

[0027]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2012

<https://doi.org/10.15017/26861>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 27, 2013. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :

寄 附 研 究 部 門

悪性腫瘍に対する新規免疫・遺伝子治療薬開発研究部門

Division of Translational Cancer Research

准教授：高橋 淳

Associate Professor : Atsushi Takahashi M.D., Ph. D.

当部門は新規腫瘍促進因子 FEAT の特性を利用し、癌の早期発見と癌予防を目指した橋渡し研究 (translational research) を行っている。

2012 年は、大学院修士課程の学生 1 名が博士課程に進学し、中国人の研究生 1 名が大学院博士課程に入学し、エジプト人の外国人訪問研究員 1 名が 1 年間の留学期間を 2 年間に延長し、2011 年と同様の態勢で研究に従事した。

A. FEAT を分子標的とする癌予防

癌の全ゲノム解析は、癌がゲノム及びエピゲノムレベルで非常に不均一な細胞集団から成ることを明らかにした。近年開発された分子標的治療薬では癌は治癒せず、癌は早期に耐性化して再発する。癌は種々の遺伝子変異とエピゲノムの異常を蓄積した、不均一な細胞の集団であり、既に集団内に分子標的治療薬に抵抗性の癌細胞を含んでいる。バイオマーカーと分子標的の同定を進め、分子標的を絞った個別化医療を目指すことで、果たしてこのような多様で進化する癌の治癒をもたらすことが可能であろうか。

癌が遺伝子変異を蓄積する前の、早期癌あるいは前癌病変の段階で見出すことができれば、分子標的治療薬に抵抗性の細胞が出現する前に治療を開始することで、癌をコントロールできると考えられる。実際、多彩な遺伝子変異を蓄積していない段階の慢性骨髄性白血病 (CML) では、患者の大半で ABL キナーゼ阻害剤が長期間有効で、腫瘍増殖を防ぎ続ける。また、癌化の早期の段階を抑える方法があれば、それ以上の癌化を停止させる癌予防が可能である。人類は難治性のウイルス疾患をワクチンによる予防で克服してきた。治療から予防へのパラダイムシフトにより癌の撲滅を目指したい。

癌の早期発見や癌予防は、大半の癌を網羅することが望まれる。例えば、前立腺癌だけ早期発見のための検査や癌予防をしても、肺癌や大腸癌には無効であり、女性は恩恵を受けられない。例えば、女性で 8 割の癌を早期発見するために、乳癌、大腸癌、胃癌、肺癌、子宮癌、肝癌、膵癌、胆のう癌、卵巣癌、甲状腺癌の 10 項目の検査を一般人口で定期的に行うことは、医療経済学的に現実的でない。多種の癌に対して広く有効な方法が必須であるが、それを可能にする分子標的は見出されていなかった。

我々が標的とする FEAT タンパクが増えている癌は、独立行政法人国立がん研究セン

ターの全国がん罹患モニタリング集計 2007 年罹患数・率報告（平成 24 年 10 月）から試算すると、日本人の癌の約 8 割に及ぶ。しかも、FEAT は早期癌（carcinoma in situ）や前癌病変（肝癌患者の肝硬変病巣）でも増えている。大多数の癌で早期から増えている癌化に働くタンパクが初めて見つかったことから、我々は、臨床応用を目指して、FEAT を標的とした癌のスクリーニングと癌予防が可能であるかを検証すると共に、そのための技術開発を行っている。

a. FEAT ノックアウトマウスの作成

FEAT 分子欠損マウスを作成し、癌予防が可能であることを明らかにし、FEAT 機能を抑制した場合にどのような副作用を生じるかを予測したい。

既に樹立した FEAT+/-マウス胚性幹（ES）細胞の胚盤胞期胚への注入を繰り返した。しかし、2012 年には FEAT+/-ヘテロマウスを一匹も得ることができなかった。FEAT が ES 細胞に発現していることから、胎生期で FEAT の発現が減少することが FEAT+/-マウスの発生を妨げる可能性が示唆された。そこで、コンディショナルノックアウトマウスを作成する方針に切替え、ターゲティングベクターの構築を開始した。

b. FEAT に対する免疫反応の誘導

FEAT が癌精巣抗原であることから、FEAT に対する免疫反応で癌を予防するワクチン作成を目指している。

まず、マウスでの実験により、FEAT の免疫原性と、抗 FEAT 免疫反応の正常組織に対する副作用を調べた。H-2Kb, H-2Db に適合するマウス FEAT ペプチド 2 種類を合成し、アジュバントと共に C57BL/6 マウスの皮下に 2 回接種後、FEAT を発現している B16-F10 メラノーマ細胞を皮下注射した。ペプチドの接種により、腫瘍に炎症反応が誘導され、血管新生が抑制された。一方、肺と肝に軽度の炎症反応および肝 Kupffer 細胞の活性化が検出された。FEAT ペプチドが免疫原性を有することが示唆された。さらに、肺と肝の炎症反応が転移した腫瘍細胞に対する反応であることを検討中である。

