

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590448

研究課題名(和文)低酸素環境を標的にした癌の複合型免疫・分子標的療法の開発

研究課題名(英文)The development of combined cancer therapy targeting hypoxic microenvironment

研究代表者

田村 保明(TAMURA, Yasuaki)

北海道大学・フード&メディカルイノベーション推進本部・特任教授

研究者番号：80322329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ER01-L は正常組織と比較し、腫瘍細胞、特に大腸癌細胞株や膵癌細胞株において高発現していた。ER01-L は小胞体常在の酸化酵素として、種々の細胞表面分子や分泌蛋白質のジスルフィド結合形成に重要な役割を果たしている。本研究では低酸素環境にあるがん細胞において、ER01-L はMHC class I分子内のS-S結合形成に必須の酸化酵素であり、その品質管理及び発現制御を行っていることを示した。低酸素環境下でのER01-L 発現増強は、癌の特徴的な細胞周囲環境である低酸素環境下におけるMHC class I分子の発現維持に寄与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：ER01- is an ER-resident oxidase. ER01- and PDI play a central role in disulfide bond formation of secreted and cell surface molecules. We have recently demonstrated that various types of tumor cells expressed high levels of ER01- . In this study, we show that ER01- associates with PDI, calnexin and immature MHC class I before being incorporated into transporter-associated with antigen processing-1 (TAP-1)-associated peptide-loading complex. Importantly, ER01- regulates the redox state as well as cell surface expression of MHC class I, leading to alteration of susceptibility by CD8+ T cell. Similarly, the ER01- expression within cancer cells was associated with the expression level of MHC class I in colon cancer tissues. Thus, the cancer-associated ER01- regulates the expression of MHC class I molecule via oxidative protein folding within hypoxic tumor microenvironment.

研究分野：病理学

キーワード：低酸素 酸化酵素 分子標的治療 がんワクチン MHC クラスI分子 ジスルフィド結合 ER01- PDI

1. 研究開始当初の背景

固形癌は一般的に低酸素環境下であり、癌細胞はその適応機構として HIF-1 の活性化を介して VEGF などの血管新生因子を産生し、このようなストレス環境から回避・生存している。さらに癌細胞は TGF- β を産生し、癌の増殖に必要な間質細胞の誘導を促進し、腫瘍の周囲環境を自らにとって優位に保つ。このように低酸素ストレスが癌の難治性化の一因となっている。そのため低酸素環境に対する癌の適応戦略を標的とした治療法が開発されつつあり、その代表的な薬剤である VEGF 阻害剤が新しい分子標的薬として臨床応用されてきている。しかし現状ではその効果は不十分であり、複数の分子を標的とする薬剤の開発はより優れた抗腫瘍活性を示すことが期待される。我々は、癌で高発現し、低酸素ストレスで発現増強する分子シャペロン ORP150 を用いた免疫制御を報告しているが (Kutomi et al, J. Immunology, 2009)、この ORP150 と会合する分子として同定した Endoplasmic reticulum oxidoreductin1-L (ERO1-L) を同定した。この発見から我々は、平成 21 年-23 年度の日本学術振興会基盤研究 C において、腫瘍に高発現している低酸素誘導性小胞体ストレス蛋白質で、ジスルフィド結合形成酵素でもある ERO1-L がジスルフィド結合を有する VEGF や TGF- β および PDGF 産生制御に重要な役割を果たしており、その発現は腫瘍増殖能を亢進させることを明らかにしている。これは ERO1-L の機能を抑制することで腫瘍増殖を促進する複数の分子を同時に標的とすることが可能となり、効率よく腫瘍増殖を制御できる可能性があることを示唆している。そこで、本研究では ERO1-L の機能を阻害する低分子化合物をスクリーニング・同定し、新しい分子標的療法を開発する。さらに、ERO1-L が腫瘍特異的に高発現していることから、この蛋白質から日本人に多い HLA-A24 および HLA-A02 に提

示される癌抗原ペプチドを同定し、免疫療法に用いることのできるワクチンを開発する。本研究の成果は癌の生存・増殖に必須の蛋白質と考えられる ERO1-L の機能を阻害し、腫瘍のドーマンシーを誘導し、かつ ERO1-L 発現腫瘍を免疫学的に傷害する全く新しい複合型免疫・分子標的療法を開発するものである。

