得られたデータの中に、データベース(③)内の配列と一致するものが、どの程度存在するか、“一致配列”のクローン数と割合の推移をグラフにする(図 1B)。我々は、ワクチン接

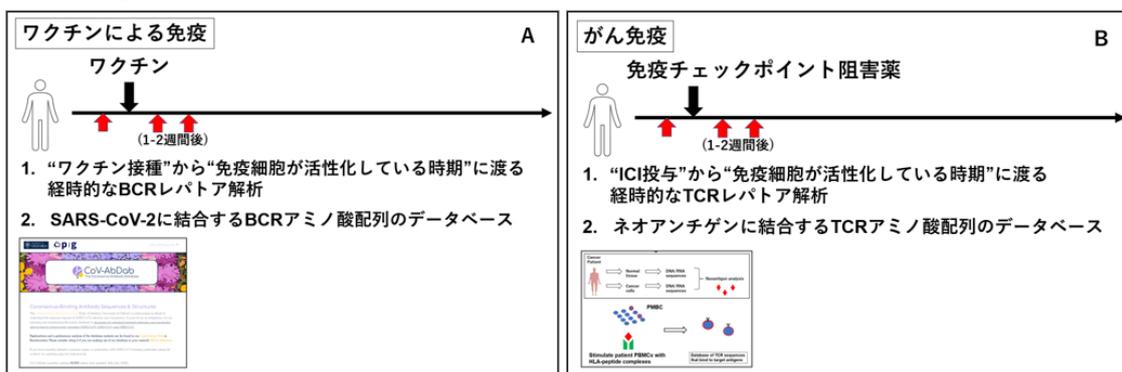
種前には一致する配列は認めないが、免疫が活性化するタイミングで一致配列のクローンが増加することを明らかにしており、これをもって接種後の免疫反応を、鋭敏に評価することが可能となった。

要旨 図1. QASAS法の概要



ここで、QASAS 法における免疫反応はワクチンに限定されるものではなく、がん免疫療法(免疫チェックポイント阻害薬:ICI)後の免疫反応(T 細胞)にも応用可能であると着想した(図 2)。ICI は、これまで寛容とされてきたがん抗原に対して、免疫細胞の再認識(抗原曝露)を促すものである。つまり、獲得免疫を賦活する介入として、“ワクチン”ではなく“ICI”を使用し、“BCR レパトア解析”ではなく“T 細胞受容体(TCR)レパトア解析”を行い、抗原に対するデータベースとして、“CoV-AbDab”ではなく“ネオアンチゲン解析より個別に作成した TCR データベース”を用いる(図 2)。解析としては、ICI 投与前には TCR データベースと一致する配列を認めないが、がん免疫応答のタイミングで出現する一致配列のクローンを明らかにする。QASAS 法は別の解釈として、“データベースにある数多くの配列から、ある時期に生体内で反応した配列を選定する”と言い換えることが出来る。TCR データベースには数多くの配列が登録されるが、配列の一致があり、さらに、免疫学的に妥当な挙動を示すものを抽出することで、個別患者内で反応する配列を選定することが出来る。これをもって、in silico 解析の予測にとどまらない、免疫学的に妥当な「真のネオアンチゲン」を同定する。また、本解析によって、従来のネオアンチゲン予測解析(アルゴリズム)の正確性も評価し、その改良に寄与することが出来る。

図2 研究計画の概要



【研究方法・研究内容】

上記の計画全体の中で 2024 年度は以下の項目について研究を実施した。

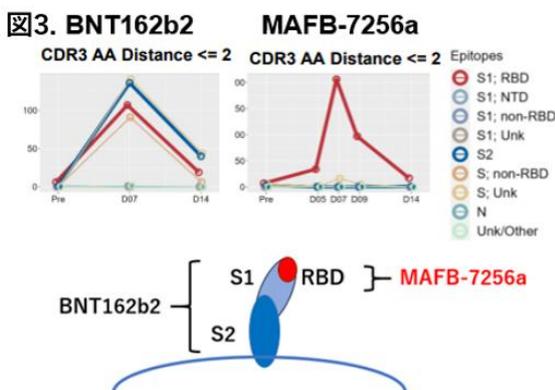
- 我々の開発した QASAS 法が、免疫反応の評価法として優れたものであることを改めて確認/検証するために、本邦で新たに開発された国産 mRNA SARS-CoV-2 ワクチン(第一三共ワクチン: MAFB-7256a)接種後の反応について、BCR レパトアを対象とした解析(BCR-QASAS 法)を施行した。
- これまでの研究成果は BCR レパトアを対象とした解析(BCR-QASAS 法)を中心に行ってきたが、TCR レパトア解析でも QASAS 法が使用可能かを検証した(TCR-QASAS 法)。この検証のために、まず、がん免疫ではなく、データが豊富な SARS-CoV-2 抗原に対する免疫反応を利用した。近年、「COVID-19 罹患後に認識される TCR 配列のデータベース(VDJ database)」が公開されている。SARS-CoV-2 mRNA ワクチン前後の TCR レパトアデータと、VDJ database を利用し TCR-QASAS 法について検証した。
- 近年、情報科学技術(AI 技術)を用いて、アミノ酸配列情報を解析することで、タンパク質の構造を予測し、さらにそれらタンパク質どうしの結合を予測する試み

が行われている。抗原受容体は、抗原結合部位として”遺伝子再構成により決定される CDR3 領域”を持つが、この特殊なアミノ酸配列においてもタンパク質言語モデルによる解析が有効であるかを検証した。

【研究成果】

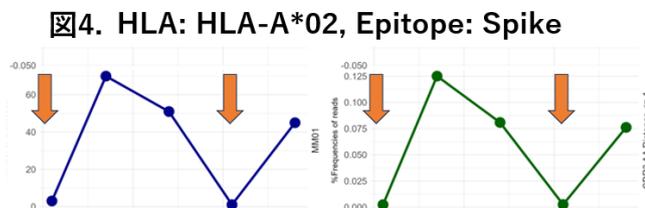
(1) 国産 mRNA SARS-CoV-2 ワクチン(第一三共ワクチン: MAFB-7256a)接種後の免疫反応の BCR-QASAS 法での評価 (QASAS 法の再検証)

ワクチンの標的であるスパイク蛋白は S1 及び S2 部分から構成されており、感染には S1 内の RBD 領域が重要である(図 3)。ファイザー(BNT162b2)による mRNA ワクチンは S1+S2 のスパイク蛋白全体を作るが、新規に開発された第一三共ワクチン(MAFB-7256a)は、RBD のみを作る。CoV-AbDab 内の BCR/抗体配列にはエピトープに関する情報が含まれており、ワクチン接種後出現した一致配列のエピトープについて解析を行った。BNT162b2 の接種後に出現する一致配列は、S1(RBD、NTD)、S2 などスパイク蛋白の様々な領域に対するものであるが、MAFB-7256a の接種後は RBD に対する配列のみが増加している(図 3、赤ライン)。このデータにより RBD mRNA ワクチンの科学的妥当性を QASAS 法で確認することができた。



(2) TCR レパトアを用いた QASAS 法(TCR-QASAS 法)の有用性の検証”

“SARS-CoV-2 ワクチン接種前後の TCR レパトアデータ”と”SARS-CoV-2 罹患後に認識される TCR 配列のデータベース(VDJ database)”を用いて特定の抗原に対する免疫反応を、TCR レパトア解析を用いて評価可能かを検証した(TCR-QASAS 法の検証)。BCR による免疫反応と、TCR による免疫反応の異なる重要なポイントは、TCR は HLA 拘束を受けることである。VDJ database は欧米で集められたデータであることから HLA-A 02:01 の症例から得られたデータが 40%程度を占める。そこで、我々はボランティアドナーのなかで HLA-A 02:01 である症例を数名選定し解析を行った。これまで、HLA の一致を考慮せず TCR-QASAS 法を実行していたため、BCR-QASA に比較して反応は明確ではなかったが、HLA を一致させることで良好な評価が可能となることが明らかになった。今後、研究をがん免疫に応用していくにあたり大きな成果となった(図 4)。

