

平成 22 年 4 月 19 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20790930
 研究課題名 (和文) エピジェネティクス治療薬による腫瘍抗原発現と T 細胞感受性の増強
 研究課題名 (英文) Enhancing effect in the expression of tumor antigens and T-cell sensitivity against tumor cells after treatment with epigenetic drugs.
 研究代表者
 原嶋 奈々江 (HARASHIMA NANAE)
 島根大学・医学部・助教
 研究者番号： 60345311

研究成果の概要 (和文)： 腎細胞癌細胞、前立腺癌細胞を DNA メチル化阻害剤で処理してもほとんど細胞増殖抑制が見られなかったのに対し、エピジェネティクス治療薬のひとつであるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) 処理後は著しい癌細胞の細胞死誘導及び生存率の低下が認められた。HDACi による癌細胞死の誘導は、薬剤濃度依存的且つ経時的であった。また、HDACi 処理後も癌特異抗原の発現は失われず、T 細胞が標的として十分認識いうる状態を維持できることがわかった。

研究成果の概要 (英文) : Histone deacetylase inhibitor (HDACi) strikingly induced cell death and decreasing cell viability of the human renal cell carcinoma and prostate cancer cells in dose- and time-dependent manner, although the effect of a DNA methyltransferase inhibitor was not recognized. Moreover, tumor-specific antigens were maintained their gene expression as a target of T-cells which enough recognizes the cancer cells after HDACi treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科系一般

キーワード：腫瘍、免疫、エピジェネティクス、薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗腫瘍ワクチン療法の現状

近年、国内外において癌に対するワクチン・免疫療法の臨床研究が進んでいるが、患者の QOL 改善には至っても、腫瘍根絶の評価となると様々な問題点を含んでおり、より詳

細な基礎データの積み上げや検討・改善が求められている。現在の癌ワクチン療法の問題点のひとつに、癌細胞で HLA-class I 分子の発現が低下・欠失し、免疫監視機構からすり抜けていることが挙げられる。乳癌患者にお

いて腫瘍細胞上の HLA-class I 分子の発現消失が起こる原因のひとつが、
・2-microglobulin 遺伝子のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による発現抑制、つまりエピジェネティックな変化であるという報告があり、HDAC を阻害することにより HLA-class I 分子の発現が回復し、免疫細胞による細胞傷害に対する感受性が増強することが示唆されている。

(2) エピジェネティクス異常と分子標的治療

癌におけるエピジェネティクスに関連した薬剤療法が注目されている。従来、癌は遺伝子異常により、それらの本来の機能や制御が失活あるいは活性化し、正常な制御から逸脱することが主な原因と考えられてきた。しかし、実際には塩基配列の変化を伴うことなく、特定の遺伝子発現が変化し、この変化が細胞分裂後も維持され、結果的に癌の原因になる例が多数知られている。このようなエピジェネティクス機構の異常は、癌抑制遺伝子の不活性化機構のひとつと考えられ、癌の発生・進行に重要な役割を果たすことがわかってきている。癌細胞を HDAC 阻害剤で処理すると、ヒストンのアセチル化が誘導され、遺伝子の再発現が引き起こされると予想される。癌細胞において CpG アイランドが強くメチル化している遺伝子の再発現には、DNA の脱メチル化に伴うヒストン修飾が重要であり、引き続いて起こるアセチル化が遺伝子発現をさらに増強することが示唆される。遺伝子の再発現にはこれらの変化のうちどれか 1 つだけではなく、全てが調和してクロマチン再構築に貢献していると考えられる。

DNA メチル化による癌抑制遺伝子の silencing を解除すれば、治療効果も期待できることが予測され、すでにアメリカでは DNA メチル化阻害剤 5-azacytidine や 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC) が癌治療薬として FDA に承認されている。骨髄異形成症候群症例に対し、DNA メチル化阻害剤 5-azadC は効果的であった反面、以前は、高濃度投与による毒性が問題になった。最近の報告によれば、低濃度の 5-azadC を繰り返し投与することにより、急性骨髄性白血病症例において約 60% の奏功があった。HDAC 阻害剤のうち、MS-275、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、depsipeptide (FK228) はアメリカで白血病に対する Phase I 及び Phase II 臨床試験が行われており、有効性については今後の検討が期待されている。

(3) エピジェネティクス・免疫療法の開発

これまでに癌ワクチン療法の臨床試験を実施した国内外の多くの施設で、腫瘍抗原や HLA-class I 分子の発現の低下・欠失が、治療効果が不十分である原因として挙げられており、このような問題点を解決する手段として、エピジェネティック治療薬は非常に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞死を誘導するエピジェネティクス治療の有効性に加え、癌特異抗原や HLA 分子の発現への影響と、それらを認識する T 細胞の感受性について検討することを目的とする。また、将来的には癌ワクチン療法との併用の可能性を検証し、新しいエピジェネティック・免疫療法の科学的基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

DNA メチル化阻害剤、HDAC 阻害剤等で処理した上皮性腫瘍細胞株 (特に前立腺癌細胞と時細胞癌細胞) の生細胞解析やフローサイトメトリー等にて検討する。また、これら阻害剤添加後の癌細胞における転写因子の発現、分子機構、アポトーシスの有無等を、タンパク発現や mRNA 発現解析によって検討する。健常人末梢血より腫瘍特異的細胞傷害 T 細胞 (CTL) を *in vitro* で誘導し、薬剤処理した腫瘍細胞に対する CTL 活性を、サイトカイン再生量測定 (ELISA 法等) やフローサイトメトリー等により検討する。

4. 研究成果

効果的な癌細胞死を誘導する分子標的治療の有効性を検討するために、腎細胞癌、大腸癌、肺癌等で高発現していることが報告されている癌関連抗原 CA9 (Carbonic Anhydrase IX) に着目し、上皮性腫瘍のなかでも特に腎細胞癌及び前立腺癌細胞におけるエピジェネティック薬剤による CA9 発現と細胞増殖能への影響の解析に取り組んだ。前立腺癌細胞株 LNCap、PC-3、DU145 などを DNA メチル化阻害剤 5-aza-CdR にて処理後細胞増殖反応を検討したところ、いずれの細胞株でも増殖抑制はほとんどみられなかった。一方、同様に HDACi であるバルブロン酸や SAHA で処理した細胞株は、いずれも低濃度で顕著な細胞増殖抑制を示した。癌関連抗原 CA9 の発現欠失あるいは回復・増強やそれらに対する各種エピジェネティック薬剤処理の影響を調べるため、mRNA 発現解析を行ったが、癌関連抗原 CA9 の癌細胞における発現は失われることはなかった。よって、T 細胞に十分認識される状態を保ちつつ、エピジェネティクス薬剤により有効な細胞死が誘導されたことが示唆された。また、日本人の約 6 割が発現

する HLA-A24 分子に結合する CA9 由来ペプチドを用い in vitro で誘導した細胞傷害性 T 細胞が、HLA-A24 陽性上皮性腫瘍細胞株に対して細胞傷害活性を示すか検討したところ、必ずしも特異的な細胞傷害活性を示さなかった。

一方、癌病巣部は血流不足や細胞外 pH の低下などによって低酸素状態となっている。低酸素時に誘導される転写因子として HIF-1 があり、本研究の標的抗原のひとつ CA9 はその活性化経路において密接な関わりがある。腎細胞癌の 90%以上が淡明細胞癌でありその 70%以上で VHL 遺伝子に変異が認められる。VHL 遺伝子の変異が起こると正常な VHL タンパクが出来ず、HIF-1 が分解されずに蓄積し、その結果下流に位置する CA9 遺伝子が強発現すると考えられているので、癌局所の低酸素状態とそれに関連する転写因子及び標的抗原 CA9 発現調節を、低酸素条件下の癌細胞におけるエピジェネティック薬剤処理の影響の面からも今後は検討していきたい。

以上のような研究結果をふまえ、タンパクレベルでのさまざまな癌関連抗原や腫瘍特異抗原および HLA 分子の発現解析と、HDACi 等薬剤処理による発現増強を検討し、今後は細胞傷害性 T 細胞がより選択的に認識する腫瘍細胞と薬剤反応性を明らかにしていきたいと考える。また、健康人あるいは癌患者由来 T 細胞による細胞傷害性を検討することで、細胞性免疫と腫瘍細胞死の関連性を調べ、そのエビデンスに基づいた治療法を提案できると予想される。

国内でも癌ワクチン療法の臨床試験は進んでおり、治療効果も報告されている。免疫療法の弱点を補填し且つ増強という新しいエピジェネティックセラピーの開発は新規性がある。海外で認可が進む分子標的治療薬は、ある特定の腫瘍に適応されていることが多いが、この適応を広げ、さらには重篤な有害事象の報告が少ない免疫療法と組み合わせれば、化学療法及び癌ワクチン療法の問題点を克服し、新しい分子標的・免疫療法の確立につながると予想され、今後も研究の継続が望まれる。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Tongu M, Harashima N, Yamada T, Harada T, Harada M. Immunogenic chemotherapy with cyclophosphamide and doxorubicin against established murine carcinoma. *Cancer*

Immunol Immunother. 査読有. 59(5), 2009, 767-777.

② Kondo M, Murakawa Y, Harashima N, Kobayashi S, Yamaguchi S, Harada M. Roles of proinflammatory cytokines and the Fas/Fas ligand interaction in the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Immunology.* 査読有. 128, 2009, e589-599.

③ Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. *Cancer Sci.* 査読有. 100, 2009, 481-489.

④ Takahashi Y*, Harashima N*, Kajigaya S, Yokoyama H, Cherkasova E, McCoy JP, Hanada K, Mena O, Kurlander R, Tawab A, Srinivasan R, Lundqvist A, Malinzak E, Geller N, Lerman MI, Childs RW. (*These authors contributed equally to this work.) Regression of human kidney cancer following allogeneic stem cell transplantation is associated with recognition of an HERV-E antigen by T cells. *J Clin Invest.* 査読有. 118, 2008, 1099-1109.

[学会発表] (計 10 件)

① 原田守, TLR3 リガンドによる前立腺癌細胞のアポトーシス, 第 39 回日本免疫学会, 2009 年 12 月 2 日, 大阪。

② 原嶋奈々江, TLR3 リガンド刺激により誘導される type-I IFN を介する前立腺癌細胞の細胞死, 第 68 回日本癌学会, 2009 年 10 月 2 日, 横浜。

③ 原田守, Immunogenic chemotherapy with cyclophosphamide and adriamycin against established murine colon carcinoma. 第13回日本がん免疫学会, 2009年6月25日, 北九州。

④ 近藤正宏, 炎症性筋疾患の病態における炎症性サイトカインとFasの役割, 第38回日本免疫学会, 2008年12月1日, 京都。

⑤ 清水由紀子, 成人T細胞白血病の免疫学的リスクファクター, 第38回日本免疫学会, 2008年12月1日, 京都。

⑥ 頓宮美樹, Cyclophosphamideと adriamycinによる抗がん免疫応答の誘導, 第67回日本癌学会, 2008年10月29日, 名古屋。

⑦ 高橋義行, 同種造血幹細胞移植後の腎細胞癌患者由来T細胞が認識するHERV-E由来新規腫瘍抗原CT-RCCの同定とその発現解析, 第67回日本癌学会, 2008年10月29日, 名古屋。

⑧ 清水由紀子, 一部のHTLV-Iキャリアとくすぶり型ATLはTax特異的T細胞応答の減弱と高プロウイルス量を示す, 第67回日本癌学会, 2008年10月29日, 名古屋。

⑨ 神奈木真理, ATLおよびその前段階におけるTax特異的T細胞の低応答性:免疫学的ATL危険因子とその回避, 第1回HTLV-1研究会, 2008年8月24日, 東京。

⑩原嶋奈々江, 同種造血幹細胞移植後の腎細胞癌患者由来T細胞が認識する新規腫瘍抗原の同定とその発現解析, 第12回基盤的癌免疫研究会, 2008年7月2日, 埼玉。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
島根大学・医学部・助教
原嶋 奈々江 (HARASHIMA NANAE)

研究者番号 : 60345311

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :