

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07367

研究課題名（和文）がんの免疫逃避機構を利用したがん免疫治療法の確立に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Study for establishing new cancer immunotherapy targeting tumor escape from immune surveillance

研究代表者

大栗 敬幸（Ohkuri, Takayuki）

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70564061

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）：患者由来の肺がん細胞および白血病細胞を用いてDNAメチル基転移酵素阻害剤を処理することにより、ステルスがん抗原の発現上昇が確認された。マウスステルスがん抗原を標的としたマウスモデルを構築し、DNAメチル化阻害剤とステルスがん抗原ペプチドを処理した樹状細胞の併用療法が抗腫瘍効果を示すことが確認された。さらに、ペプチドワクチンとの併用によっても腫瘍増殖抑制効果が確認された。ステルスがん抗原SPESP1の免疫原性およびDNAメチル化阻害剤処理した新鮮がん細胞における再発現に関する解析結果が学術雑誌に掲載された。ステルスがん抗原を標的としたT細胞活性化ペプチドが複数の国で特許が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、がん免疫治療法の新しい標的抗原を提起することができた。がん細胞は正常細胞からがん化していく際、生体内で免疫系による選択圧を受けながら増殖する。その過程で免疫細胞を活性化しやすい抗原はがん細胞の中から消失する。本研究によってDNAメチル基転移酵素阻害剤を処理し消失した免疫細胞を活性化しやすい抗原を再発現させることによって効果的ながん免疫治療につながることを明らかにした。がん治療は目覚ましい発展を遂げているが、本研究結果に基づいて開発される新しいがん免疫治療法はその恩恵を受けられない患者に対して、新たな選択肢になるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Stealth cancer antigens were upregulated by treatment with DNA methyltransferase in fresh tumor samples derived from patients with lung cancer or leukemia. To evaluate in vivo antitumor effect of cancer immunotherapy targeting stealth antigens, I established a mouse model for stealth antigen. Using the model, I demonstrated that combination therapy of inhibitor for DNA methyltransferase with dendritic cells pulsed with mouse stealth antigen-derived peptides delayed tumor growth in mouse. In addition, peptide-based immune therapy suppressed tumor growth in mice intraperitoneally treated with inhibitor for DNA methyltransferase. New findings about one of the stealth antigens SPESP1 was reported in an international scientific journal. The findings have been patented.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：ステルスがん抗原 がん免疫治療 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤がノーベル賞を受賞したことによってがん免疫療法が脚光を浴びている。しかし、免疫チェックポイント阻害剤は T 細胞の機能を回復させる薬剤であり、がんに対する特異性を有していないことから、その奏効率は現時点では 30%程度である。このことから、がん特異的 T 細胞を効果的に活性化させるためのがんワクチン治療を併用することにより奏効率が上昇すると考えられる。そこで鍵となるのは、標的抗原の選択である。従来の臨床研究では、「正常細胞で発現が認められず、がん細胞に過剰発現されている分子」をがんワクチンの標的抗原としてきた。しかし、がん患者生体内でがん特異的免疫応答を誘導することはできるものの、がんの退縮などの臨床効果を誘導するまでには至っていない。近年、がん細胞で生じる遺伝子変異に伴うアミノ酸変異を利用した「新生抗原ペプチド」を利用したがんワクチンが研究されているが (Ott PA et al, Nature 2018)、新生抗原ペプチドはアミノ酸変異により免疫系から非自己と認識されやすいという利点があるものの、アミノ酸変異が患者個々で異なることから個別化医療になり、医療費のさらなる高騰が懸念される。本研究課題の新規がんワクチン開発の基盤研究を提案する上で重要な学術的理論は「免疫エディティングと癌の免疫逃避機構」である。生体は免疫監視機構によって免疫原性の高いがん抗原を認識しがん細胞を排除するが (Schreiber RD, Science 2011)、その一方で、一部のがん細胞は免疫細胞からの攻撃を受けながらも自身の免疫原性を低下させることによって免疫系から逃れ生体内で腫瘍組織を形成する (次ページ図)。このような免疫逃避機構の一つのメカニズムとして、がん細胞は高抗原性のがん抗原遺伝子のプロモーター領域をメチル化することによってその発現を抑制することが報告された (DuPage M et al, Nature 2012)。そこで、申請者はがん細胞を脱メチル化することで再発現される高免疫原性のがん抗原の有用性を検討した結果、ヒトがん細胞株に DNA メチル基転移酵素阻害剤 (5Aza) を処理することによって再発現される分子の同定に成功し、このようながん抗原を『ステルスがん抗原』と名付けた。また、同定したステルスがん抗原由来のペプチドは *in vitro* で効果的にがん特異的ヒト T 細胞を活性化し、担がん免疫不全マウスにおいてステルスがん抗原特異的ヒト T 細胞と 5Aza の併用治療による腫瘍増殖抑制効果を示している。

2. 研究の目的

エピジェネティック変化によってがん細胞が発現抑制させた『ステルスがん抗原』を標的とした革新的がんワクチン治療法の臨床開発を進めるため、本研究では 5Aza 処理によるステルスがん抗原の発現増強についてヒトがん細胞株および患者由来新鮮がん細胞を用いて検討する。さらに、*in vitro* だけではなく免疫不全マウスを用いた *in vivo* における 5Aza 処理によるステルスがん抗原の発現増強についても検討する。ステルスがん抗原の免疫原性およびワクチン開発への可能性を評価するために、ステルスがん抗原由来のペプチドの T 細胞活性化能を検討する。

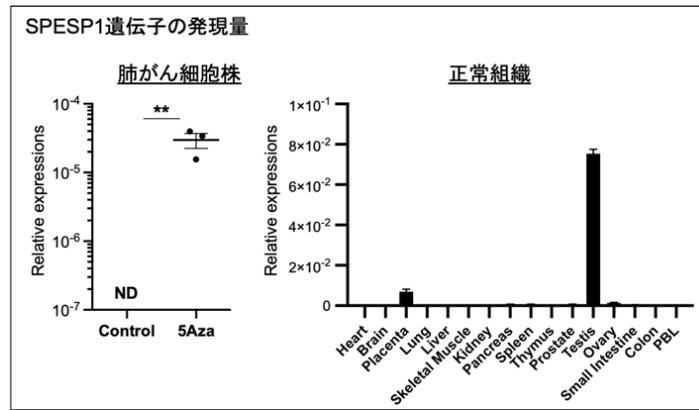
3. 研究の方法

エピジェネティック変化によってがん細胞が発現抑制させた『ステルスがん抗原』を同定するために、ヒトがん細胞株を DNA メチル化阻害剤 (5Aza) で 3 日間処理し、コントロール処理した細胞と比べて発現増強している遺伝子群を DNA マイクロアレイにて調べた。ステルスがん抗原の候補となった遺伝子をリアルタイム PCR 法で確認した。また、正常組織での発現を確認するために、ヒト正常組織由来 cDNA パネルを用いてリアルタイム PCR 法にて候補遺伝子の発現を解析した。担がん生体における 5Aza 処理によるステルスがん抗原の発現上昇を検討するために、免疫不全マウスにヒトがん細胞株を移植後、5Aza を 3 日連続腹腔内投与し、腫瘍組織を回収した。ステルス癌抗原の発現はリアルタイム PCR 法および免疫染色にて確認した。

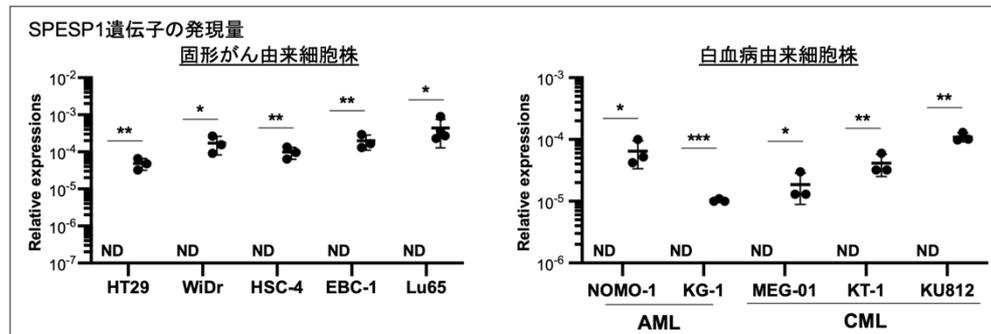
ステルスがん抗原の免疫原性を検討するために、全アミノ酸配列からコンピュータアルゴリズムを用いて得られた HLA に結合する確率が高いアミノ酸配列を基にして、20 残基長のペプチドを合成し、同意を得られた健康成人から採取された CD4 陽性 T 細胞を活性化・増殖させるかを検討した。新鮮がん細胞における 5Aza 処理によるステルスがん抗原の発現上昇を検討するために、同意を得られた急性骨髄性白血病患者および肺がん患者から採取されたがん細胞を用いた。

4. 研究成果

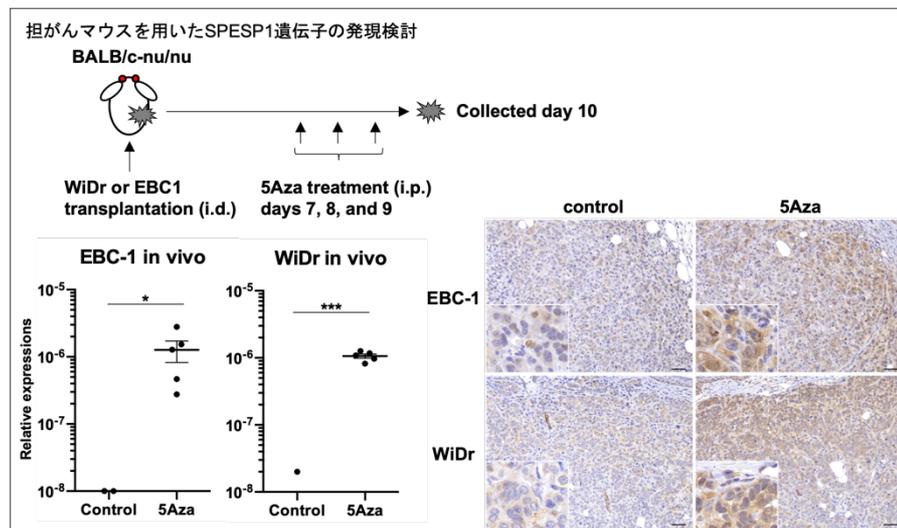
エピジェネティックに発現が抑制されているがん抗原を同定するために、ヒト肺がん細胞株 A549 を DNA メチル化阻害剤 (5Aza) で 3 日間処理した。その結果、SPESP1 遺伝子の発現が上昇することが確認された。SPESP1 遺伝子は胎盤および精巣を除く正常組織では発現が認められなかったことから、がん精巣抗原の一種であることが確認された (右図)。



次に、A549 以外のがん細胞においても 5Aza 処理することによって SPESP1 遺伝子の発現増強が認められるかを検討した。その結果、固形がん由来細胞株 HT29 (大腸がん)、WiDr (大腸がん)、HSC-4 (舌がん)、EBC-1 (肺がん)、Lu65 (肺がん) においても 5Aza 処理することによって SPESP1 遺伝子の発現増強が認められた。また、急性骨髄性白血病 (AML) 細胞株 NOMO-1 および KG-1 や慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞株 MEG-01 および KT-1、KU812 においても 5Aza 処理することによって SPESP1 遺伝子の発現増強が同様に認められた (下図)。以上のことから、がん細胞株の DNA を脱メチル化することによって SPESP1 遺伝子が普遍的に発現増強されることが *in vitro* で確認された。

