

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07764

研究課題名(和文) マイコプラズマ由来アルギニン代謝制御蛋白質を標的とした新規がん免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer immunotherapy targeting mycoplasma-derived arginine metabolism regulatory protein

研究代表者

西中川 拓也 (Nishinakagawa, Takuya)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：30600035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年のがん症例において、マイコプラズマ感染とがん悪性化に関する知見が集まりつつある。本研究では、がん細胞に感染したマイコプラズマが産生するアルギニンデイミナーゼ(ADI)に対する特異的抗体の樹立に成功し、ADIの検出系を構築した。樹立抗体は、マイコプラズマ感染とがん悪性化の関連を検討するうえで、がん患者血清や組織染色などを用いた解析において非常に有用性が高い。また、免疫担当細胞に対するADIの機能を解析し、ADIが免疫担当細胞に対して細胞死を誘導することを見出した。ADIは、免疫抑制性分子として作用し、がん細胞の生体免疫逃避機構に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のマイコプラズマ検出法の主流はPCR法による遺伝子検査であり、がん組織における病理学的変化とマイコプラズマ感染との因果関係を分析するツールとしては難しい。本研究課題では、マイコプラズマに対するマウスモノクローナル抗体を複数クローン樹立することに成功し、さらに、樹立抗体が様々なマイコプラズマ検出系に応用できることを確認した。マイコプラズマ特異的抗体の創出は、診断技術の向上や治療戦略開発において重要なツールとして応用でき、学術的・社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：In recent cancer cases, knowledge about mycoplasma infection and cancer malignant transformation is gathering. In this study, we succeeded in establishing a specific antibody against arginine deiminase (ADI) produced by mycoplasma infected with cancer cells, and constructed an ADI detection system. The established antibody is extremely useful in analyzing the relationship between mycoplasma infection and cancer malignant transformation using cancer patient serum and tissue staining. We also analyzed the function of ADI on immunocompetent cells and found that ADI induces cell death in immunocompetent cells. It was suggested that ADI acts as an immunosuppressive molecule and is involved in the immune escape mechanism of cancer cells.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がん診断法 抗体医薬 微生物感染腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のがん症例において、マイコプラズマ感染とがん悪性化に関する知見が集まりつつある。例えば、肝がん患者において、がん組織におけるマイコプラズマ感染群は、非感染群と比較して予後不良であることが報告されている。しかしながら、生体におけるマイコプラズマ感染は *M. pneumoniae* 等の一部の種を除き、不顕性感染であり、病態との因果関係については未知であった。しかし、実験レベルでは、マイコプラズマ感染はがん細胞の H-ras や c-Myc 発現の異常亢進をきたすこと、p53 が抑制されることなどが報告されているが、その詳細な分子メカニズムは不明であり、マイコプラズマ感染とがんの悪性化における分子基盤の解明は急務である

2. 研究の目的

申請者は最近、口腔扁平上皮癌および子宮頸癌の原発巣由来細胞を用いた解析で、マイコプラズマに感染したがん細胞では、リンパ球増殖抑制作用が認められることを見出し、その制御因子として、マイコプラズマ由来アルギニン代謝制御タンパク質 Arginine deiminase (ADI) を単離した。

そこで、本研究課題では、マイコプラズマ感染とがん進展との連関、およびその具体的な分子基盤を明らかにし、申請者が同定したアルギニン代謝制御タンパク質に対する特異的モノクローナル抗体を樹立することで、口腔扁平上皮および子宮頸癌の予後予測因子や治療への医薬応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) ADI に対するマウスモノクローナル抗体の樹立

マイコプラズマより大量精製した ADI を免疫原として、マウスモノクローナル抗体を複数クローン樹立し、免疫組織染色、ELISA 法などのイムノアッセイへ応用する。さらに、ADI の免疫抑制性作用に対する中和抗体も樹立する。

(2) 樹立抗体の各種イムノアッセイへの応用

ADI 検出系の構築を目指して、樹立抗体のイムノアッセイへの応用性を検討する。Western Blotting 法や ELISA 法、Flow Cytometry 法、細胞染色などに利用できる抗体クローンを選別する。

(3) ADI の生物学的機能解析

我々は、ADI がヒト活性化リンパ球や赤芽球系細胞株 K562 細胞など血球系の細胞に対して細胞障害活性を有することを見出している。ADI の細胞障害シグナルを解析するために、細胞周期関連タンパクや細胞死関連タンパクの発現解析を行った。

(4) ADI のアミノ酸一次構造の決定

マイコプラズマは 120 種以上の亜型が知られており、それら亜型間のアミノ酸配列変化や翻訳後修飾の差異により、生物活性が異なる。そこで、がん細胞特異的に感染するマイコプラズマ属の ADI をコードする遺伝子をクローニングし、アミノ酸一次構造を決定する。

4. 研究成果

(1) ADI に対する抗体の樹立および有用性

我々は、ADI に対するマウスモノクローナル抗体を 10 クローン (IgG:3 クローン、IgM:7 クローン) 作製することに成功した。

その後、IgG クローン (clone.4-22-12、clone.7-34-6、clone.8-35-1) のイムノアッセイへの応用性を検討した。その結果、3 クローンとも Western Blotting 法や ELISA 法に応用することができた。特に、4-22-12 と 7-34-8 は ADI に対する高い反応性を示したため、両クローンの組合せによるサンドイッチ ELISA 法の構築を試みた。その結果、固相化抗体(捕獲抗体)として 7-34-6 を使用し、検出抗体としてビオチン化した 4-22-12 を用いることで、高感度かつ高特異度に ADI を検出することができるサンドイッチ ELISA 法を構築することができた。

サンドイッチ ELISA 法は、患者血清など夾雑物を多く含む生体試料から目的分子を検出するツールとして優れているため、今回構築したシステムは、がん患者血清を用いた症例解析など臨床応用が可能である。

また、現在、マイコプラズマ検出法の主流は PCR 法による遺伝子検査であり、がん組織における

病理学的変化とマイコプラズマ感染との因果関係を分析するツールとしては難しい。マイコプラズマのがん関連性因子としての重要性（がんの進行度や予後との関連性）を病理学的、生化学的に明らかにするには、ヒトがん検体を試料として、優れた抗マイコプラズマ抗体を用いた解析が必須である。今回樹立した抗体の臨床応用は、マイコプラズマ感染とがんの悪性化の医学的エビデンスを得ることができ、がんの診断や分類への応用、臨床症例との関連やがん進展予測因子としての利用を可能にする。

