

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04704

研究課題名(和文) 修飾核酸を標的とした新規がん免疫病態診断マーカー探索と個別化がん免疫療法への応用

研究課題名(英文) Investigation of the modified nucleic acid for novel cancer evaluation marker candidates and its diagnostic application.

研究代表者

富岡 佳久 (Tomioka, Yoshihisa)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00282062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1抗体等によるがん免疫療法が臨床応用された。しかし、がん免疫病態の個体差は大きい。異なる免疫抑制の仕組みを標的とした免疫療法やその免疫病態を診断する新しい方法が期待される。本研究では、がん病態への関与が古くから示唆されるがその体内動態や免疫機能が不明な修飾核酸に着目し、その量的・質的変動を精密かつ包括的に把握する分析法を開発した。また、メチル化アデノシン等の核酸がT細胞の活性化を抑制することを見出し、修飾核酸ががん免疫抑制病態に関与する可能性を示唆した。この成果は、従来とは異なる新基準でがんの免疫病態を把握し、治療できる可能性を示唆し、がん治療の更なる発展への貢献が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、古くからがん病態に関与している可能性が示唆されていた修飾核酸類に着目し、精密に解析可能な修飾核酸メタボロミクスを開発し、修飾ヌクレオシドの量的・質的変動を基にがん免疫病態を診断し、従来の腫瘍マーカーとは異なる新基準でがん患者を個別化・層別化することを目的とした。この修飾核酸を新基準としたがん免疫病態の診断や修飾核酸を介したがん免疫抑制経路の発見は、新たながんの精密医療の発展に大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Cancer immunotherapy with PD-1 antibody has been applied in clinical settings. Because pathological conditions are differences in each cancer patients, it is expected to develop an evaluation for different immune suppression mechanism such as PD-1 and/or PD-L1. In this study, we focus on modified nucleosides and nucleotides that have long been implicated in cancer pathologies, but whose pharmacokinetics and immune function is still unknown in many ways. The quantitative, qualitative, accurate, and comprehensive methods were developed in this study, We also found that nucleic acids such as methylated adenosine suppress T cell activation, suggesting that modified nucleic acids may be involved in cancer immunosuppression. This result indicates the possibility that cancer immunopathology can be grasped and treated based on a new standard different from the past, and it can be expected to contribute to the further development of cancer treatment.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：修飾核酸 アデノシン メタボロミクス

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍内微小環境には宿主免疫応答を抑制するメカニズムが存在する。PD-1 や CTLA4 等の免疫抑制分子を標的とした抗体医薬の成功は、免疫抑制経路の抑制が腫瘍免疫の増強に有効であることを証明した。しかしながら、がんにおける免疫抑制機序は冗長かつ多様であり、その免疫病態には大きな個体差が存在する。したがって、がん免疫病態を反映する腫瘍関連バイオマーカーの探索と PD-1、CTLA4 に続く、がん免疫応答を制御する新規免疫抑制経路の発見は、がん患者の免疫病態に適した個別化がん免疫療法の実現に大きく貢献する。

細胞障害に起因して分泌される ATP が danger signal として免疫系を活性化することが明らかになってきた。CD39 と CD73 (ecto-5'-nucleotidase) は ATP を adenosine に分解し、T 細胞やミエロイド系細胞に発現する adenosine 受容体 (AR) の活性化を介して、ATP による過剰な免疫反応を抑制する。研究分担者の塚本らは、マウス移植片対宿主病において、CD73 が細胞外 adenosine を産生し、A<sub>2A</sub>AR の活性化を介したドナー異系 T 細胞の免疫抑制機序をはじめて明らかにした (Tsukamoto H., *et al.*, *Blood*. 2012;119(19):4554-64.)。このように CD73/Adenosine/AR 経路はがん免疫抑制機序の一端を担うことが明らかになりつつあり、腫瘍内に浸潤した制御性 T 細胞やミエロイド由来免疫抑制細胞、そしてがん細胞の多くが CD73 を高発現し、Adenosine-rich な腫瘍内微小環境の形成が示唆される。腫瘍内 adenosine は、エフェクター T 細胞や NK 細胞、あるいはミエロイド系細胞の AR を活性化し、宿主免疫応答を抑制する。一方、CD73 阻害抗体は adenosine/AR 経路による免疫抑制を解除し、内在性腫瘍免疫応答を賦活化することが報告された。申請者らも CD73 阻害薬が異系 T 細胞輸注療法による移植片対腫瘍効果を増強し悪性リンパ腫の再発を抑制することや (Tsukamoto H., *et al.*, *Blood*. 2012;119(19):4554-64.)、A<sub>2A</sub>AR 選択的アゴニストによる白血球遊走阻害とその作用機序を解明した (Yago T., *et al.*, *J Immunol*. 2015;195(8):3880-9.)。このような CD73/adenosine/AR 経路による腫瘍内微小環境の免疫抑制機序が示唆される一方、腫瘍由来 Adenosine による免疫抑制を直接的に証明した研究は乏しい。Adenosine による免疫抑制の概念は、AR や CD73 のノックアウトマウス・ノックダウンがん細胞、AR 選択的アゴニスト・アンタゴニスト、あるいは CD73 阻害薬・阻害抗体等を用いた間接的エビデンスに基づく場合がほとんどであり、adenosine を含むヌクレオシドの体内動態や直接的作用については不明な点が多い。Adenosine ががん免疫における真の内因性免疫抑制分子であるのか？ 我々は、機能的ヌクレオシドの存在を想定し、がん免疫を制御する新規免疫抑制経路を予想する。

