

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07177

研究課題名（和文）肺腺癌の腫瘍細胞のみをピンポイントに排除するがん免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of cancer immunotherapy pinpointing tumor cells of lung adenocarcinoma

研究代表者

中嶋 幹郎（Nakashima, Mikiro）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・教授

研究者番号：00260737

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）：本研究は治療すべき腫瘍細胞のみに選択的にがん免疫治療薬が働くような目印となる分子（腫瘍細胞由来）とその異常な分子の形を特定する研究である。本研究ではまず、がん免疫治療薬であるニボルマブで効果が認められた患者の血液から目印候補となる複数の分子を同定した。そして、この分子中で異常な形を形成し機能異常のもととなる部分構造を特定する手法を開発し、患者検体から当該構造部分を特定し治療開発につなげる基盤を完成させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は「どうすれば、がん細胞のみを免疫治療できるか？」という点を腫瘍細胞に含まれる異常分子の特定構造を切り口に解決するものである。本研究はヒト免疫で認識され形成された抗原-抗体複合体から異常分子とその異常構造を特定する独自解析法を治療開発につなげる基盤研究である。本研究はがん免疫治療におけるがん細胞への治療効率性と正確性の向上につながり、がん治療成績の改善に発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This research is to identify molecules that serve as markers that allow cancer immunotherapeutic drugs to act selectively only on tumor cells to be treated, and to identify the abnormal molecular shapes. In this study, we first identified multiple candidate markers in the blood of patients who responded to nivolumab, a cancer immunotherapeutic drug. Then, we developed a method to identify the partial structure that forms the abnormal shape in this molecule and causes the functional abnormality, and completed the foundation for identifying the relevant structural part from patient specimens and connecting it to the development of treatment.

研究分野：医療薬学

キーワード：免疫チェックポイント阻害剤 免疫複合体 抗原エピトープ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は重要な成果を挙げつつあるが、「いかにがん細胞のみを免疫治療できるか」が今後の課題である。がん細胞のみを免疫標的とするには、がん細胞にしかない (特に細胞表面) 変異タンパク質 (Tumor-associated antigen, TAA) とその変異部分 (エピトープ) を特定しなければならない。例えば、TAA エピトープの配列情報を、がんを特異的に攻撃できる T 細胞を体外で人為的に大量作製して投与する「遺伝子改変 T 細胞療法」での改変情報に使用すれば、がん細胞を選択的に排除する効果が格段に向上するはずである。また、同じ臓器腫瘍で TAA が同じでも患者ごとにエピトープが異なれば、個別のエピトープの特定が必要になる。よって、TAA とエピトープを正確・迅速に特定する手段の開発が課題解決に重要となる。

一方、TAA とそのエピトープの探索には、腫瘍に浸潤している T 細胞の受容体 (TCR) 解析や組織の遺伝子変異解析からのアプローチがとられてきたが、以下の問題がある。

TCR の抗原親和性は非常に低く、腫瘍に浸潤している T 細胞でも抗原親和性の高い TCR 解析は望めない (Huang, PNAS 2016)。特定の T 細胞のクローン化などにも時間がかかる。

タンパク質の自己抗原化でおきる自己免疫疾患は自己反応性 T 細胞の数が少ないことが知られている (McInnes, NEJM 2011)。腫瘍認識する T 細胞の数はさらに少ないと予想される。

遺伝子解析から TAA が精力的に探索されている。遺伝子解析では遺伝子変異以外の理由で変異した TAA、例えばスプライシング異常や翻訳後修飾異常での TAA が探索範囲に含まれない。腫瘍組織を採取できない臓器や患者であれば、TCR 解析や遺伝子解析はできない。

我々のグループは免疫複合体抗原の網羅的解析法を開発し、自己免疫疾患・感染症で新規の疾患特異的抗原を報告してきた。そして、独自開発した免疫複合体抗原の選択的な溶出法で世界最高感度の抗原検出が可能となっている。

本研究では TAA 探索における問題を一気に解決するため、我々独自の解析技術を駆使し、「全患者で採取可能な血清を使い、がん細胞のみをピンポイントに治療できるがん免疫療法の標的が見つかるのか？」という点を明らかにする。

### 2. 研究の目的

肺腺癌患者の血清中の抗原-抗体複合体を形成している抗原 (免疫複合体抗原) を一斉同定し、特異的・高頻度に検出される免疫複合体抗原を見つける。この抗原は抗体が異物認識した TAA と考えられる。そして、治療標的となる抗原タンパク質の異常配列 (エピトープ、抗体が結合する部分) を特定する。

### 3. 研究の方法

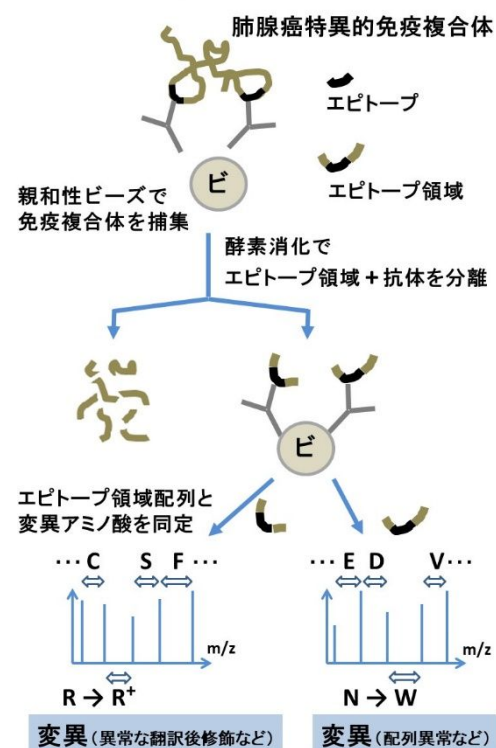
#### (1) 肺腺癌特異的な免疫複合体の抗原 (TAA) の特定

免疫複合体抗原を一斉に検出・同定できる独自解析法 (イムノコンプレキソーム解析法) で免疫チェックポイント阻害薬 (ニボルマブ [35 症例]) の効果群と無効群の比較を行う。効果群では腫瘍破壊で腫瘍から変異タンパク質が多く漏出し免疫認識・抗体産生がより進んでいる可能性がある。疾患特有のなかでも効果群に特徴的な TAA は、実際にがんが排除された患者で見つかるもので治療標的として有望である。

#### (2) 特異的 TAA のエピトープの特定

特異的免疫複合体から、エピトープ領域 (エピトープとその前後数残基) 以外を酵素消化で除去した後、エピトープ領域を抗体から分離させ、その分子量を質量分析装置で小数点以下 6 桁目まで測定してエピトープ領域のアミノ酸配列を決定し、アミノ酸変異を調べる (図 1)。検出されるエピトープ領域のうち、複数回検出される部分がエピトープである (複数のエピトープも想定)。

図1 エピトープ切除法に基づく方法



#### 4. 研究成果

##### (1) 肺腺癌特異的な免疫複合体の抗原(TAA)の特定

長崎大学病院ならびに栃木県立がんセンターで収集したニボルマブ投与患者の血清について免疫複合体解析（イムノコンプレキソーム解析）した。ニボルマブ効果群（15例）と非効果群（20例）の解析結果を比較した結果、効果群で高頻度に検出される免疫複合体抗原が9種類同定された。患者検体はいずれも初回治療を受けた患者であったが、治療だけでなく治療前にも効果群に特徴的な免疫複合体抗原が認められた。さらにニボルマブの最も高い効果予測が見込まれる抗原の組み合わせの選別を行った。効果予測については、初回投与群（治療前）の予測性が臨床に特に重要である。治療前に特徴的に検出された抗原の中から予測性が高い組み合わせを探索した結果、4種類の組み合わせ（profilin-1, purine nucleoside phosphorylase, alpha-enolase, nucleoside diphosphate kinase A、表1）で一定の効果予測が可能であることが分かった（ $p=0.0043$ , オッズ比 2.26, 95%信頼区間 1.19~4.28, AUC=0.76）。一方、初回治療後の予測性についても検討したところ、4種類の組み合わせ（peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1, complement component C8 beta chain, apolipoprotein L1、表1）で効果予測の可能性が示された（ $p=0.0039$ , オッズ比 2.56, 95%信頼区間 1.25~5.23, AUC=0.77）。本研究で目的とする治療標的となる TAA には治療後に特徴的に認められる免疫複合体抗原が該当すると考えられる。

表1 効果群または非効果群に特徴的な免疫複合体抗原

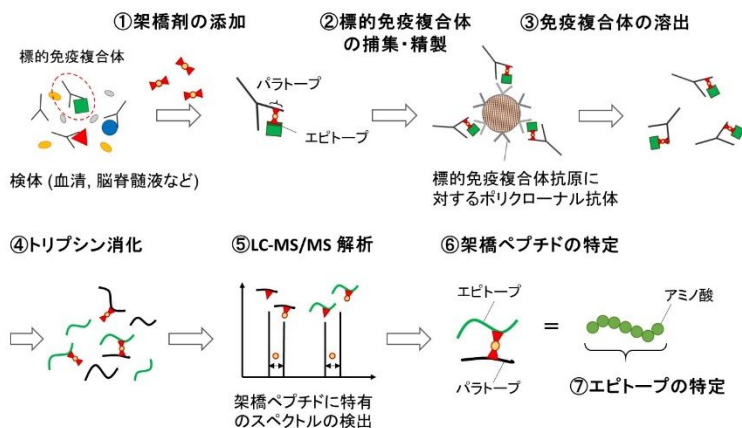
Accession	IC-antigen	Responder (Frequency, %)	Non-responder (Frequency, %)
		Before treatment	
P07737	Profilin-1	47	10
P06733	Alpha-enolase	67	35
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	33	5
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	67	35
After treatment			
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	73	40
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	27	0
P07358	Complement component C8 beta chain	47	20
O14791	Apolipoprotein L1	80	55