(2) ADI の生物学的機能解析

ADI の標的細胞の1つである K562 細胞を用いて、ADI の細胞障害機構を解析した。その結果、以下の点が明らかとなった。

ADI 刺激により細胞死が誘導され、その細胞死はアポトーシスだった。

ADI 刺激により、アポトーシス関連タンパクであるカスパーゼ3及びカスパーゼ9の活性化が認められた。一方で、カスパーゼ8の活性化は認められなかった（図1）。

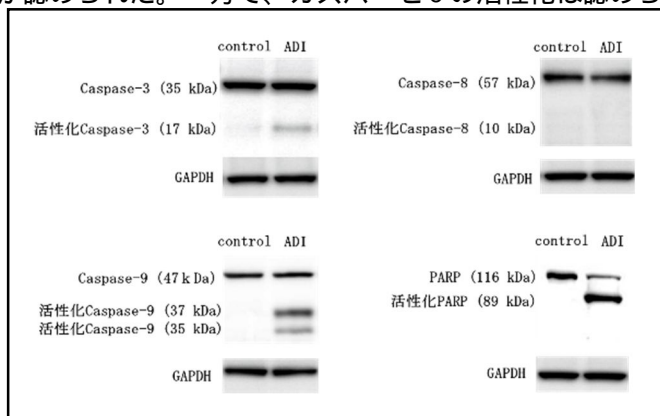


図1. アポトーシス関連タンパクの解析

ADI 刺激により、細胞周期関連タンパク質である Cyclin D や CDK4 の量的減少、さらには Rb タンパクのリン酸化状態の低下が認められた（図2）。

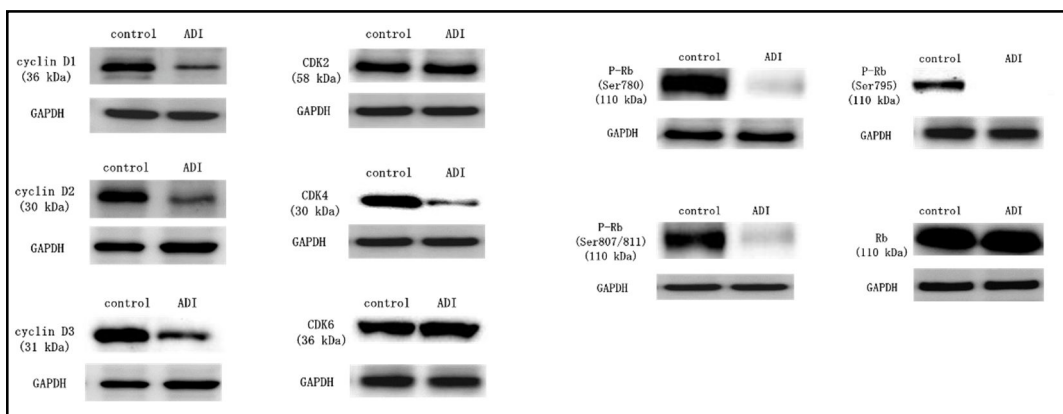


図2. 細胞周期関連タンパクの解析

以上より、ADI による細胞障害は、細胞周期関連タンパクの量的減少による細胞増殖抑制およびそれに続くアポトーシスであると考えられた。また、アポトーシス解析において、カスパーゼ9の活性化が認められたことより、ADI によるアポトーシスシグナルは、ミトコンドリアを介した経路であることが示唆された。

(3) ADI のアミノ酸一次構造の決定

マイコプラズマ感染がん細胞より、ADI をコードする cDNA をクローニングした。今回単離した cDNA から予測される ADI のアミノ酸配列と市販品のリコンビナント ADI の配列を比較すると、120 番目から 140 番目のアミノ酸残基のいくつかの違いが認められた。マイコプラズマの亜型の違いによるものと推測されるが、興味深いことに、我々が単離した ADI では血球系細胞に細胞障害活性が認められるが、市販品のリコンビナント ADI には細胞障害活性が認められなかった。アミノ酸残基の違いにより生物活性が異なると考えられ、ADI の 120~140 番目アミノ酸配列が細胞障害活性部位であることが予測された。

今回の研究課題において、我々はADIに対するモノクローナル抗体を10クローン樹立したが、ADIの細胞障害活性に対する中和抗体を樹立することはできなかった。しかしながら、120~140番目のアミノ酸に細胞障害活性部位が存在すると予測されたため、今後、該当部位のペプチドを作製し、それを免疫原として抗体作製を行うことで、ADIに対して中和活性をもつ抗体の樹立につながる可能性がある。

また、今回単離したcDNAをもとにリコンビナントADIを作製することで、さらなる生物学的機能解析やADIの細胞障害活性を阻害する低分子化合物の探索を行い、マイコプラズマ感染がんに対する新規治療薬開発を目指す。

近年、Bullmanらは、口腔がんや大腸がんにおいて*P.gingivalis*や*F.nucleatum*などの生体内に生息する細菌が宿主の生体防御機構となる免疫反応を抑制し、がん細胞の増殖を助けることによって、がんの進行を直接促していること(Nature, 2022)や、抗がん剤5-FUの効果は、生体内の細菌の増殖を抑制することでがん細胞の増殖抑制を高めることを明らかにした(Cell rep, 2022)。つまり、細菌感染が引き起こす積極的ながん細胞の増殖促進効果は徐々に認知されてきている。一方、患者がん組織におけるマイコプラズマの感染の症例はいくつか報告されているが、そのほとんどがブタやウシに常在する外来のマイコプラズマ感染である。従来から、生体におけるマイコプラズマ感染は*M. pneumoniae*等の一部の種を除き、不顕性感染であり、病態との因果関係については未知であった。また、近年のがん治療において、がん細胞自身が産生・分泌する免疫抑制分子(IL-10、PDL-1等)に対する分子標的治療の研究開発は広く行われているが、微生物感染ならびにその産生分子までを包括したがん治療法の報告はほとんどない。

以上のことから、本研究でマイコプラズマ由来の因子ADIを標的とし、その遺伝子の単離や特異的抗体を樹立したことは、がん患者生体試料(血液、組織)を用いて、マイコプラズマ感染とがん病態の進展の相互関係を明らかにし、病態の重症度を分類し、治療戦略への応用や新たな診断マーカー開発や治療法創出などの観点からも大きな意味がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 前野史佳、西中川 拓也、甲斐茜、内原佑月、細川 雅人、石橋 大輔 |
| 2. 発表標題 がん細胞株培養上清中の細胞傷害活性因子 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 西中川 拓也、櫛川 舞、石橋 大輔 |
| 2. 発表標題 がん細胞培養上清に含まれる細胞障害活性因子の単離 |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 西中川 拓也、櫛川 舞、石橋 大輔 |
| 2. 発表標題 がん細胞培養上清に含まれる細胞障害活性因子 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 西中川 拓也、櫛川 舞、安河内 友世、中島 学 |
| 2. 発表標題 がん細胞培養上清中の細胞障害活性因子の機能解析 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------|---------|
|---------|---------|