

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 19590405
 研究課題名 (和文) 癌細胞発現内因性レトロウイルスの生物学的意義解明と
 有効な癌免疫制御法開発への応用
 研究課題名 (英文) Investigation of the significance of HERV expression in cancer cells
 for development of effective cancer therapy

研究代表者 工藤 千恵 (KUDOH CHIE)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号： 90424126

研究成果の概要: 様々な癌細胞に高発現している内因性レトロウイルス (HERV) 抗原に関する免疫学的・分子生物学的な解析を行った結果、1) HERV 抗原特異的に抗腫瘍活性を示す CTL を誘導できるペプチド配列 (CTL エピトープ) を同定し、さらに、2) 癌細胞における HERV の発現が、癌治療上問題視されている悪性因子「癌転移」と「免疫抑制」の両者に深く関与していることを解明した。「ワクチン効果」と「悪性要因除去」という二つの異なるアプローチで宿主免疫を効果的に増強できる可能性を提示し、新たな癌治療法として提案するに至った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：がん、内因性レトロウイルス、CTL エピトープ、転移、免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

「内因性レトロウイルス (ERV)」とは、かつて人類の DNA にインテグレートされて以来遺伝的に受け継がれている遺伝子で、全ヒトゲノムの約 1% を構成する。ヒト ERV (HERV) は、HERV K や HERV H, F, W など数十種類の family が同定されているが、最近、その中の数種類が、悪性黒色腫や乳癌、前立腺癌などの様々な癌腫で高発現しているこ

とが報告されている。例えば、HERV K は現在最も広く研究されており、癌患者血清中での抗 HERV K 抗体の検出や (Clin Exp Immunol 128:75-82, 2002)、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に特異的に認識されるエピトープペプチドの同定 (Cancer Res 62:5510-5516, 2002) などが報告されている。しかしながら、通常サイレント状態にある HERV がなぜ癌細胞でのみ高発現するようになるのか、癌細胞における

HERV 発現の生物学的意義や病態関連機序については、未だ明らかにされていない。

一方、研究代表者は、過去に種々の腫瘍抗原を標的とした癌ワクチン療法の研究開発に取り組み、その中で、マウスERV抗原に対する免疫反応が他の腫瘍抗原に対する免疫反応に比較して強く誘導され、しかも、そのERV特異的な抗腫瘍免疫は治療効果と極めて相関すること、治療が奏効しなかった個体ではほとんど誘導されないことを見出した (Clin Cancer Res 11:2416-2426, 2005, Clin Cancer Res 11:4533-4544, 2005)。この結果から、「ERVは自己抗原でありながら、元々はウイルス由来であるという“外来抗原”としての性質を併せ持っており、高い免疫原性を示すのではないか」、また、「この反応を発端として、腫瘍細胞が発現する様々な抗原に対する免疫反応が惹起・増幅され (antigen spreading)、その結果、宿主内の抗腫瘍免疫反応が全体的に増強されるのではないか」と推測した。つまり、ERVに対する免疫反応が惹起されれば、自己抗原である従来されてきた腫瘍抗原に比較して、より強力に抗腫瘍免疫を誘導でき、より効果的に癌を生体内から排除できるのではないかと期待した。

2. 研究の目的

本研究では、HERV family の中から免疫抑制活性部位を有する“クラス I”に所属するある特定の HERV 抗原を標的として、以下の二つを目的に実験を進めた。

(1) HERV 抗原を標的とした、従来に比しより強力な抗腫瘍免疫増強法の確立

まずは、様々な癌種の細胞株や臨床検体組織における HERV の発現を解析する。その結果に基づき、日本人に高発現する HLA-A24 に焦点を当て、HLA-A24 遺伝子導入マウスを用いて HERV の CTL エピトープペプチド候補をスクリーニングして数種を選択する。また、ヒト末梢血細胞を用いて、HERV 特異的な CTL 誘導活性を評価するとともに、従来の腫瘍抗原ペプチドの CTL 誘導活性と比較解析することで、優れた CTL 誘導活性を示す HERV ペプチドを見出す。

(2) 癌細胞における ERV 発現の意義・機能に

関する分子生物学的・免疫学的解析

ERV 遺伝子に特異的な阻害作用を示す siRNA を用いて、癌細胞の増殖能や浸潤・転移能、サイトカイン産生能などの細胞機能に及ぼす影響や、この腫瘍細胞が宿主免疫に及ぼす影響などを *in vitro* と *in vivo* の両面から解析し、癌病態機序の解明に結び付ける。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞における HERV 遺伝子発現の解析

HERV が広範な癌腫に発現しているか否か、治療の標的となり得るか否かを検証するため、種々のヒト腫瘍細胞株ならびに大腸癌患者より採取した癌部・非癌部組織、各種正常組織について、HERV 遺伝子の発現量を RT-PCR 法で解析した。