メチル化等の修飾を受けた tRNA 中の修飾核酸は、サルベージ経路で再利用されずに遊離型修飾ヌクレオシドとして細胞外に排泄される。代謝が活発ながん細胞では RNA ターンオーバーが亢進し、その血液や尿は多量の修飾ヌクレオシドを含む。また、腫瘍組織ではエピジェネティック異常による RNA 修飾異常・修飾不全が報告され、がん特異的に化学修飾された tRNA 分子種も示唆される。修飾核酸を多量に含むがん性腹水には強い免疫抑制活性が存在し、古くにはいくつかの修飾ヌクレオシドが免疫抑制分子として同定された経緯がある。しかしながら、エピジェネティクス異常によるがん化のメカニズム解明が進む一方、エピジェネティックな代謝産物である修飾核酸のがん免疫病態における機能や体内動態の多くは不明である。これは、修飾核酸が多様な構造異性体や類似体からなる不均一な分子群であることに起因し、構造選択的な包括的解析基盤が乏しいことに起因する。我々は、修飾ヌクレオシド群を標的とした液体クロマトグラフィー (LC)-タンデム質量分析 (MS/MS) によるメタボロミクス解析技術の開発を進め、虚血性疾患等における 1-methyladenosine の酸化ストレス応答 (Mishima E, *et al.*, *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(10):2316-26)、また、ゲノム DNA に極微量に存在する 5-hydroxymethylcytosine と 5-methylcytosine の MLL-TET1 融合蛋白質によるエピジェネティック制御の一端 (Tsuji M., *et al.*, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014;953-954:38-47) を明らかにしてきた。このような LC-MS/MS による構造選択的な修飾核酸解析技術はがんにおける修飾核酸の動態を精密に捉えるうえで有力なアプローチになり得る。

## 2. 研究の目的

本研究では、修飾核酸の標的メタボロミクスによる、「がん免疫病態を診断する腫瘍関連バイオマーカーの探索・同定」と「個別化がん免疫療法の新しい治療戦略への応用」を目的とし、以下を明らかにする。

- (1) がん病態における修飾ヌクレオシドの包括的体内動態の把握とがん特異的あるいはがん種特異的修飾ヌクレオシドの探索技術として、LC/MS/MS による修飾ヌクレオシドの標的・非標的メタボロミクス解析法を構築する。
- (2) 修飾ヌクレオシドのメタボロミクス解析により、担がん状態の血液中、尿中及びがん組織中で増加する修飾ヌクレオシドの探索とがん病態、宿主免疫能との相関性を解析する。
- (3) 腫瘍組織内で増加した修飾核酸のがん病態における免疫学的機能と作用機序を解明する。
- (4) がん患者における腫瘍関連修飾ヌクレオシドの体内動態とがん病態、免疫機能との相関性を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) LC/MS/MS による修飾核酸の標的メタボロミクス解析基盤の構築

修飾ヌクレオシド選択的 SRM transition と LC クロマトグラフィー条件の検討により、尿中由来の主要 adenosine、guanosine、cytidine、uridine 誘導体間の構造選択的定量法を構築する。  
血液、尿、腫瘍組織からの試料調製法を確立し、修飾核酸標的メタボロミクスの解析基盤を確立する。

#### (2) 腫瘍関連修飾ヌクレオシド標的メタボロミクスによる探索とがん免疫病態との相関解析

担癌マウスを作製し、構築した修飾核酸の標的メタボロミクスにより、移植前と移植後 1 週間毎に最大 8 週間の血中、尿中及び腫瘍組織中主要修飾ヌクレオシドの体内動態を継時的に解析する。担癌マウスは、マウス腫瘍細胞の場合は同系マウスへの皮下・腹腔移植、ヒト腫瘍細胞の場合は、超免疫不全の NOD-scid マウスに移植を行い作製する。