2. 研究の目的

公開されている低分子化合物ライブラリー (約 1 万個) から、ERO1-La の機能を阻害する低分子化合物をスクリーニング・同定し、新しい分子標的療法を開発する。さらに、ERO1-L が腫瘍特異的に高発現していることから、ERO1-L は腫瘍抗原である可能性が考えられる。そこでこの蛋白質から日本人に多い HLA-A24 および HLA-A02 に提示される腫瘍抗原ペプチドを同定し、免疫療法に用いることのできるワクチンを開発する。本研究の成果は腫瘍の生存・増殖に必須の蛋白質と考えられる ERO1-L の機能を阻害することで腫瘍細胞のドーマンシーを誘導し、かつドーマントに陥った ERO1-L 発現腫瘍を免疫学的に傷害する全く新しい複合型分子標的・免疫療法を開発するものである。

3. 研究の方法

(1) ERO1-L α の機能を阻害する低分子化合物のスクリーニング

医薬品化合物ライブラリー (約 1 万)

のスクリーニング

スーパーコンピュータを用いたコンピュータ・シミュレーションによって、約 50 の候補化合物にまで絞り込む。

In vitro における ERO1-L の基質酸化能阻害アッセイ

これらの約 50 の候補化合物を用いて ERO1-L の基質酸化能 (ジスルフィド結

合形成能) を指標にしたスクリーニング法を用いて、ERO-L 阻害剤を同定する。具体的には、組換え蛋白質として精製した ERO1-L と、ERO1-L の良い基質になることが知られている精製チオレドキシシン 1 (TRX1)を用いて、ERO-L による酸化反応の有無を検討する。ERO1-L により TRX1 の酸化反応が生じると発生する過酸化酸素 (H_2O_2) は、horseradish peroxidase (HRP) による Amplex Ultra Red (AUR, Invitrogen)を酸化し、蛍光を発生する。これを蛍光リーダーで測定することにより、ERO1-L の酸化能を定量化することができる。このスクリーニングシステムを用いて、ERO1-L の基質酸化能を阻害する低分子化合物をスクリーニングする。この方法は 96 ウェルプレートでアッセイするため多数の候補低分子化合物をスクリーニングできることが特徴である。

(2) ERO1-L α 発現が宿主免疫監視機構に及ぼす影響の検討

癌免疫療法は、癌に対する新たな治療法として注目されているが、その効果は未だ十分とは言えず、同療法に対する効果予測因子も確定的なものが無いのが現状である。

癌免疫療法ではMHC class I分子の発現が重要な因子であり、MHC class I分子の安定的な発現には分子内のS-S結合形成が必須である。そこで我々は、種々の蛋白質のS-S結合形成を担うERO1-L α に着目し、MHC class I分子発現との関連性を検討した。特に低酸素環境下におけるMHC class I分子の発現維持におけるERO1-L α の重要性についても検討した。大腸癌細胞株のERO1-L α 過剰発現株およびERO1-L α knockdown細胞株を樹立して、細胞表面上に発現するMHC class I分子の発現と、これらの腫瘍細胞を用いて、癌特異的T細胞応答を比較検討した。本研究により、腫瘍に発現するERO1-L α のMHC

class I分子の発現及び腫瘍免疫応答の役割を解明する。さらに癌免疫療法の効果予測因子となる可能性について、大腸癌組織を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) ERO1-L α と MHC class I 分子の立体構造

ERO1-L α は、小胞体内に存在する酸化酵素で低酸素環境等により発現が誘導されることが知られている。ERO1-L α は、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) を酸化するが、この酸化型 PDI が対象となる蛋白質のシステイン残基対を酸化し、ジスルフィド結合(S-S 結合)を付加することにより、蛋白質の folding、品質管理に関与すると報告されている。近年その立体構造や、ERO1-L α -PDI axis の詳細な分子間相互作用が解明されてきている。小胞体内は通常酸化的であり、peroxiredoxin 4 (PRDX4) など種々の酸化還元酵素が存在するが、ERO1-L α -PDI axis がハブとして、これらの酸化還元酵素の酸化力を供給することが明らかとなっている。

一方、MHC class I分子内には3つのS-S結合が存在しており、その立体構造形成・維持に大変重要な役割を果たしている。特に $\alpha 2$ ドメインに存在する S-S 結合が、peptide-binding groove の形成に必須であると報告され、MHC class I分子が正しい立体構造をとり、抗原 peptide を乗せた状態で細胞表面へと発現するためには、小胞体内における酸化反応による S-S 結合が必要と考えられる。そこで、腫瘍細胞における MHC class I 分子の発現における ERO1-L α の役割について詳細に検討した。

腫瘍細胞における ERO1-L α の発現と MHC class I 分子発現制御

ERO1-L α の発現を RT-PCR にて検討した

ところ、正常組織と比較し、腫瘍細胞、特に大腸癌細胞株や膵癌細胞株において高発現していた。また、正常組織及び癌組織を ERO1-L α に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、正常組織ではその発現を全く認めなかったが、癌組織においては高い陽性率を示した。また、種々の癌細胞株を低酸素培養 (1% O₂) すると、ERO1-L α が発現誘導されることを確認した。すなわち、ERO1-L α は癌腫や症例によって程度の差があるものの、癌化に伴う低酸素環境によって発現が誘導される可能性が考えられる。さらに興味深いことに、ERO1-L α が過剰発現させたがん細胞では、野生型がん細胞と比較して、ERO1-L α と PDI の複合体が増加していた。すなわちより酸化型の PDI が増加しており、標的蛋白質のジスルフィド結合形成能が増加しているものと考えられた。

腫瘍細胞における ERO1-L α の発現と MHC class I 分子発現制御

前述した ERO1-L α の機能と、MHC class I 分子の立体構造及び細胞表面への発現の機序を考慮すれば、腫瘍組織における MHC class I 分子の発現と腫瘍免疫応答に ERO1-L α が重要な役割を果たしている可能性があると考えられ、更に検討を進めた。

細胞内における ERO1-L α との会合分子を検討したところ、ERO1-L α は PDI、MHC class I 分子と分子会合している事が確認された。しかし β 2-microglobulin や peptide-loading complex を形成する TAP (transporter-associated antigen processing) 分子とは会合を認めなかった。以上の事実から、ERO1-L α は、peptide-loading complex の前段階で MHC class I 分子と会合し、 α 2ドメインを含むジスルフィド結合を行っていると考えられた。さらに、大腸癌細胞株 (SW480) の ERO1-L α 過剰発現株及び

knockdown細胞株を樹立し、MHC class I 分子の発現を検討した。過剰発現株において、S-S結合を有した安定型の MHC class I 分子の増加、及び細胞表面の発現増加を認め、knockdown細胞株にて MHC class I 蛋白質が減少、細胞表面上に発現する MHC class I 分子も低下した。このような MHC class I 分子の発現低下により有意に T細胞応答が減弱した。SW480 を低酸素環境下 (1% O₂) にて培養すると、WT では ERO1-L α の発現が誘導され、細胞表面への MHC class I 分子の発現が維持されていたが、ERO1-L α の knockdown 細胞株においては、有意に MHC class I 分子の発現が低下した。すなわち、低酸素環境にあるがん細胞の MHC class I 分子の発現には ERO1-L α の酸化酵素活性が大変重要な役割を果たしている。

結論

ERO1-L α は MHC class I 分子内の S-S 結合形成を制御し、その品質管理及び発現制御を行っていることを示した。低酸素環境下での ERO1-L α 発現増強は、癌の特徴的な細胞周囲環境である低酸素環境下における MHC class I 分子の発現維持に寄与していると考えられる。さらに ERO1-L α は、S-S 結合形成による MHC class I 分子の立体構造形成のみならず、peptide の loading にも関与している可能性があり、検討中である。

以上より、ERO1-L α が高発現した癌腫、症例では、ERO1-L α が誘導されていないものと比較し、high-affinity peptide を乗せた質の高い MHC class I 分子の発現が維持され、peptide 特異的 CTL との高い反応性を示す可能性がある。将来的な癌ワクチン療法の効果予測因子としての応用も視野に入れ、更なる検討を進めたい。

今後の検討事項：ERO1-L α の機能を阻害する低分子化合物のスクリーニング

現在、候補分子を、3つ選定した。この3つの候補低分子化合物を用いて、ERO1-L 発現癌細胞におけるVEGF-AやTGF- β の酸化還元状態とそれらの分泌に与える効果について検討を行っている。

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 24 件)

1. Kukita K, Tamura Y, Kajiwara T, Kutomi G, Saito K, Okuya K, Takaya A, Kanaseki T, Tsukahara T, Hirohashi Y, Torigoe T, Furuhashi T, Hirata K, Sato N. Cancer-Associated Oxidase ERO1- α Regulates the Expression of MHC Class I Molecule via Oxidative Folding. *J Immunol.*, 194. 4988-96, 2015. 査読有り。
2. Tanaka T, Kajiwara T, Torigoe T, Okamoto Y, Sato N, Tamura Y. Cancer-associated oxidoreductase ERO1-a drives the production of tumor-promoting myeloid-derived suppressor cells via oxidative folding. *J Immunol.* 194, 2004-10, 2015. 査読有り。
3. Tanaka T, Okuya K, Kutomi G, Takaya A, Kajiwara T, Kanaseki T, Tsukahara T, Hirohashi Y, Torigoe T, Hirata K, Okamoto Y, Sato N, Tamura Y. Hsp90 targets a chaperoned peptide to the static early endosome for efficient cross-presentation by human dendritic cells. *Cancer Sci.* 106, 18-24, doi: 10.1111/CAS.12570. 2014. 査読有り。
4. Kutomi G, Tamura Y, Tanaka T, Kajiwara T, Kukita K, Ohmura T, Shima H, Takamaru T, Satomi F, Suzuki Y, Torigoe T, Sato N, Hirata H. Human Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1- (hERO1-) is a Novel Predictor for Poor Prognosis of Breast Cancer. *Cancer Sci.* 104, 1091-6, doi: 10.1111/cas.12177. 2013. 査読有り。

[学会発表](計 6 件)

1. 田中 努、田村 保明、梶原 敏充、鳥越

俊彦、岡本 芳晴、佐藤 昇志

「腫瘍に高発現する酸化酵素 ERO1- は、腫瘍増殖環境を整える」、『第 104 回日本病理学会総会』、名古屋国際会議場 (名古屋市熱田区)、2015 年 5 月

2. 田村 保明、田中 努、梶原 敏充、鳥越俊彦、岡本 芳晴、佐藤 昇志

「腫瘍に高発現する酸化酵素 ERO1- は、がん幹細胞形質の維持に關与する」第 9 回臨床ストレス応答学会、岡山大学 (岡山市)、2014 年 11 月

3. 田中 努、田村 保明、梶原 敏充、鳥越俊彦、岡本 芳晴、佐藤 昇志

「Enhanced expression of endoplasmic reticulum oxidoreductin1- (ERO1-) promotes tumor growth and pulmonary metastasis.」、『第 73 回日本癌学会』、パシフィコ横浜 (横浜市西区)、2014 年 9 月

4. 田中 努、田村 保明、久木田 和晴、梶原 敏充、鳥越 俊彦、岡本 芳晴、佐藤 昇志

「腫瘍高発現性酸化酵素 ERO1- とがん幹細胞形質維持」、『第 103 回日本病理学会総会』、3-H-28、広島国際会議場 (広島市)、2014 年 4 月

5. 田中 努、田村 保明、久木田 和晴、梶原 敏充、鳥越 俊彦、岡本 芳晴、佐藤 昇志

「Enhanced expression of endoplasmic reticulum disulfide oxidase 1- (ERO1-) inhibits anti-tumor immune response.」、『第 72 回日本癌学会』、パシフィコ横浜 (横浜市西区)、2013 年 10 月

6. 田中 努、田村 保明、久木田 和晴、梶原 敏充、鳥越 俊彦、岡本 芳晴、

佐藤 昇志

「腫瘍に高発現する酸化酵素 ER01- α は抗腫瘍免疫応答を抑制する」、『第 102 回日本病理学会総会』、ロイトン札幌（札幌市中央区）、2013 年 6 月

〔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：
出願年月日：
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

田村 保明 (TAMURA, Yasuaki)

北海道大学・産学・地域協働推進機構・フ
ード&メディカルイノベーション推進本
部・難治性疾患治療部門・特任教授
研究者番号：80322329

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：