

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15244

研究課題名(和文) 癌の免疫監視逃避過程で消失するステルス癌抗原を標的とした革新的癌免疫治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of stealth antigens for developing tumor immunotherapy

研究代表者

小林 博也 (Kobayashi, Hiroya)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90280867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞においてメチル化制御により抑制されている(DNAメチル基転移酵素阻害剤を処理することで再発現する)がん抗原分子をステルスがん抗原と名付け、それらを標的とした新しいがんワクチン製剤の開発研究を実施し、DNAメチル基転移酵素阻害剤によって、mRNAおよび蛋白質レベルでがん細胞株で発現が上昇する複数のステルスがん抗原を同定した。それらは免疫原性が高く、効率良くステルスがん抗原特異的ヒトT細胞を活性化することを確認している。さらに、免疫不全マウスを用いた検討において、ステルスがん抗原特異的ヒトT細胞とDNAメチル基転移酵素阻害剤を併用することにより効果的な腫瘍増殖抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：We found several stealth antigens which are epigenetically suppressed in tumor cells due to their high antigenicity and re-transcribed and -translated by treating with DNA methyltransferase inhibitor. We found that the stealth antigen-specific Th cells were efficiently generated from peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. Also combination therapy of the Th cells and DNA methyltransferase inhibitor efficiently inhibited growth of human cancer cell line in immunodeficient mice.

研究分野：腫瘍免疫、病理

キーワード：cancer vaccines

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞の悪性度等の性状は、免疫監視機構による免疫エディティング (免疫系の監視から逃れる方法をがんが獲得する過程) によって決められる (Smyth MJ et al. Science 2011)。近年、そのメカニズムの一つが示され、がんはその増殖過程において免疫原性の高い抗原の遺伝子発現を DNA メチル化によって抑制し、がん細胞の免疫原性を低下させることにより免疫系から逃れている可能性が示唆されている (DuPage et al. Nature 2012)。また、研究代表者及び分担者は、これまでに数多くのがん及びウイルス抗原由来の T 細胞認識エピトープペプチドを同定してきた中で (Kobayashi et al. Curr Opin Immunol 2008)、特に、DNA メチル化制御を受けるがん抗原は免疫原性が高く、T 細胞認識領域を数多く有していることを明らかにしてきた (Ohkuri et al. Br J Cancer 2009)。以上の国際的な動向及び申請者の研究成果から、「発がん時に抑制ないし消失される抗原分子 (ステルスがん抗原) はがん細胞にとって都合の悪い抗原分子であり、我々にとって好都合の標的抗原タンパクになり得るのではないかと」という着想を得るに至った。これまでのがんワクチン研究では、“現在の”腫瘍組織に発現されるタンパク質が標的抗原とされてきたが、そうではなく、がん細胞が免疫監視機構から逃れる過程で発現を抑制してきた高抗原性タンパク質を標的とする方が、効果的ながんワクチン製剤を開発できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、①がん細胞が DNA のメチル化を介して遺伝子発現を抑制している分子 (ステルスがん抗原分子) を同定し、②そのステルスがん抗原が T 細胞を効率よく活性化させるか、さらに、③ステルスがん抗原特異的 T 細胞を DNA メチル基転移酵素阻害剤と併用することによって、腫瘍増殖抑制効果が得られるかどうかを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) ①ヒトがん細胞株を DNA メチル基転移酵素阻害剤存在下で 3 日間培養し、RNA を回収する。コントロール処理のがん細胞株の RNA も同様にして回収し、マイクロアレイにて網羅的に遺伝子発現解析を行い、DNA メチル基転移酵素阻害剤を処理した細胞でのみ発現される分子をリストアップする。同定された分子のがん及び正常組織における発現の有無を調べるために、「The Human Protein Atlas」 (<http://www.proteinatlas.org>) にて、がん及び正常組織で発現がほとんど見られない分子を選別し、ヒトステルスがん抗原分子リストを作成する。

② 選別されたステルスがん抗原候補分子が複数のがん細胞株において DNA メチル基転移

酵素阻害剤を処理することによって、再発現するかどうかを確認するために、幅広いがん種の中からがん細胞株を選択し、リアルタイム qPCR 法およびウェスタンブロッティング法を用いて遺伝子発現量およびタンパク質発現量をそれぞれ解析する。

③ 選別されたステルスがん抗原候補分子が DNA メチル基転移酵素阻害剤を投与された生体においてがん細胞株で再発現されるかを検討するために、ヒトがん細胞株を移植した免疫不全マウスを用いて解析する。

(2) ヒトステルスがん抗原の候補分子において、アルゴリズム解析によるヒト MHC 分子への結合可能性を検討する。特にヒト MHC クラス II 結合性ペプチドに対するアルゴリズム解析システムに関しては、Southwood らによって開発され (J Immunol 59: 1-14, 1998)、実際に運用されている幅広い HLA クラス II 分子 (HLA-DR1, -DR4, -DR7, -DR9, -DR53) に同時に結合可能なペプチド配列を選び出すアルゴリズム解析ソフトを用いて、MHC 分子に最も結合しやすい翻訳後修飾部位を含むアミノ酸配列を選定し、ペプチドを合成、精製する。

(3) 選定され合成されたヒトステルスがん抗原ペプチドが実際にヒトリンパ球を効果的に活性化させるかどうかを検討する。健康成人から末梢血単核球をフィコールによる密度勾配遠心法によって単離後、末梢血単核球から磁気ビーズ分離法を用いて CD14 陽性細胞を単離し、GM-CSF と IL-4 存在下で 7 日間培養することによって樹状細胞 (DC) を樹立し、抗原提示細胞として用いる。同様にして末梢血単核球から CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を単離し、ヒトステルスがん抗原ペプチド存在下で DC とともに培養する。1 週おきにヒトステルスがん抗原ペプチドをパルスした末梢血単核球を抗原提示細胞として数回刺激し、ヒトステルスがん抗原ペプチド特異的 T 細胞株を樹立する。また、免疫エディティングの痕跡として、がん患者末梢血中にはステルスがん抗原特異的メモリー T 細胞が高確率に存在する可能性が高いので、健康人末梢血及び癌患者末梢血におけるステルスがん抗原特異的 T 細胞の頻度を ELISPOT アッセイにて比較する。

(4) ①生体におけるヒトステルスがん抗原の免疫賦活作用を検討するために、HLA 遺伝子組換えマウスにヒトステルスがん抗原ペプチドを免疫賦活剤とともに皮下接種し、10 日目の脾臓もしくは所属リンパ節細胞における特異的 T 細胞応答を ELISPOT アッセイにて明らかにする。

②DNA メチル基転移酵素阻害剤との併用療法の抗腫瘍効果を検討するために、HLA 型が適合するヒトがん細胞株を接種した免疫不全マウスにステルスがん抗原特異的 T 細胞を

DNA メチル基転移酵素阻害剤と共に投与し、その抗腫瘍効果を明らかにする。

(5) ①ステルスがん抗原と DNA メチル基転移酵素阻害剤の併用療法の治療効果を臨床により近い実験モデルで検討するために、マウスステルスがん抗原を標的としたマウスモデルを新しく確立する。上記で同定された複数のヒトステルスがん抗原ペプチドのアミノ酸配列の中からマウスと相同性の高い分子を同定する。

② 上記で同定されたマウスと相同性の高いペプチド配列を有するペプチドが野生型マウスの免疫系を活性化できるか検討する。申請者が所有するマウスがん細胞株の野生型マウスの系統が、C3H、C57BL/6 および BALB/c の三系統であるため、これら三系統の野生型マウスを用いて検討する。ヒトステルスがん抗原ペプチドを免疫賦活剤とともに皮内接種し、回収したリンパ節細胞によるヒトステルスがん抗原ペプチドに対する特異的反応を ELISPOT および ELISA によって明らかにする。

③ マウスと相同性の高いヒトステルスがん抗原分子がマウスがん細胞株においてもヒトがん細胞株と同様に DNA メチル基転移酵素阻害剤によって遺伝子およびタンパク質レベルで再発現されるかを検討する。

#### 4. 研究成果

**特許申請中のため、現時点で公開できる範囲および形で研究成果を報告する。**

(1) ①DNA メチル基転移酵素阻害剤存在下で培養することによって、複数のヒトステルスがん抗原候補遺伝子を同定した。これらは DNA メチル基転移酵素阻害剤を処理することによってのみ、ヒトがん細胞株で遺伝子発現が認められる遺伝子であった。これらの候補遺伝子のがん組織及び正常組織における発現の有無を調べるために「The Human Protein Atlas」によって解析した結果、正常組織ではほとんど発現が認められず、がん組織においても発現が認められなかったことから、ヒトステルスがん抗原候補分子がとして最適であることが明らかになった。

② 次に、ヒトステルスがん抗原候補分子が、DNA メチル基転移酵素阻害剤を処理することによって、複数のヒトがん細胞株において再発現されるかどうかを検討した。その結果、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで、複数のヒトがん細胞株で再発現されることが確認された。

③ DNA メチル基転移酵素阻害剤を投与された担がん生体においても、ヒトステルスがん抗原候補分子が再発現されるか検討するために、免疫不全マウスにヒトがん細胞株を移植し、DNA メチル基転移酵素阻害剤を複数回腹腔内投与した。回収した腫瘍組織から RNA およびタンパク質を抽出しリアルタイム

qPCR 法およびウェスタンブロッティング法を用いて検討した結果、先述の *in vitro* の結果と同様に、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで、複数のヒトがん細胞株でステルスがん抗原候補分子が再発現されることが確認された。

(2) 上記の検討によって、DNA メチル基転移酵素阻害剤を処理することによって、ヒトがん細胞株において確実に発現が上昇するヒトステルスがん抗原分子について、T 細胞活性化ペプチド配列を同定するために、アルゴリズム解析ソフトを用いて 15~40 残基長程度のペプチドを設計、精製した。

(3) 上記の検討によって精製されたヒトステルスがん抗原ペプチドがヒト T 細胞を活性化させるか検討した。その結果、複数人の健康成人から採取したリンパ球においてヒトステルスがん抗原ペプチドに対する特異的な T 細胞応答が得られた。

(4) ① 上記の検討によって、ヒトステルスがん抗原ペプチドが *in vitro* において効率よくヒト T 細胞を活性化させることが明らかになったことから、次に *in vivo* における T 細胞活性化能を検討した。HLA 遺伝子組換えマウスにヒトステルスがん抗原ペプチドを免疫賦活剤とともに皮内摂取し、所属リンパ節から細胞を回収し、ペプチドに対する反応性を解析した結果、強いペプチド特異的反応が得られた。このことから、同定したヒトステルスがん抗原ペプチドは、*in vivo* においても効果的に T 細胞を活性化させることが示唆された。

② 次に、ヒトステルスがん抗原を標的とすることによって、実際にヒトがん細胞株の *in vivo* における増殖を抑制することができるかを検討した。免疫不全マウスにヒトがん細胞株を移植し、DNA メチル基転移酵素阻害剤を複数回腹腔内投与した。その後、上記 (3) で樹立したヒトステルスがん抗原ペプチド特異的ヒト T 細胞をマウス尾静脈から投与し、腫瘍組織の大きさを定期的に測定した。その結果、DNA メチル基転移酵素阻害剤とヒトステルスがん抗原ペプチド特異的ヒト T 細胞の併用治療を行ったマウスでのみ腫瘍の増殖抑制効果が認められた。それぞれの単剤治療では腫瘍増殖抑制効果が認められなかったことから、DNA メチル基転移酵素阻害剤によって再発現されたステルスがん抗原をステルスがん抗原ペプチド特異的ヒト T 細胞が認識しがん細胞の増殖を抑制していることが示唆された。

(5) ①ステルスがん抗原のマウス治療モデルを確立するために、上記で同定されたヒトステルスがん抗原ペプチド配列がマウス由来のタンパク質にも含まれているかを解析した。その結果、ヒトステルスがん抗原ペプチ

ドの中で、唯一、あるマウス由来のタンパク質中に同じアミノ酸配列が含まれているペプチドが明らかになった。

② そこで、このヒトステルスがん抗原ペプチドが野生型マウスの免疫系にも認識されるかを検討した。それぞれのマウスにヒトステルスがん抗原ペプチドを免疫賦活剤とともに皮内接種し、後日、リンパ節細胞を回収しELISPOT およびELISA によってペプチド特異的T細胞応答を解析した。その結果、調べたC3H、C57BL/6 およびBALB/c の三系統の野生型マウスの中で、ある系統においてヒトステルスがん抗原ペプチド特異的T細胞応答が検出された。

③ そこで、その系統マウス由来のがん細胞株において、ヒトがん細胞株と同様に、DNAメチル基転移酵素阻害剤によって、同じステルスがん抗原が再発現されるか検討した。同系統マウス由来がん細胞株を in vitro においてDNAメチル基転移酵素阻害剤存在下で3日間培養後、RNA およびタンパク質を回収した。その結果、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで、ヒトと同様のステルスがん抗原分子が再発現されることが確認された。

以上のことから、この野生型マウスの系統とその系統由来のがん細胞株をセットで用いることによって、本研究課題で同定されたヒトステルスがん抗原ペプチドとDNAメチル基転移酵素阻害剤の併用療法による革新的がん免疫治療法の抗腫瘍効果をより臨床に近い動物モデルで検討することができるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：がん抗原ペプチド

発明者：小林 博也、小坂 朱、大栗 敬幸

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2018-024972 号

出願年月日：平成30年2月15日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 博也 (KOBAYASHI, Hiroya)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90280867

### (2) 研究分担者

小坂 朱 (KOSAKA, Akemi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40561030

大栗 敬幸 (OHKURI, Takayuki)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：70564061