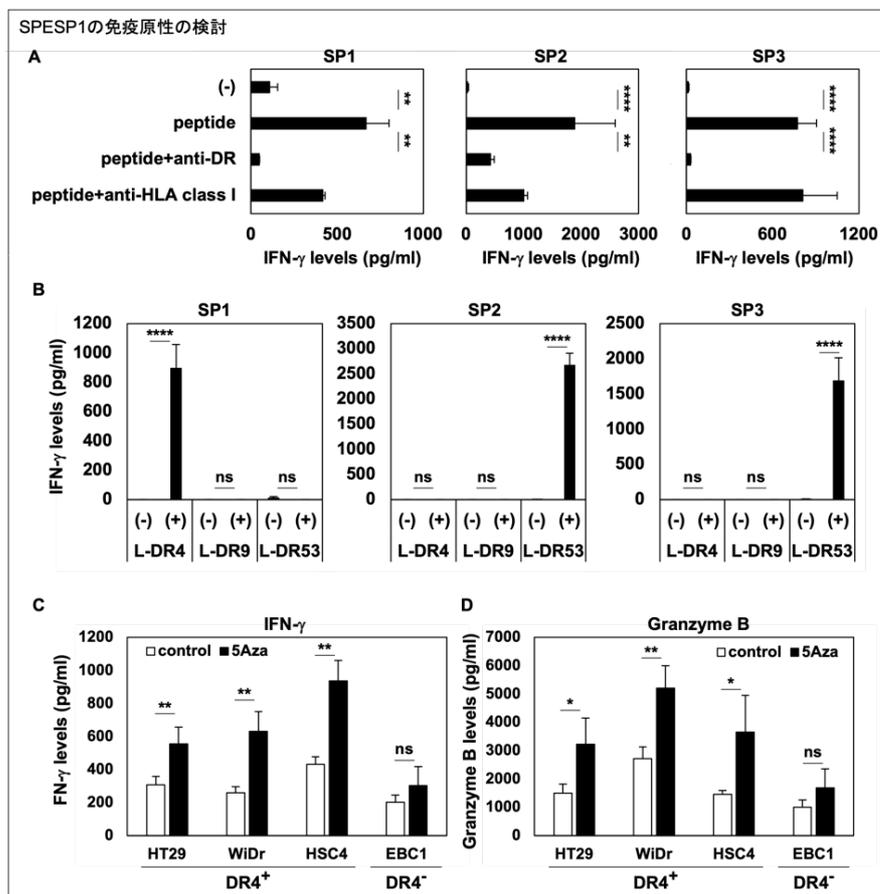


次に、*in vivo* において、がん細胞株の DNA を脱メチル化することによって SPESP1 遺伝子が発現増強されるかを検討した。免疫不全マウス BALB/c-nu/nu (ヌードマウス) に麻酔下でヒトがん細胞株 WiDr もしくは EBC-1 を皮内接種し、移植後 7、8、9 日目に 5Aza を腹腔内投与した。10 日目に腫瘍組織を回収し、SPESP-1 の遺伝子およびタンパク質発現を解析した。その結果、EBC-1 および WiDr とともに 5Aza 投与したヌードマウス由来の腫瘍組織において SPESP1 遺伝子が発現増強されていることが確認された。また、免疫染色によって腫瘍組織中の SPESP1 のタンパク質発現も 5Aza 投与したヌードマウス由来の腫瘍組織において亢進されていることが確認された (下図)。これらのことから、がん細胞株の DNA を脱メチル化することによって SPESP1 遺伝子が普遍的に発現増強されることが *in vivo* においても確認された。



SPESP1 の免疫原性を評価するために、コンピューターアルゴリズムを用いて SPESP1 の全アミノ酸配列から HLA-class II に結合する可能性の高いアミノ酸配列部位を検索し、20 残基長のペプチド断片 SPESP1₃₁₋₄₉ (QLNHYYIQLVLENLVRVSP) を合成した。健康星人の末梢血から採取した CD4 陽性 T 細胞を SPESP1₃₁₋₄₉ ペプチドで複数回刺激した結果、SPESP1₃₁₋₄₉ ペプチド特異的 T 細胞株が 3 種類 (SP1 および SP2、SP3) 樹立された。それらの HLA 拘束性を調べた結果、抗 HLA-DR 抗体