(2) HERV の CTL エピトープの同定

HERV に対する免疫応答を解析するため、日本人で高発現する HLA-A24 に焦点を当て、HLA 結合予測アルゴリズム BIMAS を活用して HLA-A24 拘束性 CTL エピトープペプチドを構築した。まずは、HERV 特異的に細胞傷害活性を誘導し得るペプチド候補を選出するため、HLA-A24 遺伝子導入 (A24-Tg) マウスを用いてスクリーニングを行い、数種に絞り込んだ。すなわち、A24-Tg マウスより採取した骨髄由来樹状細胞をペプチドで刺激し、それを A24-Tg マウス皮下に 1~2 回接種した。最終免疫から 1 週間後、そのマウスから脾臓細胞を採取してペプチドで刺激し、その 1 週間後に培養系から分離した CD8 T 細胞をペプチドで再刺激したときの IFN- γ 産生量を指標に、各ペプチドの CTL 誘導活性を比較・解析した。

次に、ヒト末梢血細胞を用いて、A24-Tg マウスを用いた実験で選出されたペプチドがヒトにおいても HERV 特異的な CTL を誘導できるか否かを検討した。すなわち、HLA-A24 陽性健康人より採取した末梢血由来 CD8 T 細胞をペプチドで数回刺激し、最終刺激 1 週間後にペプチドで再刺激したときの CD8 T 細胞からの IFN- γ 産生量ならびに HLA-A24 陽性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を指標に、各ペプチドの CTL 誘導活性を比較解析した。さらに、従来ワクチン療法で使用されている他の腫瘍抗原ペプチド (CEA, WT1, NY-ESO-1, SAGE) と CTL 誘導活性を比較解析する一方で、それらの腫瘍抗原ペプチドと組み合わせた

場合の増強効果（アジュヴァント効果）についても評価した。

(3) 癌細胞における ERV 抗原発現の意義・機能の解析

癌の悪性形質、例えば、腫瘍細胞の増殖や転移能、腫瘍による宿主免疫の抑制や回避などと腫瘍細胞における ERV 発現との関連性を追究するため、ERV 遺伝子を特異的に阻害する siRNA を用いて、ERV 発現操作による腫瘍細胞の変化、ならびに、その腫瘍細胞が宿主免疫に及ぼす影響について、*in vitro* と *in vivo* の両面から分子生物学的・免疫学的に解析した。すなわち、HERV 陽性のヒト腫瘍細胞株またはマウス ERV 陽性のマウス腫瘍細胞株に、それぞれの ERV 特異的な siRNA を PEI 法で導入し、ERV 発現低下に伴う細胞の増殖能や浸潤能を評価した。また、siRNA 導入腫瘍細胞、または、siRNA 導入腫瘍細胞と 5 日間共培養した免疫細胞について、表面抗原の発現量などをフローサイトメトリーで解析した。

一方、マウスを用いて、*in vivo* 個体レベルで ERV に対する免疫応答を解析した。すなわち、HERV 特異的な siRNA を導入したヒト腫瘍細胞株とヒト末梢血細胞を免疫不全マウスへ同時に移入し、1 週間後の腫瘍転移や免疫細胞表面抗原発現量などを解析した。また、マウス腫瘍細胞株をマウス皮下に移植して 1 週間後、マウス ERV 特異的な siRNA を腫瘍内に直接注入し、その後の腫瘍の増殖や転移を観察・測定した。

4. 研究成果

種々のヒト腫瘍細胞株ならびに各種正常組織における HERV 遺伝子の発現を RT-PCR 法で解析した結果、膀胱癌、大腸癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、白血病、食道癌では 100%、肺癌では 90%、前立腺癌では 80%、悪性黒色腫では 70%、腎癌株では 40% と、広範な癌腫に高率に発現していること、しかし、正常組織では精巣でわずかにしか検出されないことが分かった。また、大腸癌患者より採取した大腸組織についても、非癌部組織と比較して癌部組織において、特に、STAGE I に比較してより進行期の STAGE II/III の癌部組織において HERV 発現がより高く見られることが分かった。つまり、腫瘍特異的な抗原とし

て、癌治療の標的分子となり得る可能性が示唆された。

そこで、HLA 結合予測アルゴリズム BIMAS を活用して、HERV の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープを数種構築し、上位スコアに位置するペプチドについて、A24-Tg マウスを用いて、CD8 T 細胞からの IFN- γ 産生量を指標に CTL 誘導活性を比較した。本スクリーニングでは、対照として、既に確立されている他の腫瘍抗原 HLA-A24 拘束性ペプチド「SAGE」を用いたが、この SAGE の活性と比較して、2~4 倍高い活性を示すペプチドが 3 種含まれることが分かった。次に、それらのペプチドがヒトにおいても HERV 特異的な CTL を誘導できるかを明らかにするため、健康人末梢血細胞を用いて、ペプチドで刺激した CD8 T 細胞からの IFN- γ 産生量ならびに HLA-A24 陽性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を指標として、HERV 特異的な CTL 誘導能を評価した。その結果、1) 3 種のペプチドいずれもが、ヒトにおいても HERV 特異的な CTL を誘導できたが、その中の 1 つが特に高い CTL 誘導活性を示すこと、2) その活性は、既に確立されている SAGE や CEA などの HLA-A24 拘束性ペプチドの活性と比較して数倍高いこと、3) HERV ペプチドをそれらのペプチドと混合して併用すると、それぞれの活性を強く増強できるアジュヴァント効果が見られることを明らかにした。したがって、今回確立した HERV ペプチドは、癌ワクチン療法として有用である可能性が期待され、HERV の遺伝子発現が様々な癌種で高率に検出されたことから、広範な癌患者の治療に適用できる可能性も示唆された。

