

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	化学生命工学専攻
学生番号 Student No.	51424452
氏名 Name	野々村 英典

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

The importance of companion diagnostics for personalized medicine and the application of protein solubilization technology

(個別化医療の実現に向けたコンパニオン診断薬の重要性とタンパク質可溶化技術の応用に関する研究)

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

近年、ゲノム情報を活用して個々人の体質を予測し、疾患発症リスクに応じた予防や、罹患時に投与する適切な薬剤を選択する個別化医療への期待が高まっている。特に複数の治療手段がある場合は、最も治療効果が高く、副作用の少ない治療薬の選択や治療効果をモニタリングする「コンパニオン診断薬」の開発が重要である。信頼性の高いコンパニオン診断薬が開発されれば、適切な治療による、患者の QOL 向上及び、医療費の抑制が期待される。

現在、がん領域では、個別化医療が急速な発展を遂げている。特に、腫瘍局所での免疫抑制状態を解除する免疫チェックポイント阻害剤の登場により、長期生存効果が得られる報告例が増え、がん免疫治療への期待が高まっている。がん細胞は、免疫逃避機構の成立により、患者固有の性質を獲得しているため、個別のがんと免疫との関係を重視した治療戦略が必要となる。がん免疫治療の個別化には、患者体内に存在するがん細胞に含まれる免疫源の特定が重要であり、抗体検査薬が重要なツールとなる。さらに、がん抗原特異的なエフェクター細胞を効率的に誘導するがんワクチンの個別調製も重要な課題である。これらの治療法と診断薬を適切に組み合わせることが、がん免疫治療の進展の鍵となる。

本研究では、免疫系ががん細胞の目印としている「がん抗原」に着目し、タンパク質工学的手法を活用して上記の課題に取り組んだ。がん抗原とは、がん細胞内で異常に発現しているタンパク質群であり、がんと精巣に局限した発現を示す Cancer-Testis(CT)抗原や各種の変異タンパク質などが含まれる。しかし、どのタンパク質のどの部分が抗原として認識されるかは個人差が大きい。さらに CT 抗原だけでも 150 種類以上存在し、その大半は不安定で変性しやすい物性の細胞内タンパク質であり、これらのタンパク質の取り扱いには変性タンパク質の可溶化技術の活用が不可欠であった。

1. がん細胞内の総タンパク質を可溶化する新規手法の開発

外科手術で摘出されるがん組織には、各患者に固有の抗原が含まれる。それらのがん組織から得た抗原情報を免疫系に伝える効果を有するがんワクチンが、一定の治療効果を示すことが知られている。しかしながら、がん組織を生理的な溶媒中で破碎した際には、一部の難溶性画分にタンパク質が含まれるため、患者固有の全抗原を取得する手法には課題があった。検討の結果、細胞内の核酸成分を除去すると、細胞内の総タンパク質が変性状態で高い水溶性を示し、ほぼ完全に可溶化できることが確認された。具体的には、動物細胞（ヒト・マウス）内の総タンパク質の Mixture から核酸成分を Trizol 試薬（チオシアン酸グアニジニウム - フェノール - クロロホルムの混合物）を用いて完全に除去すると、変性状態の総タンパク質が沈殿として回収される。これを 6M 塩酸グアニジン中で可溶化した後に、純水に対して透析すると、総タンパク質がほぼ全て水溶性となる。この総タンパク質 Lysate には疎水性の高い膜タンパク質等もすべて含まれており、がん細胞内の総タンパク質の完全可溶化が可能となった。この溶解性は高等動物に特徴的な現象で、単細胞真核生物や原核生物由来の総タンパク質では同じ条件下で多くのタンパク質が凝集した。本手法を活用することで、外科手術で摘出されたがん組織から総タンパク質を完全に可溶化できるため、患者固有のがん抗原を取り逃すことなく全てワクチン化する材料となることが期待される。

2. 腫瘍免疫応答を定量評価する抗がん抗原抗体検査試薬の開発

腫瘍免疫応答では、がん抗原を目印とした細胞性免疫と、がん抗原に対する液性免疫（抗体産生）が誘導される。この内、液性免疫の作用により、がん抗原に対する抗体が血清中に出現することから、この抗体価の変動が腫瘍免疫活性を反映するバイオマーカーとして有望視されている。がん抗原の候補は無数にあるが、CT 抗原をはじめとして、高頻度に抗体出現が報告されている 16 種類の抗原を全長の組換えタンパク質として調製した。大腸菌で生産させた組換えタンパク質は大半が不溶性であり、可溶性として精製された抗原も不安定で保存安定性が悪かった。これらの全長抗原は Cys 残基に対して正電荷を付与する S-カチオン化により全て安定に可溶化・精製することが可能であった。抗-NY-ESO-1 抗体が多く存在するがん患者由来血清を用いて、S-カチオン化 NY-ESO-1 との結合を確認したところ、高感度な抗原抗体反応が確認され、かつ、Cys に対する化学修飾の影響もほとんどなかった。実際に、多種多様な S-カチオン化全長・水溶性がん抗原を用いた抗体検査試薬をコンパニオン診断薬として応用するためには、一度に複数の抗原抗体反応を確認できる Multi-plexed assay を可能にする必要がある。3 種類の S-カチオン化全長抗原を Multi-plexed Luminex ビーズに固定化した予備実験では、400 から 6400 倍希釈のがん患者由来の血清で S/N 比の高いシグナルを得ることに成功した。この感度を 10-plex Luminex アッセイに拡張し、1600 倍希釈の血清で実施すると仮定した場合、1 μ L の患者由来血清で、一度に 640 種の抗体価を測定できる感度及び、実用性の高さが確認できた。さらに 16 種類の S-カチオン化全長抗原を用いた Multi-plexed assay 系を構築し、がん免疫治療（自己 γ δ T 細胞移植療法）の前後で肺がん患者の血清中での各抗体価を測定した結果、がん免疫治療後の無増悪生存期間の平均は、ハイレスポンド（16 種類の抗原に対する抗体価の上昇（+10%以上）が 5 種類以上であった症例）で 237 日であったのに対し、ローレスポンド（同抗体価の上昇が 5 種類未満）では 120 日で、治療予後と抗がん抗原抗体価の上昇に相関があることが確認された（ $p=0.0223$ ）。これらの結果は、S-カチオン化全長抗原を用いた抗体検査試薬により、免疫治療後の腫瘍免疫応答を定量評価できた可能性が高く、本手法ががん免疫療法の効果の評価するための有用な診断ツールとなり得ることが示された。