

令和元年6月14日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04580

研究課題名(和文) 変性タンパク質可溶性化技術を利用したがん免疫治療の診断薬開発と個別化医療への応用

研究課題名(英文) Development of companion diagnostics for personalized cancer immunotherapy using denatured protein solubilization technology

研究代表者

二見 淳一郎 (Futami, Junichiro)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学研究科・准教授

研究者番号：00420498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血に含まれるがん抗原に対する自己抗体をバイオマーカーとして、個人差が大きいがんに対する免疫応答を的確に予測・モニタリングする技術開発に取り組んだ。150種類超の全長ヒトがん抗原の生産リソースを整備し、水溶性で全エピトープを露出するS-カチオン化抗原とluminex法を組み合わせた診断薬プロトタイプを完成した。実際ががん免疫サイクルの活性化を反映する自己抗体の変動を鋭敏に観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変性状態のタンパク質を可溶性化する独自開発技術をベースとして、がん免疫治療をサポートできる診断薬開発が進捗した。腫瘍免疫応答は個人差が大きく現状では予測・評価が困難である。本研究で開発した自己抗体定量システムは、ごく微量の末梢血でがん免疫サイクルの活性化レベルを定量評価でき、治療方針の選択に活用できる可能性がある。本研究成果をベースに診断薬の実用化を加速したい。

研究成果の概要(英文)：We have developed the technology for analysis of antitumor immune response by using anti-cancer antigen autoantibody biomarkers. This technology employed luminex technology combined with S-cationization techniques to expose linear epitopes. This antibody detection system was successfully demonstrated that sensitive autoantibody detection relating to the activation of cancer immunity cycles.

研究分野：タンパク質工学・腫瘍免疫学

キーワード：タンパク質工学 腫瘍免疫学 化学修飾 バイオテクノロジー コンパニオン診断薬 がん免疫治療 個別化医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究を開始した2016年4月は、2015年12月に「切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」に対する免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1抗体)が承認された直後であり、一部で画期的な奏功例が確認され、がん免疫治療が本格化ステージの時代に入った時期であった。一方で腫瘍免疫応答は個人差が大きいことも同時に問題点として顕在化しはじめた時期でもある。この課題解決には個別化医療の実現には免疫チェックポイント阻害剤が奏功する患者を治療前に予測可能とするバイオマーカーの開発が重要で、現在でも未解決の重要課題として多角的な検討が進行中である。また、がん免疫治療の治療効果が観察されるまでの応答時間の個人差も問題である。免疫チェックポイント阻害剤の投与後に腫瘍退縮効果が確認されるまでに早ければ1-2週間で、遅い場合は数ヶ月を要し、個々人で大きな幅がある。そのため、治療開始後にも腫瘍局所での免疫応答のレベルを随時判定できる診断薬の開発も重要な課題である。これらの課題は現在でも未解決であり、様々なアプローチで検討が継続的に進められている。本研究課題はこの様な医療現場の課題解決を優先しながら、この研究開発の過程で見出されるタンパク質科学的な新知見の解明にも確実に取り組む姿勢で実施した。

タンパク質工学を専門とする当研究グループでは、がん細胞の「抗原性」を担うがん抗原タンパク質に注目している。この「がん抗原タンパク質」とは、体細胞変異に由来する変異抗原(neoantigen)と、がん細胞内で異常に発現する共通抗原に大別される。後者の共通抗原はさらに、がんと精巣に限局した発現を示すcancer/testis antigen(CTA)と、細胞のがん化に付随して発現が亢進するtumor associated antigen(TAA)がある。がん免疫治療が奏功し、腫瘍免疫応答が活性化すると血中に複数の抗がん抗原抗体(共通抗原に対する自己抗体)が出現・増加するantigen spreadingが観察されることが古くから知られているが、これを高感度に定量評価できる診断薬がない。これは大半のがん抗原タンパク質が不安定で凝集しやすい物性であることも一因として挙げられる。当研究グループでは独自に開発した変性タンパク質の可溶化技術を活用し、全長・水溶性がん抗原の取得を進めてきた。研究開始時に100種超の全長がん抗原の生産系は有していたが、物性別に変性タンパク質を可溶化する条件の最適化も課題であった。本研究では腫瘍免疫学的に重要な全長がん抗原の生産リソース整備を進め、腫瘍免疫応を極微量の末梢血で高感度に定量評価するがん免疫治療のコンビニオン診断薬の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

抗がん抗原抗体をバイオマーカーとした抗体検査診断薬の開発には、できるだけ網羅的な抗原パネルが必要である。本研究ではCTAとTAAを中心とした腫瘍免疫学的に重要な130種超の全長・水溶性の精製がん抗原の取得法の確立を最初の目標とした。この際、各タンパク質の物性別に調製方法を分類・最適化し、タンパク質化学的な解析も実施し、変性状態の水溶性全長タンパク質調製に対応できるプロトコル開発を進めた。

