

タイトル：腫瘍免疫応答の活性化を測定する抗体検査技術の開発

氏名：二見淳一郎

所属：岡山大学大学院自然科学研究科生命医用工学専攻・准教授

【論文概要】

がん免疫治療や関連の医薬品開発において、腫瘍に対する免疫応答のレベルを簡便な血液検査で定量評価ができる診断技術が必要だ。がんに対する免疫応答が亢進している際には、血液中に様々な抗がん抗原抗体が増加する。この抗体価の定量評価には、独自開発の変性タンパク質の可溶化技術の活用が強力な手段となる。

1. はじめに

1 度かかった病気に 2 度目はかからない「免疫」は、感染症のみならず「がん」に対しても一定の作用があることが古くから知られていた。例えば 1890 年代に米国の外科医であるウィリアム・コーリーが、腫瘍内に化膿レンサ球菌とセラチア菌の死菌の混合物を直接投与することで腫瘍退縮が可能なことを示したことからも、免疫を強く刺激すればがん治療に寄与する可能性は当時から理解されていた。その後、この免疫応答を誘導する因子がサイトカイン類であることが判明し、コーリーの試みから約 100 年後の 1990 年代にはサイトカイン医薬品に期待が高まったが、多くのがんで有効性を示すことができなかった。2000 年代に入り、抗体医薬品が登場すると、がん細胞表面に抗体を結合させることで体内の免疫細胞を寄せ集める抗体依存性細胞傷害作用により、乳がん領域を中心に奏効率が向上してきた。さらに、がん細胞に対して特異的に傷害性を示す各種の免疫細胞を生体外で増幅してから体内に投与する各種の免疫細胞治療法の技術も年々向上し、がん免疫治療は確実に治療のオプションとなってきている。しかし、何れの治療法もがん制圧には至っていない。この理由は、臨床で認められるがんはすでに免疫系からの攻撃から逃避する能力を備えたがん細胞の集団であるからであろう。それでも 2010 年以降、この厄介ながん細胞の免疫逃避機構を解除する免疫チェックポイント阻害剤や、がん細胞特異的な殺傷能力に優れた遺伝子改変 T 細胞療法等の登場により、がん免疫治療の有効性は確実に高まっている。

2. がん免疫治療は個別化医療

様々なアプローチが試みられているがん免疫治療は、どの手法であっても最終的に腫瘍に対する

免疫応答が適切に活性化できれば QOL の高い延命効果が得られる。ただし、個々人の体内で免疫系との戦いの末に形成されたがん組織の特徴は個別に異なる。がん抗原の種類や免疫細胞の活性化ポテンシャルが個々人で大きく異なるため、治療効果の現れ方も大きく異なるようだ。もし治療前にかん免疫治療の奏効率が高いことが予想される患者さんを治療前診断で見極めることができれば、奏効率は大幅に向上するだろう。また、がん免疫治療が奏効する際も数ヶ月をかけてゆっくりと効果が現れる例がある。これは免疫細胞がかん組織内に集積することで一時的に腫瘍が大きくなってから徐々に退縮していくためと考えられており、免疫治療の開始後の診断は腫瘍サイズのみでは判断が難しいことがある。したがって、免疫治療開始後も腫瘍に対する免疫活性が適切に活性化されていることを簡便にモニタリングできる診断薬があれば、治療指針の選択に大きく役立つであろう。我々の研究グループでは、がん細胞内で異常に発現し、免疫系から異物として認識される「がん抗原タンパク質」に対して、腫瘍免疫応答の結果として抗がん抗原抗体の血中濃度が増加する現象 (Antigen-Spreading) に着目し、抗がん抗原抗体を定量測定する診断薬開発に取り組んでいる(図1)¹⁾。この抗体検査診断薬の開発で問題となるのが、がん抗原の多様性である。まず、がん細胞の種類と細胞内で発現する抗原の種類にあまり相関がない。さらに「がん抗原」と名前は付いていても、所詮はヒトのタンパク質であり、抗原性の強弱は個々人で異なるようだ。また、各抗原のどの部分(エピトープ)が抗原性を示すかの個人差も非常に大きい。従って、Antigen-Spreading の測定には、可能性のあるがん抗原を網羅的に取り揃える必要がある。