##### (2) 特異的 TAA のエピトープの特定

まず、エピトープ切除法 (Przybylski, *Nat Med* 2002) を改良するアプローチを試みた。具体的には、抗原と抗体が接する部分が酵素消化を受けにくいことを利用し、免疫複合体のエピトープ以外の部分を酵素で切除後、残ったエピトープ部分のアミノ酸配列を質量分析で決定する（前頁図）。しかし、この方法では再現性よくエピトープを同定することができなかった。この結果から、免疫複合体エピトープに特有の化学修飾を加え、質量分析で選択的に検出する必要があると考え、抗体と抗原の近接部位を架橋し、架橋剤とパラトープ（抗原と近接する配列部分）で化学修飾されたエピトープペプチドの配列を精密質量分析で決定する方法を考案した（図2）。

上記の架橋質量分析法について、モデル免疫複合体を複数作製し、詳細な条件検討を行った。具体的には抗原を TNF- $\alpha$  または HER2 とする複数の抗体医薬原料と各抗原を溶液中で混合してモデル免疫複合体を作製した。抗原-抗体間を架橋する架橋剤には、架橋された分子間の距離を規定するスペーサーが含まれる。このスペーサーが異なる複数種類の架橋剤をそれぞれモデル免疫複合体溶液に添加して架橋物を形成させ、酵素消化して得られたペプチドを nano-LC-

図2 架橋ペプチド特有のMS/MSスペクトルの検出に基づく方法



上記の架橋質量分析法について、モデル免疫複合体を複数作製し、詳細な条件検討を行った。具体的には抗原を TNF- $\alpha$  または HER2 とする複数の抗体医薬原料と各抗原を溶液中で混合してモデル免疫複合体を作製した。抗原-抗体間を架橋する架橋剤には、架橋された分子間の距離を規定するスペーサーが含まれる。このスペーサーが異なる複数種類の架橋剤をそれぞれモデル免疫複合体溶液に添加して架橋物を形成させ、酵素消化して得られたペプチドを nano-LC-

MS/MS で測定した。モデル免疫複合体ごとに同定された架橋ペプチドを詳細に調べ、ペプチド数、抗原-抗体間架橋ペプチド数、抗体医薬が標的とする既知配列が含まれることなどから、解析に適した抗原の種類や架橋剤の適否を検討した。抗原に関しては分子量の大きい HER2 が上記の比較項目でいずれも良好な結果を示した。一方、TNF-alpha は架橋ペプチド自体が少なく、架橋配列は検出されなかった。このことから、対象抗原としては一定の分子量が必要であることが示唆された。また、上記の項目に加え、同定された全ての架橋ペプチド数に対するエピトープ候補ペプチド数の割合を算出し、どの架橋剤がエピトープ特定に向いているかを調べた。その結果、CDI を使用した際に最も効果的にエピトープ候補ペプチドを同定できていることがわかった。これは CDI が最もスペーサー長が長く短く近接したペプチドを緩みなく架橋できることが理由と考えられた。以上のモデル実験から特異的 TAA のエピトープを特定する分析法を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 AIBARA Nozomi, AIZAWA Rika, NAKASHIMA Mikiro, OHYAMA Kaname	4. 巻 36
2. 論文標題 Optimization of pH Elution Conditions in Immune Complexome Analysis for Comprehensive Identification of Immune Complex Antigens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1423 ~ 1426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Rika, Nakamura Yoichi, Ikeda Takaya, Aibara Nozomi, Kutsuna Yuki J., Kurosaki Tomoaki, Aki Keisei, Junya Hashizume, Nakagawa Hiroo, Sato Kayoko, Kodama Yukinobu, Nakashima Mihoko N., Nakashima Mikiro, Mukae Hiroshi, Ohyama Kaname	4. 巻 532
2. 論文標題 Immune complexome analysis of serum samples from non-small-cell lung cancer patients identifies predictive biomarkers for nivolumab therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 84 ~ 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2022.05.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 N. Aibara, M. Nakashima, N. Kuroda, K. Ohyama
2. 発表標題 Selective, sensitive and comprehensive detection of immune complex antigens for discovering disease-specific antigens
3. 学会等名 68th ASMS 2020（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	大山 要  (Ohyama Kaname)  (50437860)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授    (17301)	

## 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
---------	---------