担癌マウスの修飾核酸メタボロームとがん病態、免疫機能との相関性を解明するため、血液学検査、血清生化学検査、脾臓やリンパ節細胞の免疫学的解析、腫瘍組織の病理解析や転移の有無について解析する。

#### (3) 非標的メタボロミクスによる、新規腫瘍関連修飾ヌクレオシドの探索

主要修飾ヌクレオシドの標的メタボロミクスに加え、標準品の存在しない多くの修飾核酸を対象に、非標的メタボロミクスを実施する。約 50 種の既知修飾ヌクレオシドの推定 SRM transition を設定し、担がんマウス特異的に増加する修飾ヌクレオシドを探索する。Collision-induced dissociation における開裂パターンを解析し、TripleQ 型質量分析装置を用いた neutral loss scan や precursor ion scan による修飾ヌクレオシドの探索を実施する。

担がん状態により高度な発現増加が示唆された候補修飾ヌクレオシドは、その MS/MS スペクトルや既知の代謝物データベースを基に構造予測を行い、標準品化合物を合成する。標準品との比較により候補 m/z の帰属を行い、TripleQ 型 MS を用いた SRM 定量分析によりがん病態における体内動態を明らかにする。

#### (4) 腫瘍関連修飾ヌクレオシドの免疫抑制機序の分子・細胞生物学的解析

担癌マウスで増加が認められた腫瘍関連修飾ヌクレオシドの免疫抑制機能を、ヒトやマウスの T 細胞、NK 細胞、骨髄由来樹状細胞、骨髄由来マクロファージ等を用いてその免疫活性を解析する。

修飾ヌクレオシドの AR 依存性を、AR サブタイプ選択的アゴニスト・アンタゴニスト、各 AR サブタイプのノックダウン・ノックアウト等で明らかにする。

#### (5) がん免疫における腫瘍関連修飾ヌクレオシドの機能解析

同定した腫瘍関連修飾ヌクレオシドを担がんマウスに投与し、腫瘍増殖や転移、がん免疫応答を in vivo 解析する。

腫瘍関連修飾ヌクレオシドの産生や分泌経路が既知の場合、それら経路に関わる遺伝子のノックアウト・ダウンや過剰発現がん細胞株を作製し、担がんマウスにおける腫瘍増殖、転移、がん免疫応答の変化を解析する。

AR アゴニストやアンタゴニストによる薬理的アプローチによって、がん免疫応答における機能性修飾ヌクレオシドの AR 依存性を解析する。

#### (6) がん患者における腫瘍関連修飾ヌクレオシドの体内動態とがん病態、免疫機能との相関解析

担がんマウスで得られた知見を基に、がん免疫病態を反映する腫瘍マーカーとしての有用性をがん患者で検証する。異なる癌種あるいはステージのがん患者から腫瘍組織や血液、尿試料を採取し、ヒトがん病態における腫瘍関連修飾ヌクレオシドの体内動態とがん病態、免疫機能の相関性を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) LC/MS/MS による修飾核酸の標的メタボロミクス解析基盤の構築

極性化合物の保持に有用なアダマンチル基が導入された ADME カラムを用いることで構造が極めて類似する修飾ヌクレオシド類の LC による分離を達成した。MS/MS による SRM と組み合わせることで 11 種類の修飾核酸 (guanosine, adenosine, uridine, cytidine, inosine,

1-methyladenosine, 5-methylcytidine, 2'-O-methylcytidine, 3-methylcytidine, 7-methylguanosine, 5-methyluridine, pseudouridine, 2-thiocytidine, N2-methylguanosine, N2,N2-dimethylguanosine)を分離分析できる条件を設定した。2-fluoro-2'-deoxyadenosineを内標準物質として用いることで、水溶液中をマトリックスとした添加回収試験において良好な真度、精度を達成することができた。しかしながら、血液試料を用いた場合、各種有機溶媒による除タンパクのみでは血液試料等によるマトリックス効果によるイオン化抑制が大きく、信頼性の高い修飾核酸の測定が困難であった。そこで、問題となるマトリックス効果の影響を回避するために、測定対象物質と物性が極めて類似した安定同位体標識修飾ヌクレオシド (inosine-<sup>15</sup>N<sub>4</sub>, 2'-O-methylcytidine-d<sub>3</sub>, 5-methylcytidine-d<sub>3</sub>, cytidine-d<sub>2</sub>, uridine-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, 1-methyladenosine-d<sub>5</sub>, 6-methyladenosine-d<sub>3</sub>, guanosine-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>, adenosine-d<sub>2</sub>, 7-methylguanosine-d<sub>3</sub>, 3-methylcytidine-d<sub>3</sub>)を有機合成あるいは入手した。これら安定同位体標識ヌクレオシドを各内部標準物質として用い LC-MS/MS 条件を最適化したところ、血液試料においても FDA・厚生労働省のバリデーションガイドラインの要件である日内及び日間再現性試験の真度が±15%以内(定量下限では±20%以内)、精度が±15%以内(定量下限では±20%以内)の基準を満たすことができた。

#### (2) 腫瘍関連修飾ヌクレオシド標的メタボロミクスによる探索とがん免疫病態との相関解析

C57BL/6 マウスを宿主とし、遺伝的同系の各種がん細胞株(B16 悪性黒色腫、EL4 リンパ腫、Lewis lung 3LL 転移性肺がん、MC38 大腸がん、MCA205 肉腫等)の担癌マウスを作製した。これら担癌マウスにおいて、MC38 は特に PD-1 抗体、PD-L1 抗体に感受性が高く、3LL は全く感受性を示さなかった。また、予備検討では、MCA205、EL4、B16F10 は PD-1 あるいは PD-L1 抗体に感受性は低いものの腫瘍成長を抑制する傾向が示唆された。最も難治性であると考えられる 3LL 担癌マウスから、腫瘍接種前後の血液試料を経時的に採取したので、標的・非標的メタボロミクス解析基盤が確立後、修飾核酸を測定する予定である。

#### (3) 非標的メタボロミクスによる、新規腫瘍関連修飾ヌクレオシドの探索

ヌクレオシドの多くは LC-MS/MS における collision-induced dissociation によってリボースと塩基の間で特異的に開裂することが多いことを見出した。そこで、約 50 種の既知修飾ヌクレオシドの推定 SRM transition を設定し、担がんマウス特異的に増加する修飾ヌクレオシドを探索する分析条件を検討中である。測定条件が確立後、上記の担癌マウス血液を使った非標的メタボロミクス解析を実施予定である。

#### (4) 腫瘍関連修飾ヌクレオシドの免疫抑制機序の分子・細胞生物学的解析

血液、尿中に含まれ、がん患者や担癌マウスでの増加が報告されている 1-methyladenosine が CD3 抗体クロスリンクで誘導されるマウス脾臓 T 細胞の増殖を有意に抑制することを見出した。一方、リンパ球活性化マーカーである CD69 の発現誘導に対する 1-methyladenosine の抑制効果はわずかであった。この結果から、CD73 による T 細胞の活性化を完全に抑制するのではなく、そのシグナル経路を部分的に抑制することが示唆された。

さらに、adenosine の前駆体である adenosine monophosphate (AMP) を始めとしたヌクレオシド 1 リン酸についても T 細胞抑制効果を検討したところ、adenosine よりも低濃度で CD3 /CD28 抗体刺激による T 細胞増殖を抑制することが示唆された。また、同様の T 細胞抑制活性が、6-methyladenosine monophosphate や guanosine monophosphate (GMP) でも認められ、一方、inosine, cytidine, uridine, xanthine monophosphate (IMP, CMP, UMP, XMP) では認められなかった。この AMP と GMP による T 細胞抑制効果は CD73 阻害薬 adenosine 5'-( $\gamma$ -methylene)diphosphate によって有意に回復し、脾臓細胞から CD4 T 細胞と CD8 T 細胞をネガティブセレクションで単離して CD3 /CD28 刺激した場合も認められた。したがって、AMP と GMP は CD73 依存的に T 細胞に直接的作用し、その活性化を抑制することが示唆された。また、TCR/CD3 複合体下流のシグナルを直接的に活性化する PMA/ionomycin で刺激した場合も AMP と GMP は T 細胞のクローン増殖を抑制したことから作用の標的は TCR/CD3 複合体の下流のシグナルの抑制である可能性が示唆された。さらに、MHC-I, -II 拘束性に OVA ペプチド断片に反応する T 細胞受容体組換えマウス OT-I, -II の脾臓細胞を用いて検討した場合においても、AMP と GMP は OVA ペプチドによる抗原特異的 T 細胞応答を抑制した。

AMP、GMP、6-methyladenosine monophosphate に T 細胞抑制活性が認められ、IMP、CMP、UMP、XMP にはその活性が認められなかったことから、ecto-5'-nucleotidase である CD73 の基質特異性について解析した。C 末端の glycosylphosphatidylinositol アンカー構造を欠く CD73 組換えタンパク質発現ベクターを作製し、分泌型 CD73 を高発現する CHO 安定発現細胞を作製した。本細胞の無血清順化培養液を回収し、CD73 の C 末端に付与した 6×His タグを用いてニッケルアフィニティー精製を行い、CBB 染色によって単一バンドの CD73 組換え蛋白質として精製することに成功した。LC-MS/MS による核酸解析では基質である nucleoside monophosphate によるイオン化抑制等が示唆されたため、nucleoside monophosphate の代謝により生成するリン酸イオンを定量する malachite green colorimetric assay を構築した。本法を用いて CD73 の各 nucleoside

monophosphate に対する酵素学的パラメーターを算出したところ、AMP や GMP だけでなく、T 細胞抑制活性が認められなかった IMP、CMP、UMP、XMP も基質にすることが示唆された。

( 5 ) がん免疫における腫瘍関連修飾ヌクレオシドの機能解析

担癌マウスにおける修飾ヌクレオシドの動態を解析中である。結果が得られ次第、標的となる核酸の in vivo 解析を実施する。

( 6 ) がん患者における腫瘍関連修飾ヌクレオシドの体内動態とがん病態、免疫機能との相関解析

担癌マウスにおける修飾ヌクレオシドの動態を解析中である。結果が得られ次第、引き続きがん患者における探索を行う。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kanemitsu Y, Asaji K, Matsumoto Y, Tsukamoto H, Saigusa D, Mukawa C, Tachikawa T, Abe T, Tomioka Y. Simultaneous quantitative analysis of uremic toxins by LC-MS/MS with a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange tri-modal mixed-mode column. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2017;1068-1069:1-8. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.10.009. 査読有

Jinno D, Kanemitsu K, Saitoh K, Nankumo S, Tsukamoto H, Matsumoto Y, Abe T, Tomioka Y. Rapid and selective simultaneous quantitative analysis of modified nucleosides using multi-column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Analytical Science and Technology 8:1 (2017). doi 10.1186/s40543-017-0110-4. 査読有

Hasegawa K, Tagawa M, Takagi K, Tsukamoto H, Tomioka Y, Suzuki T, Nishioka Y, Ohru T, Numasaki M. Anti-tumor immunity elicited by direct intratumoral administration of a recombinant adenovirus expressing either IL-28A/IFN- 2 or IL-29/IFN- 1. Cancer Gene Ther. 2016;23(8):266-77. doi: 10.1038/cgt.2016.29. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

塚本宏樹、久保田佳苗、富岡佳久

ToII 様受容体 4 刺激抗体による抗腫瘍 T 細胞誘導を介したがん免疫療法  
第 91 回日本生化学会大会、2018 年

塚本宏樹、久保田佳苗、富岡佳久

ToII 様受容体 4(TLR4)刺激抗体によるがん免疫療法の開発  
医療薬学フォーラム 2018/第 26 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2018 年

平本航大、松本洋太郎、塚本宏樹、富岡佳久

修飾核酸の高精度一斉定量系の構築  
第 57 回日本薬学会東北支部大会、2018 年

永井滉士、三枝大輔、山崎貴広、金光祥臣、塚本宏樹、池田均、矢富裕、松本洋太郎、富岡佳久

LC-HDMS および IMS を用いたヒト肝癌組織メタボロミクスによる新規バイオマーカーの同定  
第 56 回日本薬学会東北支部大会、2017 年

齋藤一樹、金光祥臣、田中晃佑、鈴木千登世、阿部高明、塚本宏樹、松本洋太郎、富岡佳久

LC-MS を用いた細胞内サイクリック ADP リポース高感度定量法の構築  
日本薬学会第 137 年会、2017 年

齋藤一樹、田中晃佑、鈴木千登世、阿部高明、金光祥臣、塚本宏樹、松本洋太郎、富岡佳久

サイクリック ADP リポース安定同位体の合成  
日本薬学会第 137 年会、2017 年

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~gankagak/Gann\\_Top.html](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~gankagak/Gann_Top.html)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松本 洋太郎

ローマ字氏名：( MATSUMOTO, Yotaro )

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院薬学研究科

職名：講師

研究者番号 ( 8 桁 ): 90420041

研究分担者氏名：塚本 宏樹

ローマ字氏名：( TSUKAMOTO, Hiroki )

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院薬学研究科

職名：助教

研究者番号 ( 8 桁 ): 70423605

(2)研究協力者

研究協力者氏名：沼崎 宗夫

ローマ字氏名：NUMASAKI, Muneo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。