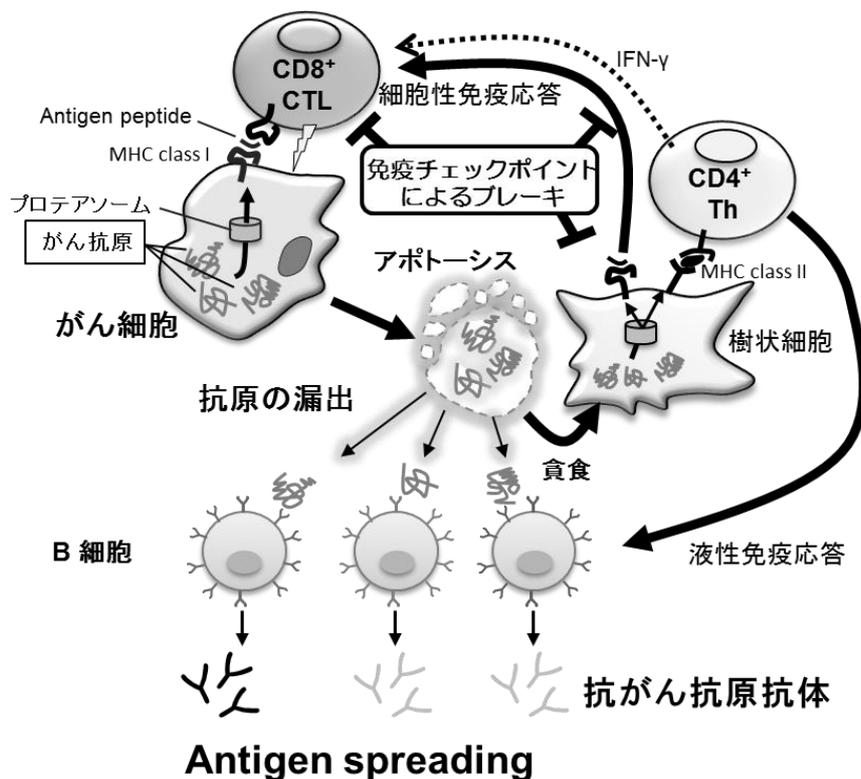


図1: 腫瘍免疫応答の活性化は抗がん抗原抗体の抗体価の上昇を伴う

3. がん抗原の種類と構造的な特徴

これまでの腫瘍免疫学的な研究成果の積み重ねにより、がん細胞と精巣に局限した発現を示す Cancer-Testis 抗原(CT 抗原)²⁾や、Tumor-Associate Antigen (TAA)³⁾と呼ばれるがん抗原が報告されているが、その数は200種類を超える。個々の CT 抗原の詳細な機能は不明なものが多いが、その発現パターンから正常細胞である精原細胞が無限増殖能を獲得するために発現している精巣特異的なタンパク質群と考えられる。正常細胞からがん細胞に変化する原因は多様であるが、この精原細胞でしか発現しないはずのタンパク質(CT 抗原)ががん細胞内で「悪用」されて、がん細胞の無限増殖能の獲得に関与している例もあるようだ。CT 抗原の発現パターンとがん細胞の種類との相関はあまり高くないが、同じ種類のがんでは、悪性度の高さと CT 抗原の発現レベルは相関していることがある⁴⁾。これらの CT 抗原のアミノ酸配列から予測される構造は、大半が単独では立体構造がとれない天然変性領域を含むタンパク質であることが報告されている⁵⁾。この天然変性領域は相互作用分子と結合する際には立体構造を形成することから、無限増殖能の獲得に必要なタンパク質群の複合体形成に関与しているものと推定されている。このような構造的な特徴からも、多くの CT 抗原が組換えタンパク質として発現させると不安定な物性で不溶化してしまう。このタンパク質の物性の悪さが、CT 抗原の研究がなかなか深まらない理由の1つともいえる。