並行して、将来の臨床試験を目指し、ヒト細胞障害性 T リンパ球（CTL）を誘導する実験を開始した。HLA-A*2402 に適合するヒト FEAT ペプチド 2 種類を合成し、HLA-A*2402 のヒト末梢血単核球から樹状細胞を培養し、FEAT ペプチドをパルスしてから成熟させた。その樹状細胞上で同じドナーのヒト末梢血単核球を培養して CTL を誘導した。HLA-A*2402 陽性で MHC クラス I 陽性の PC9 肺腺癌細胞と TE8 食道癌細胞に対する、CTL の細胞傷害活性を調べた。

c. FEAT 相互作用タンパクの同定

FEAT はメチル転移酵素の構造を有する。化合物ライブラリーをスクリーニングして FEAT 阻害剤を見出すために、酵素反応のアッセイ系を確立する。まず、FEAT と相互作用するタンパクの中から基質を見出す。FLAG-HA-FEAT タンパクを安定発現した HeLa 細胞から、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体によるタンデムアフィニティー精製を行い、マスマスペクトロメトリーで共免疫沈降したタンパクを同定した。この中から有望な 12 種類のタンパクをコードする cDNA をクローニングし、共免疫沈降法、Duolink キット、GST 融合タンパク質を用いたプルダウンアッセイにより、FEAT との相互作用を確認した。

d. 血中 FEAT タンパク測定系の開発

九州大学病院・先端分子細胞治療科において行われた臨床試験で、悪性腫瘍患者および健常ドナーより採取し凍結保存した血漿を二次利用する「血中 FEAT タンパク測定による癌診断法の開発」が、九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会により審査を受け、承認された。

ウェスタンブロットティングにより、癌患者の血漿に FEAT タンパクが存在することがわかった。FEAT は癌組織から血液中に流入すると考えられる。FEAT は早期癌や前癌病変でも増加しているため、癌の早期発見に有用な血液検査が可能となると考えられた。そこで、血液中の FEAT タンパクを高感度で測定するために、固相酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）によるアッセイ系を確立する。MBL 社によって作成された抗ヒト FEAT マウスモノクローナル抗体及び我々が作成した抗ヒト FEAT ウサギポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ法により、血漿中の FEAT タンパク濃度の測定系を確立し、健常人と癌患者の血漿を比較し、FEAT の濃度差を検知できるように測定条件を最適化する。

B. FEAT の正常組織、正常細胞での機能

a. FEAT ノックアウト ES 細胞の作成

ウェスタンブロットティングにより FEAT がマウス ES 細胞に発現していることを見出した。ES 細胞での FEAT の機能を明らかにするために、ノックアウト ES 細胞を作成した。FEAT^{+/+}-マウス ES 細胞を高濃度の G418 で薬剤選択し、PCR とサザンブロットティングで確認し、FEAT^{-/-}-ノックアウト ES 細胞を 4 クローン得た。アルカリフォスファター

ゼ (AP) 染色, 免疫蛍光染色による Oct4, SSEA1, Nanog の発現により, 多能性が維持されていることを確認した. ES 細胞より RNA を分離し, 発現マイクロアレイで FEAT 欠失の影響を調べた. 胚様体 (embryoid body, EB) に分化させ, RT-PCR で nestin, Brachyury, GATA-4 の発現を解析し, 3 胚葉への分化を調べた. さらに神経などへ分化誘導して, FEAT 発現の変化や FEAT 欠失の影響を明らかにする予定である.

b. FEAT の精巣での発現と機能

免疫組織染色により, ヒト及びマウスのライディッヒ細胞に FEAT が発現していることを明らかにした. ウェスタンブロッティングおよび免疫蛍光染色により, MA-10, I-10 マウスライディッヒ細胞株での FEAT の発現を確認した. さらに, 九州大学分子生命科学系部門性差生物学講座の諸橋憲一郎教授, 嶋雄一助教との共同研究で, 胎仔ライディッヒ細胞での FEAT の発現を調べた. 今後, FEAT が精巣に局限して発現する機序及び FEAT のライディッヒ細胞での機能を調べる予定である.

c. FEAT 発現の制御機構

FEAT の発現調節機構を明らかにするために, ヒトの FEAT 遺伝子のプロモーター領域を解析した. 全長あるいは欠失を導入したプロモーターで駆動されるルシフェラーゼプラスミドを構築し, HeLa 細胞にトランスフェクションし, ルシフェラーゼによる発光を調べた. プロモーター活性を制御する領域が少なくとも 2 ヶ所あり, 部位特異的変異を導入して確認した. さらに, 転写因子の cDNA をクローニングし, 今後, 共発現や RNA 干渉のプロモーター活性への影響を調べる. 他の調節機構の有無も今後検討したい.

業績目録

原著論文

1. S. Miyamoto, H. Inoue, T. Nakamura, M. Yamada, C. Sakamoto, Y. Urata, T. Okazaki, T. Marumoto, A. Takahashi, K. Takayama, Y. Nakanishi, H. Shimizu, K. Tani. 2012.
Coxsackievirus B3 Is an Oncolytic Virus with Immunostimulatory Properties That Is Active against Lung Adenocarcinoma.
Cancer Res. 72: 2609-2621.
2. 土方康基, 村橋(伊賀)睦了, 岡崎利彦, 田中芳浩, 大平公亮, 岡野慎士, 久野晃聖, 高橋 淳, 丸本朋稔, 井上博之, 谷 憲三朗. 2012.

固形腫瘍に対する新規免疫療法の開発—当科における第 I 相臨床研究の現状—
臨床血液. 53: 487-492.

学会発表

1. S. Miyamoto, H. Inoue, B. Wang, K. Yasunari, T. Nakamura, M. Yamada, Y. Urata, T. Marumoto, A. Takahashi, K. Takayama, Y. Nakanishi, H. Shimizu, K. Tani (2012, 4/3).
Coxsackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma.
The 103th American Association of Cancer Research Annual Meeting, Chicago, USA.
2. S. Yamaguchi, T. Marumoto, T. Nii, H. Kawano, J. Liao, Y. Nagai, M. Okada, A. Takahashi, H. Inoue, E. Sasaki, S. Okano, Y. Miura, K. Tani (2012, 6/13-16).
Characterization of dysgerminoma like tumors arose in the process of generating common marmoset induced pluripotent stem cells.
International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, Yokohama.
3. J. Liao, T. Marumoto, S. Yamaguchi, S. Okano, N. Takeda, C. Sakamoto, H. Kawano, T. Nii, Y. Nagai, M. Okada, Y. Miura, S. Shimoda, H. Inoue, A. Takahashi, M. Tanaka, K. Nagatoshi, K. Yamamura, K. Kawahara, A. Suzuki, K. Tani (2012, 6/13-16).
Efficient generation of induced pluripotent stem cells by the use of Pten inhibitor.
International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, Yokohama.
4. S. Yamaguchi, T. Marumoto, T. Nii, H. Kawano, J. Liao, Y. Nagai, M. Okada, A. Takahashi, H. Inoue, E. Sasaki, S. Okano, Y. Miura, K. Tani (2012, 6/28-29).
Characterization of common marmoset dysgerminoma-like tumors generated by the transduction of reprogramming factors.
第 18 回日本遺伝子治療学会年次学術集会, 熊本.
5. J. Liao, T. Marumoto, S. Yamaguchi, S. Okano, N. Takeda, C. Sakamoto, H. Kawano, T. Nii, Y. Nagai, M. Okada, Y. Miura, S. Shimoda, H. Inoue, A. Takahashi, M. Tanaka, K. Nagatoshi, K. Yamamura, K. Kawahara, A. Suzuki, K. Tani (2012, 6/28-29).
Highly efficient generation of induced pluripotent stem cells by the inhibition of Pten tumor suppressor.
第 18 回日本遺伝子治療学会年次学術集会, 熊本.
6. K. Kobayashi, Y. Li, K. Kawahara, A. Suzuki, K. Tani, A. Takahashi (2012, 7/15-20).
Characterization of FEAT functions in vivo.
Gordon Research Conference on Cell Death, Lucca (Barga), Italy.

7. K. Kobayashi, K. Kawahara, A. Suzuki, K. Tani, A. Takahashi (2012, 9/20).
個体における FEAT 機能の解析. Characterization of FEAT functions in vivo.
第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌.
8. 土方康基, 岡崎利彦, 村橋睦了, 田中芳浩, 大平公亮, 小林慎一, 高橋 淳, 丸本朋稔, 井上博之, 吉田浩二, 角田卓也, 谷 憲三朗 (2012, 10/25).
進行固形腫瘍患者に対する化学療法併用新規免疫細胞療法臨床研究.
第 50 回日本癌治療学会学術集会, 横浜.