極微量の患者由来血清から迅速に抗がん抗原抗体を定量評価するため、マルチプレックス磁気ビーズ法を用いた抗がん抗原抗体の高感度定量測定系の整備を進めた。この測定系を用いて抗がん抗原抗体を測定し、抗体価の変動と臨床効果を比較することで、腫瘍免疫における自己抗体バイオマーカーの有効性を評価した。さらにこの抗体検査システムの定量性保証を目的に、自家製陽性コントロールウサギ血清を用いた基礎検討を実

施した。

腫瘍免疫学の急速な発展に伴い、免疫チェックポイント阻害剤のみならず、様々な作用点を持つ薬剤と組み合わせた複合免疫療法の開発が期待されている。本システムでも次世代のがん免疫治療を見据えた基礎検討を多角的に実施することとした。

3. 研究の方法

(1) 全長・水溶性がん抗原パネルの整備

CTA については CTDatabase(<http://www.cta.lncc.br/>)に記載の 156 種類から順次選抜し、TAA に関しては各種の文献情報を参考に、ヒト由来全長抗原の生産系を構築した。生産宿主は大腸菌と Hek293 細胞の 2 種類を準備し、各タンパク質に適した生産宿主を決定した。各抗原タンパク質には精製用のタグ(HisTag および StrepTagII)を付加し、native 構造で精製できる抗原はアフィニティー精製で取得した。精製した native 抗原の一部は変性剤中で Cys 残基特異的に正電荷を導入する S-カチオン化法で可溶化し、変性状態で水溶性を維持する S-カチオン化抗原も同時に調製することで、抗体検査に優れた抗原構造の評価に用いた。大腸菌発現系で不溶性のインクルージョンボディを形成する抗原については、不溶性画分から S-カチオン化法で可溶化して精製抗原を取得した。

(2) 抗がん抗原抗体の測定の定量化と臨床相関

各精製がん抗原は、マルチプレックス磁気ビーズの表面に共有結合で固定化してルミネックス法で抗体価を測定するシステムを構築した。各精製抗原は同時に自家製陽性コントロールウサギ血清の作成に利用し、各ビーズを用いた抗体価測定の定量性の検証に用いた。臨床検体を用いた抗がん抗原抗体の測定は各方面との共同研究により実施し、臨床経過との相関や、免疫治療の奏功率と抗がん抗原抗体の種類との相関等を総合的に解析した。

(3) 複合免疫療法への基礎検討

がん細胞内での CTA の発現はゲノム DNA のメチル化により制御を受けている例が多いので、各種のがん細胞株に脱メチル化剤を添加して有意に変動するがん抗原のリストを作成した。また、複合免疫療法の基礎研究には、マウスモデルでの抗体価測定系の整備が必要である。担癌マウスモデルにおいて immunogenic cell death を誘導した際に誘導される複数の自己抗体をプロテオミクス手法を用いて同定することで、がん免疫サイクルの活性化に相関する自己抗体バイオマーカーを探索した。

4. 研究成果

(1) 全長・水溶性がん抗原パネルの整備

ヒト全長がん抗原の生産・精製系としては 150 種類以上が整備できた。腫瘍免疫学的な重要性を考慮すると 80 種類に厳選したがん抗原パネルでも一定の評価が可能で、このセットを解析用抗原パネルとした。大半の抗原は細胞内タンパク質であり、大腸菌の発現系では不溶性のインクルージョンボディとして発現された。これらは S-カチオン化法による可溶化・精製を行う理想的な材料となったが、一部の抗原は、不溶化とともに分解も同時に進行する問題点があった。この様なタイプの全長がん抗原に関しては、Hek293 細胞で生産させると、細胞内に不溶性として取得され、この発現系での原料から可溶化・精製を進めるための一連のスキームを確立した。Cys 残基特異的に正電荷を

導入する S-カチオン化法の条件検討を実施した結果、不可逆的な S-アルキル化反応を施した抗原は保存安定性に優れていた。一方で methanethiosulfonate 系の官能基を用いて可逆的な SS 結合で反応させる場合は、極めて反応が速く、SH 基の迅速な保護が必要な抗原調製には有効であった。本研究テーマと直接的には相関しないが methanethiosulfonate 系試薬の迅速反応性を活用することで、SS 結合含有タンパク質の不可逆熱失活を抑制できることを発見し、その成果を論文にまとめた。

(2) 抗がん抗原抗体の測定の定量化と臨床相関

一連のがん抗原パネルを用いた抗がん抗原抗体の測定系を、Multiple S-Cationized beads array assay (MUSCAT-assay) と命名し、実用化研究を加速した。各種の検体を用いて検討した結果、この MUSCAT-Assay では極微量の血液から抗体価が網羅的に定量評価できること、がん抗原の発現パターンや抗がん抗原抗体が認識するエピトープの個人差が大きく、臨床経過に応じてダイナミックに抗体価が変動していることなどが明確に観察され、これらの抗体価変動が腫瘍免疫応答を反映するバイオマーカーとなることが確認された。一部のがん抗原リソースは立体構造を持つ native 抗原 (conformational epitope) と S-カチオン化技術で可溶化された変性抗原 (linear epitope) の両者が調製可能であった。がん患者由来血清中に含まれる抗体の結合活性を比較検討した結果、linear epitope とよく反応する例が優位で、生体内で抗がん抗原抗体が認識している抗原の物性をよく反映している可能性が示唆された。さらに、免疫チェックポイント阻害剤が奏功する例に共通して存在する抗 CT 抗原抗体バイオマーカーが MUSCAT-assay 法で鋭敏に検出できるほか、腫瘍免疫応答の活性化に応じて様々な自己抗体の抗体価が上昇することを確認した。本システムの定量性の保証も重要な課題であるが、各種のがん抗原に対するウサギ抗血清を取得し、自家製陽性コントロールとして抗体価の測定レンジの確認や・定量性の保証に活用できることが確認された。

(3) 複合免疫療法への基礎検討

がんの抗原性を向上させるエピゲノム薬 (decitabine) の併用が複合免疫療法の 1 つとして期待されている。ヒトがん細胞株では decitabine 処理で複数のがん抗原の発現が亢進したが、ヒト正常繊維芽細胞では変化せず、ゲノム構造の安定性とエピゲノム薬の応答性の相関が示唆された。整備済みのヒトがん抗原とマウス抗原の相同性が低いため、複合免疫療法の基礎研究には、マウス版の MUSCAT-assay システムの調製が望ましい。マウスモデルの場合は免疫治療モデルの血清とがん細胞の両者が入手できる利点がある。実際に担癌マウスモデルにおいて immunogenic cell death を誘導した際に誘導される複数の自己抗体をプロテオミクス手法を用いて複数同定することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) 二見淳一郎, MUSCAT-Assay 法の個別化医療への応用, BIO Clinica, 49-51, (2018)(査読なし)

(2) 二見淳一郎, タンパク質を巻き戻すコツと原理 生物工学会誌『続・生物学基礎講座 - バイオよもやま話 - 』 328-332 (2017) (査読なし)

(3) Futami J, Miyamoto A, Hagimoto A, Suzuki S, Futami M, Tada H, Evaluation of irreversible protein thermal inactivation caused by breakage of disulphide bonds using methanethiosulphonate Scientific Reports, article number:12471 (2017) (査読有)

(4) Futami M, Nakano T, Yasunaga M, Makihara M, Asama T, Hagihara Y, Nakajima Y, Futami J, Enhanced in-cell folding of reversibly cationized transcription factor using amphipathic peptide. J Biosci Bioeng 123, 419-424 (2017) (査読有)

(5) 二見淳一郎, 腫瘍免疫応答の活性化を測定する抗体検査技術の開発 バイオインダストリー 33, 19-24 (2016) (査読なし)

〔学会発表〕(計 31 件)

・主な発表(4 件)

(1)二見淳一郎, 本莊知子, 吉岡実咲, 勝河祐希, Hannaneh Ahmadi, 木下理恵, 藤枝奈緒, 垣見和宏, 抗がん抗原抗体で腫瘍免疫応答をモニタリングする MUSCAT-Assay, 第 22 回 日本がん免疫学会総会 (2018)

(2)二見淳一郎, 丸山悠, 新土居奈緒美, 大川裕也, Hannaneh Ahmadi, 勝河祐希, 吉岡実咲, 本莊知子, 木下理恵, 腫瘍免疫応答の活性化をモニタリングする抗体検査診断薬の標準化, 第 69 回日本生物工学会大会 (2017)

(3)二見淳一郎, Quantitative analysis of activation of anti-tumor immune response, BioJAPAN2016, 2016 年 10 月 12 日~10 月 14 日 パシフィコ横浜

(4)Junichiro Futami, Akihiro Hosoi, Hirokazu Matsushita, Kazuhiro Kakimi Quantitative analysis of antigen-spreading using water-soluble and full-length cancer antigens, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 06 日~10 月 08 日 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

タンパク質が加熱失活する過程を解析する新手法を開発～タンパク質耐熱化の設計指針に～

http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id493.html

岡山大学学術成果リポジトリ：MUSCAT-Assay 法の個別化医療への応用

<http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/ja/56160>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：垣見 和宏

ローマ字氏名：KAKIMI KAZUHIRO

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部付属病院

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：80273358