4. がん抗原・CT 抗原の抗原性

肺がんでしばしば発現している CT 抗原の NY-ESO-1(CT6)や XAGE1(CT12)は、抗原性が詳細に解析されている代表的な抗原である。これらの CT 抗原が、がん組織内で発現しているがん患者の約半数には、対応する CT 抗原に対する抗体が血中に存在する^{6,7)}。各 CT 抗原に対する抗体が陽性の患者では、各 CT 抗原に対する CD8⁺T 細胞や CD4⁺T 細胞も存在することから、CT 抗原を中心とした腫瘍免疫応答(図 1)が体内で稼働していることが示唆されている。近年の腫瘍免疫学の理解をここに適用すれば、がん抗原に対する抗体や免疫細胞が検出可能な腫瘍組織内では、がん抗原を目印とした一連の腫瘍免疫応答でがん組織を退縮させるポテンシャルはあるが、腫瘍局所が免疫抑制状態に陥ってがん組織が増大してきたものと想像することができる。ここに免疫チェックポイント阻害剤を用いて免疫抑制状態を解除してやれば、これらの休眠状態におかれた免疫細胞が、再びがん組織を攻撃できる状態が回復できる可能性が考えられる。がん患者の血清中に存在する抗がん抗原抗体は、オーバーラップペプチドを用いたエピトープ解析の結果から、リニアエピトープを認識するポリクローナル抗体であり、そのエピトープ配列は個々人の患者によって大きく異なることが明らかとなっている⁷⁻⁹⁾。従って、抗 CT 抗原抗体の検出に用いる抗原は、全長抗原を使用することが望ましい。

5. 抗がん抗原抗体の上昇と腫瘍免疫応答の活性化との相関

抗 CT 抗原・がん抗原抗体は、個々人の腫瘍免疫応答で鍵となる抗原分子を反映する重要なバイオマーカーである。各種のがん免疫治療により腫瘍免疫応答が活性化すれば、様々ながん抗原に

対する抗体価が上昇してくることになる。近年、これらのがん抗原に対する抗体は、壊死した腫瘍細胞から漏出するがん抗原と免疫複合体を形成し、抗原提示細胞表面の Fc 受容体を介して抗原提示細胞内に取り込まれ、効率的に細胞性免疫を誘導することがわかってきた。すなわち、抗がん抗原抗体は単なるバイオマーカーではなく、腫瘍免疫応答の活性化に関わるブースター役としても重要な役割がある^{10,11)}。もちろん、がんを殺傷する主役の細胞傷害性 T 細胞を活性化するためには、抗がん抗原抗体のみが血中で増加するだけでは腫瘍免疫応答のサイクルは回らない。がん免疫治療の改善には、がん細胞上の MHC クラス I 分子上に提示されているがん抗原ペプチドを認識して特異的な殺傷効果を示す細胞性免疫の誘導も同時に必要である。感染症に対する予防接種と同じで、一般にがん抗原タンパク質をワクチンとして投与した場合は液性免疫の誘導が優位で、抗がん抗原抗体が増加してくる。がんに対する細胞性免疫を誘導して抗腫瘍効果を高めるためには、抗原提示細胞の細胞質内のがん抗原を送達させるクロスプレゼンテーションの強化が重要で、がんワクチンのアジュバント開発における主要課題の1つとなっている¹²⁾。腫瘍局所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併用は、これらの腫瘍免疫応答を活性化するために合理的な戦略と考えられている。いずれにせよ、腫瘍局所で免疫が抑制状態にある状態から、がん抗原を目印とした腫瘍免疫応答の活性化が誘導された状態では、抗がん抗原抗体の濃度が上昇することが期待され、これが重要な診断マーカーとなる。