一方、ヒトの大腸癌細胞株や膀胱癌細胞株、または、マウスの大腸癌細胞株やメラノーマ細胞株を用いて、HERV 遺伝子に特異的に阻害作用を示す siRNA を導入した際の影響について、癌細胞側と宿主免疫側の両面から解析した。その結果、siRNA 導入による HERV 阻害に伴って、1) 上皮間葉転換 (EMT) または細胞の運動性・転移性に深く関与する遺伝子群の発現が顕著に低下し、細胞の浸潤能が有意に抑制されること、2) これと同時に、抗腫瘍免疫応答に必須の樹状細胞や CD8 細胞などに抑制的に作用する因子の遺伝子発現も同時に低下することを明らかにした。実際に、HERV 特異的な siRNA を導入して浸潤能が低下し

た腫瘍細胞とヒト末梢血細胞を共培養したとき、siRNAを導入しない腫瘍細胞との共培養と比較して、免疫抑制性の樹状細胞や制御性T細胞の誘導が有意に抑制されることが判明した。したがって、我々が標的としたHERVは、「癌転移」のみならず、癌転移と同様に癌治療上の大きな問題となっている「免疫抑制」をも同時に制御している可能性が示唆された。つまり、癌細胞のHERV発現を阻害することによって、その両者を同時に阻害できると考えられ、このアプローチもまた有用な癌治療法の一つになるかも知れないと期待された。

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1件)

(1) Chie Kudo Saito, Hiromi Shirako, Tadashi Takeuchi and Yutaka Kawakami: Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during snail-induced EMT of cancer cells, Cancer Cell 15: 195-206, 2009、査読有

[学会発表](計8件)

(1) 発表代表者: 工藤千恵
発表標題: DC impairment by IL-13 from human colon cancer cells during EMT
学会名: 日本免疫学会
発表年月日: 2008年12月1日
発表場所: 京都

(2) 発表代表者: 工藤千恵
発表標題: Enhancement of immunoescape of cancer cells by HERV expression
学会名: 日本癌学会
発表年月日: 2008年10月29日
発表場所: 名古屋

(3) 発表代表者: 工藤千恵
発表標題: Simultaneous inhibition of tumor metastasis and immunosuppression induced by tumor cells during EMT utilizing MCP-1 blockade
学会名: 日本癌学会
発表年月日: 2008年10月29日
発表場所: 名古屋

(4) 発表代表者: 工藤千恵
発表標題: Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during snail-induced EMT of cancer cells
学会名: 日本がん免疫学会(旧SFCl)
発表年月日: 2008年7月2日
発表場所: 大宮

(5) 発表代表者: 工藤千恵
発表標題: Immunosuppressive mechanisms induced by tumor cells during EMT leading to tumor metastasis
学会名: 米国癌学会議
発表年月日: 2008年4月14日
発表場所: 米国・サンディエゴ

(6) 発表代表者: 工藤千恵
発表標題: Possible mechanism of metastasis enhancement during EMT by mediating via immunosuppression involving Treg cells
学会名: 日本免疫学会
発表年月日: 2007年11月22日
発表場所: 東京

(7) 発表代表者: 工藤千恵
発表標題: Induction of Foxp3+ regulatory T cells by colon cancer cells during EMT
学会名: 日本免疫学会
発表年月日: 2007年11月22日
発表場所: 東京

(8) 発表代表者: 工藤千恵
発表標題: Immunosuppressive mechanism induced by tumor cells during EMT
学会名: 日本癌学会
発表年月日: 2007年10月5日
発表場所: 横浜

[産業財産権]

出願状況(計2件)

(1) 名称「腫瘍細胞による免疫抑制の解除剤とそれを用いた抗腫瘍剤」
発明者: 工藤千恵
権利者: 慶應義塾
種類・番号: PCT/JP2008/064987
出願年月日: 2008年8月22日
国内外の別: 国内・国外

(2) 名称「がんの診断方法と治療方法」

発明者：工藤千恵

権利者：慶應義塾

種類・番号：特願 2008 -239943

出願年月日：2008 年 9 月 18 日

国内外の別：国内

〔その他〕 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

工藤 千恵 (KUDO -SAITO CHIE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90424126

(2)研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50161287

(3)連携研究者

特になし