によって反応が阻害されたことから、どれも HLA-DR 拘束性であることが確認された (下図 A)。また、拘束される HLA-DR の型を明らかにするために、SPESP1₃₁₋₄₉ ペプチドをパルスした様々な HLA-DR の型を強制発現する L 細胞 (L-DR4 および L-DR9、L-DR53) を用いて SPESP1₃₁₋₄₉ ペプチド特異的 T 細胞株を刺激した結果、SP1 は HLA-DR4、SP2 および SP3 は HLA-DR53 に拘束性に SPESP1₃₁₋₄₉ ペプチドを認識することが確認された (下図 B)。SPESP1₃₁₋₄₉ ペプチド特異的 T 細胞株 SP1 が 5Aza 処理によって SPESP1 遺伝子を発現増強させたがん細胞株に対して反応するかを検討した。その結果、5Aza 処理された HLA-DR4 陽性がん細胞株に対して IFN- γ (下図 C) および Granzyme B (下図 D) の産生を有意に増強させることが確認された。コントロールとして用いた HLA-DR4 陰性がん細胞株に対しては有意な反応増強は認められなかった。以上のことから、SPESP1 は CD4 陽性 T 細胞を活性化させる高い免疫原性を有していることが明らかになった。



本基盤研究によって、がん細胞がエピジェネティックに発現抑制させる『ステルスがん抗原』は免疫原性が高いことが明らかになりがん免疫治療の新たな標的抗原として有用であることが示唆された。今後も SPESP1 以外のステルスがん抗原の探索・同定を続けるとともに臨床応用にに向けた基礎研究を展開する予定である。

5. 主な発表論文等

<原著論文>

- Kosaka A, Yajima Y, Hatayama M, Ikuta K, Sasaki T, Hirai N, Yasuda S, Nagata M, Hayashi R, Harabuchi S, Ohara K, Ohara M, Kumai T, Ishibashi K, Hirata-Nozaki Y, Nagato T, Oikawa K, Harabuchi Y, Celis E, Okumura T, Ohsaki Y, Kobayashi H, **Ohkuri T**. A stealth antigen SPESP1, which is epigenetically silenced in tumors, is a suitable target for cancer immunotherapy. *Cancer Science*, 2021;112(7):2705-2713. doi: 10.1111/cas.14973

<総説>

- **大栗敬幸**, 小坂朱, 小林博也. DNA メチル化による癌抗原発現の制御. *腫瘍内科*, 27(5):552-557, 2021.

<学会発表>

- **大栗敬幸** SPESP1 はエピジェネティックに発現抑制を受けるステルスがん抗原としてがん免疫の標的抗原になりうる. 第 80 回日本癌学会学術総会 2021 年 9 月 30-10 月 2 日 横浜市
- **大栗敬幸** エピジェネティックに発現抑制を受けるステルスがん抗原 SPESP1 を標的とした新しいがん免疫療法の開発. 第 25 回日本がん免疫学会総会 2021 年 7 月 1-3 日 和歌山市

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosaka A, Yajima Y, Hatayama M, Ikuta K, Sasaki T, Hirai N, Yasuda S, Nagata M, Hayashi R, Harabuchi S, Ohara K, Ohara M, Kumai T, Ishibashi K, Hirata Nozaki Y, Nagato T, Oikawa K, Harabuchi Y, Celis E, Okumura T, Ohsaki Y, Kobayashi H, Ohkuri T	4. 巻 112
2. 論文標題 A stealth antigen SPESP1, which is epigenetically silenced in tumors, is a suitable target for cancer immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2705 ~ 2713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大栗敬幸、小坂朱、矢島優己、安田俊輔、小松田浩樹、長門利純、及川賢輔、小林博也
2. 発表標題 SPESP1はエピジェネティックに発現抑制を受けるステルスがん抗原としてがん免疫の標的抗原になりうる
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大栗敬幸、小坂朱、矢島優己、安田俊輔、長門利純、及川賢輔、小林博也
2. 発表標題 エピジェネティックに発現抑制を受けるステルスがん抗原SPESP1を標的とした新しいがん免疫療法の開発
3. 学会等名 日本がん免疫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大栗敬幸、小坂朱、小林博也	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 腫瘍内科	

〔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
---------	---------