6. 全長・水溶性がん抗原タンパク質を用いた高感度抗体検査試薬の開発

これまでの話を小括すると、がん抗原は多種多様に存在するものの、どのがん抗原がどのがんで発現するかは個人差がある。エピトープ配列にも個人差があり、さらに全長のがん抗原タンパク質は不安定で凝集しやすい厄介な物性である。しかし、がん患者内の血清中でこのがん抗原に対する抗体価が上昇すると、腫瘍免疫応答の活性化を有意に反映することから治療指針を決定する重要な指針となるので、なんとかして検出・定量評価をしたい。抗原-抗体反応を定量評価する手法は ELISA 法が信頼性の高い一般法として知られている。しかし、ELISA 法は1種類の抗原を 1well に固定化したマイクロプレートを使用するため、多種類の抗原検出には適さない。一方で、多種多様な抗原をメンブレンや基板上にスポットさせたマイクロアレイ等が、少量の血清から多項目を検出する際には適した手段となる。この際、抗原を固定化する基盤を磁気を帯びたマイクロビーズにすると、各ビーズ上でのサスペンション中で抗原-抗体反応が行われ、その後の自動洗浄とフローサイトメトリー方式での正確な統計解析が可能になる。例えば Luminex 社により開発された xMAP テクノロジーを用いると、蛍光色素で塗り分けられた 100 種類のマイクロビーズを同時に測定することができる。この同時多項目アッセイ(Multi-Plex 磁気ビーズ)は優れた S/N 比とダイナミックレンジの広い定量性を兼ね備えており、例えばごく微量の生体サンプル中に含まれる様々なサイトカインを定量評価するために、各サイトカインに対する抗体が固定化された Multi-Plex アレイが市販されている。本システムにはカルボキシル基が表面に修飾された Multi-Plex 磁気ビーズも市販されており、カルボキシル基を活性エステル化させた後に、アミノ基を介してタンパク質を固定化させることが可能である。本手法を用いれば抗がん抗原抗体を網羅的に測定するアッセイ系を構築することが可能である。

全長・水溶性のがん抗原をこのビーズ上に固定化することができれば、全エピトープを含む抗体検出が可能になり、ポリクローナル抗体である各抗がん抗原抗体の抗体価の変動が定量しやすくなる。しかし前述のとおり、大半の CT 抗原は不溶化しやすい問題点がある。我々の研究グループではこれまでに100種類超の全長 CT 抗原の発現系を構築しているが、大腸菌を生産宿主とした場合は85%以上が不溶性のインクルージョンボディを形成することが判明している。ヒト由来のタンパク質を大腸菌で生産させる際の不溶化の問題は、他のタンパク質でも頻発する問題ではあるが、CT 抗原の場合は発現宿主をヒト由来の培養細胞(Hek293細胞やHeLa細胞)にしても同様に細胞内で凝集体を形成することが確認された。これは前述のとおり、CT 抗原が様々な細胞内タンパク質と複合体を形成するハブタンパク質の役割を担っているものが多く、単独では立体構造を形成できない予測からも合理的に説明できる。このような問題点があるものの、CT 抗原には分子内に複数の Cys 残基が存在する。我々は Cys 残基を活用して、SH 基に対して正電荷を導入する S-カチオン化法^{13,14)}を活用して不溶性の CT 抗原に高い水溶性を付与し、全長・水溶性のがん抗原の生産・精製を行っている。

精製された S-カチオン化抗原が、果たしてがん患者の血液中に存在する抗がん抗原抗体に特異的に認識されるがん抗原となるかどうかは、本研究開当初から下記に示す様ないくつかの懸念があった。現時点でこれらの懸念は、ほぼ払拭できる好結果が得られているので列挙してみたい。まず、血液中に存在する抗体は抗原の「立体構造」を認識して結合することが重要なので、変性した S-カチオン化抗原を認識するかどうかという懸念があった。この問題については、CT 抗原の様に大半が不安定な構造の場合は、ほとんどがペプチド配列のみで決まるリニアエピトープを認識する抗体が多いようで、問題とならない様である。実際、NY-ESO-1(CT6)や XAGE1(CT12)といった代表的ながん抗原に対するエピトープ解析は、オーバーラップペプチドを用いて解析されており、これらの解析結果とよく相関した反応性を示していた。次に、Cys 残基に対して化学修飾された正電荷の影響で、非特異的な吸着や抗原性の喪失が起こらないか？という懸念である。これに対しては、ELISA 法で確認する限りは S-カチオン化抗原も還元されたがん抗原も、ほぼ同等の反応性を示していた。また、エピトープ/パラトープ配列内に出現するアミノ酸についての統計解析がされた例では、Cys 残基のみがほとんど出現しないことも示されており、Cys 残基の化学修飾による抗原抗体反応への影響はほとんどないものと推定される。

これらの懸念材料は、最終的には Antigen-Spreading を測定するためにもっと大規模に抗原種を増やし、抗体測定を行う臨床検体のサンプル数を増やさなければ完全に否定することはできない。しかし、何よりも重要なことは、S-カチオン化法を活用することで、取得困難ながん抗原が「全長・水溶性」として高純度精製が可能となったことである。Multi-Plex アッセイビーズに S-カチオン化ビーズを固定化すると、分散性に優れたビーズが長期に安定保存できる利点もある。さらに Multi-Plex アッセイの高感度さは特に秀逸で、抗がん抗原抗体の測定は1,600倍に希釈した血清で十分に測定ができる感度である。例えば10色の Multi-Plex 磁気ビーズに、それぞれの抗原を固定化したビーズを準備し、1,600倍に希釈した血清と反応させる場合を考えてみる。1 μ L の患者由来の血清から1600 μ L の希釈血清が調製されるが、この25 μ L の希釈血清に対し、10種類のがん抗原固定化ビーズを各10³ビーズずつ添加して反応させても、測定(10-Plex assay)できる感度である。これは計算上、

1 μ L の血清から640抗原が測定できることになり、ごく微量の血清さえあれば十分に測定できる感度といえる。

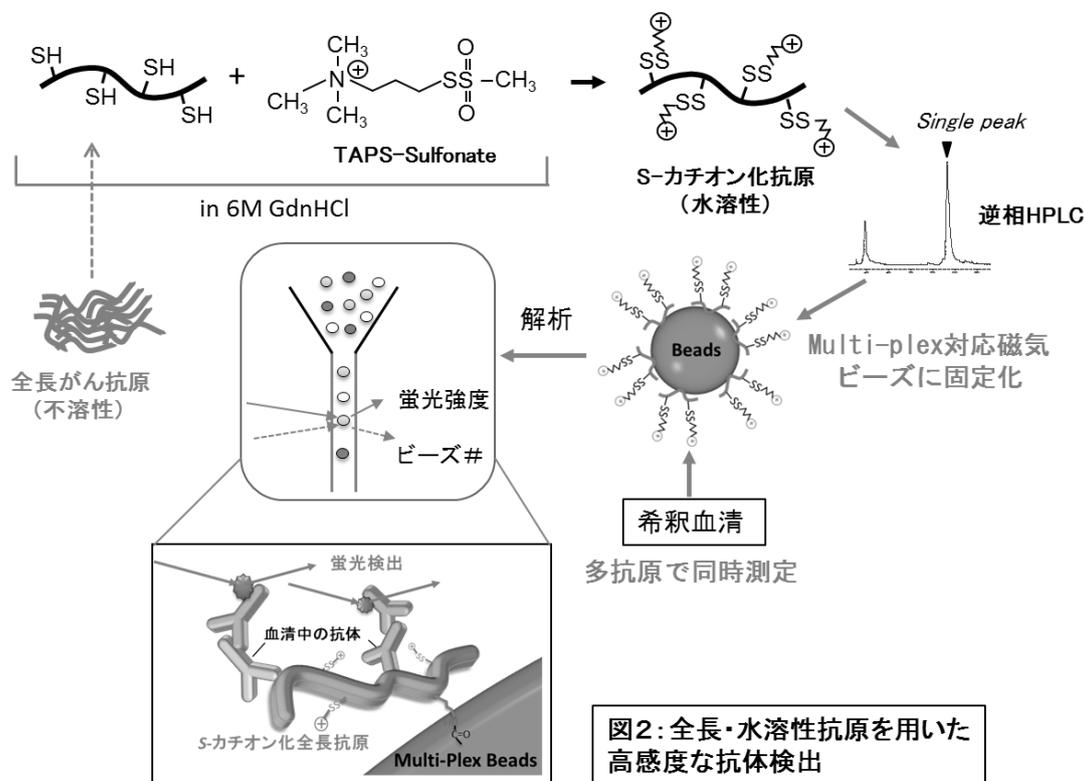


図2: 全長・水溶性抗原を用いた高感度な抗体検出

7. Antigen-Spreading 測定による腫瘍免疫応答の活性化診断の可能性

がん抗原に対する抗体価は、健常人ではほとんど検出されないとされる。我々は現時点で Antigen-Spreading 測定が、各種のがん免疫治療の治療前・治療中の診断に利用できるコンパニオン診断薬になり得るだろうとの期待の下、100種超の全長・水溶性がん抗原・CT 抗原のリソース整備を進めている。診断薬としての Proof of Concept(POC)取得はこれからの課題ではあるが、予備的な診断薬 POC 取得に既に成功している¹⁾。肺がん患者に対して $\gamma\delta$ T 免疫細胞療法を実施した血清を用いて、17種類のがん抗原に対する抗体価を測定した予備実験の結果からは、治療前後で抗体価が10%以上上昇した抗原数が5種類以上あった High responder は、5種類以下であった Low responder に対して有意に治療予後が改善することが確認された。今後は抗原種を100種類程度まで拡張し、様々ながん免疫治療の臨床検体に拡張して評価を実施して、診断薬 POC の取得を進める予定である。また、100種超の全長・水溶性がん抗原・CT 抗原を用いた抗体検査を様々な臨床検体に拡張することで、がん種と各がん抗原抗体の出現頻度の相関も見えてくると、がん検診にも使用できる可能性も見えてくる。腫瘍免疫学的な理解が進み、免疫チェックポイント阻害剤の登場で、腫瘍局所での免疫応答を再構成させる治療手段・創薬研究が進んでいる。個人差が大きい腫瘍免疫応答の活性化レベルが Antigen-Spreading 測定で定量的に評価ができれば、がん免疫治療の信

頼性も向上するであろう。がん免疫治療には様々な挑戦の歴史があり、極めて良好な奏功例も散見されてきた経緯からも、この奇跡を一般化することが人類の長年の夢ともいえる。腫瘍免疫学の最新知見と様々な治療ツールを組み合わせた複合療法による先進医療の臨床研究がこれからのトレンドとなるが、Antigen-Spreading を定量評価するコンパニオン診断薬を組み合わせることで、次世代の医療技術の実現を加速したい。

文献

1. Futami, J. *et al.*, *Bioconjug Chem* 26, 2076 (2015).
2. Almeida, L. G. *et al.*, *Nucleic Acids Res* 37, D816 (2009)
3. Cheever, M. A. *et al.*, *Clin Cancer Res* 15, 5323 (2009).
4. **中山睿一** がん免疫療法メカニズムの解明と臨床への展開:がん免疫 p51,南山堂 (2015)
5. Rajagopalan, K. *et al.* *J Cell Biochem* 112, 3256 (2011)
6. Gnjatic, S. *et al.* *Adv Cancer Res* 95, 1 (2006).
7. Ohue, Y. *et al.* *Int J Cancer* 131, E649 (2012)
8. Kawabata, R *et al.* *Int J Cancer* 120, 2178 (2007)
9. Pedersen, J. W. *et al.* *Br J Cancer* 108, 107 (2013)
10. Gupta, A. *et al.* *Cancer Immun* 13, 3 (2013)
11. DiLillo, D. J., & Ravetch, J. V. *Cell* 161, 1035 (2015)
12. Ikeuchi, N. *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392, 217 (2010)
13. Futami, J. *et al.* *Expert Opinion on Drug Discovery* 2, 261 (2007)
14. 二見淳一郎、*バイオインダストリー* 30(7) p15 (2013)