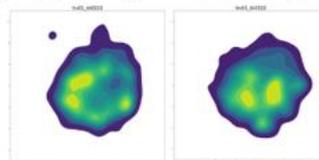


(3) タンパク質言語モデルを用いた抗原受容体 CDR3 領域の解析についての検証

“タンパク質言語モデルによる抗原結合部位の解析が可能か”についての検証を行った。我々はこれまでの研究で、SARS-CoV-2 ワクチン接種前後の BCR レパトアデータを十分量保持しており、がん免疫研究におけるレパトア解析を行うための先行研究としてこれを利用した。本項目では、膨大なレパトアデータの中から、特定の抗原曝露後に活性化した BCR 配列を、タンパク質言語モデルを利用して抗原特異的配列として選定可能かを検証した。

免疫反応を示す配列は単独で存在せず、類似する配列のクラスターを形成することが予測される。そこで、タンパク質言語モデル(AbLang2 など)により、CDR3 領域(アミノ酸配列)の類似性を解析することでクラスターを形成させ、その集積の変化をカーネル密度関数で評価することで、数多くの抗原特異的配列候補を抽出した(図5)。予備実験として、SARS-CoV-2 ワクチン前後の変化を評価したが、我々は、12 例の SARS-CoV-2 ワクチン接種前後データを解析し 315 の抗原特異的配列候補を選定したが、驚くべきことにそのうち 47 配列(14.8%)が CoV-AbDab と完全一致するものであった(図 5) (2025 情報処理学会 京都)。

図5. ワクチン前 ワクチン後



【生活や産業への貢献および波及効果】

2024 年度は、本研究助成金を利用し、(1) QASAS 法の有用性の確認、(2) TCR レポトアを用いた QASAS 法の有用性の検証、(3) タンパク質言語モデルが抗原受容体/CDR3 領域に対して有効であるかの検証、の 3 つを行った。がん免疫研究を確実にを行うために、データが充実している“SARS-CoV-2 を抗原とした免疫反応”を利用した予備実験を行い、多くの成果を得た。

上記の研究により BCR のみならず、TCR においても QASAS 法が有効であるかについて、詳細な検証を十分に行うことが出来た。TCR-QASAS では、HLA 拘束という BCR にはないパラメータを検証する必要がある。欧米では HLA-A 02 の保有が 5 割程度であることに対し、日本人は HLA-A24 の保有者が 6 割であり、HLA-A02 保有者に限定した研究/解析を行うために時間と労力が必要であったが、我々の豊富な症例から対象者を選定し、良好な成果を得ることが出来た。また、タンパク質言語モデルによる解析は従来のモデル(ESM-2 など)の利用では十分な精度を得ることが出来なかったが、特に抗体配列に特化したタンパク質言語モデルである AbLang2 の利用によりその精度を飛躍的に上昇させることに成功している。2024 年度中に、ネオアンチゲン解析などがん免疫を直接解析するまでには至らなかったが、これら成果はがん免疫研究を実行するうえで重要な基礎的データとなった。今後、これらの研究の知見を活かして、がん免疫研究を加速させ、早期に“レポトア解析を用いた新規抗原反応評価法による「真のネオアンチゲン」の同定”の達成を目指す。

【業績(論文/学会発表)】

論文発表 (1)に関連した報告: Ohji G, Funakoshi Y, Yakushijin K, Matsutani T, Sasaki T, Kusakabe T, Matsumoto S, Koyama T, Nagatani Y, Kurata K, Kimbara S, Kiyota N, Minami H. Analysis of B-cell receptor repertoire to evaluate the immunogenicity of SARS-CoV-2 RBD mRNA vaccine: MAFB-7256a (DS-5670d). *Front Immunol.* 2024 Oct 7;15:1468760.

学会発表 (3)に関連した報告: 抗体言語モデルに基づく感染症レポトア解析配列を用いた抗原由来抗体群の推定 飯棲俊介 (科学大), 船越洋平, 薬師神公和, 大 路 剛 (神戸大), 大上雅史 (科学大) 第 87 回 情報処理学会 京都