

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	北 里 大 学	研究所名等	北里大学メディカルセンター	
研 究 課 題	早期がん/前がん抗原を利用したがん診断/予防戦略 -KK-LC-1を標的とした前がん診断/がん予防ワクチ ンの検証-		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 腫瘍抗原 ②治療 ③診断 ④予防			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
福 山 隆	北里大学メディカルセンター	上級研究員	研究全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 岡 有 紀 子	医 学 部	講 師	動物実験
細 田 桂	医 学 部	准 教 授	臨床検体回収
長 塩 亮	医 療 衛 生 学 部	教 授	血中診断開発
小 寺 義 男	理 学 部	教 授	タンパク質解析
小 泉 和 三 郎	医 学 部	名 誉 教 授	免疫組織化学染色
山 崎 等	北里大学メディカルセンター	非 常 勤 医 師	抗体の評価
高 橋 禎 人	医 学 部	診 療 准 教 授	臨床検体回収
草 野 央	医 学 部	教 授	臨床検体回収

早期がん/前がん抗原を利用したがん診断/予防戦略 —KK-LC-1 を標的とした前がん診断/がん予防ワクチンの検証—

1. 研究の目的

＜KK-LC-1 を対象とした治療・診断・予防方法の構築＞

Kita-kyushu lung cancer antigen-1 (KK-LC-1)は癌/精巣抗原(CTA)が有する特性の他に、膜抗原かつ前がんから発現しているという特性を備えている。すなわち、KK-LC-1 を標的としたがんワクチンおよび抗体医薬を治療/予防に適用し、がんに対する治癒率、さらには発症率を低下させることが我々の目的である。特に本研究では、KK-LC-1 のユニークな特徴である前がんでの発現に焦点を当てた診断/予防方法を開発することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) がん予防ワクチン効果の証明

- ① KK-LC-1の機能解析のため、我々は未同定であったマウスKk-1c-1を同定した。当該年度は、マウスKk-1c-1の機能解析を行うためノックアウトマウスを作製し、当該分子の機能を明らかにし、ワクチン接種の際の影響を考察する。
- ② BALB/cAJc1マウス(正常マウス)に対して、KK-LC-1ペプチドを免疫する。免疫後の脾臓からリンパ球を回収し、BALB/cAJc1-nu/nu (ヌードマウス)へ静脈投与する。リンパ球移植ヌードマウスに対して腫瘍細胞株を移植し、抗腫瘍効果を観察する。

(2) 発がん予測検証

- ① 独自開発のモノクローナル抗体Kmb34B3を用いた免疫沈降法により培養上清中のKK-LC-1ペプチドを濃縮し、LC-MS/MSによるペプチドのアミノ酸配列を同定する。
- ② 同定された7kDa KK-LC-1ペプチドの組換えタンパク質を標準抗原として、ELISAを構築する。構築できなかった場合、7kDa KK-LC-1に標識酵素付加し、競合法によるKK-LC-1ペプチドの検出を試みる。
- ③ 健常人、萎縮性胃炎患者、胃がん患者の血清および可能な範囲で胃組織を回収し、KK-LC-1の発現について解析する。

3. 研究の成果

(1) がん予防ワクチン効果の証明

- ① 当該年度は、今まで未同定であったマウス(m)Kk-1c-1について、ヒト(hu)KK-LC-1抗体の交差反応を契機に、遺伝子座から *mKk-1c-1* を推定し、当該遺伝子が2つの exon から構成されており、精巣のみに発現を認め、2つの α -helix を有する立体構造であるという huKK-LC-1 との相同性を見出した(図1)。CRISPR/Cas9により作製した *mKk-1c-1* 欠損個体の解析では、mKk-1c-1 が精子の運動能、透明体への浸潤に関与しており、huKK-LC-1 の腫瘍細胞における遊走能・浸潤能に類似していることを明らかにした(図2)。本成果によって、mKk-1c-1 の遺伝子座に huKK-LC-1 を置換した huKK-LC-1 マウスを次年度に作製できる。当該マウスを用いて huKK-LC-1 の予防ワクチンによる薬効、薬物動態、毒性を目指す。



図1 マウス-ヒト間の KK-LC-1 の相同性

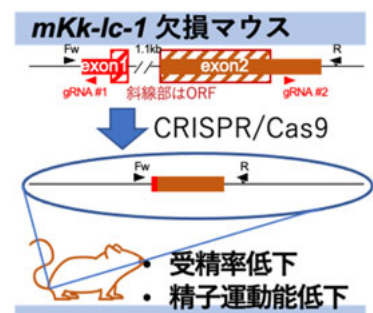


図2 mKk-1c-1 の機能解析

② huKK-LC-1とmKk-1c-1のアミノ酸相同性が20%程度であることから、マウス個体にとってhuKK-LC-1は外来性抗原としての特性が強いため、生体内に存在するタンパク質に対する免疫応答とは異なる免疫応答プロファイルを呈することが想定された。よって、mKk-1c-1 KOマウスにhuKK-LC-1をKnock inしたhuKK-LC-1を自己抗原として保有するマウスを作製し、当該個体におけるhuKK-LC-1のワクチンによる免疫応答を解析する計画に変更した。

(2) 発がん予測検証

① 我々が独自に作製した抗体(Kmab)では、91-113aaをエピトープとする抗体群は7kDのKK-LC-1分泌ペプチドと反応するが、41-65aaをエピトープとする抗体群は反応しないことがわかった。さらに、適用可能なKmab同士のエピトープが近接しているためサンドイッチELISAが困難であることもわかり、61-80aaを認識するKmabの取得が課題として挙げられた。(図3)。

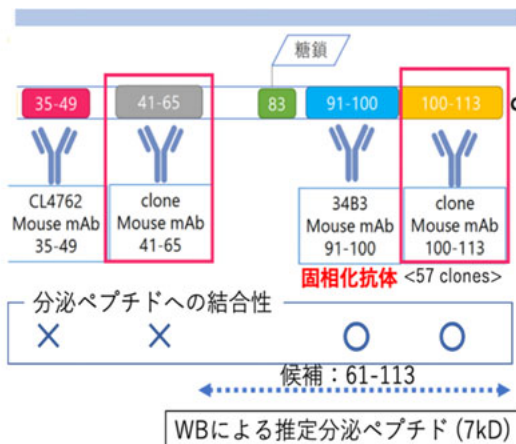


図3 Kmabの結合と分泌ペプチドの推定

② 細胞株培養上清中のKK-LC-1ペプチドについて、LC-MS/MSの解析では検出感度の限界以下の量であり、KK-LC-1のアミノ酸配列の検出ができなかった。

③ 臨床検体として、前年度の胃がん、乳がん患者血清に加え、胃がんではないがそのリスクが一般より高いとされる萎縮性胃炎(Gastric atrophy, GA)患者32例の血清を確保した。GA患者の胃生検ではKK-LC-1の遺伝子発現は13.5%と胃癌患者の非腫瘍胃の76.6%より有意に低く、さらに、KK-LC-1陽性GAの5年累積発癌率は65%(KK-LC-1陰性では2%)と胃癌のリスク因子であるHelicobacter pylori感染の14%よりも高精度に胃癌の予測が可能であることがわかり、当該技術の特許として出願した(図4, 特願2022-140097)。なお、申請者は当該技術の保険収載を目指しており、本研究成果についてはPMDAおよびAMEDの双方から高い評価を得たいっぼう、胃癌発症数の追加した解析の要望が挙げられた。そこで、症例数の追加と観察期間延長を次年度の計画として実施する。

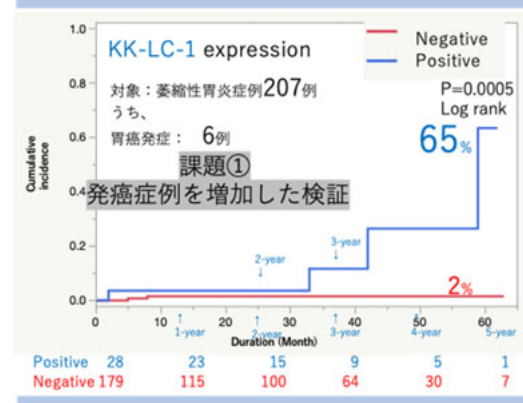


図4 KK-LC-1の発癌予測マーカーの証明

4. 研究の反省・考察

(1) がん予防ワクチン効果の証明

① mKk-1c-1 KOマウスの精子の表現型プロファイルからmKk-1c-1が運動能、浸潤能に関与していることが推察され、がん細胞におけるhuKK-LC-1の機能と類似していた。双方の発現プロファイルも鑑みると、本研究対象となった遺伝子がKK-LC-1のマウスhomologueである可能性が示唆された。

② huKK-LC-1とmKk-1c-1の低い相同性から自己抗原に対する免疫応答とは異なる結果が得られることが想定されたため、mKk-1c-1遺伝子をhuKK-LC-1遺伝子に置き換える計画に変更した。

(2) 発がん予測検証

① サンドイッチELISAに供する新たなKmabの作出が必要であることが明らかとなった。現在新たなKmab 64クローンを作成したため、それらを用いたサンドイッチELISAの構築を試みる。

② 分泌KK-LC-1ペプチドのLC-MS/MSによる検出が難しいことがわかった。今後は大量の培養上清を用い、かつ、Kmabもしくは、糖鎖に反応するレクチンを用いた濃縮を行い、再度LC-MS/MSに供する。

③ KK-LC-1の測定によって将来の胃がんの発症を予知できることを証明した。今後は、症例

数の増加による、データの確からしさを証明する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Yasuoka Y, Izumi Y, Fukuyama T, Omiya H, Pham TD, Inoue H, Oshima T, Yamazaki T, Uematsu T, Kobayashi N, Shimada Y, Nagaba Y, Yamashita T, Mukoyama M, Sato Y, Wall SM, Sands JM, Takahashi N, Kawahara K, Nonoguchi H. Effects of Roxadustat on Erythropoietin Production in the Rat Body. *Molecules* 2022; 27(3): 5399 [PMID: 35164384 PMID: PMC8838165 DOI: 10.3390/molecules27031119]
- ②Otsuka T, Fukuyama T, Futawatari N, Tahara K, Watanabe M, Ichiki Y, Soeno T, Takahashi Y, Yamazaki H, Fujimori Y, Ohshiro T, Kobayashi N, Kida M, Koizumi W, Kusano C. Detection of Kita-Kyushu Lung Cancer Antigen-1, a Cancer/Testis Antigen, in the Stomach Close to a Cancerous Condition. *Journal of Cancer* 2022; 13(14): 3526-3532 [DOI: 10.7150/jca.67534]
- ③Ichiki Y, Fukuyama T, Ueno M, Kanasaki Y, Goto H, Takahashi M, Mikami S, Kobayashi N, Nakanishi K, Hayashi S, Ishida T. Immune profile analysis of peripheral blood and tumors of lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Translational Lung Cancer Research* 2022; 11(11): 2192-2207 [DOI: 10.21037/tlcr-22-421]

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし